

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ELISA VILVERT

INTERAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* ENTRE FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR,  
*TRICHODERMA* SPP. E *FUSARIUM* SPP.

Florianópolis/SC

2010

ELISA VILVERT

INTERAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* ENTRE FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR,  
*TRICHODERMA SPP.* E *FUSARIUM SPP.*

Relatório submetido ao centro de Ciências Agrárias, Curso de Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção de título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Professor Doutor Paulo Emílio Lovato.

Florianópolis/SC

2010

## AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo à minha família, especialmente meus pais, Ivo e Vitalina, que tanto lutaram para poder disponibilizar aos filhos aquilo que eles não tiveram; aos meus irmãos Cláudia e Daniel que como eu conseguiram, mesmo com todos os empecilhos e dificuldades, ter uma formação superior em uma universidade de qualidade; à minha querida sobrinha Valentine e à minha cunhada Joice. Sem esquecer todos os familiares que fazem parte da enorme família Junkes e Vilvert e que estiveram presentes em algum momento durante este período.

Em especial à Professora Mara Coelho de Souza Lago e sua família por todo o incentivo e ajuda durante todos esses anos de convivência quase familiar.

Aos meus amigos de Biguaçu por todos os momentos de diversão, piadas e risadas que me faziam esquecer um pouco dos trabalhos e provas à realizar.

A todos os amigos e amigas do CCA que estiveram presentes durante estes anos de estudos, em especial Ilana, Giselle, Glaucia, Karen, Ada, Thais e Djalma. Não esquecendo os amigos de laboratório, Cintia, Cristiane, Murilo e Paula.

A UFSC e aos professores do CCA-UFSC, especialmente aos professores Paulo Emílio Lovato, Aparecido Lima Silva e Antônio A. Uberti.

Ao governo federal (CAPES) e aos professores organizadores, franceses e brasileiros, do programa BRAFAGRI pela maravilhosa oportunidade dada à mim e a outros estudantes para estudar e viver durante um ano na França.

Ao servidor Dalton Barreto, diretor de assuntos estudantis da Prae, pela ajuda na obtenção da minha passagem para realização deste estágio na Alemanha.

Ao ZALF, pela oportunidade dada a mim para a realização do estágio, em especial às Doutoradas Marion Tauschke e Marina Müller que me orientaram durante estes três meses; às técnicas que me auxiliaram Petra Lange e Martina Peters; e à estagiária Kristina Kohl e Maria Sheludko pela ajuda e amizade.

E por fim ao meu grande amor, Marcos Alberto Lana, por todo o seu companheirismo, apoio, paciência e amor, mesmo quando um oceano nos separa.

## RESUMO

Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e *Trichoderma* spp. são constantemente sugeridos como potenciais agentes de controle biológico, principalmente contra fungos patogênicos do gênero *Fusarium* spp., agente causal de doenças em plantas de importância agrícola. Vários experimentos *in vitro* e *in vivo* têm sido realizados para analisar a interação entre o FMA, *Trichoderma* spp. e fungo patogênico, mas devido à presença de resultados contraditórios ainda não há certeza quanto ao efeito desta interação. O trabalho teve por objetivo avaliar a interação entre um fungo micorrízico arbuscular, *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. e os efeitos sobre o crescimento e desenvolvimento dos fungos em condições *in vitro* e *in vivo*. Dois experimentos *in vitro* analisaram a interação de diferentes espécies de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. cultivados conjuntamente em meio de cultura Arroz-Agar e CZID-Agar. Um experimento *in vitro*, utilizando placas de petri descartáveis contendo dois ou três compartimentos, analisou o desenvolvimento de *Glomus intraradices*, *Trichoderma atroviride* e *Fusarium culmorum* ou *Fusarium graminearum* quando cultivados conjuntamente. Um experimento *in vivo* (*Triticum aestivum* L.) analisou o crescimento das plantas e inoculação fúngica quando cultivados com *Glomus intraradices*, *Trichoderma atroviride* e *Fusarium culmorum*. Nestes dois últimos experimentos também foi realizada a análise das enzimas micorrízicas fosfatase ácida e  $\beta$ -glucosidase. Os fungos *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. apresentaram crescimento diferenciado nos dois meios de cultura e *Trichoderma* spp. inibiu o desenvolvimento somente da espécie menos agressiva de *Fusarium* spp. O crescimento *in vitro* de *Trichoderma* spp. foi estimulado na presença de FMA e *Fusarium* spp. foi inibido. As plantas inoculadas com os três fungos apresentaram maior peso de matéria fresca da parte aérea e da raiz e maior colonização fúngica. Maior atividade de fosfatase ácida foi verificada no tratamento micorriza e fusarium, indicando maior atividade da micorriza devido a presença do patógeno. No tratamento com os três fungos essa atividade foi similar ao controle, o que indica a ação inibitória de *Trichoderma* spp. sobre a atividade do FMA.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Ilustração esquemática de uma raiz colonizada por fungo micorrizico arbuscular. Fonte: Maia *et al.* In: Michereff *et al.* (2005).....14
- Figura 2** a) Incubadora. b) Plástico quadriculado de 5mm x 5mm.....29
- Figura 3** a) Plantio das sementes de *Triticum aestivum*. b) Câmara de crescimento onde foram mantidas as plantas.....34
- Figura 4** Zona de inibição entre *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. em Arroz-Agar (a) e em CZIDAgar (b) e visualização da diferença de coloração dos micé-lios nos dois meios de cultura.....41
- Figura 5** Crescimento diário dos fungos *Fusarium cerealis* 67 e 51 em cultivo conjunto e individual em meio de cultura Arroz-Agar.....42
- Figura 6** Tamanho de crescimento diário dos fungos *Trichoderma* spp e *Fusarium* spp. em meio de cultura CZID-Agar.....43
- Figura 7** Zona de inibição entre *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. em Arroz-Agar (a) e em CZIDAgar (b) e visualização da diferença de coloração dos micélios nos dois meios de cultura.....47
- Figura 8** Tamanho de crescimento diário dos fungos *Trichoderma* spp. nos diferentes tratamentos (cultivo conjunto e individual) em meio de cultura Arroz-Agar.....48
- Figura 9** Tamanho de crescimento diário de *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. nos diferentes tratamentos em meio de cultura CZID-Agar.....50
- Figura 10** Desenvolvimento do fungo *Trichoderma atroviride* ao final do experimento em placas-de-petri com presença e ausência de fungo micorrízico. O compartimento superior continha a raiz de cenoura Ri T-DNA transformada micorrizada ou não (controle) e o inferior o fungo *Trichoderma atroviride*.....54
- Figura 11** Diâmetro de crescimento diário de *Trichoderma atroviride* (Trich1), *Fusarium graminearum* (F23g) e *Fusarium culmorum* (F13c) nos diferentes tratamentos em placas-de-petri com dois compartimentos.....54
- Figura 12** Desenvolvimento dos fungos *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum* ao final do experimento em placas-de-petri com presença e ausência de fungo micorrízico. O compartimento superior continha a raiz de cenoura Ri T-DNA

transformada micorrizada ou não (controle) e o inferior os fungos *Fusarium graminearum* ou *Fusarium culmorum* .....55

**Figura 13** Diâmetro de crescimento de *Trichoderma atroviride* (Trich1) e *Fusarium culmorum* (F13c) nas placas-de-petri com duas divisões e que apresentavam micélio de micorriza sobre toda a superfície do prato.....56

**Figura 14** Diâmetro de crescimento diário de *Trichoderma atroviride* (Trich1) nas placas-de-petri com três divisões. Em cada compartimento foi inoculado: raiz de cenoura Ri T-DNA transformada micorrizada ou não, *Trichoderma atroviride* e *Fusarium culmorum* ou *F. graminearum*.....57

**Figura 15** Diâmetro de crescimento diário de *Fusarium graminearum* (F23g) e *Fusarium culmorum* (F13c) nas placas de petri com três divisões. Em cada compartimento foi inoculado: raiz de cenoura Ri T-DNA transformada micorrizada ou não, *Trichoderma atroviride* e *Fusarium culmorum* ou *F. graminearum*.....58

**Figura 16** Exemplo do desenvolvimento dos fungos nas placas-de-petri com três divisões. Em cada compartimento foi inoculado: raiz de cenoura Ri T-DNA transformada micorrizada ou não, *Trichoderma atroviride* e *Fusarium culmorum* ou *F. graminearum*.....59

**Figura 17** Visualização das plantas ao 46 dias após o plantio. (a) Sem micorriza, (b) controles, (c) com micorriza.....62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Solução estoque do meio de cultura MSR e diluições necessárias para a preparação do meio de cultura utilizado no experimento.....	21
<b>Tabela 2</b> Identificação, origem e ano de coleta das diferentes espécies de <i>Fusarium</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp. utilizadas nos experimentos.....	25
<b>Tabela 3</b> Esquema experimental do experimento 1.....	28
<b>Tabela 4</b> Esquema experimental do experimento 2.....	30
<b>Tabela 5</b> Esquema experimental do experimento 3.....	32
<b>Tabela 6</b> Esquema experimental do experimento 4.....	35
<b>Tabela 7</b> Tamanho médio ( $\mu\text{m}$ ) dos esporos de seis isolados de <i>Fusarium</i> spp. em cultivo individual e cultivo conjunto com <i>Trichoderma atroviride</i> em meio de cultura Arroz-Agar e CZID-Agar.....	44
<b>Tabela 8</b> Tamanho médio ( $\mu\text{m}$ ) dos esporos de dois isolados de <i>Fusarium</i> spp. em cultivo individual e cultivo conjunto com três isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em meio de cultura Arroz-Agar e CIZID-Agar.....	51
<b>Tabela 9</b> Atividade da enzima fosfatase ácida e $\beta$ -glucosidase em nmol/ $\mu\text{g}$ de raiz de cenoura Ri T-DNA transformada nos tratamentos dos três diferentes tipos de placas-de-petri utilizados .....	60
<b>Tabela 10</b> Avaliação da presença de fungos na rizosfera de plantas de trigo inoculadas com <i>Glomus intraradices</i> , <i>Trichoderma atroviride</i> 1 e <i>Fusarium culmorum</i> 13.....	62
<b>Tabela 11</b> Médias e análise estatística da massa de matéria fresca (MMF) das folhas e raízes das plantas de <i>Triticum aestivum</i> quando submetidas aos diferentes tratamentos.....	63
<b>Tabela 12</b> Valores médios e análise estatística da porcentagem de colonização micorrízica nas raízes de trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ) submetidas aos diferentes tratamento utilizados no experimento.....	64
<b>Tabela 13</b> Atividade da enzima fosfatase ácida e $\beta$ -glucosidase em nmol/ $\mu\text{g}$ de raiz de <i>Triticum aestivum</i> .....	65

## SUMÁRIO

RESUMO.....	3
1 INTRODUÇÃO .....	9
2 OBJETIVO.....	11
2.1 Objetivo geral.....	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	12
3.1 Interação entre microorganismos .....	12
3.2 Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs).....	13
3.3 <i>Trichoderma</i> spp.....	16
3.4 <i>Fusarium</i> spp.....	17
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	20
4.1 Meios de cultura utilizados.....	20
4.1.1 Meio de cultura Strullu-Romand (MSR) .....	20
4.1.2 Sabouraud-1%-Glucose-1%-Maltose-Agar (Sabo) .....	21
4.1.3 Meio nutritivo sintético agarizado (SNA) .....	22
4.1.4 Arroz-Agar .....	22
4.1.5 Agar Czapek-Dox-Iprodion-Dicloran (CZID) .....	23
4.2 Fungos utilizados e sua multiplicação .....	23
4.2.1 Fungo micorrízico arbuscular.....	23
4.2.2 <i>Fusarium</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp. ....	25
4.3 Descrição dos experimentos.....	27
4.3.1 Experimento 1: Interação <i>in vitro</i> entre diferentes espécies dos fungos <i>Fusarium</i> spp. e <i>Trichoderma atroviride</i> .....	27
4.3.2 Experimento 2: Interação <i>in vitro</i> entre diferentes espécies do fungo <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Fusarium graminearum</i> ou <i>Fusarium culmorum</i> .....	29
4.3.3 Experimento 3: Interação <i>in vitro</i> entre <i>Glomus intraradices</i> , <i>Trichoderma</i> <i>atroviride</i> e <i>Fusarium graminearum</i> ou <i>Fusarium culmorum</i> .....	30
4.3.4 Experimento 4: Interação <i>in vivo</i> ( <i>Triticum aestivum</i> L.) entre <i>Glomus</i> <i>infraradices</i> , <i>Trichoderma atroviride</i> e <i>Fusarium culmorum</i> .....	33
4.4 Análise da atividade enzimática das raízes <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	36
4.5 Análise da colonização micorrízica .....	38
4.6 Análises estatísticas .....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 Experimento 1: Interação <i>in vitro</i> entre diferentes espécies de <i>Fusarium</i> spp. e <i>Trichoderma atroviride</i> .....	40
5.1.1 Crescimento dos fungos .....	40
5.1.2 Tamanho dos esporos dos fungos na zona de contato .....	44
5.1.3 Considerações finais.....	45
5.2 Experimento 2: Interação <i>in vitro</i> entre diferentes espécies de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Fusarium graminearum</i> ou <i>Fusarium culmorum</i> .....	46
5.2.1 Crescimento dos fungos .....	46

5.2.2 Tamanho dos esporos dos fungos na zona de contato .....	51
5.2.3 Considerações Finais .....	52
5.3 Experimento 3: Interações <i>in vitro</i> entre <i>Glomus intraradices</i> , <i>Trichoderma atroviride</i> e <i>Fusarium graminearum</i> ou <i>Fusarium culmorum</i> .....	52
5.3.1 Crescimento dos fungos .....	53
5.3.2 Atividade das enzimas fosfatase ácida e $\beta$ -glucosidade.....	59
5.4 Experimento 4: Interação <i>in vivo</i> ( <i>Triticum aestivum</i> L.) entre <i>Glomus intraradices</i> , <i>Trichoderma atroviride</i> e <i>Fusarium culmorum</i> .....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69

## 1 INTRODUÇÃO

Em seu ambiente natural as plantas convivem com vários microorganismos presentes nos solos e que podem se tornar agentes causais de sérias doenças levando a perdas consideráveis na agricultura (POZO *et al.*, 2004). Para evitar estas perdas usam-se meios de controle químicos que levam à diminuição da atividade biológica do solo, tanto de microorganismos benéficos quanto de maléficos, afetando de forma negativa o meio ambiente e o ser humano (PUPPI *et al.*, 1994).

