



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ
CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PAULA FERNANDA DE AZEVEDO

BIOCONTROLE *IN VITRO* DE *Fusarium solani* ISOLADO DE MANDIOCA

BANDEIRANTES, PR, BRASIL
2017

PAULA FERNANDA DE AZEVEDO

BIOCONTROLE *IN VITRO* DE *Fusarium solani* ISOLADO DE MANDIOCA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Agronomia, da Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel.

Orientador: Prof. Dr. Leopoldo Sussumu Matsumoto.

Coorientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Azevedo Marques Lescano.

BANDEIRANTES, PR, BRASIL
2017

**Ficha catalográfica elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UENP**

A994b Azevedo, Paula Fernanda de
BIOCONTROLE *in vitro* DE *Fusarium solani* ISOLADO
DE MANDIOCA / Paula Fernanda de Azevedo; orientador
Leopoldo Sussumu Matsumoto/ co-orientador Luis
Eduardo Azevedo Marques Lescano. - Bandeirantes,
2017

77 p.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) -
Universidade Estadual do Norte do Paraná, Centro de
Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, 2017.

1. Controle Biológico. 2. Fusariose. 3. Adubo
biológico. 4. Bactérias cavernícolas. 5.
Trichoderma harzianum. I. Matsumoto, Leopoldo
Sussumu, orientador. II. Luis Eduardo Azevedo
Marques Lescano, co-orient. III. Título

CA110.2.1.1.5

PAULA FERNANDA DE AZEVEDO

BIOCONTROLE *IN VITRO* DE *Fusarium solani* ISOLADO DE MANDIOCA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Agronomia, da Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel.

Aprovada em: / /

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Leopoldo Sussumu Matsumoto	UENP
Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior	UEL
Prof. ^a Dr. ^a Christiane Luciana da Costa	UENP
Prof. Dr. Odair Alberton	UNIPAR
Prof. Dr. João Pereira Torres	UENP

Prof. Dr. Leopoldo Sussumu Matsumoto
Orientador
Universidade Estadual do Norte do Paraná,
Campus Luiz Meneghel

DEDICATÓRIA

A Deus, por ser tão milagroso e nos sustentar diariamente. A minha família, pelo suporte e por sempre acreditar no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades e bênçãos que Ele tem proporcionado à mim e à minha família. Por toda força, sabedoria, conhecimento e luz, principalmente nos momentos de dificuldades.

Aos meus pais Mauro e Mariana Azevedo, pela educação e exemplos de coragem e humildade. Aos meus irmãos Cláudia e Rodrigo, além de toda minha família, pelo suporte emocional, espiritual e por sempre acreditarem no meu potencial. Ao meu noivo Caio Campanelli, pelo companheirismo, incentivo e compreensão nos momentos de ausência.

A todos os colegas dos laboratórios de Solos e de Microbiologia do Solo da UENP-CLM, em especial ao Gilberto, Esmeralda, Rodrigo, Ana Carolina, Dayane, Giovana, Gabriela e Maicon, pela amizade e auxílio nas análises.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leopoldo Matsumoto, pela parceria, confiança, conselhos, ensinamentos, paciência e exemplos de doação à pesquisa científica. Ao meu coorientador Prof. Dr. Luis Eduardo Lescano e também à Prof.^a Dr.^a Christiane Costa, pelo suporte e experiências compartilhadas.

À Prof.^a Dr.^a Mayra C. C. G. de Carvalho e ao estagiário do laboratório de Genética e Biotecnologia da UENP-CLM, Anderson Benedetti, pela contribuição na identificação molecular dos fitopatógenos.

Ao Prof. Dr. Ulisses Brigatto Albino, da Universidade Federal do Pará (UFPA), pela parceria e disponibilização dos isolados cavernícolas utilizados neste trabalho.

Aos professores, colegas de turma e secretárias do Programa de Mestrado em Agronomia da UENP-CLM, pelo convívio e aprendizado.

A UNOPAR Bandeirantes-PR, principalmente ao diretor Diomar Mazzutti e à coordenadora do curso de Agronomia, Prof.^a Dr.^a Aline Vanessa Sauer, pelo apoio na realização desta pós-graduação.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

"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. O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre a mais, no meio da alegria, e ainda mais alegre no meio da tristeza." (Guimarães Rosa)

AZEVEDO, Paula Fernanda de. **Biocontrole *in vitro* de *Fusarium solani* isolado de mandioca**. 2017. Dissertação de Mestrado em Agronomia - Universidade Estadual do Norte do Paraná, Campus Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2017.

RESUMO

A podridão radicular da mandioca ocasiona perdas relevantes em sua produção. O difícil manejo, aliado à indisponibilidade de fungicidas químicos registrados ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) resultam na necessidade de alternativas de controle. Os objetivos deste trabalho foram verificar a ação inibitória, *in vitro*, de *Trichoderma harzianum*, adubo biológico e 49 isolados bacterianos cavernícolas sobre dois isolados de *Fusarium solani*, assim como elucidar os principais mecanismos envolvidos no biocontrole dos fitopatógenos. *F. solani* (F1 e F2) foram isolados de raízes de mandioca com sinais e sintomas de fusariose. Para os bioensaios com *T. harzianum* e com as bactérias provenientes de cavernas, utilizou-se o método de cultura pareada. O adubo biológico esterilizado foi testado nas concentrações: 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0% e não esterilizado (*in natura*), nas concentrações: 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0% por diluições nos meios de cultura. Como testemunha, os fungos foram cultivados na ausência do produto. Estas foram incubadas a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas por 7 dias. Avaliou-se o crescimento micelial por meio de medição diária do diâmetro das colônias, obtendo-se o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) em mm dia⁻¹, bem como a porcentagem de inibição, além de taxa de esporulação e porcentagem de germinação dos esporos. Os bioensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado e os resultados submetidos à análise de variância. As médias obtidas no bioensaio com *T. harzianum* foram comparadas por teste t ($p < 0,05$) e os resultados do pareamento com os isolados cavernícolas foram analisados pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Para os dados do bioensaio com o adubo biológico efetuou-se a análise de regressão e teste Tukey ($p < 0,05$). Os resultados demonstraram que o crescimento micelial dos isolados de *F. solani* em cultivo pareado com *T. harzianum* foi interrompido após o encontro de suas hifas pela ocorrência de micoparasitismo, porém sem interferência na taxa de esporulação. O adubo biológico esterilizado não foi capaz de promover biocontrole, porém seu efeito não esterilizado ocasionou biocontrole satisfatório na concentração de 2,5%, com inibições de aproximadamente 64% e 85% no crescimento micelial dos fungos F1 e F2, respectivamente. Além disto, observou-se declínio na germinação dos esporos conforme aumento da concentração do produto não esterilizado. Os compostos provenientes do metabolismo da comunidade microbiana presente no adubo biológico foram essenciais para seu efeito inibitório. Quanto à ação inibitória dos 49 isolados bacterianos cavernícolas, observou-se sensibilidade de F1 e F2 à 87,80% e 89,80% dos isolados, respectivamente, o que demonstra importante potencial de seus compostos antimicrobianos. Conclui-se que as alternativas de controle propostas foram relevantes para o biocontrole, *in vitro*, de *F. solani*.

Palavras-chave: Adubo biológico. Bactérias cavernícolas. Controle biológico. Fusariose. *Trichoderma harzianum*.

AZEVEDO, Paula Fernanda de. **In vitro biocontrol of *Fusarium solani* isolated from cassava**. 2017. Dissertação de Mestrado em Agronomia- Universidade Estadual do Norte do Paraná, Campus Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2017.

ABSTRACT

Cassava root rot causes significant losses in its production. The difficult management, coupled with the unavailability of chemical fungicides registered in the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock, and Food Supply (MAPA) relies on the need for alternatives of control. The aim of this work was to verify the in vitro inhibitory action of *Trichoderma harzianum*, biofertilizer and 49 cave bacterial isolates over two *Fusarium solani* isolates, as well to elucidate the main biocontrol mechanisms involved. *F. solani* (F1 and F2), were isolated from cassava roots with signs and symptoms of fusariosis. Dual cultural in Petri dishes was the method utilized for the bioassays with *T. harzianum* and bacteria from caves. The sterilized biofertilizer was tested at concentrations: 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0% and non-sterilized (*in natura*): 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 and 40%, by dilutions in the culture medium. As a control treatment, fungi were cultivated in the absence of the product. These were incubated at 25 °C, with photoperiod of 12 hours for 7 days. Mycelial growth was evaluated by daily measurement of colonies diameter, obtaining the mycelia growth rate (mm dia⁻¹), as well as percentage of inhibition, sporulation rate and percentage of spore germination. The bioassays were conducted in a completely randomized design and the results submitted to analysis of variance. Data obtained in the *T. harzianum* bioassay were compared by t-test ($p < 0.05$) and the results of the dual culture with the cave isolates were analyzed by the Scott-Knott test ($p < 0.05$). Data from the bioassay with biofertilizer were submitted to regression analysis and Tukey test ($p < 0.05$). Results demonstrated that the mycelial growth of *F. solani* isolates in dual culture with *T. harzianum* stopped after the hyphae encounter by the occurrence of mycoparasitism, but without interference in sporulation rate. The sterilized biofertilizer was not able to promote biocontrol of the phytopathogenic fungi, however its non-sterilized effect caused a satisfactory biocontrol at the concentration of 2.5%, conferring inhibitions of 64% and 85% in the mycelial growth of F1 and F2 isolates, respectively. In addition, there was a decline in spore germination as the concentration of the non-sterilized biofertilizer increased. The metabolites produced by the microbial population of the product were essential for its inhibitory effect. In relation to the inhibitory action of the 49 cave bacteria isolates, F1 and F2 were sensitive to 87.80% and 89.80% of the cave isolates, respectively, which demonstrates important potential of its antimicrobial compounds. In conclusion, the alternatives of control proposed were relevant for the in vitro biocontrol of *Fusarium solani*.

Keywords: Biofertilizer. Cave bacteria. Biological control. Fusariosis. *Trichoderma harzianum*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 A CULTURA DA MANDIOCA	2
2.2 PODRIDÃO RADICULAR POR <i>Fusarium</i> spp.....	3
2.3 CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS	5
2.3.1 Controle biológico de fungos fitopatogênicos por <i>Trichoderma</i> spp.....	6
2.3.2 Supressão de fitopatógenos por biofertilizantes.....	8
2.3.3 Bioprospecção de microrganismos antagonistas.....	10
3 OBJETIVO GERAL	11
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
REFERÊNCIAS	12
4 ARTIGO A: Atividade antagonista de <i>Trichoderma harzianum</i> sobre <i>Fusarium solani</i> ..	19
4.1 Resumo e abstract	19
4.2 Introdução	21
4.3 Material e Métodos	22
4.4 Resultados e Discussão	24
4.5 Conclusões	31
REFERÊNCIAS	32
5 ARTIGO B: Supressão de <i>Fusarium solani</i> por adubo biológico.....	35
5.1 Resumo e Abstract	35
5.2 Introdução	37
5.3 Material e Métodos	38
5.4 Resultados e Discussão	41
5.5 Conclusões	50
REFERÊNCIAS	51

6 ARTIGO C: Bioprospecção de bactérias cavernícolas com potencial ação inibitória sobre <i>Fusarium solani</i>	55
6.1 Resumo e Abstract	55
6.2 Introdução	57
6.3 Material e Métodos	58
6.4 Resultados e Discussão	59
6.5 Conclusões	62
REFERÊNCIAS	63
7 CONCLUSÕES GERAIS	66

1 INTRODUÇÃO

Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma cultura de grande importância econômica e social, com grande adaptabilidade às diversas condições de cultivo. Toda a planta pode ser comercializada para diversas finalidades, seja *in natura* ou após processamento. No entanto, o principal órgão de interesse são as raízes, ricas em amido, fonte energética muito importante para a alimentação de milhares de pessoas mundialmente (BANDYOPADHYAY et al., 2006; BURNS et al., 2010; BOAS et al., 2016).

O Brasil é o quarto maior produtor desta cultura e o Paraná é o segundo estado brasileiro com maior produção (CONAB, 2017; IBGE, 2017). Doenças que comprometem a sanidade da planta e interferem na qualidade de suas raízes merecem atenção. A podridão radicular ocasionada pelo fungo *Fusarium* spp. (fusariose) gera perdas relevantes para esta cultura (NOTARO et al., 2013; SILVA et al., 2016) e medidas de controle alternativas são necessárias, uma vez que não há registro de fungicidas químicos específicos para seu manejo, no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (SILVA et al., 2016; BRASIL, 2017). Neste contexto, o controle biológico surge e sua utilização contra fungos fitopatogênicos tem se mostrado bastante satisfatória, além de mais sustentável (UBALUA; OTI, 2007).

O fungo *Trichoderma harzianum* é uma das opções disponíveis como fungicidas biológicos no mercado. Pode ser utilizado contra várias doenças em diversas culturas agrícolas, devido ao seu comportamento parasita e antagonista à muitos fungos fitopatogênicos (VINALE et al., 2008). Outra alternativa é a utilização de adubos biológicos, que restabelecem a microbiota edáfica pela biodiversidade de microrganismos em sua composição. Sua comunidade microbiana confere supressão à alguns fitopatógenos por meio de mecanismos de biocontrole, como competição por espaço e nutrientes, parasitismo e produção de compostos antimicrobianos (BHARDWAJ et al. 2014). Além destas alternativas, há a bioprospecção de metabólitos bioativos produzidos por microrganismos habitantes de locais com condições extremas, como as cavernas, e que possuem potencial inibitório a outros microrganismos (STROBEL; DAISY, 2003; KANCHISWAMY et al., 2015).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DA MANDIOCA

A cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é originária do Brasil, América do Sul, e pertence à família Euphorbiaceae. Possui diversas denominações populares, como aipim e macaxeira, variações nominais de acordo com o dialeto de cada região do país. Sua disseminação para outros continentes se deu por meio de colonizadores europeus e atualmente é cultivada em regiões tropicais e subtropicais devido à sua rusticidade, que permite fácil adaptação às diversas condições de cultivo, como solos com baixa fertilidade ou reduzida disponibilidade de água (BANDYOPADHYAY et al., 2006; BURNS et al., 2010).

De grande interesse econômico e social, pelo fato de suas raízes tuberosas serem ricas em amido, serve como importante fonte de energia para a dieta alimentar de milhões de pessoas no mundo, além de contribuir para o aumento da renda familiar de muitas famílias (CEBALLOS et al., 2004; NOTARO et al., 2013; BOAS et al., 2016).

Por muito tempo, esta cultura tem sido cultivada em sistema de agricultura de subsistência, principalmente em países da África, onde seu consumo é expressivo e representa a principal fonte de energia e nutrientes. No entanto, é crescente o interesse de produtores por seu cultivo, visto o grande potencial de comercialização frente à sua versatilidade de usos (BANDYOPADHYAY et al., 2006).

A raiz é considerada o principal órgão da planta a ser consumido “*in natura*” ou após processamento, porém as demais partes também podem ser aproveitadas. A planta é utilizada como matéria-prima para as indústrias alimentícias (farinhas e fécula), farmacêuticas e de cosméticos, produção de etanol, papel, rações para alimentação animal, entre outros fins (CEBALLOS et al., 2004; BANDYOPADHYAY et al., 2006).

No contexto econômico, é a sexta cultura de maior produção mundial perdendo para soja, trigo, arroz, milho e batata. Nigéria, Tailândia, Indonésia e Brasil lideram o ranking de maiores produtores. Nosso país ocupa o quarto lugar em produção de raiz de mandioca, e em âmbito nacional, esta cultura fica atrás apenas da cana-de-açúcar, soja e milho (FAO 2015; CONAB, 2017). Em levantamento feito pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, a produção brasileira atingiu aproximadamente 23,70 milhões de toneladas

provenientes de 1,54 milhões de hectares plantados no ano de 2016. Deste montante, o Paraná é considerado o segundo maior produtor, contribuiu com 3,74 milhões de toneladas, e possuiu um rendimento médio de 28.000 kg ha⁻¹ (IBGE, 2017).

Apesar de sua adaptabilidade, a cultura da mandioca pode apresentar sua produção comprometida por diversos fatores, sejam eles bióticos, como a incidência de pragas e doenças, ou abióticos, como intempéries climáticas, condições do solo e outros (LÓPEZ; BERNAL, 2012). Tais fatores afetam, em menor ou maior grau, a sanidade da planta e a estabilidade na produção estará associada à tolerância ou à resistência da variedade frente à ocorrência de algum deles (CEBALLOS et al., 2004; BURNS et al. 2010). Essa sanidade influencia na qualidade da raiz colhida e como este é o principal órgão comercializado, qualquer mudança nas características morfológicas, causada principalmente pela incidência de doenças como a podridão radicular, afetará sua qualidade e prejudicará sua comercialização, visto que os agricultores geralmente as descartam para o consumo humano (CEBALLOS et al., 2004; BOAS et al., 2016).

2.2 PODRIDÃO RADICULAR POR *Fusarium* spp.

Das diversas doenças que ocorrem na cultura da mandioca, a podridão radicular é considerada uma das mais expressivas por ocasionar danos severos e importantes perdas na produção da cultura (NOTARO et al., 2013; SILVA et al., 2016). Os prejuízos variam em função da espécie do fitopatógeno, das condições de cultivo e do manejo empregado na área, podendo atingir até 70% em casos extremos (BANDYOPADHYAY et al., 2006). No entanto, a proporção dos danos, na maioria das vezes só é mensurada no momento da colheita. O fato da planta possuir vasto sistema radicular, que confere certa resiliência à mesma, mascara os sintomas da parte aérea e dificulta a diagnose precoce, tornando-a de difícil percepção quando comparada às doenças foliares (HRIDYA et al., 2013; BOAS et al., 2016).

Podridão radicular pode estar associada a vários fitopatógenos, como *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Diplodia manihotis*, *Fusarium* spp., entre outros (BANDYOPADHYAY et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2013). Apesar da identificação do agente causal que mais provoca danos econômicos não ser uma tarefa fácil, há um consenso de que algumas espécies de *Fusarium*, como *F. oxysporum* e *F. solani*, sejam

as mais importantes deste complexo fúngico por serem encontradas na maioria dos locais onde a cultura é produzida (BANDYOPADHYAY et al., 2006; NOTARO et al., 2013; BOAS et al., 2016).

Quando ocasionada por *Fusarium* spp., a doença pode ser denominada podridão seca da raiz (OLIVEIRA et al., 2013) ou Fusariose (PALMIERI et al., 2016). Estes fungos infectam a haste da planta junto ao solo e obstruem os tecidos vasculares por impedimento da livre circulação de seiva. Murcha da parte aérea, queda de folhas e até morte da planta são reflexos da podridão das raízes (MASSOLA; BEDENDO, 2005). Além disso, algumas espécies do gênero têm a capacidade de produzir micotoxinas, que podem ser prejudiciais às plantas, animais e seres humanos (KIM; VUJANOVIC, 2016).

O fungo é capaz de colonizar diversos hospedeiros alternativos e possui estruturas de resistência chamadas clamidósporos (BUENO et al., 2007). Essas possibilitam a sobrevivência do fungo no solo por longos períodos e em condições adversas (SILVA et al., 2016), além de inutilizar áreas para plantio ao longo dos ciclos da cultura (NOTARO et al., 2013). Essas características tornam a fusariose uma doença de difícil manejo, não havendo estratégias satisfatórias para seu controle (SILVA et al., 2016).

Sabe-se que apesar de pouco sustentável, a utilização de controle químico por meio de fungicidas é uma das principais e mais constantes medidas de controle de doenças de plantas (KIM; VUJANOVIC, 2016). No entanto, não há disponíveis no mercado fungicidas específicos para o controle de fusariose em mandioca (SILVA et al., 2016; BRASIL, 2017). Diante disto, estudos têm sido desenvolvidos propondo alternativas de controle menos prejudiciais ao meio ambiente, como o uso de fontes de resistência (OLIVEIRA et al., 2013; BOAS et al., 2016) e práticas de manejo de solo (QIU et al., 2012; BARROS et al., 2014).

Uma das formas de se alcançar a supressão de uma doença é a manipulação das características físico-químicas e microbiológicas por meio de práticas de manejo do solo e rotação de culturas, por exemplo. No entanto, é crescente o interesse na aplicação de organismos específicos e suas interações no controle de doenças (WHIPPS, 2001). Neste contexto, o emprego de controle biológico surge como ferramenta promissora (UBALUA; OTI, 2007).

