

Seleção de estirpes de *Trichoderma ssp.* com atividade antagonista a *Fusarium verticillioides* produtores de fumonisina isolados de milho e de sorgo

Gabriel Angelo Saraiva Raimundo⁽¹⁾; Talita Coeli D'Angelis de Aparecida Ramos⁽²⁾; Fabrício Eustáquio Lanza⁽³⁾; Elaine Aparecida Guimarães⁽⁴⁾; Ivanildo Evódio Marriel⁽⁵⁾; Francisco Adriano de Souza^(5,6)

⁽¹⁾ Estudante de Agronomia; Universidade Federal de Viçosa; Florestal, MG; (gabriel.raimundo@ufv.br) ⁽²⁾ Mestre em produção vegetal; Universidade Federal de São João del Rei; ⁽³⁾ Pós doutorando em fitopatologia; Embrapa Milho e Sorgo; ⁽⁴⁾ Doutoranda em fitopatologia; Universidade Federal de Lavras; ⁽⁵⁾ Pesquisador; Embrapa Milho e Sorgo; ⁽⁶⁾ Autor correspondente francisco.adriano@embrapa.br;

RESUMO: A contaminação de grãos por micotoxinas causa grande prejuízo ao setor produtivo e é uma ameaça à segurança alimentar de humanos e animais domésticos. O controle biológico pode ser uma alternativa viável para redução da ocorrência de fungos produtores de micotoxinas. Um dos principais agentes de controle biológico de fungos são fungos do gênero *Trichoderma*. No entanto, a eficiência de controle varia com os agentes envolvidos (fungo, planta, condições edafoclimáticas) sendo necessária a seleção de estirpes eficientes. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação antagonística de 47 isolados de *Trichoderma spp.* da Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo contra duas estirpes de *Fusarium verticillioides* (F310 e F2743) caracterizadas pela alta produção de fumonisinas. Testes *in vitro* em cultivo pareado em placas de Petri por 7 dias indicaram o potencial de redução do crescimento das estirpes de *Fusarium*. A eficiência do biocontrole variou em função do genótipo dos agentes envolvidos. As estirpes 19 (BRM 036690; CMPC841) *T. harzianum*, 4 (BRM 036674; CMPC826) *T. asperellum*, e 6 (BRM 036676; CMPC828) *T. asperellum* apresentaram as melhores performances frente a estirpe F310. Sendo o mecanismo de controle possivelmente a antibiose. Já para a estirpe F2743 destacaram-se as estirpes 44 (BRM036705; CMPC856) *T. sp. ND*, 19 (BRM 036690; CMPC841) *T. harzianum*, 17 (BRM036688; CMPC839) *T. asperullum*, e 39 (BRM 036702; CMPC853) *Trichoderma sp. ND*. Para a F2743 o mecanismo de controle não está evidente podendo ser uma combinação de antibiose e competição por nicho.

Termos de indexação: controle biológico, micotoxinas, biotecnologia agrícola.

INTRODUÇÃO

Dentre os principais fitopatógenos das culturas de milho e de sorgo estão espécies do gênero *Fusarium*. Esses fungos pode causar apodrecimento do colmo e raiz, mortes em mudas e danos a grãos armazenados (Munkvold & Desjardins, 1997; Casela et al., 2006;). Além da fitopatogenicidade, *Fusarium spp.* podem produzir micotoxinas, dentre as quais as fumonisinas, que constituem uma ameaça à segurança alimentar de humanos e animais domesticados (Munkvold & Desjardins, 1997).

As principais formas de controle de *Fusarium* são cultivares de alta resistência e o controle químico (Michereff, 2001; Pinto, 2004). No entanto, o controle biológico vem ganhando espaço como um eficiente modo de controle (Shiomi et al., 2015). Espécies de *Trichoderma* constituem o grupo de agentes de controle biológico mais estudados e comercializados (Mukherjee et al., 2013), apresentando efeitos tanto em decorrência da antibiose, como por meio de estratégias de parasitismo e competição (Harman et al., 2004; Verma et al., 2007).