Com a diminuição dos microorganismos benéficos no solo há também uma maior perda por parte da planta, e a necessidade de maior uso de fertilizantes e agrotóxicos, já que estes microorganismos, através de interações simbióticas, podem auxiliar a planta no seu crescimento e no combate à patógenos (POZO *et al.*, 2004).

Dessa maneira verifica-se uma maior preocupação quanto ao uso de agrotóxicos e a busca por meios alternativos ao combate de doenças de plantas. O controle biológico, através do uso de microorganismos benéficos associados às plantas, é uma alternativa sustentável para o controle de algumas doenças de solo. Entre os benefícios dessas associações pode-se citar o crescimento das plantas de forma mais homogênea, a diminuição da necessidade do uso de fertilizantes e agrotóxicos (WILLIAMS *et al.*, 1992) além do controle de fungos patogênicos (ROJO *et al.*, 2007).

Essas associações podem ser constituídas de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) ou *Trichoderma* spp. e de bactérias conhecidas por terem efeitos antagônicos à patógenos, como no caso do controle do fungo patogênico *Fusarium* spp. (ROJO *et al.*, 2007).

Buscando um maior conhecimento sobre as interações ocorridas entre os microorganismos FMA, *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. quando inoculados conjuntamente ou separadamente, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, foram realizados experimentos no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia do Instituto de Dinâmica da Matéria na Paisagem Agrícola pertencente ao centro de pesquisa alemão Leibniz-Zentrum für Agrarlandschaftsforschung (ZALF – Centro de Pesquisas da Paisagem Agrícola), localizado na cidade de Müncheberg, Alemanha. O trabalho

foi realizado sob orientação das pesquisadoras Dra. Marion Tauschke e Dra. Marina Müller, com auxílio técnico das assistentes técnicas Petra Lange e Martina Peters. O período de realização do trabalho foi de 10 de agosto à 08 de novembro de 2010.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a interação entre um fungo micorrízico arbuscular, *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp., e os efeitos sobre o crescimento e desenvolvimento dos fungos em condições *in vitro* e *in vivo*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver culturas *in vitro* de diferentes espécies dos fungos *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp. e do fungo micorrízico arbuscular;
- Desenvolver o cultivo *in vitro* conjunto das diferentes espécies de *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp.;
- Analisar o crescimento micelial e verificar a interação entre os dois fungos e as conseqüências ao crescimento dos mesmos;
- Desenvolver cultivo *in vitro* e *in vivo* conjunto dos fungos *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. com raízes de cenoura Ri T-DNA transformadas, micorrizadas ou não, e com plantas de trigo, micorrizadas ou não;
- Analisar o crescimento micelial dos três fungos cultivados *in vitro* e verificar as interações ocorridas entre eles durante o crescimento;
- Acompanhar o desenvolvimento das plantas de trigo;
- Confirmar a efetividade da inoculação dos fungos nas plantas de trigo;
- Realizar análise da atividade da enzima fosfatase ácida e da enzima  $\beta$ -glucosidase nas raízes de cenoura Ri T-DNA transformadas e nas raízes de trigo.

## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 Interação entre microorganismos

O desenvolvimento de uma planta depende de uma série de fatores, dentre eles a relação planta-solo, que é a fonte de obtenção da maior parte dos nutrientes necessários ao crescimento das plantas. Além de nutrientes são encontrados nos solos microorganismos que formam associações e interações com as plantas trazendo benefícios mútuos, como é o caso dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e dos fungos saprófitos do gênero *Trichoderma*. Esses grupos são constantemente sugeridas como potenciais agentes para o controle de doenças radiculares em plantas agronômicas, como é o caso das doenças causadas pelos fungos patogênicos do gênero *Fusarium*, contribuindo também como efeito supressivo desses patógenos do solo (ROJO *et al.*, 2007).

Vários experimentos *in vitro* e *in vivo* têm sido realizados para verificar os mecanismos e os efeitos da interação entre estes microorganismos. Segundo Martinez *et al.* (2003), muitos resultados de experimentos indicam que há uma interação, tanto positiva quanto negativa, entre os FMA e o fungo *Trichoderma* spp. na rizosfera e na colonização das raízes de plantas. Dessa maneira sabe-se que esses dois grupos de fungos, isoladamente, se mostram como uma potencial alternativa para o controle de doenças de plantas, levando a uma menor necessidade do uso de produtos químicos. No entanto, ainda não há certeza se ocorre uma interação negativa quando estes dois fungos estão presentes conjuntamente, pois inúmeros trabalhos indicam resultados contraditórios.

Pesquisas envolvendo esses organismos têm como objetivo prático, aumentar a produção, reduzir o uso de fertilizantes químicos e contribuir para alcançar um padrão de agricultura mais sustentável e menos dependente de insumos (SIQUEIRA & MOREIRA, 1996 citado por SOUZA *et al.*, 2006).

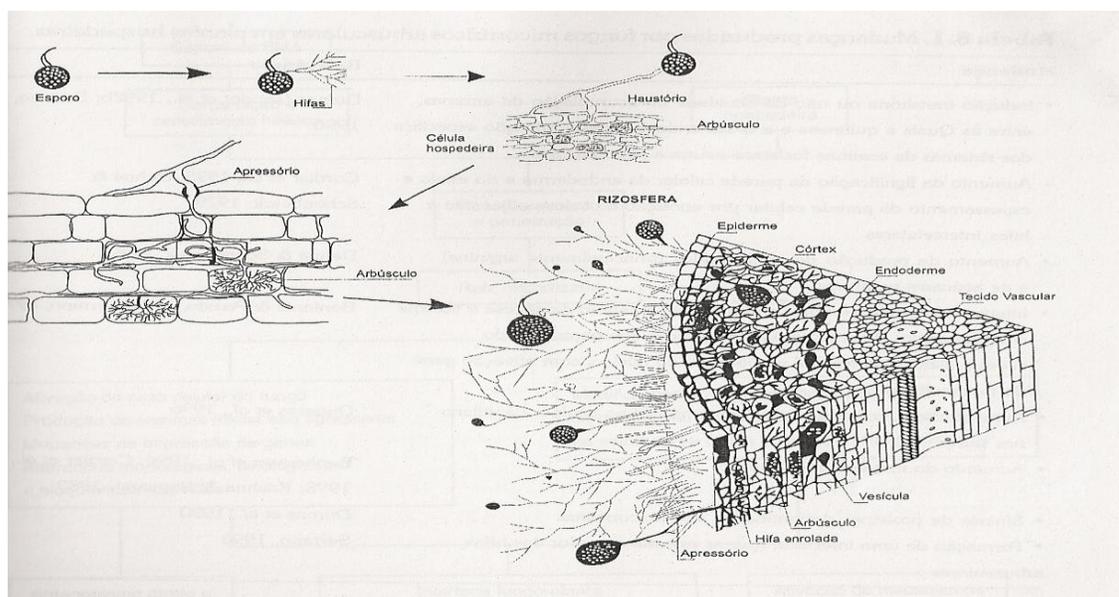
### 3.2 Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs)

Micorriza é uma associação mutualística não patogênica entre determinados fungos do solo e as raízes das plantas, sendo de ocorrência generalizada na maioria das espécies vegetais superiores (SOUZA *et al.*, 2006). O termo micorriza é originado do grego, onde “mico” significa fungo e “riza” significa raiz e foi proposta em 1885 pelo botânico alemão Albert Bernard Frank. Ainda segundo Souza *et al.* (2006), já se possuía conhecimento desta associação há muitos anos, mas era considerada uma associação parasítica, e foi somente a partir desta data que o termo micorriza foi utilizado pela primeira vez e considerada uma associação simbiótica.

Segundo as características morfológicas dos fungos, as micorrizas são divididas em dois grandes grupos: ectomicorrizas e endomicorrizas. Este último é o mais importante e mais comum entre as plantas vasculares, e de maior interesse agrônomo, compreendendo 80% das associações simbióticas, e onde se encontram os fungos micorrízicos arbusculares (ALLEN, 1996; LINDERMAN & PAULITZ, 1991; SOUZA *et al.*, 2006). Segundo Siqueira *et al.* (2002), os FMAs são formados por fungos da Ordem Glomales, classificados na Divisão Zygomycota, mas devido à divergências quanto à análises de RNA, estes foram classificados, por Schussler *et al.* (2001), em uma nova e única divisão, Glomeromycota.

As micorrizas arbusculares são formadas por fungos simbióticos obrigatórios que não sobrevivem sem a associação com as raízes das plantas, pois estas fornecem nutrientes necessários para o seu desenvolvimento em troca de nutrientes absorvidos do solo pelos fungos (SIQUEIRA *et al.*, 1985, citado por SIQUEIRA *et al.*, 2002). Os FMAs, na fase inicial de estabelecimento da simbiose, por meio de suas hifas aderem à superfície das raízes formando os apressórios, que penetram a epiderme e formam a unidade de infecção. A partir deste ponto as hifas penetram intracelularmente nas células corticais das raízes, sem causar danos às mesmas, formando estruturas especiais, os arbúsculos e vesículas, que fazem a interface entre o citoplasma da planta hospedeira e o fungo (LINDERMAN & PAULITZ, 1991;

SIQUEIRA *et al.*, 2002). Os arbúsculos são estruturas de hifas densamente ramificadas, que se assemelham a pequenas árvores, e que caracterizam este grupo de fungos, sendo sua função de troca de nutrientes entre os simbiontes. As vesículas são estruturas globulosas ou alongadas que servem de órgão de reserva do fungo. Além de penetrar internamente as raízes, na rizosfera há também o desenvolvimento de uma rede de hifas, células auxiliares e esporos, que fazem a interface entre o solo e a raiz da planta (Figura 1), auxiliando na absorção de nutrientes e formação de propágulos (SIQUEIRA *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2006).



**Figura 1.** Ilustração esquemática de uma raiz colonizada por fungo micorrízico arbuscular. Fonte: Maia *et al.* In: Michereff *et al.* (2005).

Muitos estudos têm demonstrado que quando comparado a tratamentos controles sem inoculação de FMA, durante a colonização do FMA na raiz da planta hospedeira ocorre a regulação e ativação da expressão de genes de defesa da planta, que reconhecem o fungo permitindo a colonização e em seguida suprimindo a ação destes genes. Em caso contrário a planta interpretaria este fungo como um patógeno e continuaria a ativar seus genes de defesa. Dessa forma verifica-se a

formação de um mecanismo de reconhecimento mútuo de troca de sinais e respostas bioquímicas durante o estabelecimento da simbiose, o que envolve a expressão dos chamados 'genes de simbiose' pela planta e emissão de sinais simbióticos pelo fungo, permitindo, assim, o estabelecimento e acomodação dos FMA. Esta resposta é conhecida como um processo de elicitación que é potencialmente capaz de ser mais rapidamente reativada quando houver a inoculação de um microorganismo patogênico (FILION *et al.*, 1999; DALLA COSTA, 2010).

Em razão de seu desenvolvimento ser em parte na raiz das plantas e em parte no solo, os FMAs constituem importante ligação entre os componentes bióticos e abióticos do solo com papel fundamental na sobrevivência, no crescimento e desenvolvimento das plantas (SMITH & READ, 1997 citado por LOCATELLI & LOVATO, 2002). Através do maior volume de solo explorado pelas hifas associadas às raízes há maior absorção de nutrientes, principalmente fósforo e água, que são disponibilizados ao hospedeiro em troca de fotossintatos necessários pelo fungo para o seu desenvolvimento (DALLA COSTA, 2010; SIQUEIRA *et al.*, 2002). Os micélios extraradicias dos FMA também liberam substâncias no ambiente (solo) que tendem a modificar a composição da microbiota na rizosfera, podendo influenciar o desenvolvimento de alguns microorganismos. Dentre estas substâncias destacam-se aminoácidos, fenóis, antibióticos, compostos voláteis e proteínas (FILION *et al.*, 1999).

Como as plantas ficam mais nutridas e vigorosas devido ao grande potencial dos FMAs como insumo biológico para a agricultura, há redução na necessidade de aplicação de fertilizantes. Assim, as plantas micorrizadas também têm maior resistência e tolerância ao ataque de microorganismos fitopatogênicos do solo (SIQUEIRA *et al.*, 2002).

No que diz respeito à análise da efetividade da colonização de uma planta por FMA utiliza-se a técnica de coloração das raízes, o que fornecerá dados sobre a porcentagem de colonização micorrízica da planta. Para avaliar a atividade das micorrizas empregam-se as análises da atividade de enzimas que são secretadas pelas micorrizas, principalmente quando se tem por objetivo analisar as interações

ocorridas quando em presença de outros microorganismos no solo. Isto se deve à grande produção de enzimas desde o momento da infecção até após a colonização da raiz. Como exemplo podemos citar a produção de enzimas hidrolíticas (atuam na degradação da parede celular), quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases (hidrolases liberadas quando da presença de outro patógeno), fosfatases (aquisição de fosfato para a planta) e  $\beta$ -glucosidase (envolvida em degradação celulósica).

### 3.3 *Trichoderma* spp.

*Trichoderma* spp. é um fungo necrotrófico, não patogênico, encontrado na maioria dos solos, especialmente em solos orgânicos, podendo viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos (MELO *et al.*, 2000). Pertencente ao grupo dos Deuteromicetos e mais especificamente à família Moniliaceae, este fungo é caracterizado pelo rápido crescimento de suas colônias em forma de tufo, possuindo hifas muito ramificadas que originam conidióforos também muito ramificados, e estes formam abundância de conídios acumulados no ápice de suas fiálides (SHALINI *et al.*, 2007; MELO *et al.*, 2000; MELO, 1991).