2.3 CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS

O controle biológico tem se demonstrado como alternativa para o uso de agroquímicos no combate às doenças. De cunho mais sustentável, por agredir menos o meio ambiente e a saúde das pessoas e animais, seus efeitos são mais específicos ao alvo a ser controlado, além de afetar menos a microbiota do solo (HASAN et al., 2012). Pode ser denominado controle biológico ou biocontrole, e envolve o uso de organismos vivos e/ou seus metabólitos contra outros indesejáveis, no intuito de combatê-los ou reduzir seu desenvolvimento e efeitos prejudiciais sobre as plantas (HRIDYA et al., 2013; KIM; VUJANOVIC, 2016). Os alvos não se restringem apenas aos fungos e bactérias, mas também aos insetos, nematoides e plantas daninhas (ULLOA-OGAZ et al., 2015).

Os microrganismos envolvidos no biocontrole de fitopatógenos são chamados Agentes de Biocontrole ou *Biocontrol Agents* (BCAs) (VINALE et al., 2008; KIM, VUJANOVIC, 2016). Algumas características devem ser consideradas em sua seleção, como: melhor habilidade na obtenção de nutrientes do que o patógeno, capacidade de sobrevivência em diferentes condições ambientais, estabilidade genética, efetividade em baixas concentrações e contra vários microrganismos de diferentes hospedeiros, inofensivo às plantas, entre outras (ULLOA-OGAZ et al., 2015). Vale destacar que a identificação de um organismo relacionado à supressão de uma doença não significa que somente ele é o responsável por isto, pode haver uma combinação de fatores bióticos e abióticos envolvidos (BONILLA et al., 2012).

Diversos são os mecanismos empregados pelos agentes de biocontrole e variáveis conforme o antagonista em questão, o fitopatógeno presente, a planta hospedeira, além de fatores associados ao tipo de solo, pH, temperatura e microbiota presente na rizosfera (HOWELL, 2003). O entendimento *in vitro* dos mecanismos empregados por eles é de extrema importância para a seleção dos mesmos e para o desenvolvimento de métodos de aplicação (SILVA et al., 2016).

Os mecanismos de controle biológico envolvem muitos tipos de interações entre os microrganismos envolvidos (WHIPPS, 2001). No que diz respeito à interação entre fungos e/ou bactérias com fungos fitopatogênicos, como *Fusarium* spp., o biocontrole pode ocorrer por meio de antibiose, secreção de metabólitos extracelulares inibitórios; competição por nutrientes e sítios de infecção; micoparasitismo ou hiperparasitismo (HOWELL, 2003; FREY-KLETT et al., 2011). Outros tipos de interações, as quais propiciam o

desenvolvimento da planta em detrimento ao do fitopatógeno, envolvem a indução de resistência do hospedeiro, bem como a promoção de seu crescimento (VINALE et al., 2008; HARMAN et al., 2011; ALIZADEH et al., 2013).

É importante ressaltar que os antagonistas mais eficientes são aqueles que empregam diferentes mecanismos contra seu alvo e que o biocontrole, muitas vezes, está associado à ação não somente de um agente, mas de vários em combinação (KIM, VUJANOVIC, 2016). A maioria dos produtos biológicos disponíveis no mercado para o controle de doenças envolve a combinação de vários agentes de biocontrole em sua composição (ALIZADEH et al., 2013).

2.3.1 Controle biológico de fungos fitopatogênicos por *Trichoderma* spp.

O gênero *Trichoderma* é composto de diversas espécies nativas do solo, com rápido crescimento e capazes de se desenvolverem em diferentes condições (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010). Classificados como fungos imperfeitos, com grande produção de conídios assexuados de coloração em tons de verde (HOWELL, 2003), são referidos como inofensivos aos seres humanos e animais, simbiontes avirulentos às plantas, com comportamento parasita e antagonista à muitos fungos fitopatogênicos do solo (VINALE et al., 2008; CARVALHO et al., 2011).

O potencial biocontrolador das espécies de *Trichoderma* é estudado desde a década de 1930, quando foi primeiramente reconhecido como um agente de biocontrole de doenças de plantas (HOWELL, 2003; HASAN et al., 2012). Desde então, pesquisas envolvendo suas espécies no controle de variados fitopatógenos não cessam, o que faz deste microrganismo o mais estudado neste quesito (UBALUA; OTI, 2007; JAVID et al., 2016). Seu forte antagonismo atrai amplo interesse econômico, o que permite a comercialização de algumas espécies como fungicidas microbiológicos, ou em formulações de biofertilizantes, passíveis de aplicação à campo em diferentes culturas (VINALE et al., 2008).

Efeitos satisfatórios de *Trichoderma* spp. têm sido relatados no controle biológico dos fungos fitopatogênicos *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rizhooctonia solani*, entre outros habitantes do solo, em variadas culturas. Os trabalhos envolvem principalmente as espécies *T. harzianum* e *T. viride*, empregadas isoladamente ou em combinação com outros agentes de biocontrole, como *Pseudomonas*

fluorescens e *Streptomyces rochei* (EZZIYYANI et al., 2007; SRIVASTAVA et al., 2010; HRIDYA et al., 2013; QUALHATO et al., 2013).

Em mandioca, Silva et al. (2016) estudaram, *in vitro*, a atividade antagonista e produção de quitinase (enzima degradadora de parede celular) de dez isolados de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium solani*, um dos agentes causais da podridão radicular. Os resultados demonstraram que todos os isolados foram competitivos contra o fitopatógeno e capazes de produzir quitinase, destacando-se *T. hamatum* URM 6656 e *T. aureoviride* URM 5158, que foram selecionados para testes *in vivo*. Estes dois isolados reduziram significativamente a severidade da doença, sendo *T. aureoviride* URM 5158 mais efetivo para biocontrole de fusariose.

Os principais mecanismos empregados por *Trichoderma* spp. são o micoparasitismo, produção e difusão de compostos antibióticos extracelulares (antibiose) e competição por espaço e nutrientes (HARMAN, 2006). No processo de micoparasitismo ou hiperparasitismo, o antagonista reconhece o patógeno e o ataca por contato direto, com enrolamento e penetração de suas hifas no micélio do mesmo. Nesta etapa, ocorre a produção e liberação de enzimas (quitinase, glucanase, protease) que desintegram a parede celular do fungo hospedeiro, ocasionando sua morte (VINALE et al., 2008; TROIAN et al., 2014). *Trichoderma* spp. é classificado como micoparasita necrotrófico, pois absorvem os nutrientes provenientes das células mortas do fungo parasitado. O sucesso deste mecanismo de biocontrole está relacionado com a compatibilidade entre os fungos, seus estágios de desenvolvimento, interação com a planta hospedeira e com outros microrganismos presentes no solo, além de fatores ambientais (KIM, VUJANOVIC, 2016).

Além de sua habilidade no controle de fitopatógenos, *Trichoderma* spp. são capazes de promover a indução de resistência e o crescimento da planta hospedeira (VINALE et al., 2008). Em experimento executado por Vinale et. al (2004), observou-se aumento na produtividade de plantas de tomate, pimentão e alface em condições de casa de vegetação e campo, por intermédio da aplicação de *T. harzianum* (T22) e *T. atroviride* (P1). Alizadeh et al. (2013) testaram a ação de *Trichoderma harzianum* (Tr6) e *Pseudomonas* sp. (Ps14), isoladamente e em combinação, a fim de elucidar a indução de resistência em plantas de pepino contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis cucumerinum*. A combinação destes dois microrganismos induziu significativamente a resistência das plantas contra este fitopatógeno.

Apesar dos inúmeros trabalhos realizados com *Trichoderma* spp. e de seu conhecido potencial como agente de biocontrole de doenças de plantas, sua utilização ainda requer análise de seus mecanismos de ação contra os fungos alvos em diferentes condições

ambientais, culturas agrícolas e regiões geográficas (HASAN et al., 2012; QUALHATO et al., 2013).

2.3.2 Supressão de fitopatógenos por biofertilizantes

A interação dos atributos químicos, físicos e biológicos de um solo compõem sua qualidade. O equilíbrio destes parâmetros determina sua capacidade em desempenhar funções e manter a produtividade frente às limitações do ecossistema. Já o termo “saúde do solo”, preferido por alguns autores, provém de uma expansão de sua parte biológica, por retratar o solo como um sistema vivo e dinâmico, com diversidade de organismos vivos que requerem manejo e conservação (BONILLA et al., 2012).

A manutenção da saúde do solo é um dos principais requisitos para a produção das culturas em sistemas agrícolas. Os microrganismos do solo desempenham papéis cruciais, como decomposição da matéria orgânica, atuação nos ciclos biogeoquímicos dos nutrientes e antagonismo à fitopatógenos (SHEN et al., 2015). Neste sentido, é sempre plausível observar as respostas da microbiota do solo às práticas de manejo adotadas, uma vez que a aplicação de agroquímicos e insumos agrícolas pode interferir no seu desenvolvimento de formas benéficas ou maléficas (SHEN et al., 2015; PALMIERI et al., 2016). Barros et al. (2014) observaram diferenças na supressividade de podridão radicular da mandioca, ocasionada por *Fusarium solani*, de acordo com o manejo empregado em solos arenosos.

Todos os solos possuem certa capacidade de suprimir o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis presentes. No entanto, o grau de supressividade de um solo está relacionado com a atividade e diversidade de sua biomassa microbiana (BONILLA et al., 2012), a qual favorece um ambiente competitivo e deletério ao fitopatógeno (SHEN et al., 2013). Isto pode ser explicado pelo fato da severidade de uma doença ser menor em um solo nativo quando comparado à um solo esterilizado antes da introdução do patógeno (MAZZOLA, 2004).

A utilização de compostos orgânicos (esterços de animais, resíduos de plantas) nos sistemas agropecuários tem sido proposta por diversos autores por enriquecer a atividade microbiana edáfica, diminuir incidência de doenças de plantas, além de melhorar a fertilidade do solo (MAZZOLA, 2004; BONANOMI et al., 2007). Neste contexto, o emprego de biofertilizantes ou adubos biológicos surge como uma complementação ao uso de

fertilizantes minerais, o qual proporciona a nutrição mineral, promove a segurança alimentar de forma sustentável e ainda restabelece a biodiversidade microbiana do solo (QIU et al., 2012; BHARDWAJ et al. 2014; FU et al., 2017).

Biofertilizantes ou adubos biológicos são compostos bioativos produzidos em um processo denominado compostagem líquida contínua, onde ocorre a fermentação de materiais orgânicos de origem vegetal e animal (esterco bovino e conteúdo ruminal, por exemplo) por bactérias e leveduras, juntamente com um composto balanceado de minerais e água (MEDEIROS; LOPES, 2006; SILVA et al., 2007).

Sua composição varia conforme o material orgânico utilizado, possuem macro e micronutrientes necessários à nutrição vegetal, além de microrganismos benéficos vivos que colonizam a rizosfera e o interior das plantas, conferindo efeitos fito hormonais e supressivos à alguns fitopatógenos (TRATCH; BETTIOL, 1997; HRIDYA et al., 2013; SHEN et al., 2013).

A ação supressiva dos biofertilizantes é cumulativa e duradoura no solo, além de menos prejudicial ao ecossistema (BAILEY; LAZAROVITS, 2003; BHARDWAJ et al., 2014). Sua aplicação se dá via foliar ou diretamente no solo (MEDEIROS; LOPES, 2006) e seu desempenho na supressividade de doenças está ligado à diversidade microbiológica, à microbiota edáfica e a fatores como tipo de solo, condições climáticas e manejo adotado (AKTER et al., 2013). Bonilla et al. (2012) complementam que a supressão de doenças não é atribuída a toda a população microbiana, mas sim à atividade e mecanismos de biocontrole empregados por grupos específicos de microrganismos presentes.

Os efeitos supressivos dos biofertilizantes têm sido comprovados por diversos pesquisadores contra fungos fitopatogênicos em diferentes culturas, tais como pepino, mandioca, citros (TRATCH; BETTIOL, 1997; KUPPER et al., 2009; AKTER et al., 2013; HRIDYA et al., 2013). Para a supressão de doenças causadas por *Fusarium* spp., biofertilizantes à base de compostos orgânicos de origem animal combinados com agentes de biocontrole específicos estão sendo amplamente testados em *Musa acuminata* (bananeiras) por Shen et al. (2013), Zhang et al. (2014), Shen et al. (2015) e em *Cucumis sativus* (pepino), por Qiu et al. (2012). No entanto, são escassos os trabalhos envolvendo o uso de biofertilizante para a supressão de fusariose em mandioca.

2.3.3 Bioprospecção de microrganismos antagonistas

A bioprospecção fundamenta-se na busca por metabólitos primários e secundários produzidos por espécies de plantas, animais e microrganismos, com potencial de uso em áreas distintas, como na indústria farmacêutica, alimentícia, nas ciências agrárias, entre outras (STROBEL; DAISY, 2003; GOHEL et al., 2006; KANCHISWAMY et al., 2015). Geralmente, as espécies mais aptas a sintetizar tais compostos vivem em ambientes diversos e em condições extremas de sobrevivência, como em desertos, vulcões e cavernas. Esta alta adaptabilidade os fazem desenvolver variadas vias metabólicas para seu crescimento (ENGEL, 2007; RODRIGUES, 2009).

Os metabólitos naturais produzidos por microrganismos são a origem de muitos antibióticos que se encontram no mercado há anos. Exemplos clássicos são a produção dos compostos antibióticos estreptomicina e penicilina produzidos por *Streptomyces* spp. e *Penicillium* spp., respectivamente (HWANG et al., 2001; PELÁEZ, 2006). A importância destes antibióticos citados culmina na necessidade constante de exploração da biodiversidade presente nos mais diversificados ambientes com o intuito de descobrir novas moléculas bioativas, resultantes do metabolismo dos microrganismos e que sejam passíveis de extração e utilização no controle de doenças humanas, animais e de plantas (PELAEZ, 2006; RODRIGUES, 2009).

A produção de compostos bioativos está relacionada com as etapas do metabolismo do microrganismo. O metabolismo primário envolve as atividades metabólicas necessárias ao seu desenvolvimento celular, e os metabólitos produzidos nesta etapa são responsáveis pela geração de energia para as células. Já em seu metabolismo secundário, os metabólitos sintetizados são produzidos na fase final de seu crescimento, também chamada de fase estacionária, principalmente em condições adversas do meio, como esgotamento de nutrientes ou até mesmo a presença de outro microrganismo indutor. Os metabólitos secundários (toxinas, antibióticos, pigmentos, entre outros) geralmente não estão relacionados ao seu crescimento e desenvolvimento celular, mas sim aos seus mecanismos de defesa frente às condições limitadas (DEMAIN, 1998; RODRIGUES, 2009; TORTORA et al, 2012).

No estudo de microrganismos com versatilidade metabólica, os microbiologistas tem dado atenção àqueles que são capazes de se desenvolver em ambientes extremos de temperatura, pH, luminosidade, pressão osmótica, fontes nutricionais, entre outros fatores abióticos (BARTON; JURADO; 2007; ENGEL, 2007).

As cavernas são locais geralmente isolados, com baixíssima ou até mesmo ausência de luminosidade, muito pobres em recursos energéticos, onde a concentração de carbono orgânico é ínfima e as condições climáticas extremas, o que propicia um habitat microbiano único (NORTHUP; LAVOIE, 2001; ENGEL, 2007; MARQUES et al., 2015). Devido à essas características, alguns microrganismos presentes parecem ter evoluído para a produção de enzimas e metabólitos secundários especializados, como antimicrobianos, com potencial antagônico a outros microrganismos (BARTON; NORTHUP, 2007; KAMBESIS, 2007; GABRIEL; NORTHUP, 2013).

3 OBJETIVO GERAL

O trabalho teve por objetivo avaliar alternativas de controle biológico, *in vitro*, de *Fusarium solani* causador de podridão radicular na cultura da mandioca.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a ação antagonista do fungo *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium solani*.

Avaliar o efeito supressivo do adubo biológico MICROGEO® sobre *Fusarium solani*.

Analisar a ação inibitória de bactérias cavernícolas contra *Fusarium solani*.

Elucidar os principais mecanismos de biocontrole envolvidos.

REFERÊNCIAS

- AKTER, Z.; WEINMANN, M.; NEUMANN, G.; RÖMHELD, V. An in-vitro screening method to study the activity potential of biofertilizers based on *Trichoderma* and *Bacillus* sp.. **Journal of Plant Nutrition**, v. 36, n. 9, p. 1439-1452, 2013.
- ALIZADEH, H.; BEHBOUDI, K.; AHMADZADEH, M.; JAVAN-NIKKHAH, M.; ZAMIOUDIS, C.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. A. H. M. Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14. **Biological Control**, v. 65, p. 14–23, 2013.
- BAILEY, K. L.; LAZAROVITS, G. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. **Soil & Tillage Research**, v. 72, p. 169–180, 2003.
- BANDYOPADHYAY, R.; MWANGI, M.; AIGBE, S.O.; LESLIE, J.F. *Fusarium* species from cassava root rot complex in West Africa. **Phytopathology**, v. 96, p. 673-676, 2006.
- BARROS, J. A.; MEDEIROS, E. V.; NOTARO, K. A.; MORAES, W. S.; SILVA, T. C. E. S.; MOREIRA, K. A. Different cover promote sandy soil suppressiveness to root rot disease of cassava caused by *Fusarium solani*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, p. 967–973, 2014.
- BARTON, H. A.; JURADO, V. What's Up Down There: Microbial Diversity in Caves. **Microbe**, v. 2, p. 132-138, 2007.
- BARTON, H. A.; NORTHUP, D. E. Geomicrobiology in cave environments: past, current and future perspectives. **Journal of Cave and Karst Studies**, v.69, p.163–178, 2007.
- BHARDWAJ, D.; ANSARI, M. W.; SAHOO, R. K.; TUTEJA, N. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 66, 2014.
- BOAS, S. A. V.; HOHENFELD, C. S.; DE OLIVEIRA, S. A. S.; SANTOS, V. S.; DE OLIVEIRA, E. J. Sources of resistance to cassava root rot caused by *Fusarium* spp.: a genotypic approach. **Euphytica**, v. 209, n. 1, p. 237-251, 2016.
- BONANOMI, G.; ANTIGNANI, V.; PANE, C.; SCALA, F. Suppression of soilborne fungal diseases with organic amendments. **Journal of Plant Pathology**, v. 89, p. 311-324, 2007.

BONILLA, N.; GUTIÉRREZ-BARRANQUERO, J. A.; VICENTE, A.; CAZORLA, F. M. Enhancing Soil Quality and Plant Health Through Suppressive Organic Amendments. **Diversity**, v. 4, p. 475-491, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Defesa Agropecuária: Agrotóxicos**, 2017. Disponível em: < http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons > Acesso em: 17 jun. 2015.

BUENO, C. J.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; SOUZA, N. L. Produção e avaliação da sobrevivência de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.1, p.47-55, 2007.

BURNS, A.; GLEADOW, R.; CLIFF, J.; ZACARIAS, A.; CAVAGNARO, T. Cassava: The Drought, War and Famine Crop in a Changing World. **Sustainability**, v. 2, p. 3572-3607, 2010.

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**, v. 36, n. 1, p. 028-034, 2011.

CEBALLOS, H.; IGLESIAS, C. A.; PÉREZ, J. C.; DIXON, A. G. O. Cassava breeding: opportunities and challenges. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 503-516, 2004.

CONAB. Mandioca: Raíz, Farinha e Fécula. **Conjuntura Mensal**. 9p. Jan, 2017. Disponível em: < http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_02_16_17_38_32_17.pdf >. Acesso em: 08 jan. 2017.

DEMAIN, A. L. Induction of microbial secondary metabolism. **International Microbiology**, v. 1, p. 259–264, 1998.

ENGEL, A. S. Observations on the biodiversity of sulfidic karst habitats. **Journal of Cave and Karst Studies**, v.69, p.187–206, 2007.

EZZIYYANI, M; REQUENA, M. E; EGEEA-GILABERT, C; CANDELA, M. E. Biological Control of *Phytophthora* Root Rot of Pepper Using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in Combination. **Journal of Phytopathology**, v. 155, p. 342–349, 2007.

FAO. Statistical Pocket Book. **World food and agriculture**. 236 p. 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i4691e.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2016.

FREY-KLETT, P.; BURLINSON, P.; DEVEAU, A.; BARRET, M.; TARKKA, M.; SARNIGUET, A. Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 75, n. 4, p. 583–609, 2011.

FU, L.; PENTON, C. R.; RUAN, Y.; SHEN, Z.; XUE, C.; LI, R.; SHEN, Q. Inducing the rhizosphere microbiome by biofertilizer application to suppress banana *Fusarium* wilt disease. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 104, p. 39-48, 2017.

GABRIEL, C. R.; NORTHUP, D. E. Microbial ecology: caves as an extreme habitat. In: **Cave Microbiomes: A Novel Resource for Drug Discovery**. Springer New York, p. 85-108, 2013.