A prospecção de estirpes eficientes contra fungos produtores de micotoxinas por meio de testes *in vitro* permite a observação das interações patógeno-antagonista, constituindo o primeiro passo para o desenvolvimento de estratégias de controle biológico (Mariano, 1993). O objetivo deste estudo foi avaliar a ação antagonista de 47 isolados de *Trichoderma* contra duas estirpes de *Fusarium verticillioides* de alto potencial produção de fumonisinas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 47 estirpes de *Trichoderma* pertencentes à coleção de Micro-organismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo (CMMFEMS). As estirpes foram reativadas, a partir de esporos conservados a -80° C, em meio BDA.

Os Isolados do patógeno *F. verticillioides* CML

2743 e F310 pertencentes à Coleção CMMFEMS foram selecionados baseados na alta produção de fumonisinas. A estirpe F310 foi obtida a partir de sabugos de milho coletados em Luís Eduardo Magalhães (BA) (Lanza, 2014). E a estirpe CML 2743 foi isolada de plantas de sorgo em Sete Lagoas (MG) (dados não publicados).

A atividade antagonista dos isolados de *Trichoderma* sobre os isolados de *F. verticillioides* foi avaliada pelo método de cultivo pareado proposto por Galarza et al., 2015. O teste desenvolveu-se em triplicata colocando-se discos de micélio de 5mm de diâmetro distando 10mm da borda de cada lado da placa de Petri (87mm) contendo meio BDA. Os discos do patógeno foram fixados três dias antes do antagonista e as placas foram mantidas em sala de crescimento a 27° C com fotoperíodo de 12 horas. Durante sete dias a partir da inoculação do antagonista realizaram-se medições diárias do raio micelial do patógeno. O controle consistiu de um disco micelial do patógeno distando 10mm da borda

A partir do raio micelial aferido durante os sete dias de incubação, calculou-se a área abaixo da curva padrão de crescimento (AACPC), de acordo com o algoritmo Shanner & Finner (1977) na qual Y_i é o raio micelial aferido no dia X_i :

$$AACPC = \sum_{i=1}^n [(Y_{i+1} + Y_i) / 2] [X_{i+1} - X_i]$$

O delineamento experimental adotado foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 48x2 com três repetições. Os resultados da AACPC foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram agrupadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade utilizando-se o programa SISVAR 5.3®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ação antagônica das 47 estirpes de *Trichoderma* frente às estirpes de *F. verticillioides* CML 2743 e F310 produtoras de fumonisinas estão apresentadas na **Tabela 1**. Houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o padrão de crescimento das duas estirpes de *F. verticillioides* (**Figura 1**), bem como houve interação significativa entre o efeito exercido pelas estirpes de *Trichoderma* sobre o crescimento das estirpes de *F. verticillioides*. Para o isolado F310 houve a distinção de 4 grupos (a, b, c e d) pelo teste de Scott Knott, já para a estirpe CML 2743 ocorreu a formação de somente dois grupos (a e b).

As estirpes que proporcionaram menores valores de AACPC contra o isolado F310 foram 19 (BRM 036690; CMPC841) *T. harzianum*, 4 (BRM 036674; CMPC826) *T. asperellum*, e 6 (BRM 036676;

CMPC828) *T. asperellum*. As estirpes 44 (BRM036705; CMPC856) *Trichoderma* ND, 19 (BRM 036690; CMPC841) *T. harzianum*, 17 (BRM 036688; CMPC839) *T. asperellum*, entre outras, apresentaram as melhores performances frente a estirpe CML 2743 (**Tabela 1**). Este comportamento expressa a variabilidade intraespecífica das estirpes (**Tabela 2**).