Este gênero tem recebido uma grande atenção na área de biocontrole de doenças devido às suas características naturais de antagonista a outros microorganismos. Além disso, inúmeros estudos demonstraram seu potencial uso como agente de biocontrole contra diversos patógenos de solo que atacam várias culturas agrícolas. Ele pode parasitar as estruturas de sobrevivência dos patógenos que persistem no solo por longos períodos, diminuindo a presença de fontes de inóculos destes fungos. As espécies mais estudadas e que têm demonstrado eficiência no controle biológico são: *Trichoderma harzianum*, *T. koningii*, *T. atroviride*, *T. viride*, *T. hamatum* e *T. pseudokoningii*. Estas espécies têm sua aplicação direcionada especialmente para o controle dos seguintes patógenos: *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* spp. e *Pythium* spp. (MELO *et al.*, 2000; MELO, 1991; ROJO *et al.*, 2007).

As espécies de *Trichoderma* atuam sobre outros microorganismos através de interações complexas com o uso de mecanismos antagônicos, associados ou isolados, como micoparasitismo, antibiose e competição (ROJO *et al.*, 2007). Em muitos estudos foi verificada a capacidade destes fungos de produzir antibióticos voláteis tóxicos e enzimas líticas na presença de outros fungos, e que são capazes de inibir a ação de fungos patogênicos e seus propágulos (ETHUR *et al.*, 2001). Os diversos antibióticos liberados pelo fungo são de interesse tanto agrícola como medicinal, e a supressão dos fungos patogênicos decorre do poder toxicológico destes antibióticos sobre os mesmos. Dentre os antibióticos liberados podemos citar gliotoxina, emodina, trichodermina e trichodermol (SAMSON *et al.*, 2002). As enzimas líticas, por sua vez, têm ação degradadora da parede celular dos fungos parasitados, usando a celulose obtida a partir desta degradação como fonte de carbono e energia para o seu metabolismo. Em resumo, o parasitismo de um fungo patogênico por espécies do gênero *Trichoderma* ocorre através da detecção do hospedeiro por estímulos químicos liberados pelo mesmo e reconhecidos pelo *Trichoderma* spp., levando ao crescimento deste em direção do fungo hospedeiro, e ao entrar em contato enrola suas hifas fortemente sobre toda a extensão das hifas do fungo patogênico, penetrando-as em seguida (MELO *et al.*, 2000; MELO, 1991).

Muitos estudos estão sendo realizados no sentido de aumentar a fonte de inóculo destes fungos no solo para assim ser realizado o controle biológico de patógenos, levando-se em consideração as condições abióticas de desenvolvimento dos mesmos para que ocorram resultados satisfatórios no controle dessas doenças (MELO, 1991).

### **3.4 *Fusarium* spp.**

Os fungos do gênero *Fusarium* são patógenos de solo com ampla distribuição geográfica, apresentando espécies cosmopolitas, que podem se desenvolver em diferentes regiões, ou em regiões específicas. Tendo ocorrência desde a região

tropical e subtropical até a região temperada, causando doenças em uma ampla gama de espécies de interesse agrônômico. Cada uma das espécies de fungos deste gênero podem ter uma ampla gama de hospedeiros, mas existem algumas espécies e raças que são específicas a um único hospedeiro (MICHEREFF *et al.*, 2005).

São fungos assexuados, possuindo forma sexuada em algumas espécies, caracterizados pela formação de macroconídios fusiformes, apresentando ação necrotrófica, pois mata os tecidos vegetais da planta hospedeira tirando nutrientes da mesma para o seu crescimento dentro da planta (AGRIOS, 2005; OKUBARA & PAULITZ, 2005; citados por DALLA COSTA, 2010).

O desenvolvimento deste fungo em plantas pode causar diversos tipos de doenças, sendo os efeitos mais comuns a podridão de sementes, podridão das raízes e murcha vascular pela sua penetração e desenvolvimento no sistema vascular. Como exemplos de espécies deste gênero pode-se citar os seguintes fungos: *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (murcha em algodão), *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (mal do Panamá na banana), *Fusarium oxysporum* f. sp. *glycines* (murcha na soja), *Fusarium solani* (podridão seca em cebola, batata, mamão e mandioca; podridão do caule em café; podridão radicular vermelha na soja), *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (podridão radicular seca em feijão), *Fusarium moniliforme* (podridão do colmo em milho), *Fusarium graminearum* (principal causador de fusariose em plantas de trigo), *Fusarium culmorum* e *Fusarium cerealis* (causadores de podridão radicular e fusariose em diversos cereais), entre outros (MICHEREFF *et al.*, 2005; SAMSON, *et al.*, 2002).

Segundo Rojo *et al.* (2007), durante a colonização da planta hospedeira o *Fusarium* spp. pode liberar compostos micotóxicos que podem ser tóxicos para um grande número de animais e seres humanos quando acumulados nos alimentos. Como exemplo, os fungos *Fusarium proliferatum* e *Fusarium moniliforme*, espécies dominantes de *Fusarium* spp. que colonizam as plantas de milho, são responsáveis pela acumulação de três diferentes tipos de micotoxinas nos grãos de milho: fumonisinas (produz efeitos tóxicos em animais), fusaproliferina (tóxico para células de mamíferos), beauvericina (tóxico para inúmeras células humanas). *Fusarium*

*graminearum* e *Fusarium culmorum* produzem outros tipos de micotoxinas também altamente tóxicas aos seres humanos, como deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV) e zearalenona (ZEA), estas duas últimas também produzidas por *Fusarium cerealis*. Vários estudos já foram realizados comprovando o efeito deletério de DON sobre o sistema digestivo de suínos, e em seres humanos pode causar náuseas, febre, dor de cabeça e vômito. Zearalenona possui um efeito menos tóxico que DON, mas é conhecida por afetar a fertilidade dos animais devido à sua semelhança com o hormônio feminino (SCHMALE & BERGSTROM, 2003).

Por esses motivos também se torna necessário um controle mais eficiente contra este patógeno nas culturas agronômicas visando diminuir quedas de rendimento e a presença de micotoxinas que podem prejudicar a saúde de quem consome um alimento contaminado.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Meios de cultura utilizados

Para a realização dos experimentos *in vitro* e para a micropropagação dos fungos utilizados nos experimentos foram utilizados cinco diferentes meios de cultura, descritos a seguir. Logo após a preparação e esterilização, os meios de cultura, ainda quentes, foram adicionados às placas-de-petri em câmara de fluxo (Heraeus Instruments, Hanau, Alemanha) com ambiente asséptico.

#### 4.1.1 Meio de cultura Strullu-Romand (MSR)

O meio de cultura MSR tem sido largamente utilizado em experimentos *in vitro* com fungos micorrízicos, sendo o mais ideal para estabilizar o cultivo destes fungos *in vitro* (Diop, 2003). Constituído de macro e micronutrientes além de vitaminas, Fe-EDTA, açúcar (fonte de carbono) e Bacto Agar (agente geleificante), mostra-se um meio altamente nutritivo.

Para a preparação deste meio foram primeiramente preparados soluções estoques como descrita na tabela 1. Os nutrientes das cinco soluções estoques foram diluídos em 1L de água ultrapura e armazenados em refrigerador para uso posterior. Para a preparação final do meio de cultura retiram-se as quantidades indicadas na tabela 1 de cada solução estoque diluindo-as em 1L de água ultrapura, após foi adicionado 10g/l de sacarose, deixando em agitação até diluição completa. O meio de cultura deve ser ajustado à pH 5,5 para somente depois se adicionar 2g/l de Bacto Agar e ser autoclavado (Autoclave 40160,1E; KSG Esterilizadores GmbH, Göttingen, Alemanha) à 121°C por 15 minutos.

**Tabela 1.** Solução estoque do meio de cultura MSR e diluições necessárias para a preparação do meio de cultura utilizado no experimento.

	<b>Nutrientes</b>	<b>Solução estoque (g/l)</b>	<b>Quantidade necessária para preparar o meio de cultura (ml/L)</b>
Macronutrientes 1	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	73,9	10
	KNO <sub>3</sub>	7,6	
	KCl	6,5	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,41	
Micronutrientes	MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	2,45	1
	ZnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	0,29	
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,86	
	CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,24	
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4H <sub>2</sub> O	0,035	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,0024	
Vitaminas	Tiamina	1,0	10
	Piroxidina	0,9	
	Nicotina	1,0	
	D-ácido pantotênico	0,9	
	B12	0,4	
	Biotina	0,9 x 10 <sup>-3</sup>	
Macronutrientes 2	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	35,9	10
	NaFeEDTA	1,6	5

#### 4.1.2 Sabouraud-1%-Glucose-1%-Maltose-Agar (Sabo)

Este meio de cultura possibilita um crescimento normal da maioria dos fungos, apresentando a coloração característica dos mesmos, mas com pouco desenvolvimento de esporos. É por isso um meio de cultura ideal para multiplicação dos fungos e identificação das espécies.

Para a preparação de 500ml deste meio de cultura foram necessários: 2,5g peptona de caseína; 2,5g peptona de carne; 5g de α-D-glucose; 5g maltose; 8,5g Agar-agar; e 500ml água destilada. Primeiramente o Agar-agar foi dissolvido em 300ml de água destilada por uma hora em panela à vapor (Dampftopf Typ 9120-0010; VEB MLW, Berlin, Alemanha). Durante o tempo de dissolução o restante dos ingredientes foram dissolvidos nos 200mL de água restantes, sendo estes adicionados junto à solução de Agar-agar já dissolvida e em seguida a solução final foi autoclavada à 121°C por 15 minutos.

#### 4.1.3 Meio nutritivo sintético agarizado (SNA)

Este é um meio de cultura rico em nutrientes, apresentando crescimento anormal das colônias de fungos por apresentar o desenvolvimento de micélio de coloração clara (quase incolor), não desenvolvendo a coloração característica de cada fungo. Mas, ao contrário do meio Sabo, SNA possibilita o desenvolvimento de muitos esporos, sendo por isso ideal para a produção de suspensão de esporos que são utilizados como inoculantes para os experimentos.

Para a preparação de 500ml deste meio foram necessários: 0,5g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5g de  $\text{KNO}_3$ ; 0,25g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,25g de  $\text{KCl}$ ; 0,1g de glicose; 0,1g de sacarose; 10g de Agar-agar; e 500mL de água destilada. Primeiramente foi dissolvido o Agar-agar nos 500ml de água destilada por uma hora em panela à vapor. Após a dissolução do Agar-agar adicionou-se o restante dos ingredientes sendo então o meio de cultura autoclavado à  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos.

#### 4.1.4 Arroz-Agar

Este meio de cultura é muito utilizado para avaliar a presença de micotoxinas liberadas pelos fungos do gênero *Fusarium*, tentando recriar um ambiente de desenvolvimento próximo ao natural. Para a preparação de 500ml deste meio foram necessários: 9g de Agar-agar; 25ml de suspensão de arroz na concentração de 40g/L; e 475ml de água destilada. Primeiramente foi preparada a suspensão de arroz utilizando 40g de farinha de arroz branco comercial que foi misturado à 1L de água destilada e cozida por 30 minutos. Após o cozimento esta mistura foi filtrada e utilizada como suspensão de arroz na concentração de 40g/L. Durante a preparação da suspensão de arroz foi realizada a dissolução do Agar-agar nos 475ml de água destilada por uma hora na panela a vapor. A solução de Agar-agar e a suspensão de

arroz foram autoclavadas separadamente à 121°C por 15 minutos e só após é que foi misturado os 25ml de suspensão de arroz à solução de Agar-agar.

#### **4.1.5 Agar Czapek-Dox-Iprodion-Dicloran (CZID)**

Meio de cultura muito utilizado em pesquisas que avaliam o crescimento de fungos, mas devido à presença de vários antibióticos pode restringir o crescimento de algumas espécies. Para a preparação de 500ml do meio de cultura foram necessários: 17,5g de Agar Czapek-Dox; 0,0025g de  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0,005g de  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; 5g de Agar-agar; 0,5ml de dicloran (0,2% em etanol); 0,025g de cloranfenicol; 0,025g de penicilina; 0,025g de estreptomicina; 0,025g de chlortetracyclin-hydrochl; 0,5g de solução de iprodione; e 500ml de água destilada. A água destilada, o Agar-Czapek-Dox, o  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$  e o Agar-agar foram colocados em um frasco de 500ml e dissolvidos por cerca de uma hora na panela à vapor, sendo posteriormente autoclavado à 121°C por 15 minutos. Os outros ingredientes somente foram acrescentados ao meio de cultura após o processo de autoclavagem, antes da colocação do meio de cultura nas placas-de-petri, quando este ainda estava com 55°C. Os antibióticos foram anteriormente dissolvidos em 5ml de água estéril morna; a solução de iprodione foi preparada dissolvendo-se 0,3g de iprodione em 50ml de água estéril; sendo que a solução de dicloran já estava preparada.

## **4.2 Fungos utilizados e sua multiplicação**

### **4.2.1 Fungo micorrízico arbuscular**

O experimento foi conduzido com o uso de esporos da espécie micorrízica *Glomus intraradices*, obtido de inoculantes micorrízicos produzidos no próprio

laboratório a partir de experimentos realizados anteriormente em plantas de alho-poró. O inoculante micorrízico é uma mistura de substrato e sistema radicular de plantas micorrizadas. Para a realização do isolamento dos esporos contidos no inoculante foi realizada a lavagem do mesmo em água corrente deixando o inoculante passar por peneiras de 710 $\mu$ m, 250 $\mu$ m e 50 $\mu$ m, respectivamente. A solução presente na última peneira foi coletada e analisada em estereomicroscópio (Stemi SV11 Apo. Zeiss; Carlos Zeiss MicroImaging, Inc) onde foi realizado o isolamento dos esporos das micorrizas. Estes esporos foram retirados da solução com o auxílio de uma pipeta e transferido para tubo eppendorff com água destilada e armazenado em freezer à -20°C até o seu uso.

Após o isolamento dos esporos foi realizada a sua esterilização (os esporos devem estar descongelados), em câmara de fluxo, deixando-os por 2 minutos em 0,5 $\mu$ l de hipoclorito de sódio 0,5%, seguida de quatro lavagens em 0,5 $\mu$ l de água estéril.