GOHEL, V.; VIMAL, M.; ASHWINI, P.; CHHATPAR, H. S. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 54-72, 2006.

HARMAN, G. E. Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. **New Phytologist**, v. 189, p. 647–649, 2011.

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

HASAN, M. M.; RAHMAN, S. M. E.; KIM, G. H.; ABDALLAH, E.; OH, D. H. Antagonistic Potentiality of *Trichoderma harzianum* Towards Seed-Borne Fungal Pathogens of Winter Wheat cv. Protiva *In Vitro* and *In Vivo*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 585–591, 2012.

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

HRIDYA, A. C.; BYJU, G.; MISRA, R. S. Effect of biocontrol agents and biofertilizers on root rot, yield, harvest index and nutrient uptake of cassava (*Manihot esculanta* Crantz). **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 59, n. 9, 2013.

HWANG, B. K.; LIM, S. W.; KIM, B. S.; LEE, J. Y.; MOON, S. S. Isolation and In Vivo and In Vitro Antifungal Activity of Phenylacetic Acid and Sodium Phenylacetate from *Streptomyces humidus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 8, p. 3739–3745, 2001.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. 108p, Janeiro, 2017. Disponível em:< [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/lspa_201701.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201701.pdf)> Acesso em: 12 fev. 2017.

JAVID, K. J.; MAHDIAN, S.; BEHBOUDI, K.; ALIZADEH, H. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* by some *Trichoderma harzianum* isolates. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, p. 1-14, 2016.

KAMBESIS, P. The importance of cave exploration to scientific research. **Journal of Cave and Karst Studies**, v. 69, n. 1, p. 46–58, 2007.

KANCHISWAMY, C. N.; MALNOY, M.; MAFFEI, M. E. Bioprospecting bacterial and fungal volatiles for sustainable agriculture. **Trends in plant science**, v. 20, n. 4, p. 206-211, 2015.

KIM, S. H.; VUJANOVIC, V. Relationship between mycoparasites lifestyles and biocontrol behaviors against *Fusarium* spp. and mycotoxins production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 5257-5272, 2016.

KUPPER, K. C.; BELLOTTE, J. A. M.; DE GOES, A. Controle alternativo de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 4, p. 1004-1015, 2009.

LÓPEZ, C. E.; BERNAL, A. J. Cassava bacterial blight: using genomics for the elucidation and management of an old problem. **Tropical Plant Biology**, v. 5, p.117–126, 2012.

MARQUES, E.L.S.; CORREIA, D.C.; OLIVEIRA, R.B.F.; SILVA, K.B.; DIAS, J.C.T.; PIROVANI, C.P.; REZENDE, R.P. Potencial biotecnológico de microrganismos isolados de cavernas de Paripiranga, Bahia. In: RASTEIRO, M.A.; SALLUN FILHO, W. (orgs.) CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, 33, 2015. Eldorado. **Anais...** Campinas: SBE, p.161-168, 2015. Disponível em: <http://www.cavernas.org.br/anais33cbe/33cbe_161-168.pdf>. Acesso em: 02/11/2016.

MASSOLA; N. S.; BEDENDO, I. P. Doenças da Mandioca. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E.A. **Manual de Fitopatologia**. v. 2. Doenças de Plantas Cultivadas. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, cap. 51. p. 453, 2005.

MAZZOLA, M. Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 35-59, 2004.

MEDEIROS, M. B.; LOPES, J. S. Biofertilizantes líquidos e sustentabilidade agrícola. **Bahia Agrícola**, v.7, n.3, nov. 2006.

NORTHUP, D. E.; LAVOIE, K. H. Geomicrobiology of Caves: A Review. **Geomicrobiology Journal**, v. 18, p. 199–222, 2001.

NOTARO, K.A.; MEDEIROS, E.V.; SILVA, C.A.D.; BARROS, J.A. Prospecção de fitopatógenos associados à podridão radicular da mandioca em Pernambuco, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 29, p.1832-1839, 2013.

OLIVEIRA, S. A. S.; HOHENFELD, C. S.; SANTOS, V. S.; HADDAD, F.; DE OLIVEIRA, E. J. Resistance to *Fusarium* dry root rot disease in cassava accessions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n.10, p.1414-1417, out. 2013.

PALMIERI, D.; VITULLO, D.; DE CURTIS, F.; LIMA, G. A microbial consortium in the rhizosphere as a new biocontrol approach against *Fusarium* decline of chickpea. **Plant and Soil**, p. 1-15, 2016.

PELÁEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products—Can history repeat? **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 981-990, 2006.

QIU, M.; ZHANG, R.; XUE, C.; ZHANG, S.; LI, S.; ZHANG, N.; SHEN, Q. Application of bio-organic fertilizer can control *Fusarium* wilt of cucumber plant by regulation microbial community of rhizosphere soil. **Biologogy and Fertility of Soils**, v. 48, p. 807-816, 2012.

QUALHATO, T. F.; LOPES, F. A. C.; STEINDORFF, A. S.; BRANDÃO, R. S.; JESUINO, R. S. A.; ULHOA, C. J. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology Letters**, v. 35, p. 1461–1468, 2013.

RODRIGUES, A. A. **Atividade antimicrobiana e produção de enzimas de interesse biotecnológico de bactérias isoladas de diferentes habitats**. 2009. 68 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2009.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 787-799, 2010.

SHEN, Z.; RUAN, Y.; WANG, B.; ZHONG, S.; SU, L.; LI, R.; SHEN, Q. Effect of biofertilizer for suppressing *Fusarium* wilt disease of banana as well as enhancing microbial and chemical properties of soil under greenhouse trial. **Applied Soil Ecology**, v. 93, p. 111–119, 2015.

SHEN, Z.; ZHONG, S.; WANG, Y.; WANG, B.; MEI, X.; LI, R.; RUAN, Y.; SHEN, Q. Induced soil microbial suppression of banana fusarium wilt disease using compost and biofertilizers to improve yield and quality. **European journal of soil biology**, v. 57, p. 1-8, 2013.

SILVA, A. F.; PINTO, J. M.; FRANÇA, C. R. R. S.; FERNANDES, S. C.; GOMES, T. C. A.; SILVA, M. S. L.; MATOS, A. N. B. **Preparo e uso de biofertilizantes líquidos**. EMBRAPA. Comunicado técnico, n. 130, 2007.

SILVA, J. A. T.; MEDEIROS, E. V.; SILVA, J. M.; TENÓRIO, D. A.; MOREIRA, K. A.; NASCIMENTO, T. C. E. S.; SOUZA-MOTTA, C. *Trichoderma aureoviride* URM 5158 and *Trichoderma hamatum* URM 6656 are Biocontrol Agents that act against Cassava Root rot through different Mechanisms. **Journal of Phytopathology**, v. 164, p. 1003-1011, 2016.

SRIVASTAVA, R.; KHALID, A.; SINGH, U.S.; SHARMA, A.K. Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt. **Biological Control**, v. 53, p. 24–31, 2010.

STROBEL, G., DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Crescimento Microbiano. In: TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ª ed. Porto Alegre: Artmed. p.156-183, 2012.

TRATCH, R.; BETTIOL, W. Efeito de biofertilizantes sobre o crescimento micelial e a germinação de esporos de alguns fungos fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, n. 2, p. 1131-1139, 1997.

TROIAN, R. F.; STEINDORFF, A. S.; RAMADA, M. H. S.; ARRUDA, W.; ULHOA, C. J. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: evaluation of antagonism and expression of cell wall-degrading enzymes genes. **Biotechnology Letters**, v. 36, p. 2095–2101, 2014.

UBALUA, A. O.; OTI, E. Antagonistic properties of *Trichoderma viride* on post harvest cassava root rot pathogens. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 2447-2450, 2007.

ULLOA-OGAZ, A. L.; MUÑOZ-CASTELLANOS, L. N.; NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. V. Biocontrol of phytopathogens: Antibiotic production as mechanism of control. In: **The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs**, Edition: 1st, Publisher: Formatex, Editors: Méndez-Vilas A., p.305-309, 2015.

VINALE, F.; D'AMBROSIO, G.; ABADI, K.; SCALA, F.; MARRA, R.; TURRA, D.; WOO, S. L.; LORITO, M. Application of *Trichoderma harzianum* (T22) and *Trichoderma atroviride* (P1) as plant growth promoters, and their compatibility with copper oxychloride. **Journal of Zhejiang University Science**, v. 30, p. 2–8, 2004.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K. GHISALBERTI, E. L.; MARRAA, R.; WOOA, S. L.; LORITO, M. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 1–10, 2008.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 487-511, 2001.

ZHANG, S.; HE, X.; ZHANG, J.; RAZA, W.; YANG, X.; RUAN, Y.; SHEN, Q.; HUANG, Q. Suppression of *Fusarium* wilt of banana with application of bio-organic fertilizers. **Pedosphere**, v. 24, p. 613-624, 2014.

4 ARTIGO A: Atividade antagonista de *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium solani*

4.1 RESUMO E ABSTRACT

RESUMO

A cultura da mandioca expressa relevância econômica e social em diversos países e raízes de qualidade são primordiais para sua comercialização. A fusariose, podridão radicular ocasionada por *Fusarium* sp., é responsável por severos prejuízos. No entanto, a indisponibilidade de controle químico dificulta o manejo fitossanitário, sendo necessárias alternativas de controle, como a utilização do fungo *Trichoderma harzianum*, um potencial agente antagonista à diversos fungos nativos do solo. O objetivo do trabalho foi verificar a ação antagonista de *Trichoderma harzianum* sobre isolados de *Fusarium solani*. Os isolados de *F. solani*, denominados F1 e F2, foram obtidos de raízes sintomáticas de mandioca e como agente antagonista, uma linhagem comercial de *T. harzianum*. Utilizou-se o método de cultura pareada *in vitro* e foram analisados crescimento micelial, taxa de esporulação e morfologia macro e microscópica dos fitopatógenos. O bioensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições e os resultados foram submetidos à análise de variância e comparação das médias por teste t ($p < 0,05$). O biocontrole dos isolados F1 e F2 de *F. solani* ocorreu após encontro micelial com *T. harzianum*. Apesar da paralização no crescimento dos fungos fitopatogênicos, não houve efeitos significativos na taxa de esporulação dos mesmos. Observou-se mudança de coloração na região de encontro das hifas e a análise microscópica demonstrou enrolamento das hifas de *T. harzianum* sobre as hifas de *F. solani*. Conclui-se que *T. harzianum* desempenhou ação antagonista sobre *F. solani*, pela ocorrência de micoparasitismo como principal mecanismo de biocontrole, o que demonstra potencial deste fungo para o biocontrole de fusariose em mandioca.

Palavras-chave: Controle biológico. *Manihot esculenta* Crantz. Micoparasitismo. Podridão radicular.

ABSTRACT

Cassava expresses economic and social relevance in several countries and roots of quality are essential for its commercialization. Fusariosis, root rot caused by *Fusarium* sp., is responsible for severe damage. However, the unavailability of chemical control makes phytosanitary management difficult, and alternatives of control are necessary, such as the use of the fungus *Trichoderma harzianum*, a potential antagonist to several native soil fungi. The aim of this work was to verify the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* on *Fusarium solani* isolates. The isolates of *F. solani*, F1 and F2, were obtained from symptomatic roots of cassava and as an antagonistic agent, a commercial strain of *T. harzianum*. In vitro dual

culture method was used and mycelial growth, sporulation rate, macro and microscopic morphology of phytopathogens were analyzed. The bioassay was conducted in a completely randomized design, with five replicates and the results were submitted to analysis of variance and comparison of the means by t test ($p < 0.05$). The biocontrol of *F. solani* isolates F1 and F2 occurred after a mycelial encounter with *T. harzianum*. Despite the stoppage in the growth of phytopathogenic fungi, there were no significant effects on their sporulation rate. Color change was observed in the region of the hyphae encounter and microscopic analysis demonstrated *T. harzianum* hyphae coiling over hyphae of *F. solani*. In conclusion, *T. harzianum* played an antagonistic action on *F. solani*, due to the occurrence of mycoparasitism as the main mechanism of biocontrol, which demonstrates the potential of this fungus for the biocontrol of fusariosis in cassava.

Keywords: Biological control. *Manihot esculenta* Crantz. Mycoparasitism. Root rot.

4.2 INTRODUÇÃO

Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma cultura com notável importância econômica e social. De fácil adaptabilidade às diversas condições de cultivo, contribui com a dieta alimentar e aumento da renda de muitas famílias no mundo todo. A planta inteira pode ser destinada à várias finalidades, no entanto, a raiz é considerada seu principal órgão, comercializada *in natura* ou após processamento. Desta forma, a sanidade da planta é primordial para a obtenção de raízes de qualidade (BURNS et al., 2010; BOAS et al., 2016).

A fusariose, podridão radicular ocasionada por fungos do gênero *Fusarium*, é responsável por danos severos e importantes perdas na produção da cultura (NOTARO et al., 2013; SILVA et al., 2016). Esses fitopatógenos são capazes de colonizar plantas hospedeiras alternativas e sobreviver no solo por longos períodos sob condições adversas, o que dificulta o manejo fitossanitário (BUENO et al., 2007; SILVA et al., 2016). Além disso, a indisponibilidade de fungicidas químicos registrados para manejo desta doença na cultura da mandioca demanda alternativas de controle (BRASIL, 2017).

Espécies do fungo *Trichoderma*, potenciais agentes de biocontrole, surgem como uma opção promissora. São microrganismos edáficos, com rápido crescimento, aptos ao desenvolvimento em condições distintas (VINALE et al., 2008; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010) e com comportamento parasita e antagonista à muitos fungos fitopatogênicos nativos do solo, como *Phytophthora* sp., *Fusarium* spp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rizhoctonia solani*, entre outros (SRIVASTAVA et al., 2010; HRIDYA et al., 2013; QUALHATO et al., 2013). Além disso, têm se mostrado simbioses avirulentos às plantas, podendo induzir resistência e crescimento das mesmas (HARMAN et al., 2004; VINALE et al., 2008). Estes efeitos benéficos propiciaram a comercialização de algumas espécies em formulações de fungicidas microbiológicos, passíveis de aplicação em várias culturas (VINALE et al., 2008).

Os mecanismos de biocontrole desempenhados por *Trichoderma* spp. sobre o fungo hospedeiro envolvem antibiose (produção de compostos antibióticos extracelulares, como gliotoxinas), competição por espaço e nutrientes, além de micoparasitismo, no qual ocorre enrolamento e penetração de suas hifas no micélio do fitopatógeno, com produção e liberação de enzimas (quitinases, por exemplo) que degradam sua parede celular, ocasionando sua morte (HOWELL, 2003; TROIAN et al., 2014; KIM, VUJANOVIC, 2016; SILVA et al., 2016). É importante ressaltar que o sucesso do biocontrole depende da compatibilidade entre

os fungos, seus estágios de desenvolvimento, interação com a planta hospedeira e com outros microrganismos presentes no solo, além de fatores ambientais (KIM, VUJANOVIC, 2016). Diante disto, o trabalho teve por objetivo verificar a ação antagonista de *Trichoderma harzianum* sobre isolados de *Fusarium solani*.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Isolamento e caracterização morfológica dos fitopatógenos

Para o isolamento de *Fusarium* foram utilizadas amostras de raízes de mandioca, com sintomas característicos de fusariose, provenientes de propriedades da região de Paranaíba-PR. As amostras foram previamente lavadas em água corrente, seguido de desinfecção superficial em álcool 70% por 30 segundos, solução de hipoclorito de sódio a 1,5% por 60 segundos, e passagem em água destilada e esterilizada. Fragmentos foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (B.D.A.) e incubados em câmara climática B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*) a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas por 7 dias. Foram realizados isolamentos monospóricos para a obtenção de culturas puras, sendo os isolados diferenciados por meio de características morfológicas macroscópicas da colônia (pigmentação) e microscópicas (observação da morfologia das hifas e conídios em microscópio óptico).

4.3.2 Identificação molecular dos fitopatógenos

Os isolados de *Fusarium* foram submetidos à identificação molecular, no Laboratório de Genética e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP-CLM), para confirmação da espécie *Fusarium solani*. O DNA genômico dos isolados foi extraído utilizando o protocolo proposto por Gontia-Mishra, Tripathi e Tiwari (2014). A região ITS do genoma do *F. solani* foi amplificada pela técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) utilizando os *primers* ITS-F (5'-CCAGAGGACCCCCTAACTCT-3') e ITS-R (5'-CTCTCCAGTTGCGAGGTGTT-3') (ARIF et al., 2012). A reação de amplificação foi realizada em 25 µL da mistura contendo 8 µL de Master Mix 2X (Promega), 0,2 mM dos

primers (ITS-F e ITS-R), 2 unidades de Taq DNA polimerase, 400 mM de cada dNTP e 1 μL do DNA genômico (40 ng μL^{-1}) da amostra.

As amostras foram amplificadas por PCR convencional em termociclador (Veriti-Applied Biosystems), ocorrendo 42 ciclos de desnaturação por 5 minutos a 94 °C, anelamento por 1 minuto a 64,5 °C, extensão por 2 minutos a 72 °C e extensão final por 10 minutos a 72 °C. O produto de PCR foi aplicado em gel de agarose 1,4% em TBE 1X (Tris-EDTA-Ácido bórico pH 8,3), corados com brometo de etídio (EtBr) e visualizados sob um transluminador UV.

4.3.3 Isolamento do antagonista *Trichoderma harzianum*

O isolamento do fungo *T. harzianum* linhagem ESALQ 1306 ocorreu por diluição seriada de um fungicida biológico, seguido de inoculação de uma alíquota de 100 μL em meio de cultura B.D.A. e incubação a 28 °C na ausência de luz por 7 dias.

4.3.4 Ação antagonista de *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium solani*

A ação antagonista de *T. harzianum* sobre *F. solani* foi avaliada, *in vitro*, pelo método adaptado de cultura pareada proposto por Dennis e Webster (1971). Cada placa de Petri (150 mm de diâmetro) contendo meio de cultura B.D.A., recebeu dois discos de ágar (8 mm de diâmetro) com micélio dos fungos, um disco da colônia de *F. solani* e outro do *T. harzianum*, depositados em lados opostos e distantes 1,5 cm das bordas da placa. Os discos de micélio de *F. solani* foram retirados de colônias com 10 dias de cultivo e sua repicagem ocorreu 96 horas antes do *T. harzianum*, conforme metodologia adaptada de Carvalho et al. (2008). Como testemunhas, os fungos foram cultivados isoladamente, colocando-se um disco de micélio no centro da placa. As placas foram mantidas em câmara climática B.O.D. a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas, por 9 dias.

O crescimento micelial (mm) dos fungos foi determinado pela medição diária do diâmetro das colônias, o que possibilitou o cálculo do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), em mm dia^{-1} , proposto por Oliveira (1991): $\text{IVCM} = \sum (D - D_a) / N$; sendo: D = diâmetro atual da colônia, D_a = diâmetro da colônia no dia anterior e N = número de dias após a inoculação.

4.3.5 Análise de esporulação de *Fusarium solani*

Para a análise de esporulação dos isolados de *F. solani* utilizou-se metodologia adaptada de Guzmán-de-Peña e Ruiz-Herrera (1997), com contagem dos esporos provenientes de três discos de micélio (8 mm de diâmetro) coletados da região central, intermediária e periférica das colônias no 10º dia de cultivo. As amostras de cada colônia foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de solução de Tween 80 a 0,05% e agitadas em vortex durante dois minutos ou até a completa liberação dos esporos. As contagens foram realizadas em câmara de Neubauer por microscopia óptica, não havendo necessidade de diluição da suspensão de esporos. A esporulação foi expressa em números de esporos cm⁻² de colônia.

4.3.6 Morfologia macroscópica e microscópica de *Fusarium solani*

A morfologia macroscópica foi avaliada de acordo com o proposto por Pitt e Hocking (1997) e a microscópica foi analisada por meio de microcultivo pareado dos fungos em lâminas de microscopia e posterior observação em microscópio óptico.

4.3.7 Análise estatística dos resultados

O bioensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições e os resultados submetidos à análise de variância e comparação das médias por teste t ($p < 0,05$).

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Isolamento e caracterização morfológica dos fitopatógenos

Cultivos monospóricos do fungo possibilitaram a identificação de dois isolados de *Fusarium*, denominados F1 e F2, diferenciados por meio de características

morfológicas macroscópicas das colônias (F1 com micélio de pigmentação branca e F2 com micélio de pigmentação rosada) e microscópicas (F1 com conídios em formato de foice e F2 com conídios ovalados) (Figuras 1 e 2).

