

Avaliação do crescimento micelial *in vitro* de *Fusarium spp.* sob ação de diferentes agentes biológicos isolados e associados

Evaluation of *in vitro* micelial growth of *Fusarium spp.* under action of different isolated and associated biological agents

RESUMO

A podridão vermelha da raiz da soja, causada por *Fusarium spp.*, é uma das doenças que tem apresentado crescente aumento em área e severidade na soja no Brasil, devido à sua dificuldade de controle. O objetivo deste trabalho é avaliar o crescimento micelial *in vitro* de *Fusarium tucumaniae* (CMES 25), *Fusarium crassistipitatum* (CMES 24), sob efeito de agentes de controle biológico. Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados como controladores biológicos: *Bacillus subtilis*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasilense* – Cepas AbV5 e AbV6 e *Trichoderma harzianum*, bem como a combinação dos mesmos. Os fungos foram fornecidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa soja – Londrina-PR), com identificação molecular. Após inoculados nas Placas de Petri o antagonista e o fungo, avaliou-se diariamente o experimento até que em uma repetição, o patógeno coloniza-se toda a placa. Tendo como base os resultados obtidos, é possível inferir, que para estes patógenos os tratamentos à base de *T. harzianum*, reduzem o crescimento micelial e diferem estatisticamente dos demais, entretanto os demais tratamentos utilizados também apresentam redução do crescimento micelial, diferindo estatisticamente da testemunha na maioria dos casos.

PALAVRAS-CHAVE: Controle biológico. Fungo habitante de solo. *Fusarium tucumaniae*. *Fusarium crassistipitatum*

Renan Quisini

renanquisini@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Jean Carlo Possenti

jpossenti@utfpr.edu.br Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Marcieli da Silva

marcielidasilva@hotmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Illana Niqueleli Talino dos Santos

ilananiqueleitdossantos@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Sérgio Miguel Mazaró

mazarosergio@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Thayllane de Campos Siega

thayllanedecampos@hotmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



ABSTRACT

Red rot of soybean root, caused by *Fusarium spp.*, is one of the diseases that has been increasing in area and severity in soybean in Brazil, due to its difficulty to control. The objective of this work is to evaluate *in vitro* mycelial growth of *Fusarium tucumaniae* (cmes 25), *Fusarium crassistipitatum* (cmes 24), under the effect of biological control agents. For the development of this work, were used as biological controllers: *Bacillus*

subtilis, *Bradyrhizobium japonicum*, *Azospirillum brasiliense* - strains abv5 and abv6 and *Trichoderma harzianum*, as well as their combination. The fungi were supplied by the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA soybean - Londrina-PR), with molecular identification. After inoculating the antagonist and the fungus in the Petri Dishes, the experiment was evaluated daily until in a repeat, the pathogen colonizes the whole plate. Based on the results obtained, it can be inferred that for these pathogens *T. harzianum* based treatments reduce mycelial growth and differ statistically from the others, however the other treatments used also present reduction of mycelial growth, differing statistically from the control in most cases.

KEYWORDS: Biological control. Fungus inhabitant of soil. *Fusarium tucumaniae*. *Fusarium crassitipitatum*

INTRODUÇÃO

A podridão vermelha da raiz da soja (PVR), causada por *Fusarium* spp., é uma das doenças que tem apresentado crescente aumento em área e severidade na soja no Brasil, devido à sua dificuldade de controle. Fato devido à sua dificuldade de controle. Essa doença era tradicionalmente associada ao fungo *Fusarium* (Mart.) Sacc. f. sp. *glycines* K. W. Roy (FRANCO, 2009). Entretanto, Aoki et al. (2003), determinaram que, na América do Sul, ela é causada pela espécie *F. tucumaniae*.

No Brasil, segundo Guizeline et al. (2014), três espécies do Complexo *Fusarium solani* estão associadas à PVR: *F. brasiliense*, *F. crassitipitatum* e *F. tucumaniae*. Desse modo o objetivo desse trabalho foi avaliar o crescimento micelial de *F. crassitipitatum* e *F. tucumaniae* *in vitro*, quando desafiados por agentes de controle biológico associados, bem como isolados.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados produtos comerciais biológicos a base de *Bacillus subtilis* (Serenade®); *Bradyrhizobium japonicum* – Semia 5079 e 5080 (Atmo®)- dois isolados; *Azospirillum brasiliense* – Cepas AbV5 e AbV6 (AzzoFix®) dois isolados e *Trichoderma harzianum* (Ecotrich®) e também a combinação dos mesmos, respeitando a dose comercial recomendada pelo fabricante, em todos os tratamentos.

Os fungos *Fusarium tucumaniae* (CMES 25), *Fusarium crassitipitatum* (CMES 24) foram fornecidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa soja – Londrina-PR) com identificação molecular.