Após a esterilização os esporos estão aptos a serem utilizados como inóculo para experimentos com plantas ou para uso em experimentos *in vitro*, sendo neste caso cultivados em meio de cultura 1% agar-água. Em uma câmara de fluxo e com o auxílio de uma pipeta retirou-se a solução esporo-água do tubo eppendorff adicionando pequenas bolhas da solução sobre o meio de cultura em diferentes pontos da placa-de-petri. As placas foram mantidas em incubadora (B6060, Heraeus Instruments; Hanau, Alemanha), em posição invertida, à temperatura de 27,5°C no escuro, sendo diariamente analisadas em estereomicroscópio para verificar o desenvolvimento de hifas.

Os esporos, uma vez que apresentaram hifas bem desenvolvidas poderiam ser utilizados para a colonização micorrízica de raízes de cenoura Ri T-DNA transformadas, utilizadas nos experimentos *in vitro*. Essas raízes foram obtidas no próprio laboratório, cultivadas em meio de cultura MSR e mantidas em incubadora (B12 Function Line, Heraeus Instruments; Hanau, Alemanha), em posição invertida, a 27°C no escuro.

#### 4.2.2 *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp.

As estirpes destes fungos utilizadas no experimento foram obtidas da coleção de fungos mantido no laboratório, coletadas e isoladas em diferentes áreas rurais do estado de Brandenburg, na Alemanha, e em experimentos realizados no próprio laboratório (tabela 2). Todos os fungos são conservados em tubos de vidro com o próprio substrato (solo) de onde foram coletados.

**Tabela 2.** Identificação, origem e ano de coleta das diferentes espécies de *Fusarium* spp e *Trichoderma* spp. utilizadas nos experimentos.

Espécies	Sigla	Cidade	Origem	
			Ano	Planta/órgão
<i>Fusarium culmorum</i>	Fc1	Havelland	2006	FORAGEIRA/folha
<i>Fusarium culmorum</i>	Fc13	Märkish Oderland	2006	Trigo/espiga
<i>Fusarium graminearum</i>	Fg18	Uckermark	2006	Trigo/espiga
<i>Fusarium graminearum</i>	Fg21	Märkish Oderland	2006	Trigo/raiz
<i>Fusarium graminearum</i>	Fg23	Märkish Oderland	2006	Trigo/espiga
<i>Fusarium cerealis</i>	Fc51	Uckermark	2001	Trigo/raiz
<i>Fusarium culmorum</i>	Fc53	Uckermark	2001	Trigo/raiz
<i>Fusarium cerealis</i>	Fc67	Uckermark	2001	Trigo/raiz
<i>Trichoderma atroviride</i>	Trich1	Müncheberg	2010	Esporo de micorriza
<i>Trichoderma koningii</i>	Trich2	Müncheberg	2001	Inoculo micorrízico.
<i>Trichoderma harzianum</i>	Trich654	Müncheberg	1999	Solo

Para a multiplicação *in vitro* foi fragmentado, em câmara de fluxo, um pouco do substrato-fungo de cada estirpe em placas contendo meio de cultura Sabo. Estas foram mantidas por aproximadamente 3 dias (até se verificar o crescimento de colônias típicas de cada fungo) em incubadora (B6120, Heraeus Instruments; Hanau, Alemanha) a 25°C no escuro. Com a confirmação da presença do fungo realizou-se a repicagem e nova multiplicação para que cada estirpe crescesse livre de contaminantes, sendo então possível a identificação das espécies e preparação de

suspensões de esporos. A repicagem foi realizada em câmara de fluxo por meio de raspagem do micélio da colônia identificada, seguida de inoculação em placa-de-petri com meio Sabo e também em placa-de-petri com meio SNA. Em seguida as placas foram colocadas em incubadora à 25°C no escuro por 3 dias. Após este período confirmou-se a pureza da colônia pela visualização das placas com meio Sabo e a identificação das espécies em microscópio com esporos das placas-de-petri com meio SNA. A identificação das espécies é realizada através da visualização microscópica (Jenaval, Carl Zeiss) do formato dos esporos e comparação com a chave descritiva encontrada em SAMSON *et al.* (2002).

Com a confirmação de pureza e identificação da espécie de cada fungo realizou-se a multiplicação em placas-de-petri com meio de cultura SNA para a obtenção dos inóculos necessários para os experimentos. Depois de inoculadas com os respectivos fungos as placas foram mantidas em incubadora à 25°C no escuro por 1 à 2 dias, sendo em seguida transferidas para uma câmara de crescimento (fabricação própria), mantida à temperatura ambiente e com ciclo luminoso de 12 horas, onde permaneceram por mais 10 dias.

Após o período de crescimento foi realizada a retirada dos esporos das placas-de-petri para a obtenção de uma suspensão de esporos de cada fungo. Em cada placa-de-petri foram adicionados 6ml da solução de Locke Ringer (NaCl, CaCl<sub>2</sub>, KCl) e com o auxílio de uma alça de Drigalski foi realizada a raspagem do micélio, sendo este passado por um funil contendo gaze estéril para filtração da suspensão. A concentração da suspensão de esporos foi calculada com o auxílio de um hemacitômetro, sendo então a suspensão ajustada para a concentração desejada (esporos/ml).

### 4.3 Descrição dos experimentos

#### 4.3.1 Experimento 1: Interação *in vitro* entre diferentes espécies dos fungos *Fusarium* spp. e *Trichoderma atroviride*

Este experimento teve como objetivo avaliar a velocidade de crescimento, agressividade e interação das diferentes espécies do fungo *Fusarium* spp. (tabela 2) quando cultivados em conjunto com *Trichoderma atroviride* e em dois meios de cultura distintos. Foram utilizadas placas-de-petri de vidro e os meios de cultura Arroz-Agar e CZID, sendo o experimento dividido em 2 sub-experimentos como descrito na tabela 3.

Os inóculos de cada fungo foram obtidos pela preparação de uma solução de esporos a partir do cultivo dos fungos em meio SNA, ajustando esta solução para a concentração de  $2 \times 10^5$  esporos/ml.

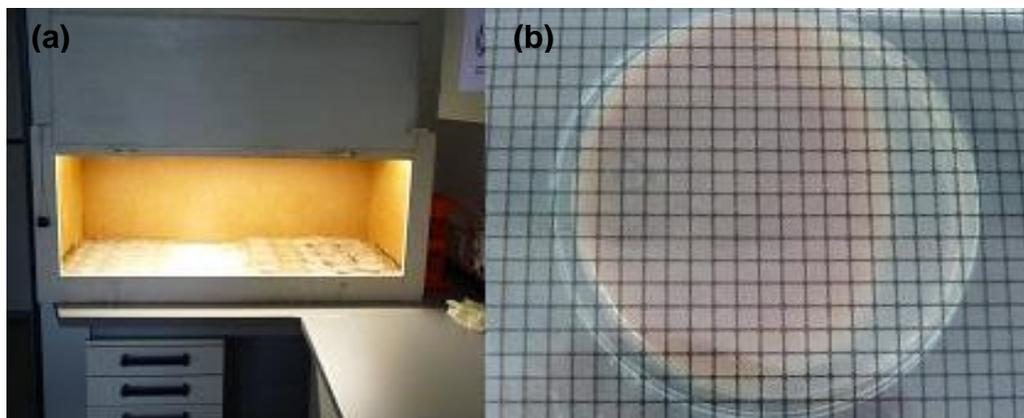
Para a inoculação dos fungos nas placas-de-petri foram feitos dois orifícios de 5mm no meio de cultura distantes cerca de 1cm da borda da placa em lados opostos. O meio de cultura foi removido e neste foi adicionado em um lado 0,03ml de *Fusarium* spp. (a espécie inoculada em cada placa conforme o tratamento) e no outro o mesmo volume de *Trichoderma atroviride*. Como controle foi realizado o cultivo isolado de cada fungo, sendo, portanto feito somente um orifício no meio de cultura e adicionada o mesmo volume de inóculo. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento.

As placas foram mantidas em incubadora (fabricação própria, figura 2a) por 15 dias à temperatura ambiente e ciclo luminoso de 12 horas luz. Até o quinto dia de cultivo foram feitas análises diárias do crescimento das colônias dos fungos, após este período as análises foram realizadas a cada dois dias até o 15º dia. O crescimento das colônias foi determinado com o auxílio de um plástico quadriculado (figura 2b), contando o numero de quadrados de 5mm x 5mm ocupados pelo fungo. Após o período de cultivo foi realizada a análise em microscópio dos esporos de

cada fungo em cada tratamento. (nas placas com dois fungos crescendo juntos foi retirado esporos da zona de contato dos fungos) e determinado o tamanho dos mesmos em  $\mu\text{m}$ .

**Tabela 3.** Esquema experimental do experimento 1

<b>Meio de cultura Arroz-Agar</b>	
<b>Identificação</b>	<b>Tratamento</b>
1	<i>Trichoderma atroviride</i> 1 + <i>Fusarium culmorum</i> 1
2	<i>Trichoderma atroviride</i> 1 + <i>Fusarium graminearum</i> 18
3	<i>Trichoderma atroviride</i> 1 + <i>Fusarium graminearum</i> 21
4	<i>Trichoderma atroviride</i> 1 + <i>Fusarium cerealis</i> 51
5	<i>Trichoderma atroviride</i> 1 + <i>Fusarium culmorum</i> 53
6	<i>Trichoderma atroviride</i> 1 + <i>Fusarium cerealis</i> 67
7	<i>Trichoderma atroviride</i> 1
8	<i>Fusarium culmorum</i> 1
9	<i>Fusarium graminearum</i> 18
10	<i>Fusarium graminearum</i> 21
11	<i>Fusarium cerealis</i> 51
12	<i>Fusarium culmorum</i> 53
13	<i>Fusarium cerealis</i> 67
<b>Meio de cultura CZID</b>	
<b>Identificação</b>	<b>Tratamento</b>
1	<i>Trichoderma atroviride</i> 1 + <i>Fusarium culmorum</i> 1
2	<i>Trichoderma atroviride</i> 1 + <i>Fusarium graminearum</i> 18
3	<i>Trichoderma atroviride</i> 1 + <i>Fusarium graminearum</i> 21
4	<i>Trichoderma atroviride</i> 1 + <i>Fusarium cerealis</i> 51
5	<i>Trichoderma atroviride</i> 1 + <i>Fusarium culmorum</i> 53
6	<i>Trichoderma atroviride</i> 1 + <i>Fusarium cerealis</i> 67
7	<i>Trichoderma atroviride</i> 1
8	<i>Fusarium culmorum</i> 1
9	<i>Fusarium graminearum</i> 18
10	<i>Fusarium graminearum</i> 21
11	<i>Fusarium cerealis</i> 51
12	<i>Fusarium culmorum</i> 53
13	<i>Fusarium cerealis</i> 67



**Figura 2.** a) Incubadora. b) Plástico quadriculado de 5mm x 5mm.

#### **4.3.2 Experimento 2: Interação *in vitro* entre diferentes espécies do fungo *Trichoderma* spp. e *Fusarium graminearum* ou *Fusarium culmorum***

Este experimento teve como objetivo avaliar a velocidade de crescimento, a agressividade e a interação dos fungos *Fusarium graminearum* ou *Fusarium culmorum* quando cultivados em conjunto com três diferentes espécies do fungo *Trichoderma* spp. (tabela 2) e em dois meios de cultura distintos. Foram utilizadas placas-de-petri de vidro e os meios de cultura Arroz-Agar e CZID, sendo o experimento dividido em 2 sub-experimentos como descrito na tabela 4, e com cinco repetições para cada tratamento.

O procedimento para o preparo deste experimento e as análises realizadas seguem a mesma metodologia do experimento 1, sendo o tratamento controle também identificado pelo cultivo individual de cada fungo.

**Tabela 4.** Esquema experimental do experimento 2

<b>Meio de cultura Arroz-Agar</b>	
<b>Identificação</b>	<b>Tratamento</b>
1	<i>Trichoderma atroviride</i> 1 + <i>Fusarium culmorum</i> 13
2	<i>Trichoderma atroviride</i> 1 + <i>Fusarium graminearum</i> 23
3	<i>Trichoderma koningii</i> 2 + <i>Fusarium culmorum</i> 13
4	<i>Trichoderma koningii</i> 2 + <i>Fusarium graminearum</i> 23
5	<i>Trichoderma harzianum</i> 654 + <i>Fusarium culmorum</i> 13
6	<i>Trichoderma harzianum</i> 654 + <i>Fusarium graminearum</i> 23
7	<i>Trichoderma atroviride</i> 1
8	<i>Trichoderma koningii</i> 2
9	<i>Trichoderma harzianum</i> 654
10	<i>Fusarium culmorum</i> 13
11	<i>Fusarium graminearum</i> 23
<b>Meio de cultura CZID</b>	
<b>Identificação</b>	<b>Tratamento</b>
1	<i>Trichoderma atroviride</i> 1 + <i>Fusarium culmorum</i> 13
2	<i>Trichoderma atroviride</i> 1 + <i>Fusarium graminearum</i> 23
3	<i>Trichoderma koningii</i> 2 + <i>Fusarium culmorum</i> 13
4	<i>Trichoderma koningii</i> 2 + <i>Fusarium graminearum</i> 23
5	<i>Trichoderma harzianum</i> 654 + <i>Fusarium culmorum</i> 13
6	<i>Trichoderma harzianum</i> 654 + <i>Fusarium graminearum</i> 23
7	<i>Trichoderma atroviride</i> 1
8	<i>Trichoderma koningii</i> 2
9	<i>Trichoderma harzianum</i> 654
10	<i>Fusarium culmorum</i> 13
11	<i>Fusarium graminearum</i> 23

#### **4.3.3 Experimento 3: Interação *in vitro* entre *Glomus intraradices*, *Trichoderma atroviride* e *Fusarium graminearum* ou *Fusarium culmorum***

O objetivo deste experimento foi verificar o comportamento no crescimento dos fungos saprofitos e necrotróficos, cultivados em conjunto ou separadamente, quando em presença do fungo micorrízico arbuscular. Para isto foram utilizadas

placas-de-petri descartáveis estéreis com dois ou três compartimentos. O meio de cultura utilizado foi o MSR, sendo este dividido em dois tipos: com açúcar (MSR+, com sua formulação normal) e sem açúcar (MSR-, formulação modificada). No caso das placas-de-petri com dois compartimentos, foi adicionado o meio MSR+ em todo o volume de um compartimento, sendo este o local onde se inoculou com esporos de *Glomus intraradices* a raiz de cenoura Ri T-DNA transformada. No segundo compartimento foi adicionado o meio MSR- somente até a metade da altura da placa-de-petri, onde foram inoculados separadamente o fungo saprofítico e o necrotrofico. O mesmo foi realizado nas placas com três compartimentos, sendo que neste caso são dois compartimentos com o meio MSR-, nos quais foram inoculados separadamente os dois fungos saprofíticos. Entre estas divisões foi adicionado um pouco de meio de cultura MSR- para formar uma rampa que facilitasse a passagem dos fungos e o contato entre um compartimento e outro (FILION *et al*, 1999).