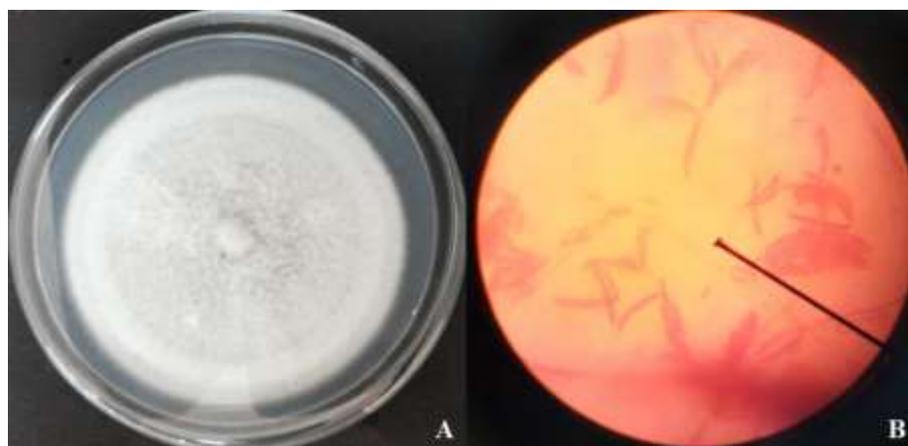


Figura 1 – Características macroscópicas (A) e microscópicas (B) do isolado F1 de *Fusarium* em meio B.D.A.

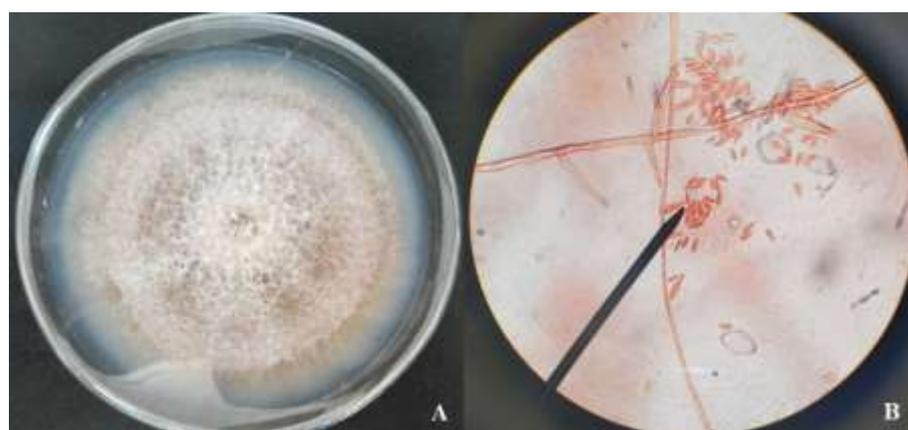


Figura 2 – Características macroscópicas (A) e microscópicas (B) do isolado F2 de *Fusarium* em meio B.D.A.

4.4.2 Identificação molecular dos fitopatógenos

A detecção da espécie de *Fusarium* baseada somente nas características morfológicas do fungo requer a habilidade de taxonomistas especializados. Sendo assim, a identificação molecular dos isolados F1 e F2 de *Fusarium* demonstrou confirmação para a espécie *F. Solani* (Figura 3), conforme observação da reprodução de fragmentos de 595 pb (pares de base) produzidos a partir da amplificação da região ITS da espécie (ARIF et al., 2012).

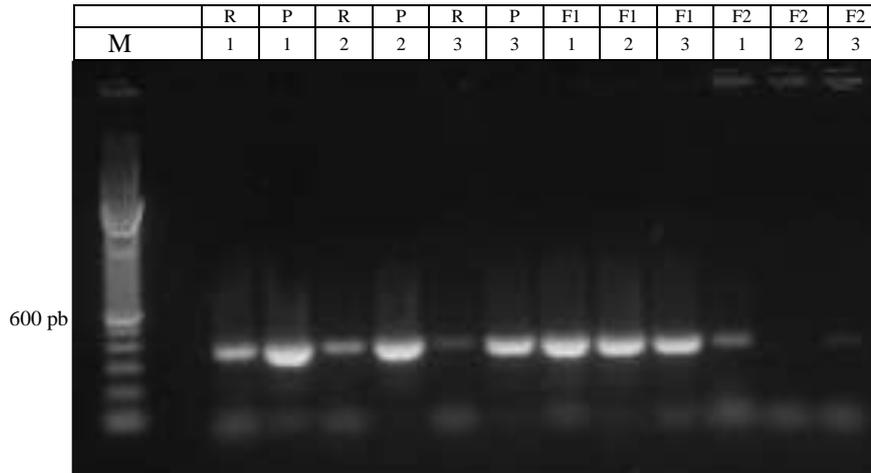


Figura 3 - Gel de confirmação para *Fusarium solani*.

Dados: (R) (P) = *Fusarium* isolados de raízes de Feijão. (F1) (F2) = *Fusarium* isolados de raiz de mandioca; (M) Marcador molecular 100 pb; 1, 2 e 3 = concentração de DNA na reação.

4.4.3 Ação antagonista de *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium solani*

O pareamento de *T. harzianum* com os isolados de *F. solani* demonstrou interrupção no crescimento micelial dos fitopatógenos no momento de encontro de suas hifas com as do agente antagonista, no 7º dia após a repicagem (D.A.R.) dos mesmos (Figuras 4 e 5). Antes disso, não houve ação inibitória de *T. harzianum*, uma vez que o IVC (mm dia⁻¹) dos isolados F1 e F2 não diferiu de suas testemunhas (Tabela 1).

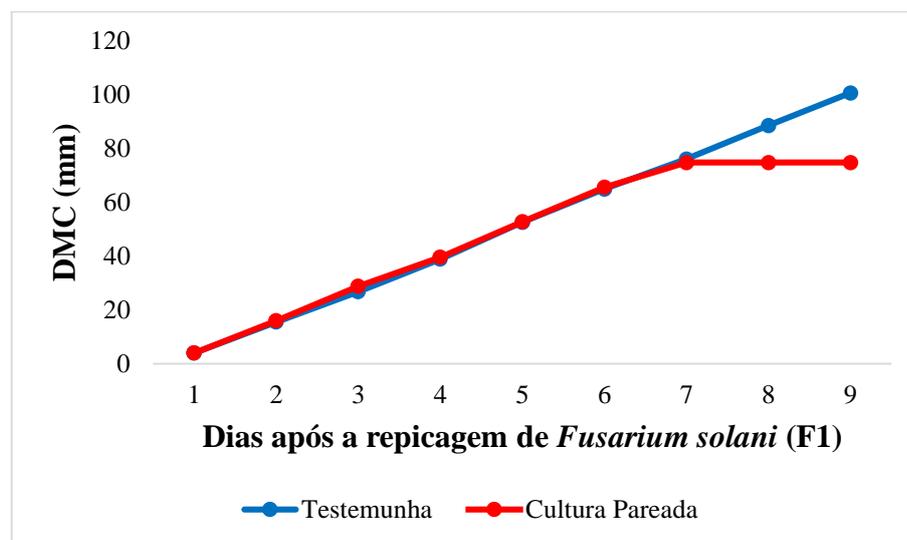


Figura 4 - Diâmetro médio (mm) das colônias (DMC) do isolado F1 de *Fusarium solani* ao longo do período de cultivo com *Trichoderma harzianum*.

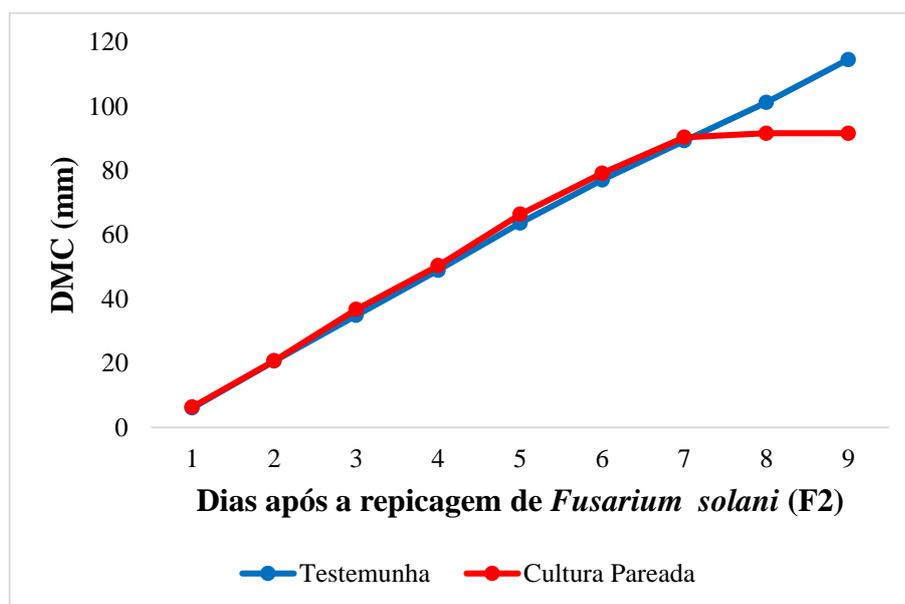


Figura 5 - Diâmetro médio (mm) das colônias (DMC) do isolado F2 de *Fusarium solani* ao longo do período de cultivo com *Trichoderma harzianum*.

O biocontrole, no entanto, somente foi perceptível à partir do 8º D.A.R. dos fitopatógenos, pela diferença estatística nos diâmetros médios das colônias em comparação às suas testemunhas (Tabela 1).

Tabela 1 - Diâmetro médio das colônias dos isolados F1 e F2 de *Fusarium solani* em cultura pareada com *Trichoderma harzianum*.

	Diâmetro da colônia (mm)									IVCM**
	1	2	3	4	5	6	7	8	9*	
F1										
T ¹	4,00 a	15,50 a	26,80 a	38,90 a	52,60 a	64,97 a	76,10 a	88,57 a	100,63 a	10,87 a
C.P. ²	4,00 a	16,00 a	28,80 a	39,60 a	52,80 a	65,60 a	74,80 a	74,80 b	74,80 b	10,69 a
C.V. ³	1,25	3,89	5,41	2,69	2,17	1,72	3,28	3,41	3,38	3,28
F2										
T ¹	6,10 a	20,70 a	34,90 a	49,00 a	63,70 b	77,10 b	89,30 a	101,23 a	114,57 a	12,76 a
C.P. ²	6,40 a	20,80 a	36,80 a	50,40 a	66,40 a	79,20 a	90,40 a	91,60 b	91,60 b	12,91 a
C.V. ³	11,17	4,70	4,41	2,95	1,72	1,78	1,47	2,48	2,33	1,47

¹ Testemunha, ² Cultura pareada, ³ Coeficiente de variação (%), * Dias Após Repicagem (D.A.R), ** Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (mm dia⁻¹) calculado à partir dos diâmetros das colônias de *Fusarium solani* no 7º D.A.R. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

Uma das características do *Trichoderma* sp. é seu rápido desenvolvimento em relação a outros fungos e este atributo é relevante para o seu desempenho como agente de biocontrole (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010). *T. harzianum* possuiu um crescimento micelial médio de 40,77 mm dia⁻¹, o que foi correspondente à aproximadamente quatro vezes o IVCM do isolado F1 (10,87 mm dia⁻¹) e três vezes o IVCM do isolado F2 (12,91 mm dia⁻¹) de *F. solani* (Tabela 2). Apesar de ter sido transferido para a placa de Petri 96 horas após *F. Solani* (Figura 6), o antagonista rapidamente alcançou e ultrapassou o crescimento micelial dos fitopatógenos (Figura 7), além de continuar crescendo e esporular sobre suas colônias (Figura 9).

Tabela 2 – Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos isolados de *Fusarium solani* (F1 e F2) e de *Trichoderma harzianum* cultivados isoladamente.

Isolado	IVCM (mm dia ⁻¹)
F1	10,87
F2	12,91
<i>Trichoderma harzianum</i>	40,77

Resultados semelhantes foram obtidos por Pereira (2009), ao analisar o antagonismo de dez isolados de *Trichoderma* contra isolados de *Fusarium* sp., causadores da murcha vascular do tomateiro. Em seu estudo, todos os isolados de *Trichoderma* sp. apresentaram crescimento mais rápido que os fitopatógenos testados.

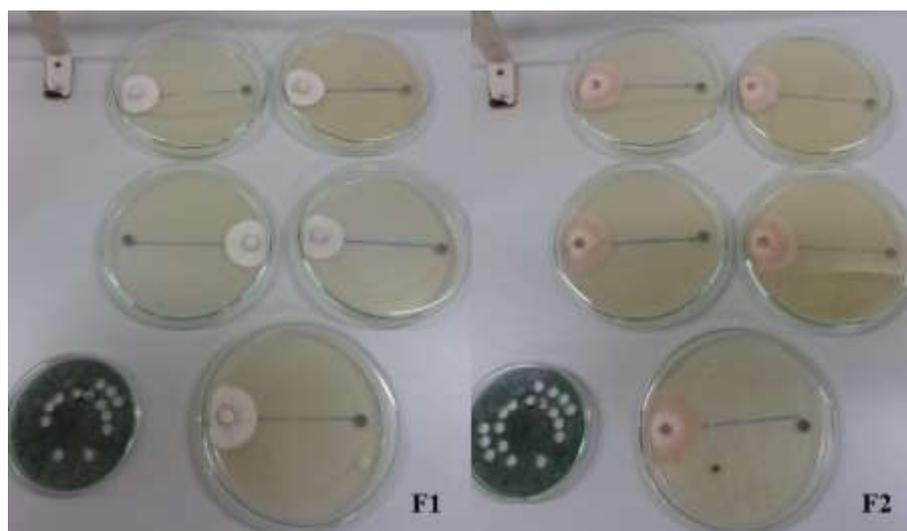


Figura 6 - Isolados F1 e F2 de *Fusarium solani* em cultura pareada com *Trichoderma harzianum* em meio B.D.A.

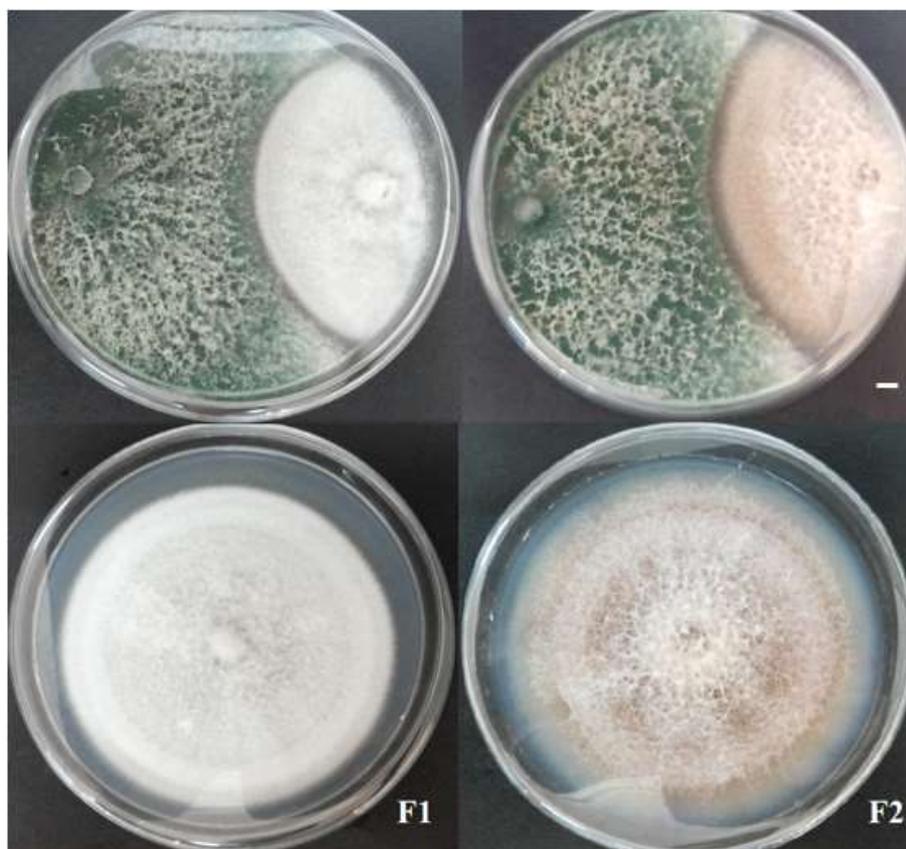


Figura 7 – *Fusarium solani* F1 (à esquerda) e F2 (à direita) em cultura pareada com *Trichoderma harzianum* e suas respectivas testemunhas no 9º dia de incubação em meio B.D.A. Barra de escala representa 10 mm.

4.4.4 Análise de esporulação de *Fusarium solani*

O antagonismo realizado por *Trichoderma* sp. envolve principalmente os mecanismos de antibiose (liberação de compostos extracelulares inibitórios, como gliotoxinas), parasitismo (contato direto com produção e liberação de enzimas que desintegram a parede celular do fungo parasitado, como quitinases) e competição por nutrientes e espaço (HARMAN, 2006; KIM, VUJANOVIC, 2016). Apesar da interrupção no crescimento micelial de *F. solani* F1 e F2 pela ação de *T. harzianum* após o contato do micélio, a análise de esporulação das colônias dos fungos (Tabela 3) não demonstrou resultados significativos, o que sugere que *T. harzianum* não foi capaz de produzir compostos extracelulares inibitórios. Estes resultados divergem dos constatados por Santos (2008), o qual observou inibição na esporulação de *Fusarium oxysporum* pela produção de metabólitos por antibiose.

Tabela 3 - Taxa de esporulação* dos isolados F1 e F2 de *Fusarium solani* em cultura pareada com *Trichoderma harzianum*.

	F1	F2
Testemunha	1,2049 x 10 ⁷ a	3,1566 x 10 ⁷ a
Cultura pareada	1,2547 x 10 ⁷ a	3,4066 x 10 ⁷ a
C.V. (%)	26,41	21,92

* Número médio de esporos/cm² de colônia. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

4.4.5 Morfologia macroscópica e microscópica de *Fusarium solani*

Observou-se ação micoparasitária de *T. harzianum* sobre os isolados F1 e F2 de *F. solani* após contato direto com suas hifas. A análise microscópica do micélio da região de encontro demonstrou enrolamento das hifas de *T. harzianum* sobre as hifas dos fungos hospedeiros (Figura 8), e as consequências deste evento podem ter ocasionado a degradação mecânica e enzimática (produção de quitinases) da parede celular dos fungos parasitados, bem como absorção de seus nutrientes, ocasionando sua morte (TROIAN et al., 2014; KIM; VUJANOVIC, 2016).

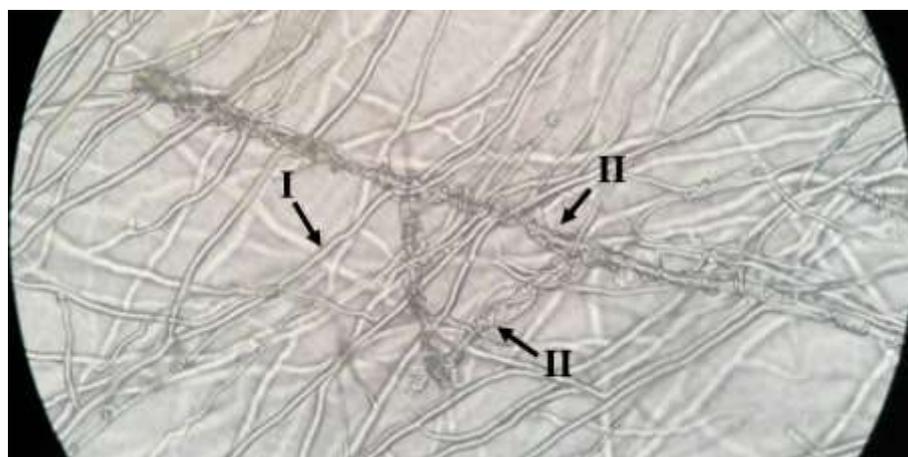


Figura 8 – Microcultivo pareado: I – Aspecto das hifas de *Fusarium solani* (F2). II – enrolamento das hifas de *Trichoderma harzianum* sobre as hifas do isolado F2 (microscopia óptica no aumento de 400 x).

A análise macroscópica das colônias demonstrou mudança no aspecto e na coloração do micélio dos isolados de *F. solani* conforme a sobreposição e esporulação do *T. harzianum* sobre as hifas dos fitopatógenos (Figura 9). Estes fatos também foram observados por Carvalho et al. (2011) em antagonismo de isolados de *T. harzianum* contra *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* e por Siameto et al. (2010), contra os fungos *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp. e

Fusarium spp. Os autores atribuíram a redução no crescimento dos fitopatógenos à competição por nutrientes e espaço, além de enrolamento e penetração das hifas de *T. harzianum* sobre as hifas dos fungos hospedeiros, ocasionando desintegração das mesmas, o que confirma forte hiperparasitismo.