O experimento foi realizado no Laboratório de Fitossanidade da Universidade Tecnológica Federal do Paraná em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Para o estudo, cada repetição recebeu 15 µL do produto biológico, sendo que quando usados em associação os dois produtos foram

colocados em quantidades iguais em recipientes esterilizados e misturados até homogeneizarem e desta mistura foram retirados 15 µL. A testemunha recebeu somente o patógeno.

Foi adicionado 15 µL de cada produto em placas de Placas de Petri (90 mm) contendo 20 mL de meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar). Paralelamente a cada produto 5 cm distante, foi fixado um disco com 1 cm de diâmetro da colônia do fungo.

Sob o disco do fungo (*F. tucumaniae* e *F. crassistipitatum*), foram demarcadas duas linhas, uma em direção ao ponto que recebeu o agente biológico e outra perpendicular à esta. As mesmas foram utilizadas como referências para medições diárias do crescimento da colônia em direção ao tratamento e lateralmente.

As placas foram mantidas em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 12 horas e temperatura constante de 25 °C±2. As medições foram efetuadas diariamente para verificar o índice de crescimento diário do fungo, até que o patógeno em algum tratamento atingisse as extremidades da placa.

Os dados foram tabulados e submetidos ao Teste de Normalidade de Lilliefors. Confirmados os pressupostos dos modelos estatísticos, estes foram submetidos à ANOVA pelo teste de análise de variância (p=0,05). Como apresentaram significância foram submetidos ao teste de Scott-Knott (p=0,05), com auxílio do software Genes® (CRUZ, 2016).

REUSLTADOS E DISCUSSÃO

A variável crescimento micelial mostrou-se significativa, quando analisada, para os fungos *F. tucumaniae* e *F. crassistipitatum* (Tabela 1).

Tabela 1 - Graus de liberdade e quadrados médios da análise de variância das variáveis dias para *F. tucumaniae*, *F. crassistipitatum*, em experimentos conduzidos em DIC. Dois Vizinhos, 2019.

Fontes de variação	GL	<i>F. tucumaniae</i>		<i>F. crassistipitatum</i>	
		Cinco dias	Dez dias	Cinco dias	Dez dias
Tratamentos	10	0,3624*	6,2780*	1,2345*	5,6981*
Erro	33	0,1250	0,2327	0,0648	0,0502
Total	43	-	-	-	-
Média geral	-	4,15	5,80	5,28	5,99
CV (%)	-	8,51	8,32	4,82	3,74

* Significativo em nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F.

Fonte: Autoria própria, 2019.

Para o *F. tucumaniae* com cinco dias de análise, o tratamento que manteve o menor crescimento micelial do patógeno foi o *T. harzianum*, que não diferiu estatisticamente dos tratamentos Testemunha, *B. subtilis*, *T. harzianum* + *B. subtilis*, *T. harzianum* + *A. brasiliense* e *T. harzianum* + *B. japonicum*. Para este mesmo fungo aos dez dias de análise o *T. harzianum* continuou a ter o maior

controle sobre o patógeno diferindo estatisticamente da Testemunha, *A. brasiliense* e *B. japonicum* (Tabela 2).

Para o *F. crassistipitatum* com cinco e dez dias de análise, o tratamento que manteve o menor crescimento micelial do patógeno foi o *T. harzianum* que não diferiu estatisticamente de *T. harzianum* + *A. brasiliense* e *T. harzianum* + *B. japonicum* (Tabela 2).

Louzada (2009), afirma que 50 de 230 exemplares de *Trichoderma spp.* coletados na natureza inibem o desenvolvimento de *Fusarium spp.* Para PANDOLFO et al., 2007 e HILGEMBERG et al. 2007, a maioria dos relatos encontrados aponta *Trichoderma spp.* como um dos mais promissores agentes no controle biológico de fungos.

Tabela 2 - Comparação de médias das variáveis cinco e dez dias de crescimento micelial para os fungos *F. tucumaniae* e *F. crassistipitatum* em experimentos conduzidos em DIC. Dois Vizinhos, 2019.