Para a inoculação do fungo micorrízico foram feitos orifícios de 5mm de diâmetro no meio de cultura, próximo à borda superior da placa, onde foi introduzido um pedaço de meio de cultura com hifas e esporos de *G. intraradices* foram retirados das placas-de-petri anteriormente cultivadas com esporos esterilizados do fungo micorrízico (como descrito no item 4.2.1). Após colocou-se no meio de cultura, em contato com os esporos, um pedaço de raiz de cenoura Ri T-DNA transformada para que fosse micorrizada. Todo o processo foi realizado em câmara de fluxo, sendo sem seguida as placas fechadas com parafilm® e incubadas em incubadora (B6060, Heraeus Instruments; Hanau, Alemanha) à 27,5°C no escuro para que ocorresse a colonização da raiz pelo fungo micorrízico.

Após o período de crescimento micorrízico foi realizada a inoculação dos fungos *Trichoderma atroviride*, *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum* nos seus respectivos compartimentos das placas-de-petri, conforme esquema experimental demonstrado na tabela 5. O controle foi composto de placas com raízes de cenoura Ri T-DNA transformada não micorrizadas.

A concentração da suspensão de esporos de cada fungo utilizada como inóculo para este experimento foi ajustada à  $1 \times 10^4$  esporos/ml, sendo inoculados com o auxílio de uma pipeta, que foi levemente introduzida no meio de cultura para

então liberar a suspensão de esporos. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo com ambiente asséptico para evitar a contaminação com outros microorganismos.

**Tabela 5.** Esquema experimental do experimento 3

<b>Placas-de-petri com dois compartimentos</b>		
<b>Identificação</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Repetições</b>
1	Raiz micorrizada + <i>Fusarium culmorum</i> *	3
2	Raiz micorrizada + <i>Fusarium graminearum</i>	3
3	Raiz micorrizada + <i>Trichoderma atroviride</i>	3
4	Raiz não micorrizada + <i>Fusarium culmorum</i>	3
5	Raiz não micorrizada + <i>Fusarium graminearum</i>	3
6	Raiz não micorrizada + <i>Trichoderma atroviride</i>	3
<b>Placas-de-petri com dois compartimentos e apresentando micélio de micorriza sobre toda a placa de petri.</b>		
<b>Identificação</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Repetições**</b>
7	Raiz micorrizada + <i>Trichoderma atroviride</i>	1
8	Raiz micorrizada + <i>Fusarium culmorum</i>	1
9	Raiz não micorrizada + <i>Trichoderma atroviride</i>	1
10	Raiz não micorrizada + <i>Fusarium culmorum</i>	1
<b>Placas-de-petri com três compartimentos</b>		
<b>Identificação</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Repetições</b>
11	Raiz micorrizada + <i>F. culmorum</i> + <i>T. atroviride</i>	4
12	Raiz micorrizada + <i>F. graminearum</i> + <i>T. atroviride</i>	4
13	Raiz não micorrizada + <i>F. culmorum</i> + <i>T. atroviride</i>	4
14	Raiz micorrizada + <i>F. graminearum</i> + <i>T. atroviride</i>	4

Notas: \* As siglas dos fungos utilizados neste experimento são Fc13, Fg23 e Trich1.

\*\* Foi realizada somente uma repetição neste experimento por haver somente duas placas-de-petri contendo micélio micorrízico sobre toda a sua superfície, sendo este tratamento utilizado para comparação com o tratamento idêntico, acima identificado, que continha micélio somente em um compartimento da placa.

Após a inoculação as placas foram fechadas com parafilm® e mantidas em incubadora (B290, Heraeus Instruments; Hanau, Alemanha) à 27°C no escuro por um período de 15 dias, durante os quais foi analisado diariamente o diâmetro de crescimento de cada fungo com o auxílio de uma régua. Após os 15 dias foi realizada a análise de atividade da enzima fosfatase ácida e da enzima  $\beta$ -glucosidase das

raízes de cenoura Ri T-DNA transformadas de cada placa-de-petri dos tratamentos (método descrito no item 4.4).

#### **4.3.4 Experimento 4: Interação *in vivo* (*Triticum aestivum* L.) entre *Glomus intraradices*, *Trichoderma atroviride* e *Fusarium culmorum***

Para estudar o efeito da interação *in vivo* entre os fungos *Glomus intraradices*, *Trichoderma atroviride* e *Fusarium culmorum* foi realizado um experimento em plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.), tendo como substrato areia esterilizada.

A areia foi lavada em água corrente por 4 vezes, drenando-se a água suja a cada nova lavada. Em seguida foi mantida em estufa a 50°C para secagem, sendo então autoclavada para esterilização. Os vasos de plástico de 250ml foram lavados com água e sabão, secos e desinfetados com álcool 70%. As sementes de trigo foram desinfetadas pela imersão em solução 0,5% de hipoclorito de cálcio, mantidas em agitação por 5 minutos. Em seguida elas foram imersas em água destilada estéril e mantidas em agitação 4 vezes por 10 minutos para lavagem e retirada de resíduos de hipoclorito de cálcio.

Em cada vaso foram pesados 400g de substrato, sendo nos tratamentos com micorriza pesados primeiramente 300g de substrato e na superfície central inoculados 350 esporos de *Glomus intraradices* por vaso e em seguida adicionadas as outras 100g de substrato. O substrato foi molhado para em seguida serem plantadas as sementes, estas foram colocadas no centro do vaso a uma profundidade máxima de 1cm (figura 3a). O esquema experimental é apresentado na tabela 6, sendo ao total 8 variáveis com 5 repetições cada, ao total 40 plantas. Separadamente foram cultivadas três plantas e inoculadas com fungo micorrízico para serem colhidas no dia da inoculação dos fungos saprófitos para a análise e confirmação da colonização micorrízica.

Todos os vasos foram mantidos em câmara de crescimento (Heraeus Vötsch HB1514, Vötsch Industrietechnik GmbH) para o crescimento das plantas e a colonização micorrízica (figura 3b). A câmara de crescimento foi programada para

um fotoperíodo de 14 horas diárias, temperatura de 20°C durante o período luminoso e temperatura de 16°C no escuro. Inicialmente foram realizadas regas diárias de cada vaso com água destilada e após a emergência das plantas estas regas passaram a ocorrer a cada dois dias.



**Figura 3.**a) Plantio das sementes de *Triticum aestivum*. b) Câmara de crescimento onde foram mantidas as plantas.

Após três semanas de cultivo foi realizada a inoculação dos dois fungos saprófitos conjuntamente. As plantas foram retiradas cuidadosamente do substrato, sendo realizados alguns cortes nas raízes, que serviram de pontos de infecção, e estas foram reintroduzidas nos vasos utilizando o mesmo substrato. Em seguida foram inoculados em cada vaso, ao redor da planta, 1ml da suspensão de esporos de cada fungo: o fungo *Trichoderma atroviride* (Trich 1) foi inoculado na concentração de  $5 \times 10^5$  esporos/ml e o fungo *Fusarium culmorum* (Fc13) na concentração de  $2 \times 10^5$  esporos/ml. Nos vasos onde foi inoculado somente um fungo foi adicionado também 1ml de água destilada estéril. Na tabela 6 pode-se visualizar o esquema experimental e os tratamentos utilizados no experimento.

**Tabela 6.** Esquema experimental do experimento 4.

<b>Identificação</b>	<b>Tratamentos</b>
1	Controle
2	Micorriza
3	Micorriza + <i>T. atroviride</i>
4	Micorriza + <i>F. culmorum</i>
5	Micorriza + <i>T. harzianum</i> + <i>F. culmorum</i>
6	<i>F. culmorum</i>
7	<i>T. atroviride</i>
8	<i>T. atroviride</i> + <i>F. culmorum</i>

Os vasos foram novamente mantidos em câmara de crescimento, com mesma programação de luz e temperatura, para crescimento e colonização fúngica das plantas. As plantas continuaram a ser regadas a cada dois dias e passaram a receber 5ml da solução nutritiva Knopsche NL (1g de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0,25g de  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$ , 0,12g de KCl, 500 $\mu\text{l}$  de  $\text{FeCl}_3$  5%, 0,5g de  $\text{KNO}_3$ , 0,5g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e 0,01g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , diluídos em 1 litro de água ultra pura e autoclavado por 20 minutos à 120°C) duas vezes por semana.

Vinte dias após a inoculação foi realizada a retirada de pequenos pedaços da raiz de cada planta com auxílio de um perfurador metálico. Os fragmentos foram lavados em água destilada estéril e micropropagados em placas-de-petri em meio de cultura Sabouraud e mantidos por 3 dias em incubadora à 25°C no escuro para confirmação da presença ou não dos fungos nas raízes e para verificar a efetividade da inoculação dos fungos.

Vinte e quatro dias após a inoculação (46 dias após o plantio) as plantas foram retiradas do substrato, sendo lavadas as raízes em água destilada estéril e realizadas as análises de atividade enzimática (item 4.4) e colonização micorrízica das raízes (item 4.5), além da medição da altura da planta, peso úmido e seco da parte aérea e raízes.

#### 4.4 Análise da atividade enzimática das raízes *in vitro* e *in vivo*

Nos experimentos 3 e 4 foram realizadas análises de atividade da enzima fosfatase ácida e da enzima  $\beta$ -glucosidade nas raízes de cenoura Ri T-DNA transformadas e nas raízes de trigo, seguindo adaptação do método descrito por Pritsch *et al.* (2004).

Para esta análise foram utilizadas micro placas contendo 12 fileiras com 8 poços cada e tiras com 8 microtubos com o fundo fechado por um filtro de nylon (podendo a raiz estar em contato com as soluções utilizadas na análise), que se encaixam nos poços das micro placas. O procedimento da análise é dividida em três passos, cada um utilizando diferentes micro placas: incubação, lavagem e parada de reação. Foram utilizados dois substratos de enzima tendo em sua composição o composto 4-metilumbelliferone (MU). Para a análise da atividade da enzima fosfatase ácida utilizou-se MU-fosfato (1,6ml de solução estoque 5nM mais 8,4ml de água destilada estéril) e para a análise da enzima  $\beta$ -glucosidase utilizou-se o substrato MU- $\beta$ -glicopiranoside (1ml de solução estoque 5mM mais 9ml de água destilada estéril). Foram utilizadas duas soluções tampão: solução tampão de incubação, composta de 75mM de ácido maléico e 75mM de Tris-HCl à pH 4,5; e solução tampão de parada de reação, composta de 2,5M Tris-HCl pH 10,5.

A amostra utilizada para as análises era composta de pedaços de 4mm da ponta basal das raízes (onde há maior atividade enzimática). Após o término do período dos experimentos as raízes das plantas e das placas-de-petri foram separadas e lavadas em água destilada e visualizadas em estereomicroscópio para a realização de cortes mais precisos.

Antes de iniciar as análises foi realizada a preparação das microplacas com suas respectivas soluções, sendo as fileiras 4 e 9 utilizadas como controle (sem substrato enzimático e sem raiz) e os últimos poços de todas as fileiras utilizadas como controle da autofluorescência do substrato enzimático (com substrato e sem raiz). As microplacas de incubação continham 100 $\mu$ l de tampão de incubação mais 50 $\mu$ l de substrato enzimático (exceto nas fileiras 4 e 9, controle). As microplacas de lavagem continham 100 $\mu$ l de tampão de incubação e 50 $\mu$ l de água estéril (exceto nas

fileiras 4 e 9, controle). As microplacas de parada de reação continham 100µl de tampão de parada de reação em todas as fileiras.

Ao realizar os cortes das raízes estas foram colocadas uma a uma em cada um dos microtubos (exceto o último microtubo de cada tira), e cada tira de microtubos foi colocada dentro dos poços de cada fileira de uma microplaca contendo água destilada. Após todos os microtubos da microplaca possuírem um pedaço de raiz (exceto poços das fileiras 4 e 9, controle) cada uma das tiras foi retirada da microplaca, pressionado o fundo contra um papel toalha para remoção do excesso de água. Em seguida estas foram colocadas em suas respectivas fileiras na micro placa de incubação. A microplaca de incubação foi então colocada em uma incubadora à 21°C, no escuro, e com agitação. Para o substrato UM-Fosfato o tempo de incubação foi de 10 minutos. Já para o substrato UM-glucopiranoside o tempo de incubação foi de 15 minutos. Ao fim do período de incubação os micro tubos com as raízes foram retirados das microplacas contendo o substrato, colocadas em contato com um papel toalha para retirar o excesso de líquido e em seguida transferidas para as microplacas de lavagem por 3 minutos, transferindo depois para a microplaca de incubação seguinte. Durante os 3 minutos da etapa de lavagem foram retirados 100µl da solução presente em cada poço da microplaca de incubação transferindo para os respectivos poços na microplaca de parada de reação. O volume final de cada poço foi ajustado para 250µl, motivo pelo qual adicionou-se 150µl de água destilada estéril nas fileiras 4 e 9 (pois estas estavam vazias na micro placa de incubação) e depois mais 50µl de água estéril em todos os poços das outras fileiras.