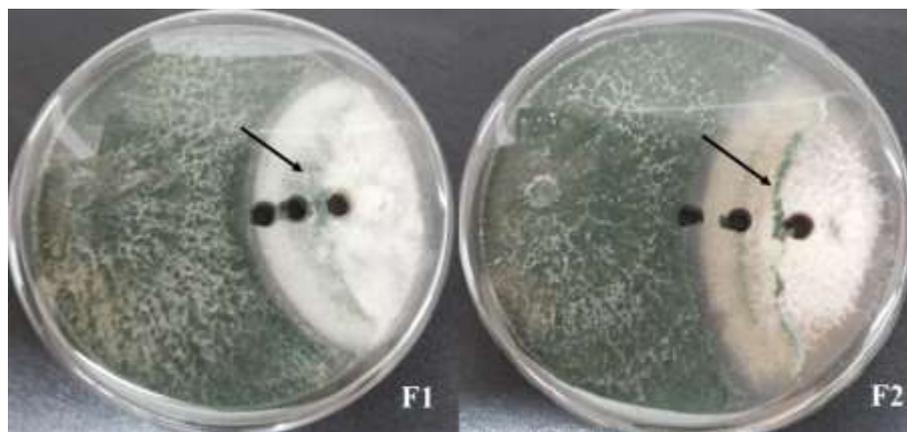


Figura 9- Sobreposição e esporulação de *Trichoderma harzianum* sobre o micélio de *Fusarium solani* (F1 – à esquerda e F2 – à direita) com 12 dias de cultivo em meio B.D.A.

O manejo fitossanitário de fusariose em mandioca é dificultado pela indisponibilidade de fungicidas químicos registrados para controle de seus agentes causais (BRASIL, 2017) e pela permanência dos mesmos no solo por longos períodos colonizando hospedeiros alternativos (SILVA et al., 2016). Os resultados *in vitro* demonstraram que *T. harzianum* é um potencial fungo a ser utilizado para o controle biológico desta doença. Fato relevante, devido a possibilidade de sua aplicação à campo por meio de fungicidas microbiológicos comercializados no mercado (VINALE et al., 2008), que além de enriquecer a microbiota edáfica, oferecem antagonismo à *Fusarium* sp. e a outros fungos do solo pelos seus mecanismos de biocontrole (QUALHATO et al., 2013).

4.5 CONCLUSÕES

Trichoderma harzianum demonstrou ação antagonista sobre *Fusarium solani* e o biocontrole ocorreu por micoparasitismo após o encontro micelial dos fungos, o que evidencia a importância deste fungo para o controle biológico de fusariose em mandioca.

REFERÊNCIAS

- ARIF, M.; CHAWLA, S.; ZAIDI, N. W.; RAYAR, J. K.; VARIAR, M.; SINGH, U. S. Development of specific primers for genus *Fusarium* and *F. solani* using rDNA sub-unit and transcription elongation factor (TEF-1 α) gene. **African Journal of Biotechnology**, v. 11 (2), p. 444-447, 2012.
- BOAS, S. A. V.; HOHENFELD, C. S.; DE OLIVEIRA, S. A. S.; SANTOS, V. S.; DE OLIVEIRA, E. J. Sources of resistance to cassava root rot caused by *Fusarium* spp.: a genotypic approach. **Euphytica**, v. 209, n. 1, p. 237-251, 2016.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Defesa Agropecuária: Agrotóxicos**, 2017. Disponível em: <
http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons > Acesso em: 17 jun. 2015.
- BUENO, C. J.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; SOUZA, N. L. Produção e avaliação da sobrevivência de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.1, p.47-55, 2007.
- BURNS, A.; GLEADOW, R.; CLIFF, J.; ZACARIAS, A.; CAVAGNARO, T. Cassava: The Drought, War and Famine Crop in a Changing World. **Sustainability**, v. 2, p. 3572-3607, 2010.
- 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**, v. 36, n. 1, p. 028-034, 2011.
- CARVALHO, D. D. C.; OLIVEIRA, T. A. S.; BRAÚNA, L. M.; MELLO, S. C. M. Isolados de *Trichoderma* sp. antagonistas a *Fusarium oxysporum*. Comunicado técnico, n. 178. EMBRAPA. Brasília, DF. 2008.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, n. 3, p. 363-369, 1971.
- GONTIA-MISHRA, I.; TRIPATHI, N.; TIWARI, S. A simple and rapid DNA extraction protocol for filamentous fungi efficient for molecular studies. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 13, p.536-539, 2014.

GUZMAN-DE-PEÑA, D.; RUIZ-HERRERA, J. Relationship between aflatoxin biosynthesis and sporulation in *Aspergillus parasiticus*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 21, p. 198–205, 1997.

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

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Review Microbiology**, v. 2, p. 43–56, 2004.

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

HRIDYA, A. C.; BYJU, G.; MISRA, R. S. Effect of biocontrol agents and biofertilizers on root rot, yield, harvest index and nutrient uptake of cassava (*Manihot esculanta* Crantz). **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 59, n. 9, 2013.

KIM, D. H.; MARTYN, R. D.; MAGILL, C. W. Restriction fragment length polymorphism groups and physical map of mitochondrial DNA from *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. **Phytopathology**, v. 82, p. 346–353, 1992.

KIM, S. H.; VUJANOVIC, V. Relationship between mycoparasites lifestyles and biocontrol behaviors against *Fusarium* spp. and mycotoxins production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 5257-5272, 2016.

NOTARO, K.A.; MEDEIROS, E.V.; SILVA, C.A.D.; BARROS, J.A. Prospecção de fitopatógenos associados à podridão radicular da mandioca em Pernambuco, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 29, p.1832-1839, 2013.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**.1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade), Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

PEREIRA, C. O. F. **Estudo da patogenicidade e controle biológico de *Fusarium* sp. com *Trichoderma* sp.** 2009. 74 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2009.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. Blackie Academic & Professional, London 2^a Ed, p. 592, 1997.

QUALHATO, T. F.; LOPES, F. A. C.; STEINDORFF, A. S.; BRANDÃO, R. S.; JESUINO, R. S. A.; ULHOA, C. J. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology Letters**, v. 35, p. 1461–1468, 2013.

SANTOS, H. A. ***Trichoderma* spp. como promotores de crescimento em plantas e como antagonistas a *Fusarium oxysporum***. 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado em ciências agrárias). Universidade de Brasília, 2008.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 787-799, 2010.

SIAMETO, E. N.; OKOTH, S.; AMUGUNE, N. O.; CHEGE, N.C. Antagonism of *Trichoderma farzianum* isolates on soil borne plant pathogenic fungi from Embu District, Kenya. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v. 1, n. 13, p. 47-54, 2010.

SILVA, J. A. T; MEDEIROS, E. V.; SILVA, J. M.; TENÓRIO, D. A.; MOREIRA, K. A.; NASCIMENTO, T. C. E. S.; SOUZA-MOTTA, C. *Trichoderma aureoviride* URM 5158 and *Trichoderma hamatum* URM 6656 are Biocontrol Agents that act against Cassava Root rot through different Mechanisms. **Journal of Phytopathology**, v. 164, p. 1003-1011, 2016.

SRIVASTAVA, R; KHALID, A; SINGH, U.S; SHARMA, A.K. Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt. **Biological Control**, v. 53, p. 24–31, 2010.

TROIAN, R. F.; STEINDORFF, A. S.; RAMADA, M. H. S.; ARRUDA, W.; ULHOA, C. J. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: evaluation of antagonism and expression of cell wall-degrading enzymes genes. **Biotechnology Letters**, v. 36, p. 2095–2101, 2014.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K. GHISALBERTI, E. L.; MARRAA, R.; WOOA, S. L.; LORITO, M. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 1–10, 2008.

5 ARTIGO B: Supressão de *Fusarium solani* por adubo biológico

5.1 RESUMO E ABSTRACT

RESUMO

A fusariose é uma das doenças mais nocivas à cultura da mandioca. Seu manejo fitossanitário é dificultado pela indisponibilidade de fungicidas químicos registrados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A utilização de adubos biológicos demonstra-se uma alternativa promissora e sustentável. Eles possuem nutrientes necessários à nutrição vegetal e biodiversidade de microrganismos que podem conferir efeitos supressivos à fitopatógenos edáficos. O objetivo do trabalho foi verificar a ação supressiva *in vitro* do adubo biológico MICROGEO[®] sobre isolados de *Fusarium solani*. *F. solani*, F1 e F2, foram isolados de raízes de mandioca com sintomas de fusariose. O adubo biológico utilizado foi produzido por compostagem líquida contínua de MICROGEO[®], conteúdo ruminal bovino e água. Testou-se o efeito do produto esterilizado nas concentrações: 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0% (v/v) e não esterilizado (*in natura*): 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0% (v/v) por diluições nos meios de cultura. Como testemunha, os fungos foram cultivados na ausência do produto. O bioensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e os resultados submetidos às análises de variância e regressão, além de teste Tukey ($p < 0,05$). Foram avaliados crescimento micelial, porcentagem de inibição e germinação dos esporos dos fungos. O adubo biológico esterilizado não promoveu o biocontrole de *F. solani* porém seu efeito não esterilizado ocasionou biocontrole satisfatório na concentração de 2,5%, com inibições de aproximadamente 64% e 85% no crescimento micelial dos fungos F1 e F2, respectivamente. Os metabólitos produzidos pela população microbiana presente no adubo biológico foram essenciais para seu efeito supressivo e também para o declínio na porcentagem de germinação dos esporos conforme o aumento da dose. Conclui-se que o adubo biológico MICROGEO[®] *in natura* possui efeito supressivo *in vitro* sobre *F. solani* e que a antibiose foi o principal mecanismo de biocontrole desempenhado por sua população microbiana.

Palavras-chave: Antibiose. Biodiversidade microbiana. Biofertilizante. Fusariose. *Manihot esculenta* Crantz.

ABSTRACT

Fusariosis is one of the most harmful diseases of cassava. Its phytosanitary management is hampered by the unavailability of chemical fungicides registered by the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock, and Food Supply (MAPA). The use of biofertilizers is a promising and sustainable alternative. They have nutrients necessary for plant nutrition and biodiversity of microorganisms that can confer suppressive effects on edaphic plant pathogens. The aim of this work was to verify the *in vitro* suppressive action of biofertilizer MICROGEO[®] on

Fusarium solani isolates. *F. solani*, F1 and F2, were isolated from cassava roots with symptoms of fusariosis. Continuous liquid composting of MICROGEO[®], bovine rumen contents and water produced the biofertilizer. The effect of the sterilized product was verified at concentrations: 2.5; 5.0; 10.0; 20.0; 40.0% (v/v) and non-sterilized: 0.3125; 0.625; 1.25; 2.5; 5.0; 10.0; 20.0 and 40.0% (v/v) by dilutions in the culture media. As control, fungi were cultivated in the absence of the biofertilizer. The bioassay was conducted in a completely randomized design and the results were submitted to analysis of variance and regression, in addition to Tukey test ($p < 0.05$). Mycelial growth, percentage of inhibition and germination of fungal spores were evaluated. The sterilized biofertilizer did not promote biocontrol of *F. solani*, but its non-sterilized effect caused a satisfactory biocontrol at the concentration of 2.5%, with inhibitions of approximately 64% and 85% in the mycelial growth of fungi F1 and F2, respectively. The metabolites produced by the microbial population present in the biofertilizer were essential for its suppressive effect, as well as for the decline in the spore germination percentage as the dose increased. In conclusion, the biofertilizer MICROGEO[®] has an in vitro suppressive effect on *F. solani* and antibiosis was the main mechanism of biocontrol performed by its microbial population.

Keywords: Antibiosis. Microbial biodiversity. Biofertilizer. Fusariosis. *Manihot esculenta* Crantz.

5.2 INTRODUÇÃO

A adaptabilidade às diversas condições de cultivo e a versatilidade de usos fazem da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) uma cultura muito relevante tanto social quanto economicamente (BURNS et al., 2010). O maior interesse está em suas raízes tuberosas, no entanto, a planta pode ser completamente aproveitada, seja para nutrição humana e animal, ou como matéria prima para indústrias alimentícias, farmacêuticas e de produção de energia (BANDYOPADHYAY et al., 2006). É considerada a sexta cultura de maior produção mundial e dentre os países produtores, o Brasil ocupa a quarta posição (FAO 2015; CONAB, 2017).

A fusariose é uma das doenças mais nocivas à sua produção. Ocasionalmente por fungos edáficos do gênero *Fusarium*, interfere diretamente na qualidade das raízes colhidas, prejudicando a comercialização. Seus agentes causais são aptos a colonizar hospedeiros alternativos e capazes de sobreviver no solo por longos períodos e em condições adversas, além de inutilizar áreas para plantio ao longo dos ciclos da cultura (NOTARO et al., 2013; SILVA et al., 2016). Aliado a estes fatores, a ausência de fungicidas químicos registrados dificultam o manejo fitossanitário desta doença (BRASIL, 2017), o que incide sobre a necessidade de alternativas de controle.

Uma das formas alternativas seria a manipulação das características físico-químicas e microbiológicas do solo por meio de práticas de manejo que enriqueçam a biodiversidade e atividade microbiana edáfica (QIU et al., 2012; BARROS et al., 2014). Os microrganismos do solo desempenham papéis cruciais, como decomposição da matéria orgânica presente, atuação nos ciclos biogeoquímicos dos nutrientes, além de antagonismo aos fitopatógenos, por criar um ambiente competitivo e deletério à eles (SHEN et al., 2015). Neste contexto, o emprego de adubos biológicos, também denominados biofertilizantes surge não somente como complementação à nutrição mineral de forma sustentável, mas também restabelecendo a biodiversidade microbiana do solo (QIU et al., 2012; BHARDWAJ et al. 2014; FU et al., 2017).

Biofertilizantes ou adubos biológicos são compostos bioativos produzidos em um processo de compostagem líquida contínua, onde ocorre fermentação de materiais orgânicos de origem vegetal e animal (esterco bovino e conteúdo ruminal, por exemplo) por bactérias e leveduras, juntamente com água (MEDEIROS; LOPES, 2006; SILVA et al., 2007). Sua composição é variável conforme o material orgânico utilizado e possuem macro e

micronutrientes necessários à nutrição vegetal, além de microrganismos benéficos vivos que podem conferir efeitos fito hormonais e supressivos à diversos fitopatógenos em diferentes culturas, conforme constatado por Hridya et al. (2013), contra *Phytophthora palmivora* na cultura da mandioca; Shen et al. (2015) e Zhang et al. (2014), contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* em bananeiras e Qiu et al. (2012), contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* em pepino.

Apesar de seus efeitos serem mais lentos que fungicidas químicos, são cumulativos e duradouros, além de menos prejudiciais ao ecossistema (BAILEY; LAZAROVITS, 2003; BHARDWAJ et al., 2014). Sua aplicação se dá via foliar ou diretamente no solo (MEDEIROS; LOPES, 2006) e seu desempenho na supressividade de doenças está ligado à sua diversidade microbiológica, à microbiota edáfica e a fatores como tipo de solo, condições climáticas e manejo adotado (AKTER et al., 2013). Bonilla et al. (2012) complementam que a supressão de doenças não é atribuída a toda a população microbiana do biofertilizante, mas sim à atividade e mecanismos de biocontrole empregados por grupos específicos de microrganismos presentes. Desta forma, o objetivo do trabalho foi verificar a ação supressiva *in vitro* do adubo biológico MICROGEO[®] sobre isolados de *Fusarium solani*.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Isolamento, caracterização morfológica e identificação molecular dos isolados de *Fusarium*

O isolamento, caracterização morfológica macroscópica e microscópica e identificação molecular dos isolados de *Fusarium* ocorreu conforme descrição apresentada nos itens 4.3.1 e 4.3.2 do artigo A.

5.3.2 Determinação da comunidade microbiana do adubo biológico

O adubo biológico utilizado foi obtido por meio de compostagem líquida contínua de MICROGEO[®] juntamente com conteúdo ruminal bovino e água. A calda foi

agitada diariamente por 25 dias, após este período foi mantido em repouso por 24 horas. Foram determinados os grupos funcionais de microrganismos presentes na calda, tais como populações de fungos totais, bactérias heterotróficas, *Pseudomonas fluorescens*, actinomicetos e população de microrganismos pertencentes ao ciclo do carbono (celulolíticos, proteolíticos e amilolíticos), ao ciclo do nitrogênio (fixadores de nitrogênio de vida livre) e ao ciclo do fósforo (solubilizadores de fosfato) pelo método de diluição seriada e plaqueamento em meio de cultura seletivo (Tabela 1).

Do adubo biológico obteve-se uma amostra, a qual foi previamente filtrada em papel filtro comum, seguido de diluição seriada até 10^{-3} . Após a homogeneização, 50 μL foram semeados sobre o meio de cultura solidificado específico e seletivo e uniformizado com o auxílio da alça de Drigalski. As placas foram mantidas em B.O.D. a 25 °C e a avaliação foi realizada 48 a 72 horas após a incubação, determinando as unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC mL^{-1}) e valores transformados em razão logarítmica (LogUFC mL^{-1}).

Tabela 1 - Meios de cultura seletivos utilizados para análise microbiana do adubo biológico.

Grupo funcional	Meio de cultura	Diluição plaqueada
Fungos Totais	B.D.A (Acumedia®)	
Actinomicetos	Casein agar (KUSTER; WILLIANS, 1964)	10 ⁻²
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	King B (MISAGHI et al., 1982)	
Solubilizadores de fosfato	SF (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982)	
Bactérias Heterotróficas	T.S.A (Acumedia®)	
Celulolíticos	Celulolítico (WOOD, 1980)	10 ⁻³
Proteolíticos	Proteolítico (PONTECORVO et al., 1953 – modificado)	
Amilolíticos	Amido-caseína (PONTECORVO et al., 1953)	
Fixadores biológicos de Nitrogênio (Nfb)	Nfb (DOBEREINER; DAY, 1976)	

5.3.3 Efeito do adubo biológico na taxa de crescimento micelial de *Fusarium solani*

Os testes com o adubo biológico foram realizados, *in vitro*, com o produto *in natura* (não esterilizado) e esterilizado. Para a esterilização do mesmo, uma amostra foi submetida aos seguintes procedimentos: correção do pH para 6,8-7,2; filtragem em papel filtro comum; centrifugação a 4.000 rotações por minuto (rpm) por 20 minutos; centrifugação

do sobrenadante a 10.000 rpm por 10 minutos e esterilização por filtração em bomba de vácuo com membrana Millipore de 0,22 µm.

O adubo biológico esterilizado foi testado em meio B.D.A (batata-dextrose-ágar) e T.S.A (tryptic-soy-agar) nas concentrações: 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0% (v/v). Já o efeito *in natura* foi verificado em meio T.S.A nas concentrações: 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0% (v/v). O produto foi diluído nos meios de cultura depois que estes foram esterilizados em autoclave, porém antes de sua solidificação. Como testemunhas, os isolados de *F. solani* foram cultivados na ausência do adubo biológico.

Discos de 8 mm de diâmetro de micélio de *F. solani* foram repicados para o centro das placas de Petri (90 mm de diâmetro) contendo o meio de cultura acrescido do adubo biológico. As condições de incubação foram de 25 °C com fotoperíodo de 12 horas por 7 dias.

O diâmetro micelial dos isolados de *F. solani* foi medido diariamente, nos dois sentidos perpendiculares da placa de Petri, a fim de obter a média dos diâmetros (mm) de cada colônia, para o cálculo do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), conforme Oliveira (1991): $IVCM = \sum (D - D_a) / N$; sendo: D = diâmetro atual da colônia, D_a = diâmetro da colônia no dia anterior e N = número de dias após a inoculação.

Para a avaliação da inibição do crescimento micelial foram utilizados os valores dos diâmetros das colônias do último dia de incubação e aplicou-se a fórmula descrita por Silva (2011): % inibição = $[(C - T) / C] \times 100$, sendo C = Diâmetro do crescimento micelial da colônia controle, T = diâmetro do crescimento micelial do tratamento.