Tabela 1 - Capacidade de biocontrole de 47 estirpes de *Trichoderma* em relação a duas estirpes de *Fusarium verticillioides* produtoras de fumonisinas avaliado pelo método de cultivo pareado, estimado pelo cálculo da Área Abaixo da Curva Padrão de Crescimento (AACPC)

Estirpes <i>Trichoderma</i>	F310 AACPC	Estirpes <i>Trichoderma</i>	CML 2743 AACPC
19	8,23 a*	44	8,760 a*
4	9,21 a	19	9,650 a
6	10,53 a	17	10,05 a
16	11,43 b	39	10,71 a
39	11,50 b	33	10,76 a
7	11,76 b	34	10,80 a
18	12,30 b	18	10,91 a
42	12,30 b	845	11,21 a
44	12,46 b	5	11,23 a
3	12,71 b	27	11,45 a
22	12,78 b	24	11,48 a
8	12,90 b	35	11,50 a
11	12,96 b	11	11,63 a
845	13,13 b	966	11,65 a
814	13,13 b	36	11,75 a
21	13,20 b	662	12,11 a
844	13,23 b	6	12,21 a
870	13,35 b	21	12,41 a
861	13,55 b	879	12,52 a
5	13,58 b	25	12,60 a
36	13,58 b	793	12,60 a
966	13,71 b	22	12,86 b
967	14,03 c	42	13,01 b
2	14,05 c	40	13,23 b
35	14,10 c	28	13,25 b
12	14,11 c	14	13,33 b
9	14,28 c	861	13,35 b
25	14,38 c	870	13,36 b
728	14,41 c	13	13,38 b
10	14,43 c	15	13,46 b
793	14,65 c	814	13,48 b
17	14,81 c	2	13,48 b
502	14,83 c	7	13,53 b
15	14,93 c	8	13,56 b
24	15,01 c	10	13,58 b
662	15,31 c	12	13,61 b
879	15,33 c	16	13,85 b
33	15,38 c	4	13,86 b
27	15,66 c	9	14,20 b
40	15,88 d	844	14,35 b
28	16,36 d	23	14,46 b
34	16,41 d	854	14,73 b
771	16,58 d	728	14,80 b
14	16,66 d	502	14,83 b
13	16,90 d	967	15,03 b
23	16,90 d	771	15,35 b
854	17,93 d	3	15,55 b
Controle	17,95 d	Controle	16,45 b

(*) grupos de médias seguidas pela mesma letra, na mesma

coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Lazarotto et al. (2012) também verificaram diferenças no efeito antagonista de estirpes de *Trichoderma* a isolados *Fusarium spp.* Os autores ressaltaram que, para cada isolado de *Fusarium* em particular, deve ser feita a seleção do seu agente antagonista potencial. Para fins práticos comerciais seria ideal que uma mesma estirpe apresentasse multifuncionalidade mediante distintos isolados de *Fusarium*.

Além disso, é possível observar que o mecanismo de ação do antagonista pode variar em função do patógeno. A **Figura 1** sugere que possivelmente para o isolado F310 o antagonismo ocorreu por antibiose, já para a estirpe CML2743 ocorreu em função de diferentes mecanismos.



Figura 1- Culturas pareadas de estirpes de *Trichoderma* (antagonista à direita) com *Fusarium verticillioides* (patógeno à esquerda).

Os resultados obtidos indicam o potencial da utilização de estirpes de *Trichoderma* para controle biológico *F. verticillioides* tanto na cultura do milho quanto em sorgo. Considerando que o controle biológico é uma alternativa eficiente do ponto de vista econômico e ambiental, as estirpes avaliadas poderão ser exploradas em programas biotecnológicos a fim de possibilitarem a redução dos riscos e prejuízos causados por fungos produtores de micotoxinas, dessa forma avaliações em condições de casa de vegetação e campo são necessárias para validar a eficiência destas estirpes e desenvolvimento de produtos comerciais.

CONCLUSÕES

1. Estirpes de *Trichoderma* apresentam capacidade de reduzir o crescimento micelial de *F. verticillioides* em teste de crescimento pareado *in vitro* por diferentes mecanismos de ação.

2. A eficiência do biocontrole varia em função do genótipo dos agentes envolvidos, havendo necessidade de seleção de estirpes com maior potencial de biocontrole.

3. A estirpe 19 (BRM 036690; CMPC841) *T. harzianum* apresentou capacidade de controle dos dois isolados de *F. verticillioides* avaliadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES, FAPEMIG e UFSJ pelo apoio financeiro e concessão de bolsas de estudo.