Ao total foram realizadas, separadamente, duas análises de cada enzima, sendo necessária a realização de duas incubações seguidas para a enzima fosfatase ácida, seguida de duas incubações para a enzima  $\beta$ -glucosidase, usando sempre os mesmos pedaços de raízes e seguindo o mesmo procedimento descrito acima após cada incubação.

A atividade enzimática foi analisada através da leitura de cada microplaca de parada de reação em espectrômetro de fluorescência (435nm) seguida de análise dos dados no software Soft Max 3.1. Para a análise dos dados no SoftMax 3.1 foi criada uma curva padrão a partir da leitura no espectrômetro de fluorescência

(435nm) da solução de metilumbelliferone em diferentes concentrações (5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500 nmol). Os dados referentes às atividades enzimáticas obtidas no software SoftMax 3.1 foram ao final transformadas para nmol por micrograma de raiz através dos dados de pesagem de cada raiz utilizada nas análises, sendo então realizada a média para cada tratamento.

#### **4.5 Análise da colonização micorrízica**

Para avaliar a efetividade da colonização micorrízica das plantas de trigo do experimento 4 foi realizada avaliação da porcentagem de colonização micorrízica de cada planta.

Após a colheita das plantas as raízes foram lavadas, retirando o excesso de substrato. Pesou-se 0,5g da raiz de cada planta sendo estas imersas separadamente em solução de KOH 10% “overnight” à 50°C e em agitação, para sua descoloração. Após a descoloração, as raízes foram lavadas em água destilada e imersas separadamente, por 3 minutos, em solução de lactoglicerol contendo 0,05% de azul de metileno (PHILLIPS & HAYMAN, 1970). Depois as raízes foram lavadas em água destilada e mantidas imersas em lactoglicerol em refrigerador para conservação até o momento final da análise.

As raízes foram analisadas em estereomicroscópio, visualizando-se 100 pedaços de raízes em placa-de-petri quadriculada. Pelo método da linha de intersecção na qual se verificou a presença ou ausência de micorriza, obtendo a porcentagem de colonização micorrízica de cada planta (GIOVANNETTI & MOSSE, 1980).

#### **4.6 Análises estatísticas**

Os dados referentes ao tamanho dos esporos dos fungos dos experimentos 1 e 2, colonização micorrízica, massa da matéria fresca da parte aérea e da raiz, comprimento de folhas e análise da atividade enzimática do experimento 4 foram submetidos à análise de variância (teste F). Na presença de diferenças significativas foi aplicado o teste de separação de médias de Tukey, com probabilidade de 5%.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

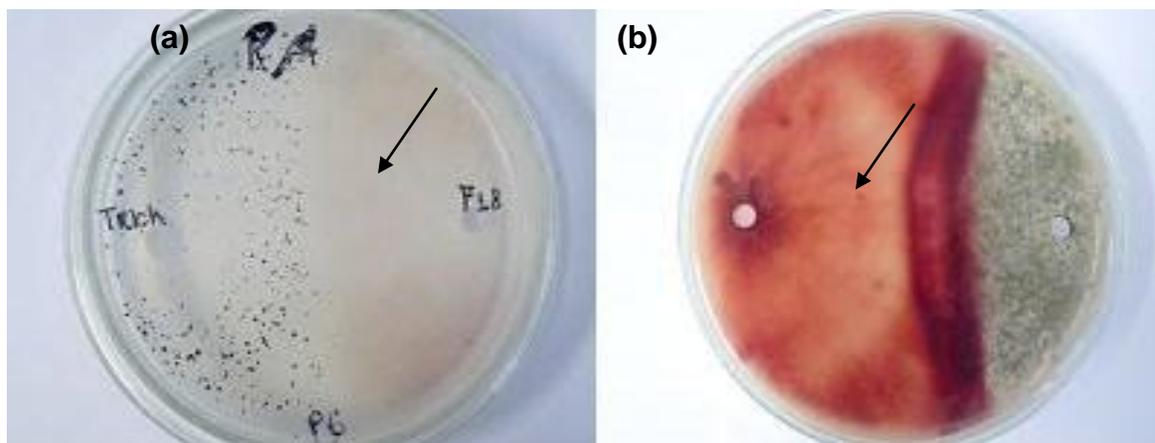
### 5.1 Experimento 1: Interação *in vitro* entre diferentes espécies de *Fusarium* spp. e *Trichoderma atroviride*

#### 5.1.1 Crescimento dos fungos

O cultivo em meio de cultura Arroz-Agar se mostrou mais eficiente para o crescimento dos fungos que o cultivo em CZID-Agar, pois no primeiro os fungos apresentaram crescimento micelial já no segundo dia após o início do experimento, colonizando rapidamente toda a placa-de-petri. Por outro lado, no meio CZID o início do crescimento só foi verificado a partir do terceiro dia, apresentando crescimento mais lento ao longo dos outros dias. No entanto o meio de cultura CZID apresentou melhor facilidade para as análises de medição do crescimento, pois possui a característica de desenvolver colônias fúngicas com sua coloração micelial característica, enquanto que no Arroz-Agar as colônias apresentavam-se praticamente incolores, sendo necessário colocar a placa contra uma fonte de luz para a melhor visualização do micélio, mas mesmo assim ainda apresentando dificuldades.

Em todos os tratamentos com cultivo conjunto dos fungos *Trichoderma atroviride* e *Fusarium* spp. o contato entre estes se deu a partir do quinto dia e do sétimo dia após o início do experimento em Arroz-Agar e em CZID-Agar, respectivamente. As exceções foram os tratamentos com *Fusarium cerealis* 51 e 67 e *Fusarium culmorum* 53 em meio de cultura CZID que só apresentaram contato com *Trichoderma atroviride* no nono dia, apresentando também menor crescimento quando comparado com os outros fungos. Após o contato físico dos fungos estes iniciaram crescimento conjunto, entrelaçado, nos dois meios de cultura. Neste ponto só foi possível acompanhar o crescimento dos fungos do gênero *Fusarium* uma vez que apresentavam coloração mais intensa, mascarando o micélio de *Trichoderma*

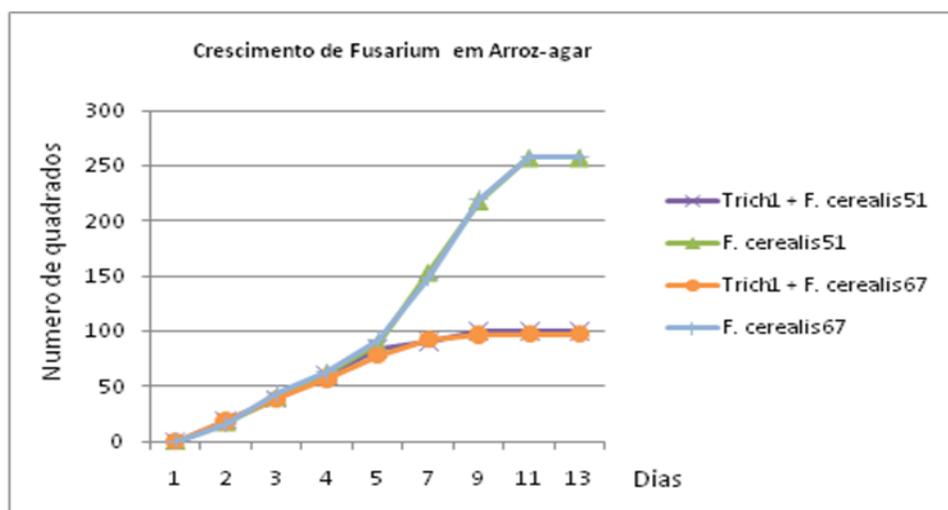
*atroviride*. Em experimento similar realizado por Rojo *et al.* (2007) com o cultivo conjunto de duas espécies de *Trichoderma* com *Fusarium proliferatum*, foi verificado o crescimento de *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium proliferatum* após o contato inicial. No entanto, com o uso de outra espécie de *Trichoderma* spp obteve-se efeito contrário, onde *Fusarium proliferatum* cresceu sobre o micélio de *Trichoderma longibrachiatum*. Ao final do experimento foi possível verificar que *Trichoderma atroviride* havia crescido sobre *Fusarium* devido à presença de esporos de coloração verde sobre este. Nos dois meios de cultura foi possível verificar uma zona de inibição a partir do contato inicial dos fungos que possuía em média 1,0cm de largura e que apresentava coloração mais intensa que o normal no meio de cultura CZID, como pode ser visto na figura 4. Em trabalho similar realizado por Calistru *et al.* (1997) foram verificados resultados semelhantes, como o contato entre os fungos a partir do quinto dia e a presença de uma zona de inibição com coloração diferente daquela observada nas outras áreas de crescimento dos fungos.



**Figura 4.** Zona de inibição entre *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. em Arroz-Agar (a) e em CZIDAgar (b) e visualização da diferença de coloração dos micélios nos dois meios de cultura.

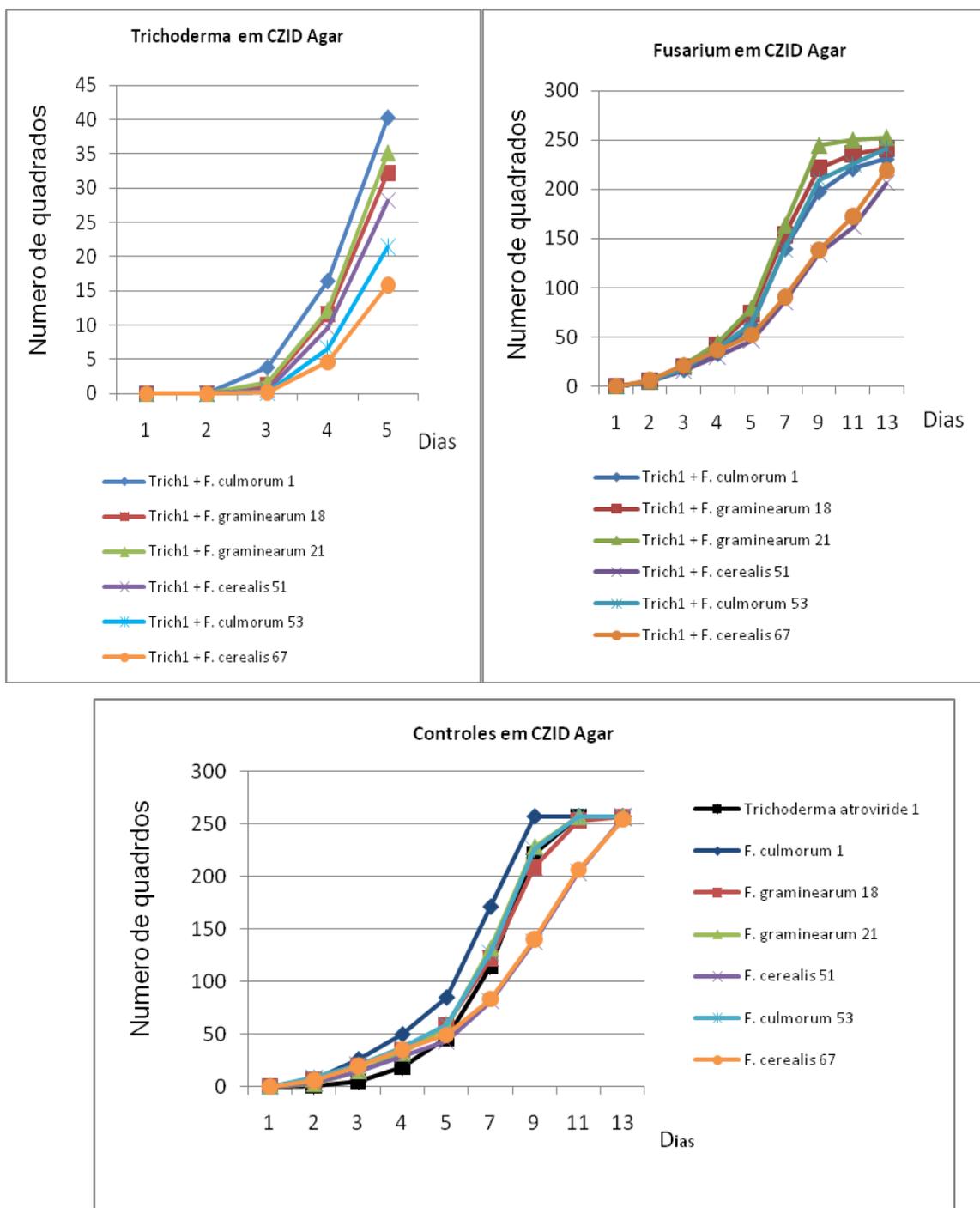
Em relação ao tamanho de crescimento dos fungos em meio de cultura Arroz-Agar foi verificado que o crescimento do fungo *Trichoderma atroviride*, ao quinto dia após o início do experimento, não apresentou diferenças de crescimento entre os tratamentos, sendo similar tanto em cultivo conjunto quanto em cultivo individualizado. Houve uma pequena diferença quando em cultivo conjunto com

*Fusarium cerealis* 67 e 51, obtendo crescimento relativamente maior que os demais tratamentos. Ao analisar os dados do tamanho de crescimento dos fungos *Fusarium* spp. quando cultivados conjuntamente com *Trichoderma atroviride* verificou-se, novamente, diferença somente no tamanho de crescimento dos fungos *Fusarium cerealis* 67 e 51 que apresentaram menor crescimento em cultivo conjunto, sendo este crescimento menor do que o apresentado pelo cultivo individualizado. Os demais fungos apresentaram crescimento semelhante entre eles, tanto em cultivo conjunto quanto individualizado.



**Figura 5.** Crescimento diário dos fungos *Fusarium cerealis* 67 e 51 em cultivo conjunto e individualizado em meio de cultura Arroz-Agar.