5.3.4 Efeito do adubo biológico na germinação de esporos de *Fusarium solani*

A germinação dos esporos dos isolados de *F. solani* ocorreu em lâminas de microscopia contendo meio de cultura T.S.A. acrescido do adubo biológico *in natura* nas concentrações: 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0% (v/v). Como testemunha, a germinação dos esporos ocorreu na ausência do produto. Sobre as lâminas de microscopia foram inoculados 50 µL de uma suspensão de esporos provenientes de colônias de *F. solani* com cinco dias de cultivo. A concentração dos esporos foi ajustada a 1×10^5 conídios mL⁻¹ de suspensão, obtida por leitura em câmara de Neubauer. Após a inoculação, as lâminas foram colocadas em placas de Petri contendo algodão umedecido com água destilada estéril, para obtenção de alta umidade relativa. O conjunto foi colocado em câmara climática B.O.D. a

25°C por 6 horas. A germinação foi determinada por meio da contagem de esporos germinados e não germinados em quatro campos de visão escolhidos ao acaso, perfazendo um mínimo de 100 esporos por campo, a fim de se obter a porcentagem de germinação.

5.3.5 Análise estatística dos resultados

O bioensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e os resultados submetidos à análise de variância, com posterior análise de regressão e teste Tukey ($p < 0,05$).

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1 Isolamento, caracterização morfológica e identificação molecular dos isolados de *Fusarium*

A caracterização morfológica macroscópica e microscópica de *Fusarium* possibilitaram a identificação de dois isolados, denominados F1 e F2, confirmados para a espécie *F. solani* após identificação molecular, conforme os itens 4.4.1 e 4.4.2 do artigo A.

5.4.2 Composição microbiana do adubo biológico

A contagem da população microbiana contida no adubo biológico demonstrou considerável diversidade de microrganismos (Tabela 2), participantes do ciclo biogeoquímico do carbono (celulolíticos, proteolíticos e amilolíticos), do nitrogênio (fixadores de nitrogênio de vida livre) e do fósforo (solubilizadores de fosfato). A presença de actinomicetos e *Pseudomonas fluorescens* também é fundamental, uma vez que estes microrganismos são considerados fortes agentes de biocontrole (WHIPPS, 2001; RODRIGUES, 2009; HRIDYA et al., 2013). Segundo Tratch e Bettioli (1997), somente parte da população de microrganismos é passível de contagem em meios seletivos, de tal forma que a população real seja superior à detectada.

Tabela 2 - Comunidade microbiana do adubo biológico utilizado.

Grupo funcional*	FT	BAC	ACT	CEL	PRO	AMI	Nfb	Psf	SF
LogUFC mL ⁻¹	3,97	7,01	4,80	4,88	5,07	5,21	6,14	3,50	0,00

*Populações de fungos totais (FT), bactérias heterotróficas (BAC), actinomicetos (ACT), celulolíticos (CEL), proteolíticos (PRO), amilolíticos (AMI), fixadores de nitrogênio de vida livre (Nfb), *Pseudomonas fluorescens* (Psf) e solubilizadores de fosfato (SF).

A composição microbiana encontrada no adubo biológico (Tabela 2) é relevante para seu desempenho na supressão de doenças. Geralmente, problemas fitossanitários associados a fungos do solo como *Fusarium* spp. estão vinculados à diminuição da diversidade microbiana presente no mesmo (PALMIERI et al., 2016). Desta forma, a reestruturação da microbiota por intermédio da aplicação de um biofertilizante rico em microrganismos, além de acelerar a degradação da matéria orgânica do solo e disponibilizar os nutrientes de forma assimilável para as plantas, auxilia no controle de doenças ocasionadas por fitopatógenos edáficos por propiciar um ambiente competitivo (MAHDI et al., 2010). Barros et al. (2014) observaram que a supressividade de um solo à podridão radicular de mandioca por *Fusarium solani* era favorecida pelo aumento de sua biodiversidade conforme o sistema de cultivo e manejo empregado na área, e que as maiores severidades da doença ocorria em solos com histórico de monocultura.

5.4.3 Ação do adubo biológico esterilizado no crescimento micelial de *Fusarium solani*

O adubo biológico esterilizado promoveu maior crescimento micelial dos isolados de *F. solani* (F1 e F2) em meio B.D.A em comparação às testemunhas. Com aumento das concentrações do produto houve incremento no índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos isolados F1 ($R^2 = 0,7599$) e F2 ($R^2 = 0,5403$) de *F. solani* (Figuras 1A e 1B).

A eficiência dos adubos biológicos ou biofertilizantes está relacionada à sua composição química e microbiológica (KUPPER et al., 2009). A não inibição no desenvolvimento de *F. solani* cultivado em meio B.D.A. acrescido do adubo biológico esterilizado (Figuras 1A e 1B) pode estar relacionada à ausência de microrganismos antagonistas e o favorecimento no crescimento micelial ao meio de cultura utilizado, bem

como à composição química do produto, rico em aminoácidos, carboidratos, proteínas e outros compostos provenientes do metabolismo microbiano promovido na compostagem líquida contínua (D'ANDRÉA, 2002).

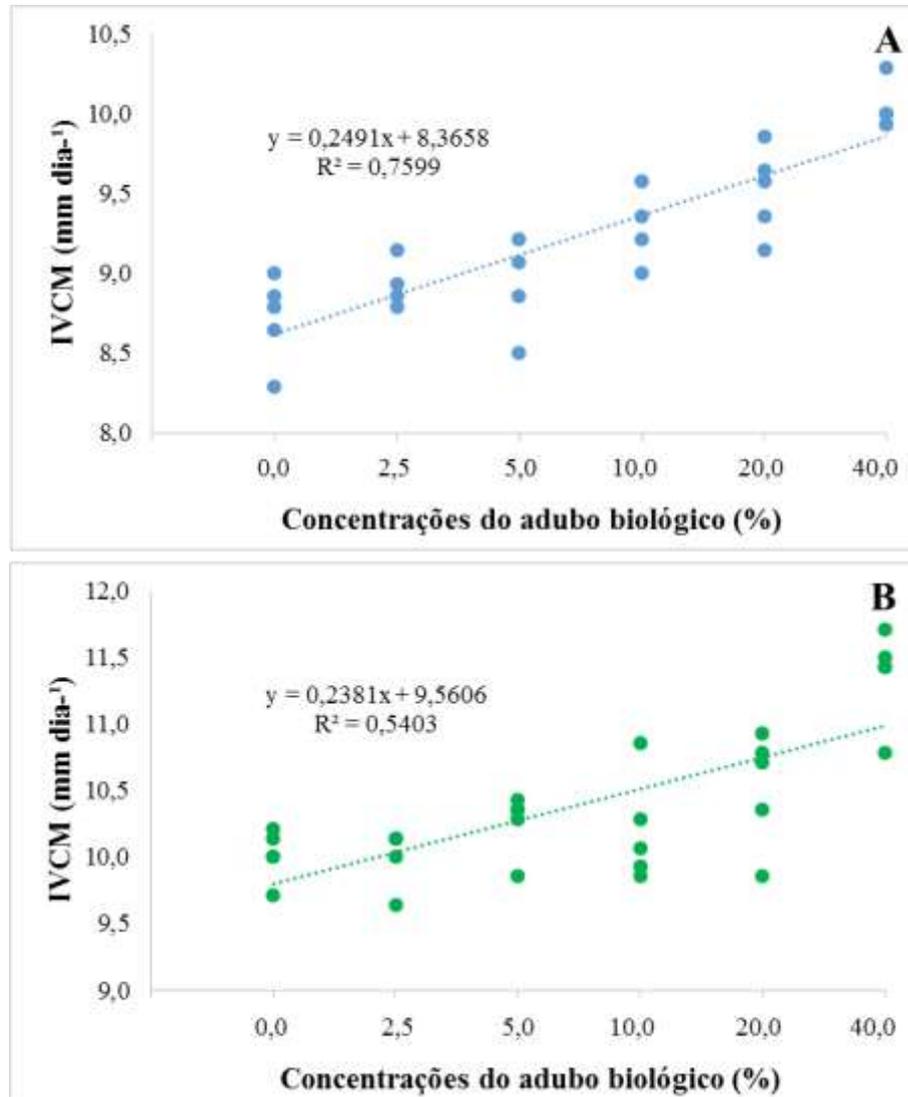


Figura 1 - Efeito do adubo biológico esterilizado no Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos isolados F1 (A) e F2 (B) de *Fusarium solani* em meio de cultura B.D.A.

Quando cultivado em meio T.S.A., o adubo biológico esterilizado não surtiu efeito significativo sobre o IVCM do isolado F1 de *F. solani* (Figura 2A). No entanto, para o isolado F2 houve decréscimo pouco acentuado em seu IVCM (Figura 2B), apresentando porcentagem média de inibição de apenas 5,74% na maior concentração testada (Figura 3).

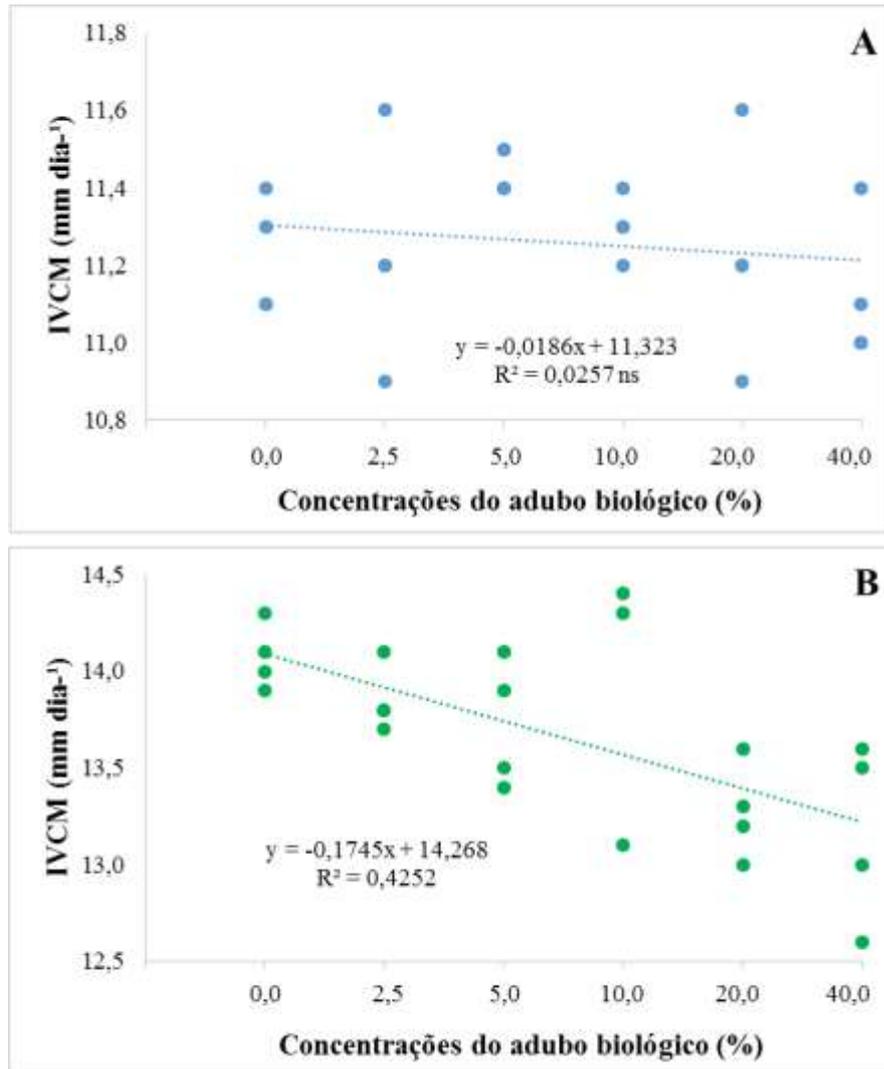


Figura 2 - Efeito do adubo biológico esterilizado no Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos isolados F1 (A) e F2 (B) de *Fusarium solani* em meio de cultura T.S.A.

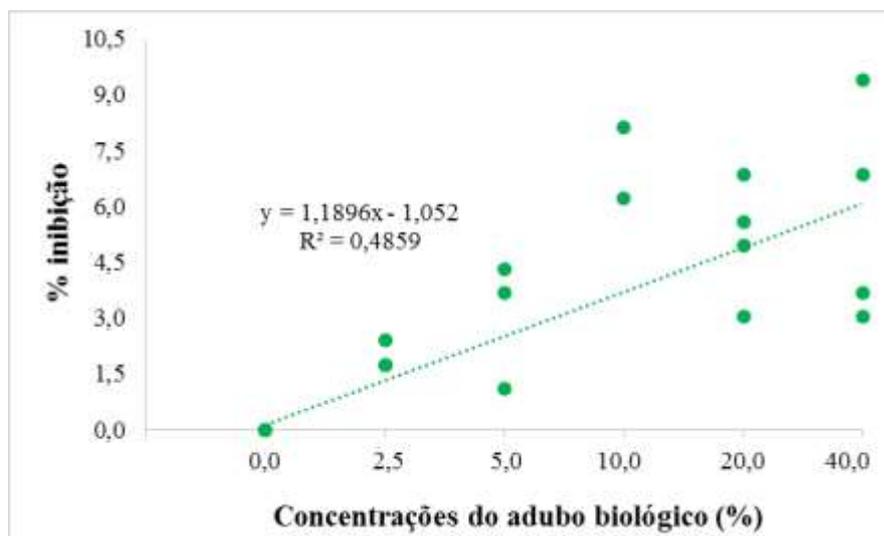


Figura 3 - Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Fusarium solani* (F2) em meio de cultura T.S.A sob efeito das concentrações do adubo biológico esterilizado.

5.4.4 Ação do adubo biológico *in natura* no crescimento micelial de *Fusarium solani*

A ação do adubo biológico *in natura* (não esterilizado) foi semelhante para os dois isolados (F1 e F2) de *F. solani*. Observou-se decréscimo acentuado do IVCN até a concentração de 2,5% do produto (Figuras 4A e 4B), não diferindo para as demais concentrações pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

O adubo biológico *in natura*, na concentração 2,5%, promoveu inibições de aproximadamente 64% no crescimento micelial do isolado F1 (Figura 5A) e 85% sobre o isolado F2 de *F. solani* (Figura 5B). Assim como observado com o IVCN dos fungos (Figuras 4A e 4B), à partir da concentração de 2,5% do produto *in natura*, seu efeito sobre a porcentagem de inibição não diferiu estatisticamente pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Resultados semelhantes foram observados por Tratch e Bettiol (1997) quanto ao efeito de um biofertilizante produzido por fermentação anaeróbica de esterco bovino enriquecido de compostos orgânicos sobre o crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Neste estudo, observaram que o biocontrole do fitopatógeno foi efetivo à partir da concentração de 10% do produto, não diferindo para as maiores concentrações testadas.

Para aplicações foliares, biofertilizantes geralmente são pulverizados em concentrações que variam de 0,1 a 5% do produto diluído em água. Associadas à sua composição nutricional e microbiana, a aplicação de concentrações muito elevadas podem interferir no desenvolvimento da planta, ocasionando estresse fisiológico, além de favorecer o crescimento vegetativo e retardar seu estágio reprodutivo (PINHEIRO; BARRETO, 1996; MEDEIROS; LOPES, 2006). As recomendações técnicas preconizadas pelo fabricante deste adubo biológico utilizado preconizam doses de 3 a 5% do produto diluído em água.

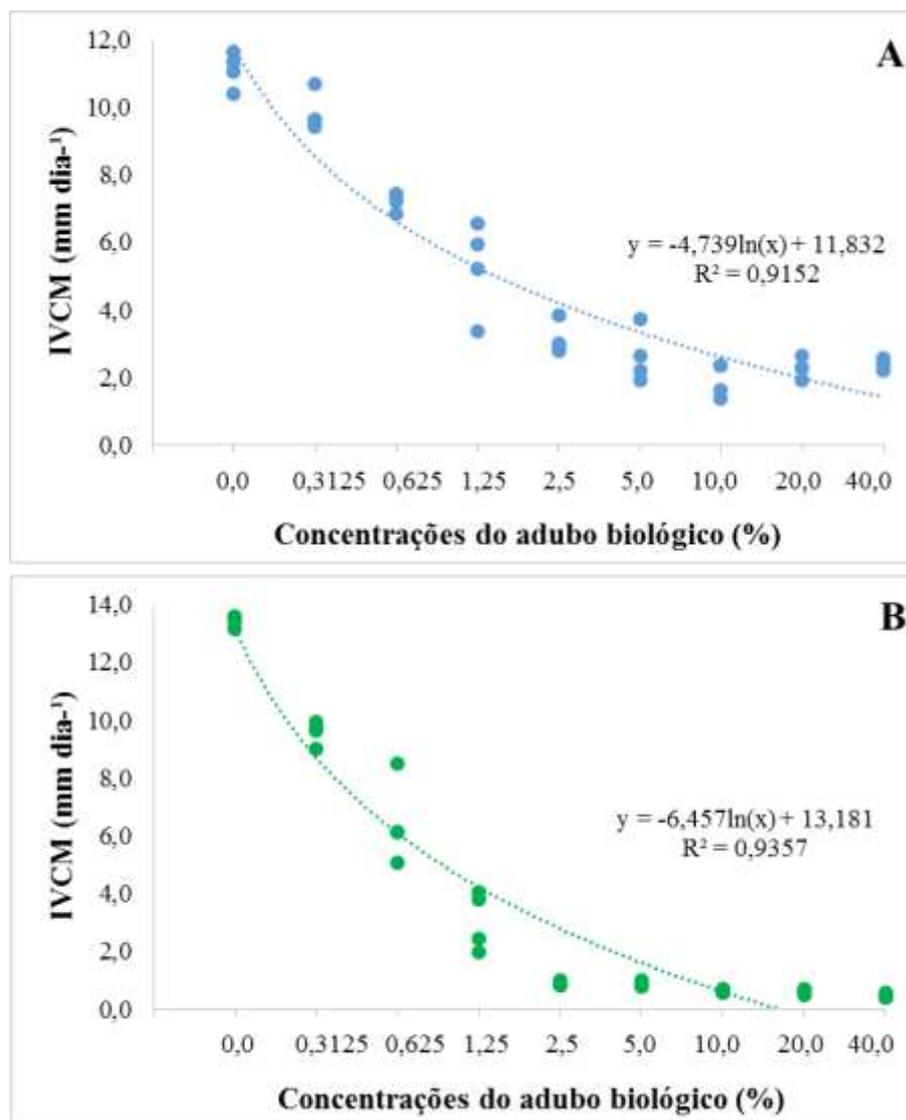


Figura 4 - Efeito do adubo biológico *in natura* no Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos isolados de F1 (A) e F2 (B) de *Fusarium solani*.

O comportamento da população microbiana presente no adubo biológico (Tabela 2) foi primordial para o controle biológico *in vitro* de *F. solani* (Figuras 6 e 7). Sendo a comunidade microbiana rica e diversa, há a possibilidade de ocorrência simultânea dos mecanismos de ação dos microrganismos, como parasitismo, competição por nutrientes, produção de compostos antimicrobianos (KUPPER et al., 2009). Os resultados de IVCM (Figura 4) e porcentagem de inibição dos fitopatógenos (Figura 5) inferem que na presença dos fungos fitopatogênicos, os microrganismos contidos no adubo biológico foram capazes de produzir metabólitos antimicrobianos pelo mecanismo de biocontrole denominado antibiose. Um fato relevante para a confirmação deste mecanismo foi a não inibição de *F. solani* sob efeito do produto esterilizado.