Tratamentos	<i>F. tucumaniae</i>		<i>F. crassistipitatum</i>	
	Cinco dias	Dez dias	Cinco dias	Dez dias
Testemunha	3,93 b	7,18 a	5,53 a	7,40 a
<i>T. harzianum</i>	3,80 b	4,23 d	4,43 c	4,43 d
<i>B. subtilis</i>	4,20 b	5,93 b	5,70 a	5,98 b
<i>A. brasiliense</i>	4,43 a	7,48 a	5,18 b	7,50 a
<i>B. japonicum</i>	4,60 a	7,43 a	5,73 a	7,58 a
<i>T. harzianum</i> + <i>B. subtilis</i>	4,00 b	4,85 d	5,45 b	5,48 c
<i>T. harzianum</i> + <i>A. brasiliense</i>	3,83 b	4,30 d	4,45 c	4,45 d
<i>T. harzianum</i> + <i>B. japonicum</i>	4,13 b	4,33 d	4,50 c	4,50 d
<i>B. subtilis</i> + <i>A. brasiliense</i>	4,63 a	6,18 b	5,65 a	6,23 b
<i>B. subtilis</i> + <i>B. japonicum</i>	4,30 a	6,38 b	5,80 a	6,30 b

*Dados não seguidos por mesma letra, na coluna, diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Autoria própria, 2019.

Para Bomfim et al. (2010), a ação fungistática de *Trichoderma spp.* sob outros fungos está ligada ao fato deste, produzir enzimas que podem degradar as paredes celulares de outros fungos, aliados a ação tóxica de metabólitos provenientes do metabolismo deste, modulando o crescimento e a esporulação do patógeno.

O descrito por Louzada et al, bem como Bomfim et al, possivelmente estão ligados aos resultados obtidos.

Para Amorim(2003), o controle fungos fitopatogênicos, redução, alteração e substituição do uso de insumos agrícolas podem ser auxiliados pelo uso de agentes biológicos. Estes apresentam ampla adaptação e diversidade na natureza. Estudos mostram que bactérias do gênero *Bacillus*, possuem potencial para serem

utilizadas nesta finalidade. Fato que é constatado neste experimento, pois diferem-se estatisticamente da testemunha.

CONCLUSÃO

Para ambos os patógenos, todos os tratamentos com *T. harzianum* apresentam reduções significativas no crescimento micelial, entretanto

Ainda são necessários testes em campo com estes patógenos e os respectivos tratamentos para verificar se os comportamentos obtidos in vitro se repetem

REFERÊNCIAS

- AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes ambientais. Revista Brasileira de Epidemiologia, São Paulo, v.6, n.2, p.158-170, 2003.
- AOKI, T.; O'DONNELL, K.; HOMMA, Y.; LATTANZI, A.R. 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**, Bronx, v.95, p.660-684, 2003.
- BOMFIM, M.P., SÃO JOSÉ, A.R., REBOUÇAS, T.N.H., ALMEIDA, S.S., SOUZA, I.V.B. & DIAS, N.O. (2010). Avaliação antagonística in vitro e in vivo de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. Summa Phytopathologica, 36(1), 61-67. doi: 10.1590/S010054052010000100011.
- CRUZ, C.D. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. Acta Scientiarum. v.38, n.4, p.547-552, 2016.
- FRANCO, H.B.J.; CENTURION, M.A.P.C.; BARBOSA, J.C. (2009). Estudo de métodos de inoculação para a avaliação de cultivares de soja a *Fusarium tucumaniae*. Summa phytopathol. vol.35 no.1 Botucatu Jan./Feb. 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-5405200900010005. Acesso em 18/08/2019.
- HILGEMBERG, P.; DALLA PRIA, M.; DUDA, L.; SANDINI, F.; KAMIKOGA, A.T.M. Antagonismo de *Trichoderma* spp. e *Publ. UEPG Exact Earth Sci., Agr. Sci. Eng., Ponta Grossa*, 13 (3): 31-36, dez. 2007 *Trichotecium roseum* a fungos de solo. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.32, p.121, 2007.
- GUIZELINE, J.; SEIXAS, C. D. S.; DIANESE, A. de C.; ALMEIDA, A. M. R.; ARIAS, C. A. A.; OLIVEIRA, M. F. de; LOPES, E. F. (2014), Interação diferencial de genótipos de soja em espécies do complexo *Fusarium solani* causadoras da podridão vermelha

da raiz. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1010931/interacao-diferencial-de-genotipos-de-soja-em-especies-do-complexo-fusarium-solani-causadoras-da-podridao-vermelha-da-raiz>. Acesso em: 19/08/2019.

LOUZADA, G.A.S.; CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; JÚNIOR, M.L.; MARTINS, I.; BRAÚNA, L.M. (2009). Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. *Biota Neotrop.* vol.9 no.3 Campinas July/Sept. 2009. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1676-06032009000300014&script=sci_arttext&tlng=pt. Acesso em: 19/08/2019.

PANDOLFO, J.D.; MATSUMURA, A.T.S.; PORTO, M.D.M. Efeito antagônico de *Trichoderma* sp. e de fungicidas, in vitro, sobre o desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.32, p.260, 2007.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à EMBRAPA-SOJA Londrina-PR, por fornecerem os patógenos para o desenvolvimento deste trabalho, bem como a Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelo espaço disponibilizado.