O cultivo em meio de cultura CZID-Agar obteve alguns resultados discrepantes com os obtidos em cultivo em meio de cultura Arroz-Agar, como pode ser visto na figura 6. Nos tratamentos com cultivo conjunto, ao quinto dia após o início dos experimentos, o fungo *Trichoderma atroviride* apresentou maior crescimento quando cultivado conjuntamente com *Fusarium culmorum* 1. Já esse crescimento foi menor quando cultivado com *Fusarium cerealis* 67, resultado inverso àquele apresentando no cultivo em Arroz-Agar. Houve diferenças no tamanho de crescimento entre os distintos tratamentos, sendo sempre menor em cultivo conjunto quando comparado ao cultivo individualizado.



**Figura 6.** Tamanho de crescimento diário dos fungos *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. em meio de cultura CZID-Agar.

Em relação ao crescimento dos fungos *Fusarium* spp. verificou-se novamente que o fungo *Fusarium cerealis* 51 seguido de *Fusarium cerealis* 67 apresentaram menor crescimento tendo as outras espécies apresentado maior crescimento não

diferindo entre elas. Neste caso os fungos do cultivo conjunto apresentaram crescimento semelhante ao cultivo individualizado.

### 5.1.2 Tamanho dos esporos dos fungos na zona de contato

Para o fungo *Trichoderma atroviride* verificou-se que não houve diferença no tamanho médio dos esporos encontrados em cada tratamento, nos dois meios de cultura. O tamanho dos esporos de *Trichoderma atroviride* variou de 4 a 4,4 $\mu$ m, sendo semelhante aos valores encontrados na literatura que variam de 3 a 5 $\mu$ m (SAMSON *et al.*, 2002).

**Tabela 7.** Tamanho médio ( $\mu$ m) dos esporos de seis isolados de *Fusarium* spp. em cultivo individual e cultivo conjunto com *Trichoderma atroviride* em meio de cultura Arroz-Agar e CZID-Agar.

Tratamentos	Média Arroz-Agar*	Média CZID-Agar*
<i>F. graminearum</i> 21	55,2a	50,3abc
<i>T. atroviride</i> 1 + <i>F. graminearum</i> 21	54,8a	45,2bc
<i>T. atroviride</i> 1 + <i>F. graminearum</i> 18	48,4ab	58,4a
<i>T. atroviride</i> 1 + <i>F. cerealis</i> 51	48,4ab	46,4bc
<i>F. graminearum</i> 18	48,0ab	50,8ab
<i>F. cerealis</i> 51	48,0ab	44,6bc
<i>T. atroviride</i> 1 + <i>F. culmorum</i> 53	45,2ab	43,2bc
<i>T. atroviride</i> 1 + <i>F. cerealis</i> 67	45,2ab	47,6abc
<i>T. atroviride</i> 1 + <i>F. culmorum</i> 1	44,4b	39,2c
<i>F. culmorum</i> 1	44,0b	41,8bc
<i>F. culmorum</i> 53	41,2b	44,0bc
<i>F. cerealis</i> 67	40,0b	44,4bc

\*Nota: Valores seguidos pela mesma letra em cada coluna não diferem significativamente pelo teste Tukey 5%.

Já para as espécies do gênero *Fusarium* foram encontradas diferenças significativas entre o tamanho dos esporos. No entanto não houve diferença estatística entre os dados dos tratamentos com cultivo conjunto com os dados dos respectivos controle. Os tamanhos dos esporos são semelhantes àqueles

encontrados na literatura. Segundo Samson *et al.* (2002) o tamanho dos esporos de *F. graminearum* podem variar de 41 a 60µm, os de *F. culmorum* de 26 a 50µm e os de *F. cerealis* de 30 a 40µm.

Em resumo, não houve influência do cultivo conjunto sobre o desenvolvimento dos esporos dos fungos.

### 5.1.3 Considerações finais

Os resultados mostram que o meio de cultura influenciou diretamente o crescimento dos fungos. Foi verificado que estes microorganismos apresentavam menor velocidade de crescimento em meio de cultura CZID-Agar devido, provavelmente, à ação inibitória dos antibióticos utilizados no preparo deste meio, principalmente no desenvolvimento de *Trichoderma atroviride*. Este fato também foi destacado por Fillion *et al.* (1999) que obteve resultados distintos aos encontrados em experimento semelhante anteriormente realizado, sendo destacado que a principal causa desta diferença foi a utilização de meios de cultura distintos nos dois experimentos, tendo a composição química dos meios um impacto maior sobre as modificações ocorridas na interação entre os fungos.

Comparando os resultados dos dois meios de cultura verificou-se nos dois casos que os fungos *Fusarium cerealis* 67 e 51 apresentam menor agressividade, e que os fungos *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum* apresentam maior agressividade quando cultivados em conjunto com *T. atroviride* ou isoladamente. Esta menor agressividade das estirpes do fungo *Fusarium cerealis* pode estar ligada principalmente ao fato destes não produzirem a micotoxina DON, condição não observada para as estirpes de *F. graminearum* e *F. culmorum*, ambas produtoras da toxina. Esta é uma das mais fortes e perigosas aos seres humanos. Uma possibilidade é que DON tenha ação antibiótica a outros microorganismos e por isto *F. culmorum* e *F. graminearum* se desenvolvam bem na presença de *Trichoderma* spp. (MÜLLER, 2010). Dessa maneira pôde identificar-se uma possível interferência de *Trichoderma atroviride* somente sobre os fungos *Fusarium cerealis* 67 e 51, já que

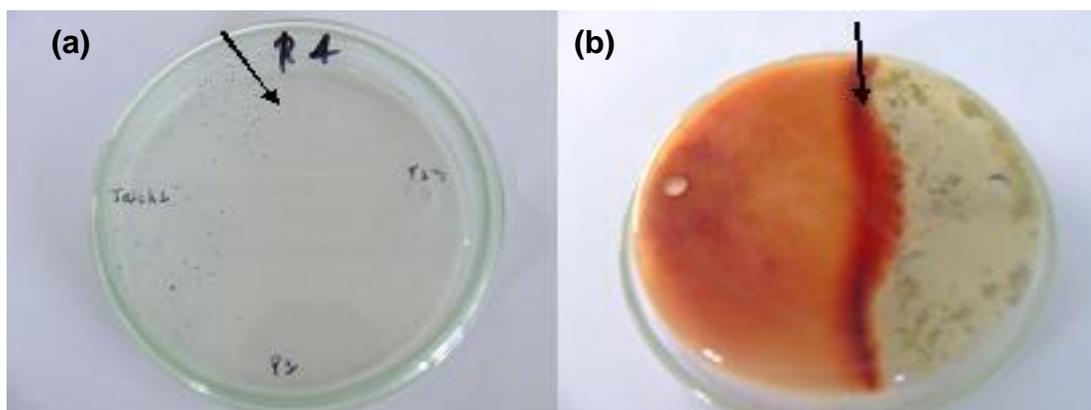
nos dois meios de cultura eles apresentaram crescimento menor do que o controle. No entanto, esta influência não foi verificada quanto ao tamanho dos esporos, tendo estes apresentado tamanho similar ao controle em todos os tratamentos. Em experimento realizado por Yates *et al.* (1999) foi verificada a supressão de *F. moniliforme* quando inoculado em meio de cultura Agar-água conjuntamente com *Trichoderma viride*, e esta supressão pode ter sido regulado pelos compostos voláteis e enzimas extracelulares que são liberadas pelos fungos *Trichoderma* spp. Resultados semelhantes de supressão de *Fusarium* spp. por *Trichoderma* spp. também são encontrados em outros experimentos, como relatado por Calistru *et al.* (1997) e Rojo *et al.* (2007).

## **5.2 Experimento 2: Interação *in vitro* entre diferentes espécies de *Trichoderma* spp. e *Fusarium graminearum* ou *Fusarium culmorum***

### **5.2.1 Crescimento dos fungos**

*Fusarium graminearum* e *F. culmorum* apresentaram crescimento já no primeiro dia após o início do experimento nos dois meios de cultura, com maior crescimento no meio Arroz Agar. Em relação às espécies de fungos do gênero *Trichoderma* estas iniciaram seu crescimento no segundo e terceiro dia após o início do experimento no meio de cultura Arroz Agar e CZID Agar, respectivamente. Uma exceção ocorreu com o fungo *Trichoderma koningii* 2 que iniciou seu crescimento no meio Arroz Agar somente no quinto dia após o início do experimento, não tendo se desenvolvido no meio CZID-Agar. Dessa maneira verifica-se mais uma vez a maior eficiência quanto à velocidade de desenvolvimento dos fungos cultivados em meio de cultura Arroz Agar, tendo o meio CZID Agar apresentado novamente melhor facilidade para a realização das análises, devido à maior coloração das colônias.

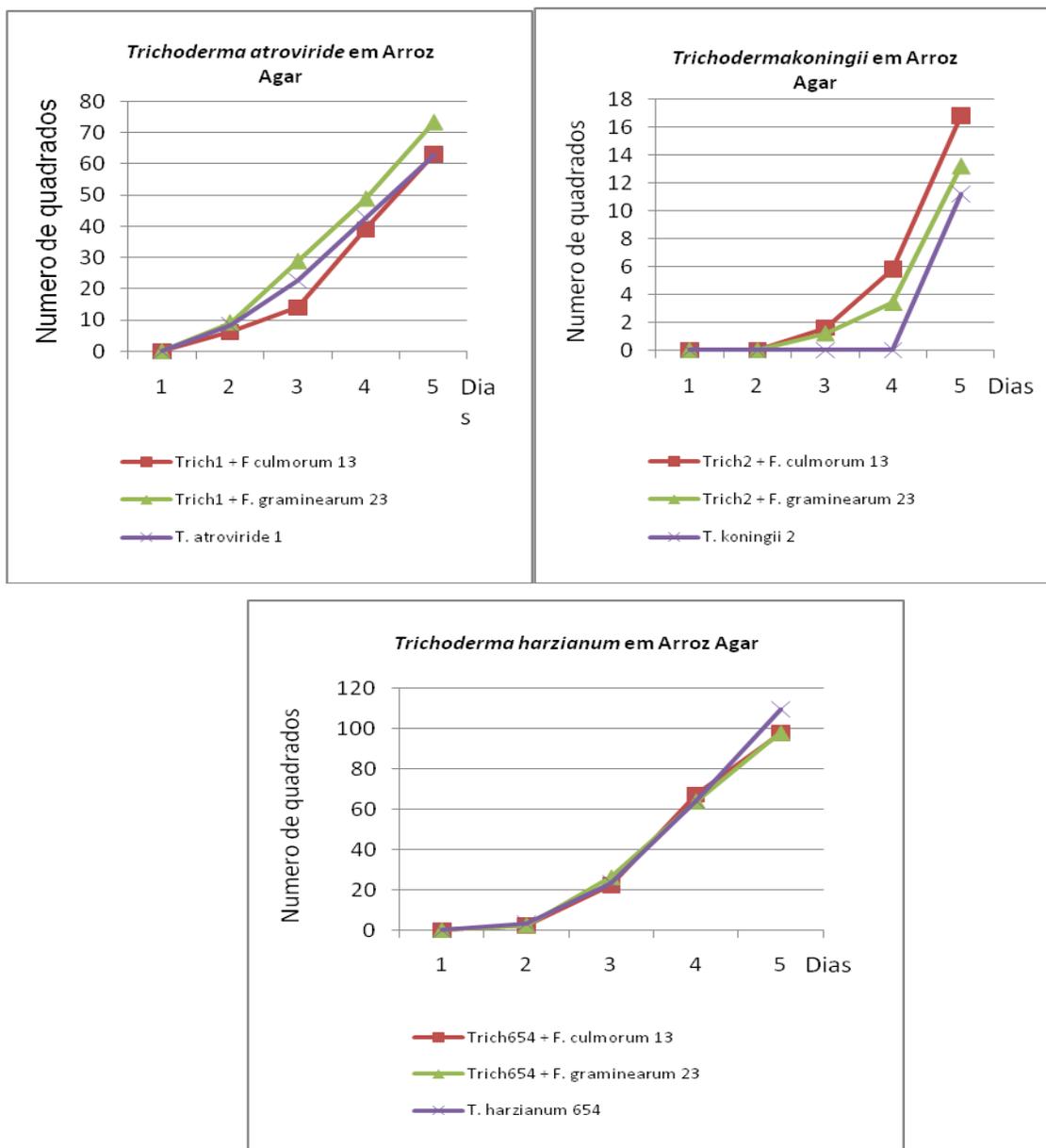
Em todos os tratamentos com cultivo conjunto dos fungos *T. atroviride* 1 e *T. harzianum* 654 com os dois fungos do gênero *Fusarium* o contato entre estes ocorreu a partir do quinto dia e do sétimo dia após o início do experimento em Arroz-Agar e em CZID-Agar, respectivamente. Em relação aos tratamentos com *T. koningii* 2, em meio de cultura Arroz Agar, o contato iniciou somente no nono dia. Neste experimento também ocorreu o crescimento conjunto dos fungos, um sobre o outro, nos dois meios de cultura após o contato entre eles, tendo sido possível, novamente, acompanhar o crescimento dos fungos *Fusarium* spp. devido a coloração mais intensa dos micélios. Ao final do experimento foi possível verificar que os fungos do gênero *Trichoderma* tinham crescido sobre os fungos do gênero *Fusarium* em razão da presença de esporos de coloração verde sobre este. Nos dois meios de cultura foi possível verificar a zona de inibição que se forma a partir do contato inicial dos fungos, mas que ao contrário do experimento anterior, não possuíam forma regular e nem uma largura média, esta variando desde 1,0cm até 3,5cm dentro e entre os tratamentos dos dois meios de cultura. Neste caso a zona de inibição também apresentava coloração mais intensa que o normal no meio de cultura CZID, como pode ser visto na figura 7.



**Figura 7.** Zona de inibição entre *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. em Arroz-Agar (a) e em CZID-Agar (b) e visualização da diferença de coloração dos micélios nos dois meios de cultura.

No meio de cultura Arroz-Agar os dois fungos do gênero *Fusarium* apresentaram crescimento similar em todos os tratamentos, não havendo influência dos fungos *Trichoderma* spp. sobre o crescimento destes. Foi possível somente

verificar diferença no tamanho de crescimento entre as três diferentes espécies de *Trichoderma* (figura 8), não diferindo o crescimento de cada espécie entre o cultivo com *Fusarium graminearum* ou *Fusarium culmorum* e o controle.