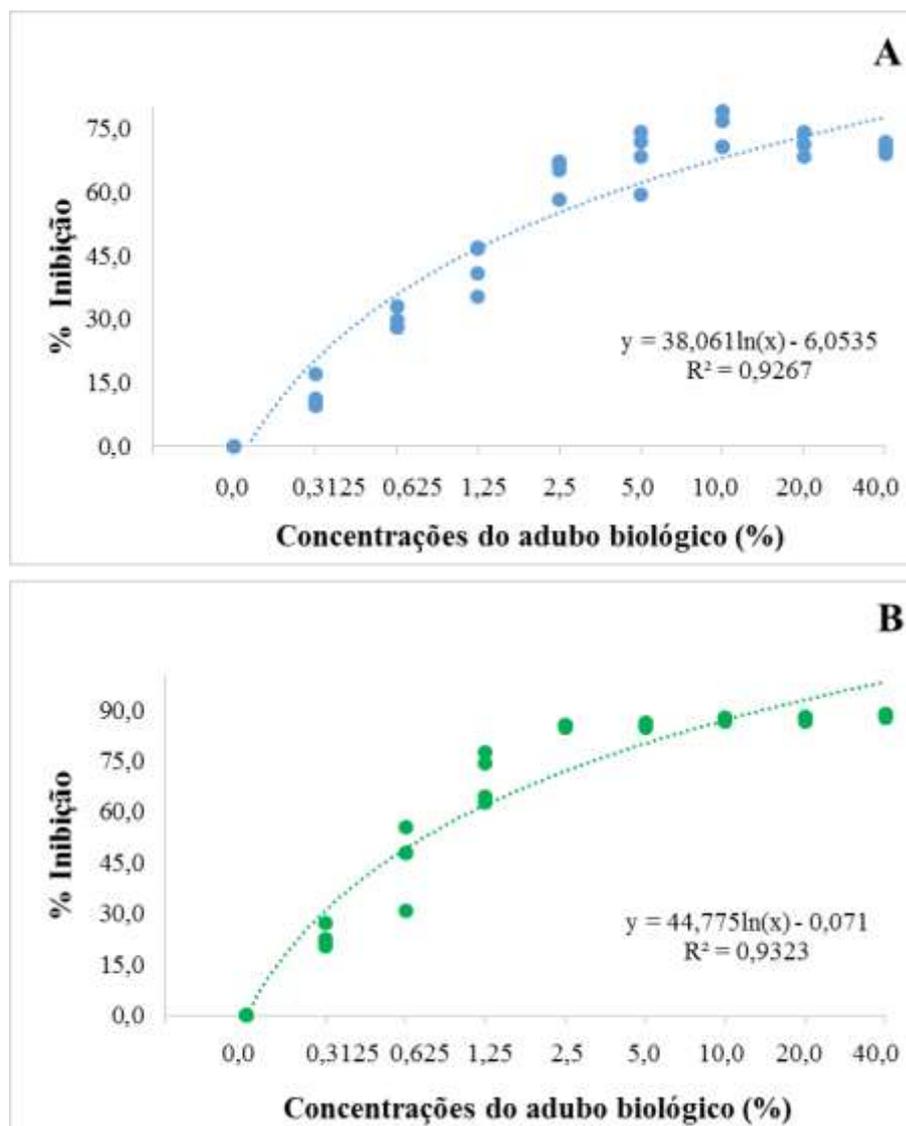


Figura 5 - Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos isolados F1 (A) e F2 (B) de *Fusarium solani* sob efeito das concentrações do adubo biológico *in natura*.

O efeito supressivo *in vitro* e *in vivo* de biofertilizantes à diversos fitopatógenos tem sido relatado por muitos autores em culturas como citros (KUPPER et al. 2006), pepino (QIU et al., 2012; AKTER et al., 2013) e banana (ZHANG et al., 2011; WANG et al., 2013; SHEN et al., 2015). Em experimento realizado por Shen et al. (2013) com fusariose (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) na cultura da banana, testaram-se diferentes compostos orgânicos, além de um biofertilizante à base de esterco de porco e aminoácidos inoculado com cepa antagonista de *Bacillus amyloliquefaciens*. A ação do biofertilizante reduziu a incidência da doença à apenas 20% comparado aos outros tratamentos. Além da supressão da doença por meio do enriquecimento e estimulação da microbiota edáfica, observou-se aumento na produção da cultura.

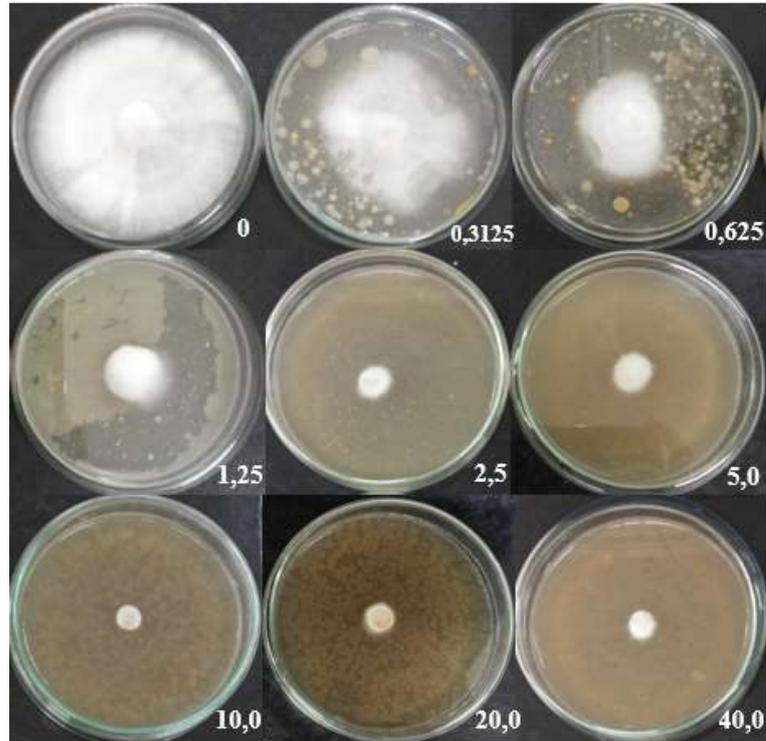


Figura 6 - Biocontrole *in vitro* de *Fusarium solani* (F1) pela ação do adubo biológico *in natura* nas concentrações (v/v): 0 - testemunha; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40%. Colônias com 7 dias de cultivo em meio de cultura T.S.A.

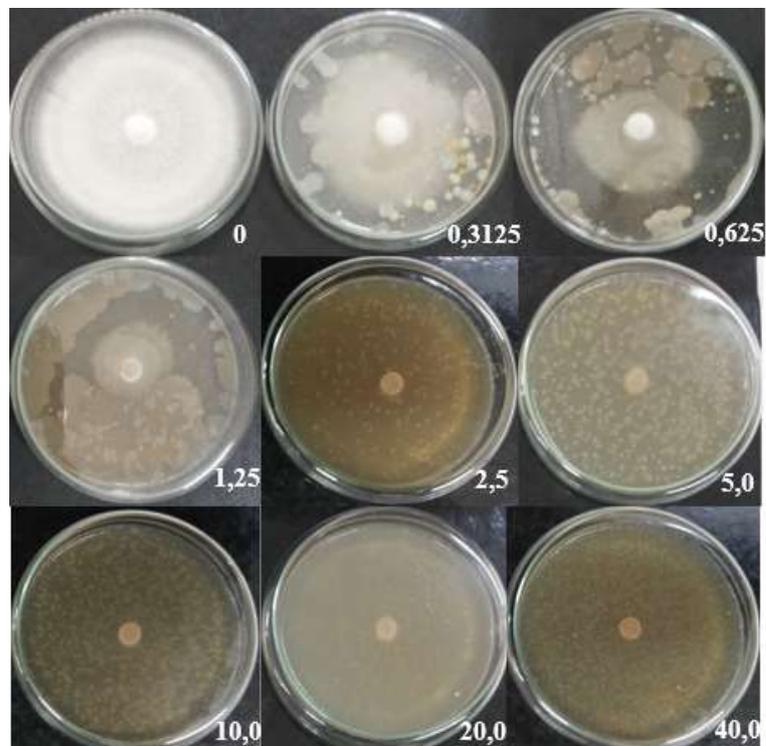


Figura 7 - Biocontrole *in vitro* de *Fusarium solani* (F2) pela ação do adubo biológico *in natura* nas concentrações (v/v): 0 - testemunha; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40%. Colônias com 7 dias de cultivo em meio de cultura T.S.A.

5.4.5 Ação do adubo biológico *in natura* na germinação de esporos de *Fusarium solani*

O efeito do adubo biológico *in natura* foi significativo para porcentagem de germinação dos esporos de *F. solani* F1 e F2. Em relação à testemunha, observou-se declínio na porcentagem de germinação conforme aumento da concentração do produto, resultando em redução de aproximadamente 34% na germinação dos esporos do isolado F1 e 52% para o isolado F2 na maior concentração testada (Figuras 8A e 8B).

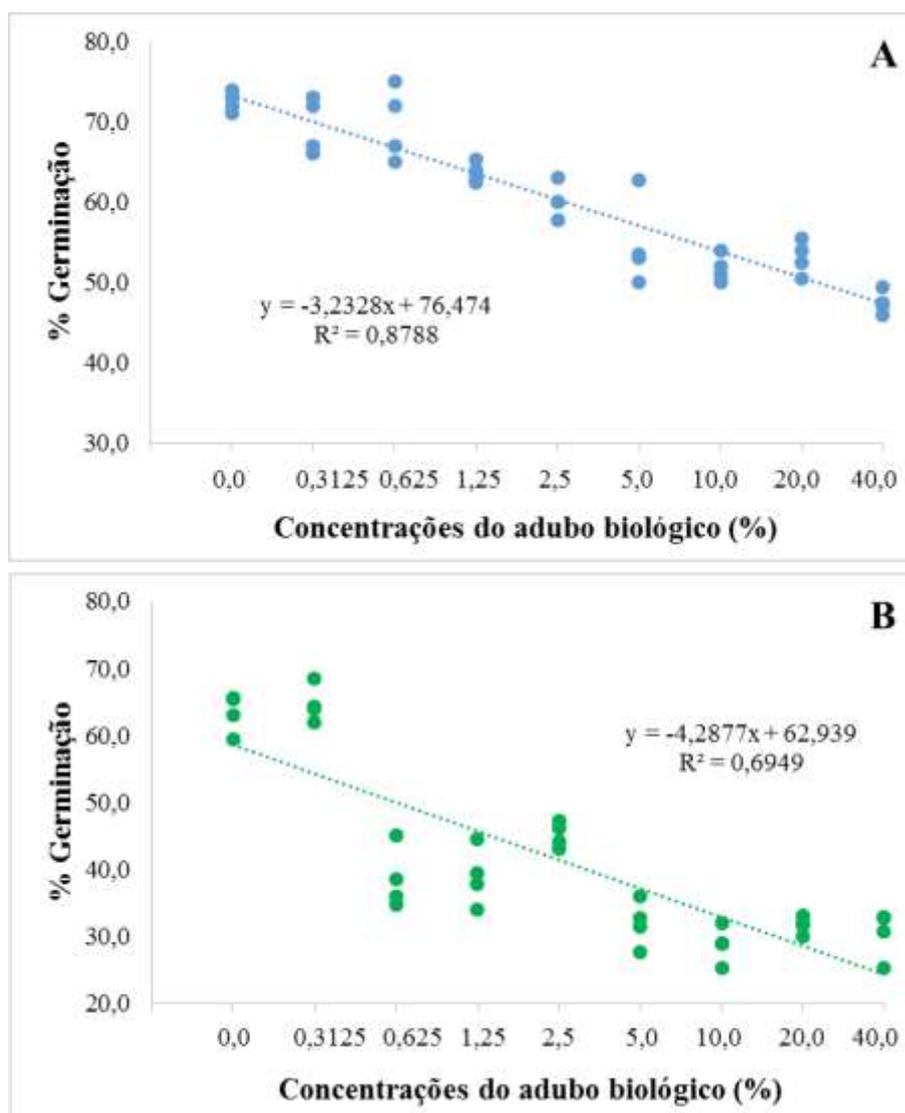


Figura 8 - Porcentagem de germinação dos esporos dos isolados F1 (A) e F2 (B) de *Fusarium solani* sob efeito das concentrações do adubo biológico *in natura*.

Os resultados obtidos mostraram-se convergentes aos verificados por Kupper et al. (2009), os quais analisaram o efeito de diferentes concentrações de dois

biofertilizantes à base de esterco bovino, um produzido sobre condições anaeróbias (Bio1) e outro sob condições aeróbias (Bio2), sobre a porcentagem de germinação de esporos de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura de frutos cítricos. Os autores verificaram inibições superiores a 50% na germinação dos esporos sob efeito dos produtos em concentrações acima de 10%, com destaque para Bio2, o qual apresentou maiores porcentagens de inibições.

Tratch e Bettioli (1997) também observaram o efeito nocivo de biofertilizantes na germinação de esporos de vários fungos fitopatogênicos. Para o fungo *Botrytis cinerea*, concentrações acima de 20% inibiram completamente a germinação dos esporos, já para *Alternaria solani*, a concentração de 10% foi suficiente.

Frente às vantagens da utilização de biofertilizantes ou adubos biológicos para a manutenção das características químicas, físicas e microbiológicas do solo e suas respostas na supressão de fitopatógenos e desenvolvimento das culturas agrícolas, é cada vez mais plausível sua inserção em sistemas de produção agropecuária sustentáveis (MAHDI et al., 2010; BHARDWAJ et al., 2014).

5.5 CONCLUSÕES

A utilização do adubo biológico MICROGEO® *in natura* na concentração de 2,5% foi suficiente para promover inibição do crescimento micelial dos isolados fitopatogênicos, confirmando forte ação supressiva sobre a doença.

Na presença dos fitopatógenos, houve produção de metabólitos antimicrobianos pelos microrganismos de sua composição pelo mecanismo de antibiose.

A ação do adubo biológico *in natura* resultou em diminuição na germinação dos esporos dos fitopatógenos.

REFERÊNCIAS

- AKTER, Z.; WEINMANN, M.; NEUMANN, G.; RÖMHELD, V. An in-vitro screening method to study the activity potential of biofertilizers based on *Trichoderma* and *Bacillus* sp.. **Journal of Plant Nutrition**, v. 36, n. 9, p. 1439-1452, 2013.
- BAILEY, K. L.; LAZAROVITS, G. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. **Soil & Tillage Research**, v. 72, p. 169–180, 2003.
- BANDYOPADHYAY, R.; MWANGI, M.; AIGBE, S.O.; LESLIE, J.F. *Fusarium* species from cassava root rot complex in West Africa. **Phytopathology**, v. 96, p. 673-676, 2006.
- BARROS, J. A.; MEDEIROS, E. V.; NOTARO, K. A.; MORAES, W. S.; SILVA, T. C. E. S.; MOREIRA, K. A. Different cover promote sandy soil suppressiveness to root rot disease of cassava caused by *Fusarium solani*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, p. 967–973, 2014.
- BHARDWAJ, D.; ANSARI, M. W.; SAHOO, R. K.; TUTEJA, N. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 66, 2014.
- BONILLA, N.; GUTIÉRREZ-BARRANQUERO, J. A.; VICENTE, A.; CAZORLA, F. M. Enhancing Soil Quality and Plant Health Through Suppressive Organic Amendments. **Diversity**, v. 4, p. 475-491, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Defesa Agropecuária: Agrotóxicos, 2017. Disponível em: < http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons > Acesso em: 17 jun. 2015.
- BURNS, A.; GLEADOW, R.; CLIFF, J.; ZACARIAS, A.; CAVAGNARO, T. Cassava: The Drought, War and Famine Crop in a Changing World. **Sustainability**, v. 2, p. 3572-3607, 2010.
- CONAB. Mandioca: Raíz, Farinha e Fécula. **Conjuntura Mensal**. 9p. Jan, 2017. Disponível em: < http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_02_16_17_38_32_17.pdf >. Acesso em: 08 jan. 2017.

D'ANDRÉA, P. A. Microbiol Indústria e Comércio Ltda. **Processo de compostagem líquida contínua – CLC e Biofertilizante**. BR n. PI 0207342-0, 14 nov. 2002, 14 nov. 2022.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: **Proceedings of the 1st international symposium on nitrogen fixation**. Washington State University Press Pullman, p. 518-538, 1976.

FAO. Statistical Pocket Book. **World food and agriculture**. 236 p. 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i4691e.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2016.

FU, L.; PENTON, C. R.; RUAN, Y.; SHEN, Z.; XUE, C.; LI, R.; SHEN, Q. Inducing the rhizosphere microbiome by biofertilizer application to suppress banana *Fusarium* wilt disease. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 104, p. 39-48, 2017.

HRIDYA, A. C.; BYJU, G.; MISRA, R. S. Effect of biocontrol agents and biofertilizers on root rot, yield, harvest index and nutrient uptake of cassava (*Manihot esculanta* Crantz). **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 59, n. 9, 2013.

KIM, D. H.; MARTYN, R. D.; MAGILL, C. W. Restriction fragment length polymorphism groups and physical map of mitochondrial DNA from *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. **Phytopathology**, v. 82, p. 346–353, 1992.

KUPPER, K. C.; BETTIOL, W.; DE GOES, A.; DE SOUZA, P. S., BELLOTTE, J. A. M. Biofertilizer for control of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **Crop Protection**, v. 25, p. 569–573, 2006.

KUPPER, K. C.; BELLOTTE, J. A. M.; DE GOES, A. Controle alternativo de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 4, p. 1004-1015, 2009.

KUSTER, E.; WILLIAMS, S. T. Selection of media for isolation of *Streptomyces*. **Nature**, v.202, p.928-929, 1964.

MAHDI, S. S.; HASSAN, G. I.; SAMOON, S. A.; RATHER, H. A.; DAR, S. A.; ZEHRA, B. Bio-fertilizers in organic agriculture. **Journal of Phytology**, v. 2, n. 10, 2010.

MEDEIROS, M. B; LOPES, J. S. Biofertilizantes líquidos e sustentabilidade agrícola. **Bahia Agríc.**, v.7, n.3, nov. 2006.

MISAGHI, I. J.; STOWELL, L. J.; GROGAN, R. G.; SPEARMAN, L. C. Fungi static activity of water-soluble fluorescent pigments of fluorescent pseudomorphs. **Phytopathology**, v. 72, p. 33-36, 1982.

NOTARO, K.A.; MEDEIROS, E.V.; SILVA, C.A.D.; BARROS, J.A. Prospecção de fitopatógenos associados à podridão radicular da mandioca em Pernambuco, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 29, p.1832-1839, 2013.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**.1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade), Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

PALMIERI, D.; VITULLO, D.; DE CURTIS, F.; LIMA, G. A microbial consortium in the rhizosphere as a new biocontrol approach against *Fusarium* decline of chickpea. **Plant and Soil**, p. 1-15, 2016.

PINHEIRO, S.; BARRETO, S. B. Agricultura sustentável, trofobiose e biofertilizantes. Porto Alegre: Ed. Junqueira Candiru. 276p. 1996.

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMONS, L. M.; McDONALDS, K. D.; BUFFON, A. W. J. The genetic of *Aspergillus nidulans*. **Adv. Gen.**, v. 5, p. 141-238, 1953.

QIU, M.; ZHANG, R.; XUE, C.; ZHANG, S.; LI, S.; ZHANG, N.; SHEN, Q. Application of bio-organic fertilizer can control *Fusarium* wilt of cucumber plant by regulation microbial community of rhizosphere soil. **Biologic Fertility Soils**, v. 48, p. 807-816, 2012.

RODRIGUES, A. A. **Atividade antimicrobiana e produção de enzimas de interesse biotecnológico de bactérias isoladas de diferentes habitats**. 2009. 68 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2009.

SHEN, Z.; RUAN, Y.; WANG, B.;ZHONG, S.; SU, L.; LI, R.; SHEN, Q. Effect of biofertilizer for suppressing *Fusarium* wilt disease of banana as well as enhancing microbial and chemical properties of soil under greenhouse trial. **Applied Soil Ecology**, v. 93, p. 111–119, 2015.

SHEN, Z.; ZHONG, S.; WANG, Y.; WANG, B.; MEI, X.; LI, R.; RUAN, Y.; SHEN, Q. Induced soil microbial suppression of banana fusarium wilt disease using compost and biofertilizers to improve yield and quality. **European journal of soil biology**, v. 57, p. 1-8, 2013.

SILVA, A. F; PINTO, J. M; FRANÇA, C. R. R. S; FERNANDES, S. C; GOMES, T. C. A; SILVA, M. S. L; MATOS, A. N. B. **Preparo e uso de biofertilizantes líquidos**. EMBRAPA. Comunicado técnico, n. 130, 2007.

SILVA, A. N. **Efeito de produtos químicos de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium solani* do maracujazeiro**. 2011. 53 f. Dissertação (Mestrado em agronomia), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2011.

SILVA, J. A. T; MEDEIROS, E. V.; SILVA, J. M.; TENÓRIO, D. A.; MOREIRA, K. A.; NASCIMENTO, T. C. E. S.; SOUZA-MOTTA, C. *Trichoderma aureoviride* URM 5158 and *Trichoderma hamatum* URM 6656 are Biocontrol Agents that act against Cassava Root rot through different Mechanisms. **Journal of Phytopathology**, v. 164, p. 1003-1011, 2016.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LATORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L.A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na amazônia. **Acta Amazonica**. Manaus, v. 12, p. 15-22, out. 1982.

TRATCH, R.; WAGNER BETTIOL, W. Efeito de biofertilizantes sobre o crescimento micelial e a germinação de esporos de alguns fungos fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, n. 2, p. 1131-1139, 1997.

WANG, B. B.; YUAN, J.; ZHANG, J.; SHEN, Z. Z.; ZHANG, M. X; LI, R.; RUAN, Y. X.; SHEN, Q. R. Effects of novel bioorganic fertilizer produced by *Bacillus amyloliquefaciens* W19 on antagonism of Fusarium wilt of banana. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, p. 435–446, 2013.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 487-511, 2001.