REFERÊNCIAS

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. da S.; PINTO, N. F. J. A. **Doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 14p. Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 83.

GALARZA, L.; AKAGI, Y.; TAKAO, K.; KIM, C.S.; MAEKAWA, N.; ITAI, I.; PERALTA, E.; SANTOS, E.; KODAMA, M. **Characterization of Trichoderma species isolated in Ecuador and their antagonistic activities against phytopathogenic fungi from Ecuador and Japan**. Journal Genetic Plant Pathology, v.81, p. 201-210, 2015.

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

LAZAROTTO, M.; BOVOLINI, M. P.; MACIEL, C. G.; MUNIZ, M. F. B. **Seleção in vitro de Isolados de Trichoderma spp. com Potencial de Antagonismo a Isolados Patogênicos de Fusarium spp.** In: XVI Simpósio De Ensino, Pesquisa E Extensão, Unifra, v. 3, 2012.

LANZA, F.E.; ZAMBOLIM, L.; COSTA, R.V.; QUEIROZ, V.A.V.; COTA, L.V.; SILVA, D.D.; SOUZA, A.G.C.; FIGUEIREDO, J.E.F. **Prevalence of fumonisin-producing Fusarium species in Brazilian corn grains**. Crop Protection, v. 65, p. 232-237, 2014.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle biológico de patógenos de plantas. In: FERNANDES, J. M. C.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. Passo Fundo: **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 1993, v.1, p. 369-409. 417 p.

MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de Fitopatologia**. Recife, p.109-118, 2001.

MUNKVOLD, G.P.; DESJARDINS, A.E. **Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence?** Plant Disease, v.81, p.556-565, 1997.

MUKHERJEE, P.K.; BENJAMIN A. HORWITZ, B. A.;

HERRERA-ESTRELLA, A.; SCHMOLL, M.; KENERLEY, C.M. **Trichoderma Research in the Genome Era**. Annual Review of Phytopathology, v. 51, p. 105-129, 2013.

PINTO, N. F. J. A. **Controle químico de doenças foliares do milho**. Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.3, n.1, p.134-138, 2004.

SHANER, G.; FINNEY, R.E. **The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat**. Phytopathology, v. 67, p. 1051-1056, 1977

SHIOMI, H. F.; MELO, I. S.; INHONI, M.T. A. **Avaliação de bactérias endofíticas para o controle biológico da mancha foliar de Exserohilum turcicum em milho**. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v. 82, p. 1-4, 2015.

VERMA, M.; BRAR, S.; TYAGI, R.; SURAMPALLI, R.; VALERO, J. **Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control**. Biochemical Engenery Journal, v. 3, p.1–20, 2007.

Tabela 2- Estirpes de *Trichoderma* do Banco de Germoplasma de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo (CMMFEMS) utilizadas para avaliação da capacidade antagonista contra isolados de *Fusarium verticillioides*.