WOOD, P. J. Specify in the interactions of direct dyes with polysaccharides. **Carbohydrate Res.**, v. 85, p. 271-287, 1980.

ZHANG, N.; WU, K.; HE, X.; LI, S. Q.; ZHANG, Z.H.; SHEN, B.; YANG, X.M.; ZHANG, R. F.; HUANG, Q. W.; SHEN, Q. R. A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *Bacillus subtilis* N11. **Plant and Soil**, v. 344, p. 87–97, 2011.

ZHANG, S.; HE, X.; ZHANG, J.; RAZA, W.; YANG, X.; RUAN, Y.; SHEN, Q.; HUANG, Q. Supression of *Fusarium* wilt of banana with application of bio-organic fertilizers. **Pedosphere**, v. 24, p. 613-624, 2014.

6 ARTIGO C: Bioprospecção de bactérias cavernícolas com potencial ação inibitória sobre *Fusarium solani*

6.1 RESUMO E ABSTRACT

RESUMO

A biosprossecção de bactérias com potencial de produção de metabólitos bioativos inibitórios a outros microrganismos demonstra-se promissora para o manejo de doenças de difícil controle, como a fusariose na cultura da mandioca. O objetivo do trabalho foi verificar o potencial inibitório de isolados bacterianos cavernícolas sobre o desenvolvimento de isolados de *Fusarium solani*. Os isolados de *F. solani* (F1 e F2) foram obtidos de raízes de mandioca com fusariose. O efeito antagônico de 49 isolados bacterianos cavernícolas (IS1 a IS49) foi testado pelo método de pareamento *in vitro*. Cada placa de Petri recebeu um disco de micélio do fungo e em quatro pontos equidistantes, a cepa bacteriana. As condições de incubação foram 25°C com fotoperíodo de 12 horas por 7 dias. Ao final do período de incubação mediu-se o crescimento micelial dos fungos, para obtenção da porcentagem de inibição. O bioensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado e os resultados foram submetidos à análise de variância, com posterior agrupamento das médias pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). *F. solani* (F1) sofreu ação inibitória de 43 isolados, com inibições variando de 22,91% (IS8) à 45,46% (IS26). *F. solani* (F2) foi sensível a 44 isolados e sua inibição variou de 28,31% (IS36) à 63,82% (IS10). Conclui-se que as bactérias cavernícolas demonstraram importante antagonismo aos fitopatógenos devido à ação de compostos antimicrobianos provenientes de seu metabolismo.

Palavras-chave: Isolados de caverna. *Manihot esculenta* Crantz. Podridão radicular. Potencial inibitório.

ABSTRACT

Biosprospection of bacteria with potential to produce bioactive metabolites inhibitory to other microorganisms has shown to be promising for the management of diseases with difficult control, such as fusariosis in cassava. The aim of this work was to verify the inhibitory potential of cave bacteria on the development of *Fusarium solani* isolates. *F. solani* isolates (F1 and F2) were obtained from cassava roots with fusariosis. The antagonistic effect of 49 cave bacterial isolates (IS1 to IS49) was tested by the *in vitro* dual culture method. Each Petri dish received a mycelial disc of the fungus and at four equidistant points, the bacterial strain. Incubation conditions were 25 °C with 12-hour photoperiod for 7 days. At the end of the incubation period, the fungal mycelial growth was measured to obtain the percentage of inhibition. The bioassay was performed in a completely randomized design and the results were submitted to analysis of variance, with a subsequent grouping of means by the Scott-Knott test ($p < 0.05$). *F. solani* (F1) underwent an inhibitory action of 43 isolates, with inhibitions varying from 22.91% (IS8) to 45.46% (IS26). *F. solani* (F2) was sensitive to 44 isolates and their inhibition ranged from 28.31% (IS36) to 63.82% (IS10). In conclusion, cave

bacteria showed important antagonism to the phytopathogens due to the action of antimicrobial compounds from their metabolism.

Keywords: Cave isolates. *Manihot esculenta* Crantz. Root rot. Inhibitory potencial.

6.2 INTRODUÇÃO

A bioprospecção fundamenta-se na busca por metabólitos primários e secundários produzidos por espécies de plantas, animais e microrganismos, que possuam potencial de uso em áreas distintas, como na indústria farmacêutica, alimentícia, nas ciências agrárias, entre outras (STROBEL; DAISY, 2003; GOHEL et al., 2006; KANCHISWAMY et al., 2015).

Exemplos clássicos de metabólitos naturais produzidos por microrganismos são a produção dos compostos antibióticos estreptomicina e penicilina produzidos por *Streptomyces* spp. e *Penicillium* spp., respectivamente (HWANG et al., 2001; PELÁEZ, 2006). A importância destes antibióticos para a indústria farmacêutica culmina na necessidade constante de exploração da biodiversidade presente nos mais diversificados ambientes com o intuito de descobrir novas moléculas bioativas, resultantes do metabolismo dos microrganismos e que sejam passíveis de extração e utilização no controle de doenças humanas, animais e de plantas (PELAEZ, 2006; RODRIGUES, 2009).

No que diz respeito à agricultura, a bioprospecção de compostos microbianos com potencial inibitório à fitopatógenos é de grande valor para a proteção de plantas, uma vez que o controle químico, apesar de muito utilizado, é mais nocivo ao meio ambiente e à saúde das pessoas, e nem sempre está disponível para determinadas doenças e culturas (KANCHISWAMY et al., 2015; KIM; VUJANOVIC, 2016).

A fusariose, podridão radicular ocasionada por fungos do gênero *Fusarium*, é uma das doenças mais nocivas e considerada de difícil manejo na cultura da mandioca. Isto ocorre devido à indisponibilidade de fungicidas químicos registrados e pela permanência de seu agente causal no solo por longos períodos (BUENO et al., 2007; SILVA et al., 2016; BRASIL, 2017). O fungo causa severas perdas na cultura por afetar principalmente a qualidade e interferir no rendimento do principal órgão da planta, a raiz (NOTARO et al., 2013). Desta forma, alternativas de manejo se fazem necessárias, como a biosprossecção de compostos antimicrobianos passíveis de exploração para o biocontrole deste fitopatógeno.

Geralmente, as espécies mais aptas a sintetizar metabólitos bioativos vivem em ambientes como desertos, vulcões e cavernas, com condições extremas de temperatura, pH, luminosidade, pressão osmótica, fontes nutricionais, entre outros fatores abióticos. Esta alta adaptabilidade os fazem desenvolver variadas vias metabólicas para seu crescimento (BARTON; JURADO; 2007; ENGEL, 2007; RODRIGUES, 2009).

As cavernas são locais isolados, pobres em recursos energéticos, com condições climáticas extremas, o que propicia uma habitat microbiano único, evoluído para a produção de enzimas e metabólitos secundários especializados, como os antibióticos, com potencial antagônico a outros microrganismos (BARTON; NORTHUP, 2007; KAMBESIS, 2007; GABRIEL; NORTHUP, 2013). Diante disto, o objetivo do trabalho foi verificar o potencial inibitório de cepas bacterianas cavernícolas sobre o desenvolvimento de *Fusarium solani*.

6.3 MATERIAL E MÉTODOS

6.3.1 Isolamento, caracterização morfológica e identificação molecular dos isolados de *Fusarium*

A metodologia utilizada para o isolamento, caracterização morfológica macroscópica e microscópica e identificação molecular dos isolados de *Fusarium* está descrita nos itens 4.3.1 e 4.3.2 do artigo A.

6.3.2 Obtenção dos isolados cavernícolas

As cepas bacterianas utilizadas foram gentilmente cedidas, em cooperação científica, pela Universidade Federal do Pará (UFPA) e haviam sido isoladas guanos de morcego, solos e paredes de cavernas presentes no município de Altamira- PA, totalizando 49 isolados, denominados IS1 a IS49.

6.3.3 Ação antagonista das bactérias cavernícolas sobre *Fusarium solani*

O antagonismo das bactérias cavernícolas contra *Fusarium solani* ocorreu pelo método de pareamento em placas de Petri contendo meio de cultura T.S.A (tryptic-soy-agar), conforme metodologia adaptada de Araújo et al. (2005). No centro de cada placa de Petri (90 mm de diâmetro) repicou-se um disco de 8 mm de micélio do fitopatógeno e em 4

pontos equidistantes inoculou-se a cepa bacteriana, totalizando 4 repetições por placa. Como testemunha, os fungos cresceram na ausência das bactérias.

As placas foram mantidas em B.O.D. a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas por 7 dias e ao final do período de incubação mediu-se o crescimento micelial dos fungos em pareamento com as bactérias, bem como suas colônias controle, a fim de calcular a porcentagem de inibição do crescimento micelial: % inibição = $[(cr_{test} - cr_{trat}) / cr_{test}] \times 100$, sendo: cr_{test} = crescimento radial testemunha; cr_{trat} = crescimento radial tratamento (MENTEN et al., 1976).

6.3.4 Análise estatística dos resultados

O bioensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado e os resultados foram submetidos à análise de variância, com posterior agrupamento das médias pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.4.1 Isolamento, caracterização morfológica e identificação molecular dos isolados de *Fusarium*

A caracterização morfológica macroscópica e microscópica de *Fusarium* possibilitaram a identificação de dois isolados, denominados F1 e F2, confirmados para a espécie *F. solani* após identificação molecular, conforme os itens 4.4.1 e 4.4.2 do artigo A.

6.4.2 Ação antagonista das bactérias cavernícolas sobre *Fusarium solani*

Os dois isolados de *F. solani* foram sensíveis à presença das bactérias cavernícolas, demonstrado pela elevada porcentagem de inibição de ambos. *F. solani* F1 sofreu ação inibitória de 43 isolados bacterianos (IS), com inibições variando de 22,91% à 45,46%. Já o isolado F2 foi sensível a 44 isolados e sua inibição variou de 28,31% à 63,82% (Tabela 1).

É importante ressaltar que somente foram considerados como biocontrole, valores de inibição acima de 20%. Desta forma, a inibição correspondente a 9,82% do IS4 (Tabela 1) sobre o crescimento micelial do *F. solani* F1 não foi suficiente para caracterizá-lo como forte antagonista à este fungo.

Dos 49 isolados bacterianos, apenas os isolados 1, 2, 16, 38 e 47 não apresentaram inibição no crescimento micelial de nenhum dos fungos (Tabela 1). Este percentual baixo demonstra o grande potencial antagônico dessas bactérias para o biocontrole de outros microrganismos, como os fitopatogênicos.

Tabela 1 - Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Fusarium solani* F1 e F2 em cultura pareada com os isolados bacterianos cavernícolas.

<i>Fusarium solani</i>	% inibição	Isolado bacteriano (IS)
F1	40,37 a 45,46	10, 13, 23, 19, 29, 49, 36, 20, 22, 33, 26
	34,55 a 39,64	25, 32, 41, 15, 39, 5, 9, 34, 31, 7, 45, 14
	28,00 a 32,36	3, 12, 18, 40, 35, 37, 27, 30, 24, 11, 21, 43, 46
	22,91 a 26,54	8, 6, 17, 48, 28, 42, 44
	9,82	4
	0,00	1, 2, 16, 38, 47
F2	59,80 a 63,82	14, 10
	53,77 a 56,45	19, 29, 30, 12, 45, 3
	46,40 a 51,76	25, 35, 24, 33, 49, 5, 26, 22, 13, 11
	38,36 a 45,06	21, 23, 7, 28, 44, 8, 9, 17, 20, 34, 46, 15, 31, 40, 6
	28,31 a 37,69	36, 37, 43, 4, 27, 32, 39, 48, 41, 42, 18
	0,00	1, 2, 16, 38, 47

Médias agrupadas pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). C.V. (F1) = 14,01%; C.V. (F2) = 11,64%.

O potencial antagônico das bactérias cavernícolas está relacionado à sua versatilidade metabólica, evoluídas para a produção de metabólitos antimicrobianos, devido a adaptação e capacidade de sobrevivência em locais com condições extremas e peculiares de temperatura, pH, pressão osmótica, pouca luminosidade e escassez de nutrientes e energia (BARTON, 2006; KAMBESIS, 2007; GABRIEL; NORTHUP, 2013).

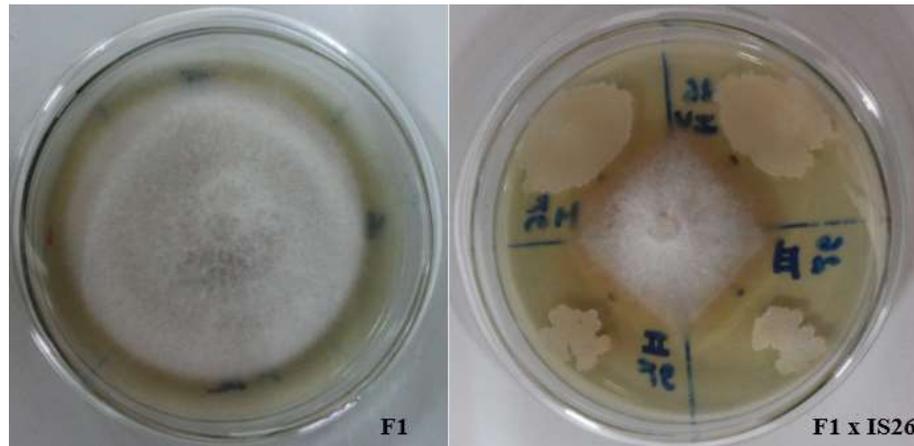


Figura 1 – *F. solani* (F1) isoladamente e em cultura pareada com o isolado bacteriano cavernícola (I26) em meio de cultura T.S.A aos 7 dias de cultivo.



Figura 2 – *F. solani* (F2) isoladamente e em cultura pareada com o isolado bacteriano cavernícola (IS10) em meio de cultura T.S.A aos 7 dias de cultivo.

No presente bioensaio, observou-se que a inibição no desenvolvimento dos isolados de *Fusarium solani* pela ação das bactérias ocorreu devido à produção e difusão de substâncias antimicrobianas no meio de cultura, com conseqüente formação de halos de inibição (Figuras 1 e 2). Resultado semelhante quanto ao mecanismo de biocontrole foi encontrado por Rodrigues (2009) e Marques et al. (2015) ao analisarem a atividade antagônica de isolados de caverna contra microrganismos causadores de doenças humanas, como *Staphylococcus aureus* e por Kay, Pathom-aree e Cheeptham (2013), ao estudarem a atividade inibitória de um isolado cavernícola do gênero *Streptomyces* sobre *Paenibacillus larvae*, agente causal de doença destrutiva de larvas de abelhas produtoras de mel.

O conhecimento sobre a comunidade microbiana cavernícola é restrito, mas seu potencial para a bioprospecção de moléculas ativas com propriedades antimicrobianas tem se mostrado grande, de tal forma que a investigação sobre a produção e efeito dessas

substâncias para o controle biológico de fitopatógenos seja promissora (BARTON; NORTHUP, 2007; RODRIGUES, 2009).

Análises complementares com metabólitos primários e secundários destas bactérias cavernícolas estão sendo realizadas em laboratório, além do efeito destes sobre esporulação, germinação e alterações morfológicas das hifas.

6.5 CONCLUSÕES

Os isolados bacterianos cavernícolas demonstraram importante antagonismo aos fitopatógenos. *Fusarium solani* F1 e F2 foram sensíveis aos metabólitos produzidos por 87,80% e 89,80% dos isolados testados, respectivamente. A produção de compostos antimicrobianos provenientes de seu metabolismo ressalta sua importância para a bioprospecção de moléculas ativas que possam ser utilizadas no controle biológico de fusariose.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, F. F.; HENNING, A. A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 1639–1645, 2005.

BARTON, H. A. Introduction to cave microbiology: A review for the non-specialist. **Journal of Cave and Karst Studies**, v. 68, n. 2, p. 43–54, 2006.

BARTON, H. A.; JURADO, V. What's Up Down There: Microbial Diversity in Caves. **Microbe**, v. 2, p. 132-138, 2007.

BARTON, H. A.; NORTHUP, D. E. Geomicrobiology in cave environments: past, current and future perspectives. **Journal of Cave and Karst Studies**, v.69, p.163–178, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Defesa Agropecuária: Agrotóxicos**, 2017. Disponível em: <
http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons > Acesso em: 17 jun. 2015.

BUENO, C. J.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; SOUZA, N. L. Produção e avaliação da sobrevivência de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.1, p.47-55, 2007.

ENGEL, A. S. Observations on the biodiversity of sulfidic karst habitats. **Journal of Cave and Karst Studies**, v.69, p.187–206, 2007.

GABRIEL, C. R.; NORTHUP, D. E. Microbial ecology: caves as an extreme habitat. In: **Cave Microbiomes: A Novel Resource for Drug Discovery**. Springer New York, p. 85-108, 2013.

GOHEL, V.; VIMAL, M.; ASHWINI, P.; CHHATPAR, H. S. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 54-72, 2006.

HWANG, B. K.; LIM, S. W.; KIM, B. S.; LEE, J. Y.; MOON, S. S. Isolation and In Vivo and In Vitro Antifungal Activity of Phenylacetic Acid and Sodium Phenylacetate from *Streptomyces humidus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 8, p. 3739–3745, 2001.

KAMBESIS, P. The importance of cave exploration to scientific research. **Journal of Cave and Karst Studies**, v. 69, n. 1, p. 46–58, 2007.

KANCHISWAMY, C. N.; MALNOY, M.; MAFFEI, M. E. Bioprospecting bacterial and fungal volatiles for sustainable agriculture. **Trends in plant science**, v. 20, n. 4, p. 206-211, 2015.

KAY, S.; PATHOM-AREE, W.; CHEEPHAM, N. Screening of volcanic cave actinomycetes for antimicrobial activity against *Paenibacillus larvae*, a honey bee pathogen. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 40, p. 26-33, 2013.

KIM, D. H.; MARTYN, R. D.; MAGILL, C. W. Restriction fragment length polymorphism groups and physical map of mitochondrial DNA from *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. **Phytopathology**, v. 82, p. 346–353, 1992.

KIM, S. H.; VUJANOVIC, V. Relationship between mycoparasites lifestyles and biocontrol behaviors against *Fusarium* spp. and mycotoxins production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 5257-5272, 2016.

MARQUES, E.L.S.; CORREIA, D.C.; OLIVEIRA, R.B.F.; SILVA, K.B.; DIAS, J.C.T.; PIROVANI, C.P.; REZENDE, R.P. Potencial biotecnológico de microrganismos isolados de cavernas de Paripiranga, Bahia. In: RASTEIRO, M.A.; SALLUN FILHO, W. (orgs.) CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPELEOLOGIA, 33, 2015. Eldorado. **Anais...** Campinas: SBE, p.161-168, 2015. Disponível em: <http://www.cavernas.org.br/anais33cbe/33cbe_161-168.pdf>. Acesso em: 02/11/2016.

MENTEN, J. O. M.; MINUSSI, C. C.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. “*in vitro*”. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.

PELÁEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products—Can history repeat? **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 981-990, 2006.

RODRIGUES, A. A. **Atividade antimicrobiana e produção de enzimas de interesse biotecnológico de bactérias isoladas de diferentes habitats**. 2009. 68 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2009.

SILVA, J. A. T; MEDEIROS, E. V.; SILVA, J. M.; TENÓRIO, D. A.; MOREIRA, K. A.; NASCIMENTO, T. C. E. S.; SOUZA-MOTTA, C. *Trichoderma aureoviride* URM 5158 and *Trichoderma hamatum* URM 6656 are Biocontrol Agents that act against Cassava Root rot through different Mechanisms. **Journal of Phytopathology**, v. 164, p. 1003-1011, 2016.

STROBEL, G., DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

7 CONCLUSÕES GERAIS

O biocontrole de *Fusarium solani* por *Trichoderma harzianum* ocorreu por micoparasitismo após o encontro micelial dos fungos.

A utilização do adubo biológico MICROGEO® *in natura* na concentração de 2,5% foi suficiente para promover inibição do crescimento micelial dos isolados fitopatogênicos. Na presença dos fitopatógenos, houve produção de metabólitos antimicrobianos, pela população microbiana, pelo mecanismo de antibiose.

Os isolados bacterianos cavernícolas demonstraram importante antagonismo aos fitopatógenos. A produção de compostos antimicrobianos provenientes de seu metabolismo ressalta sua importância para a bioprospecção de moléculas ativas que possam ser utilizadas no controle biológico de fusariose.

As alternativas de manejo propostas demonstraram-se relevantes para o controle biológico, *in vitro*, de *Fusarium solani* causador de fusariose da cultura da mandioca.