Código BRM	Código CMMFEMS	Vegetação – Bioma ²	Código Laboratório	Identificação BLAST-N ³
BRM 036672	CMPC824	Restinga – Mata Atlântica	2	<i>T. asperellum</i>
BRM 036673	CMPC825	Restinga – Mata Atlântica	3	<i>T. reesei</i>
BRM 036674	CMPC826	Restinga – Mata Atlântica	4	<i>T. asperellum</i>
BRM 036675	CMPC827	Restinga – Mata Atlântica	5	<i>Trichoderma</i> ND
BRM 036676	CMPC828	Restinga – Mata Atlântica	6	<i>T. asperellum</i>
BRM 036677	CMPC829	Restinga – Mata Atlântica	7	<i>T. reesei</i>
BRM 036678	CMPC830	Restinga – Mata Atlântica	8	<i>T. reesei</i>
BRM 036680	CMPC831	Restinga – Mata Atlântica	9	<i>T. longibrachiatum</i>
BRM 036681	CMPC832	Restinga – Mata Atlântica	10	<i>Trichoderma</i> ND
BRM 036682	CMPC833	Restinga – Mata Atlântica	11	<i>T. reesei</i>
BRM 036683	CMPC834	Restinga – Mata Atlântica	12	<i>T. artroviride</i>
BRM 036684	CMPC835	Restinga – Mata Atlântica	13	<i>T. asperellum</i>
BRM 036685	CMPC836	Restinga – Mata Atlântica	14	<i>T. asperellum</i>
BRM 036686	CMPC837	Restinga – Mata Atlântica	15	<i>T. asperellum</i>
BRM 036687	CMPC838	Restinga – Mata Atlântica	16	<i>T. asperellum</i>
BRM 036688	CMPC839	Restinga – Mata Atlântica	17	<i>T. asperellum</i>
BRM 036689	CMPC840	Restinga – Mata Atlântica	18	<i>T. asperellum</i>
BRM 036690	CMPC841	Restinga – Mata Atlântica	19	<i>T. harzianum</i>
BRM 036691	CMPC842	Restinga – Mata Atlântica	21	<i>T. intricatum</i>
BRM 036692	CMPC843	Restinga – Mata Atlântica	22	<i>T. intricatum</i> .
BRM 036693	CMPC844	Restinga – Mata Atlântica	23	<i>T. virens</i>
BRM 036694	CMPC845	Restinga – Mata Atlântica	24	<i>Trichoderma</i> ND.
BRM 036695	CMPC846	Restinga – Mata Atlântica	25	<i>T. longibrachiatum</i>
BRM 036696	CMPC847	Restinga – Mata Atlântica	27	<i>T. longibrachiatum</i>
BRM 036697	CMPC848	Restinga – Mata Atlântica	28	<i>T. viren</i>
BRM 036698	CMPC849	Restinga – Mata Atlântica	33	<i>T. asperellum</i>
BRM 036699	CMPC850	Restinga – Mata Atlântica	34	<i>T. asperellum</i>
BRM 036700	CMPC851	Restinga – Mata Atlântica	35	<i>T. asperellum</i>
BRM 036701	CMPC852	Restinga – Mata Atlântica	36	<i>Trichoderma</i> ND
BRM 036702	CMPC853	Restinga – Mata Atlântica	39	<i>Trichoderma</i> ND
BRM 036703	CMPC854	Restinga – Mata Atlântica	40	<i>T. longibrachiatum</i> sp.
BRM 036704	CMPC855	Restinga – Mata Atlântica	42	<i>T. artroviride</i>
BRM 036705	CMPC856	Restinga – Mata Atlântica	44	<i>Trichoderma</i> ND
BRM 036706	CMPC857	Restinga – Mata Atlântica	45	<i>Trichoderma</i> ND.
BRM 034945	CMSV502	Canga – Cerrado	502	<i>T. koningiopsis</i>
BRM034989	CMSV662	Cerrado – Cerrado	662	<i>T. sp. 662</i>
BRM034991	CMSV728	Eucalipto – Cerrado	728	<i>T. spirale</i>
BRM035072	CMSV771	Mata – Cerrado	771	<i>T. gamsii</i>
BRM035073	CMSV793	Cerrado – Cerrado	793	<i>T. harzianum</i>
BRM034958	CMSV814	Mata – Cerrado	814	<i>T. uncultured</i>
BRM035066	CMSV844	Mata – Cerrado	844	<i>T. harzianum</i>
BRM035075	CMSV845	Capim – Cerrado	845	<i>T. sp. 845</i>
BRM035154	CMSV854	Canga – Cerrado	854	<i>T. harzianum</i>
BRM035042	CMSV861	Capim – Cerrado	861	<i>T. sp. 861</i>
BRM035077	CMSV870	Eucalipto – Cerrado	870	<i>T. harzianum</i>
BRM035049	CMSV879	Capim – Cerrado	879	<i>T. harzianum</i>
BRM035082	CMSV966	Capim – Cerrado	966	<i>T. harzianum</i>

BRM¹ Brasil Microrganismo: <http://alelomicro.cenargem.embrapa.br/alelomicro>. ²Área de coleta dos fungos. ³Identificação de isolados de fungos filamentosos por sequenciamento da região ITS do rDNA pela ferramenta BLAST N em comparação com o material encontrado no *GenBank*. ND – Não Determinado.