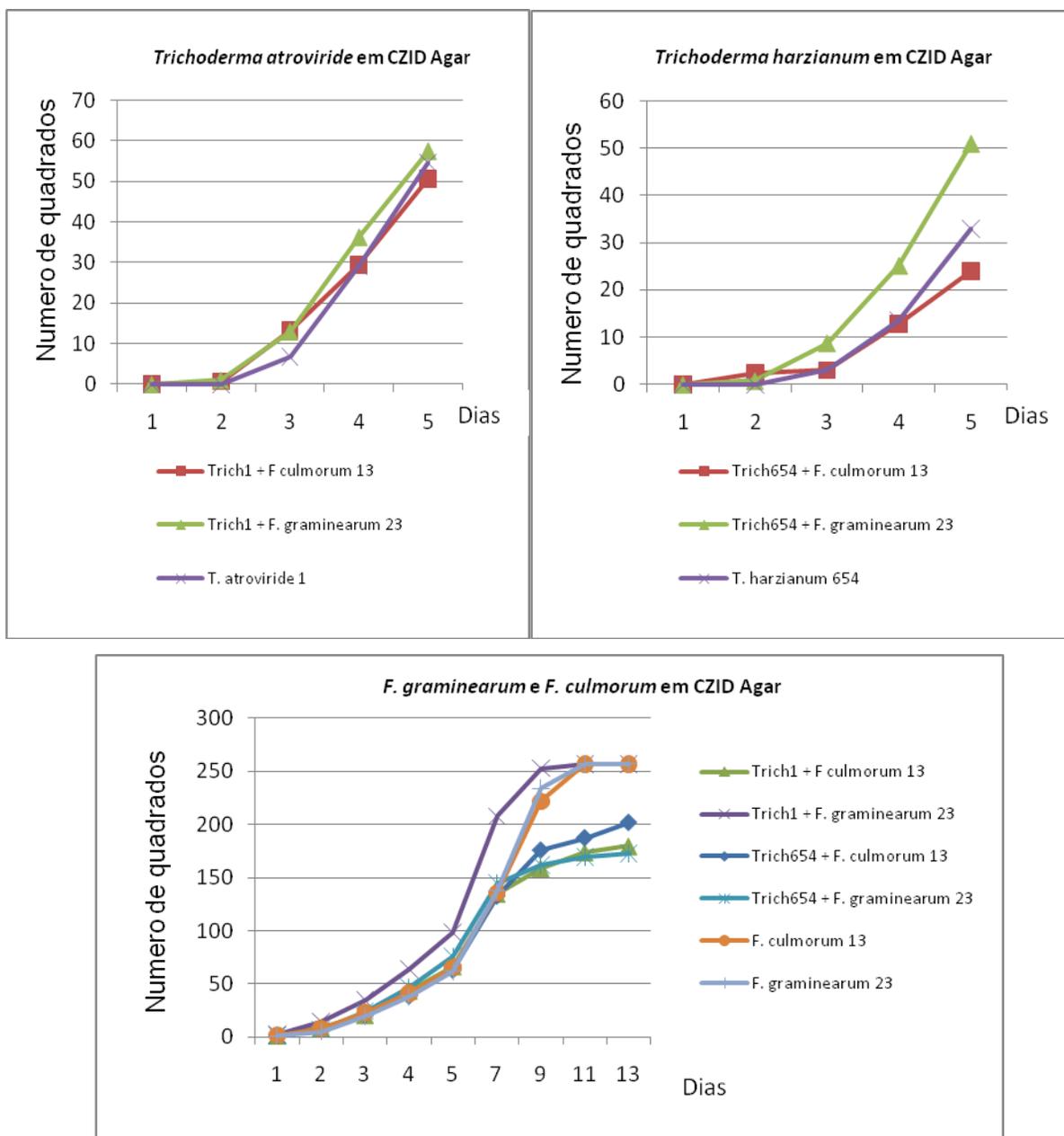
**Figura 8.** Tamanho de crescimento diário dos fungos *Trichoderma* spp. nos diferentes tratamentos (cultivo conjunto e individual) em meio de cultura Arroz-Agar.

*Trichoderma harzianum* apresentou maior crescimento, seguido por *Trichoderma atroviride* e *Trichoderma koningii*, que pouco se desenvolveu. Os dois

fungos do gênero *Fusarium* tiveram crescimento médio idêntico em cultivo individual sendo esse similar ao crescimento em cultivo conjunto.

O cultivo em meio de cultura CZID-Agar obteve alguns resultados discrepantes com os obtidos no cultivo em meio de cultura Arroz-Agar, como pode ser visto na figura 9. O fungo *Trichoderma koningii* não apresentou desenvolvimento neste meio de cultura, e deve ter uma baixa capacidade de crescimento, visto que não apresentou crescimento vigoroso em Arroz-Agar, meio no qual os fungos tendem a se desenvolver rapidamente. Ele pode ter sido prejudicado, também, pela ação dos antibióticos presentes neste meio de cultura. Ao inverso do experimento em Arroz-Agar, o fungo *Trichoderma atroviride* 1 apresentou maior crescimento ao quinto dia após o início dos experimentos, não diferindo entre o cultivo com os dois fungos *Fusarium* spp. e o controle. Somente *Trichoderma harzianum* 654 apresentou diferenças no tamanho de crescimento entre tratamentos, tendo apresentado crescimento semelhante à *T. atroviride* quando cultivado com *Fusarium graminearum* 23 e menor crescimento quando cultivado com *Fusarium culmorum* 13. O tratamento controle apresentou um crescimento intermediário aos os outros dois tratamentos.

Em relação ao crescimento dos fungos *Fusarium* spp. verificou-se que estes apresentavam crescimento semelhante em todos os tratamentos ao quinto dia após o início do experimento, sendo que após este período os fungos *Fusarium* spp. cultivados individualmente e *Fusarium graminearum* 23 cultivado com *Trichoderma atroviride* 1 apresentou crescimento maior que os outros tratamento.



**Figura 9.** Tamanho de crescimento diário de *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. nos diferentes tratamentos em meio de cultura CZID-Agar.

### 5.2.2 Tamanho dos esporos dos fungos na zona de contato

Em relação ao tamanho dos esporos (tabela 8) não houve diferença entre os médias encontradas em cada tratamento e entre as espécies nos dois meios de cultura para o fungos do gênero *Trichoderma*. A média do tamanho dos esporos para estes fungos variou entre 4-5 $\mu$ m, estando dentro dos valores encontrados na literatura, 3-5 $\mu$ m (SAMSON *et al.*, 2002).

**Tabela 8.** Tamanho médio ( $\mu$ m) dos esporos de dois isolados de *Fusarium* spp. em cultivo individual e cultivo conjunto com três isolados de *Trichoderma* spp. em meio de cultura Arroz-Agar e CZID-Agar.

Tratamentos	Média Arroz-Agar*	Média CZID-Agar*
<i>T. harzianum</i> 654 + <i>F. graminearum</i> 23	57,6a	58,0a
<i>T. atroviride</i> 1 + <i>F. graminearum</i> 23	53,6ab	53,6a
<i>T. koningii</i> 2 + <i>F. graminearum</i> 23	52,0ab	50,4ab
<i>F. graminearum</i> 23	44,0bc	39,2c
<i>T. koningii</i> 2 + <i>F. culmorum</i> 13	40,8c	41,6bc
<i>T. harzianum</i> 654 + <i>F. culmorum</i> 13	40,0c	44,0bc
<i>F. culmorum</i> 13	39,2c	38,8c
<i>T. atroviride</i> 1 + <i>F. culmorum</i> 13	38,8c	37,2c

\*Nota: Valores seguidos pela mesma letra em cada coluna não diferem significativamente pelo teste Tukey 5%.

Foram encontradas diferenças significativas entre o tamanho dos esporos nas duas espécies de fusário em meio de cultura Arroz-Agar, mas não houve diferença estatística entre os dados dos tratamentos com cultivo conjunto com os dados dos respectivos controle. Entretanto, no meio de cultura CZID-Agar foi verificada diferença entre o tamanho dos esporos de *Fusarium graminearum* 23 no tratamento controle e nos tratamentos com cultivo conjunto. Esta diferença pode ter sido um erro de análise já que o tamanho dos esporos no tratamento conjunto com fungos do gênero *Fusarium* é idêntico aos mesmos tratamentos em meio de cultura Arroz-Agar, sendo no tratamento controle encontrado um valor menor. Em todos os casos o tamanho dos esporos de cada fungo esta dentro da média encontrada na literatura e já citada anteriormente (item 5.1.2).

Assim conclui-se novamente que não há influência no desenvolvimento dos fungos quando estes são cultivados conjuntamente.

### 5.2.3 Considerações Finais

O meio de cultura apresentou influência direta sobre o desenvolvimento dos fungos, tendo estes apresentado menores velocidades de crescimento em meio de cultura CZID-Agar. Este fato é devido provavelmente à ação inibitória dos antibióticos utilizados no preparo do meio de cultura CZID-Agar que podem ter inibido o crescimento dos fungos, principalmente os do gênero *Trichoderma*. *Trichoderma koningii* foi a espécie mais afetada pelos antibióticos, pois não apresentou crescimento em meio CZID-Agar, apresentando, inclusive, baixo desenvolvimento em meio de cultura Arroz-Agar quando comparado com as outras duas espécies de *Trichoderma*.

Comparando os resultados dos dois meios de cultura verificou-se nos dois casos que os fungos *Fusarium graminearum* 23 e *Fusarium culmorum* 13 não apresentaram diferenças de crescimento, possuindo, portanto agressividade semelhante, como verificado também no experimento 1. No entanto, não é possível afirmar a influência de um fungo sobre o outro quando em cultivo conjunto tanto no tamanho de crescimento quanto no tamanho dos esporos, pois os dados não diferiram muito dos valores encontrados nos tratamentos controle. A falta de coerência quanto ao tamanho de crescimento dos fungos *Trichoderma* spp. nos dois meios de cultura também reforçam esta conclusão.

### 5.3 Experimento 3: Interações *in vitro* entre *Glomus intraradices*, *Trichoderma atroviride* e *Fusarium graminearum* ou *Fusarium culmorum*

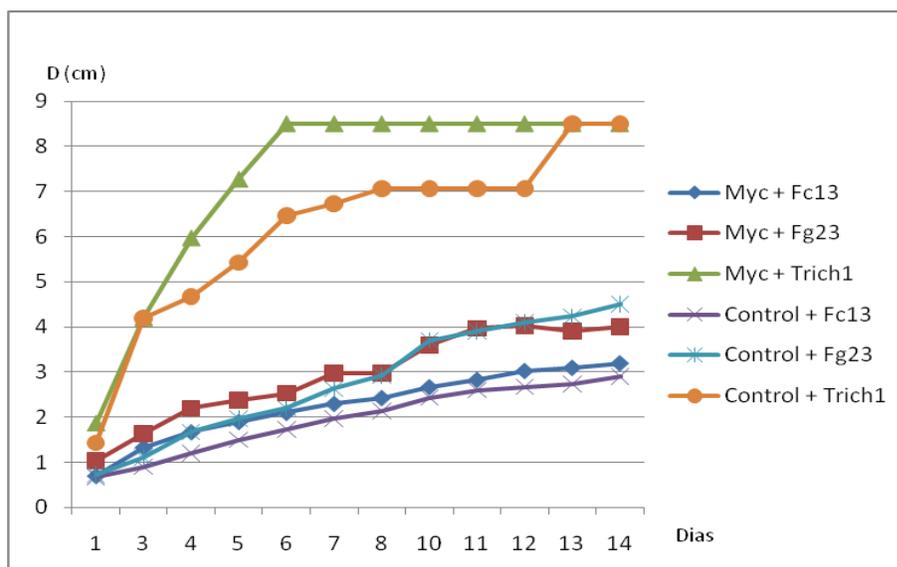
### 5.3.1 Crescimento dos fungos

Neste experimento, antes da inoculação dos fungos *Trichoderma atroviride*, *Fusarium graminearum* ou *Fusarium culmorum* foi feita uma medição e análise das hifas do fungo micorrízico *Glomus intraradices* nas placas com raiz de cenoura Ri T-DNA transformada, micorrizada ou não. Em geral o micélio micorrízico não se apresentava muito desenvolvido, colonizando somente o compartimento da placa-de-petri onde se localizava a raiz de cenoura Ri T-DNA micorrizada. A exceção foram as duas placas-de-petri com duas divisões (experimento a parte realizado para comparar com o outro experimento) que apresentaram micélio de micorriza por toda a superfície da placa-de-petri (nos dois compartimentos, tendo o micélio de micorriza contato direto com os outros dois fungos). Após a inoculação dos demais fungos nas placas verificou-se que não houve maior desenvolvimento do fungo micorrízico, sendo sua visualização prejudicada pelo desenvolvimento dos demais microrganismos, especialmente *Trichoderma atroviride*, sobre o mesmo. As espécies do fungo micorrízico arbuscular têm por característica apresentar crescimento lento, sendo necessário um período maior de incubação para a colonização da placa-de-petri ou das plantas quando comparado com os outros dois microorganismos. Por este motivo não foi verificada influência dos outros fungos sobre o desenvolvimento de *Glomus intraradices*, uma vez que durante duas semanas (período do experimento) o micélio de micorriza cresce muito pouco (TAUSCHKE, 2010).

Na figura 11 o gráfico de crescimento dos três fungos nos diferentes tratamentos quando inoculados nas placas-de-petri com duas divisões mostra que o fungo *Trichoderma atroviride* apresentou crescimento rápido no tratamento com raiz micorrizada tendo colonizado toda a placa-de-petri no sexto dia após o início do experimento. No tratamento controle o crescimento foi mais lento, tendo colonizado toda a placa-de-petri somente no décimo segundo dia (figura 10). O rápido crescimento das espécies de *Trichoderma* é característico deste gênero, fato corroborado por outros trabalhos sobre a interação deste com outros fungos (CALISTRU *et al.*, 1997).



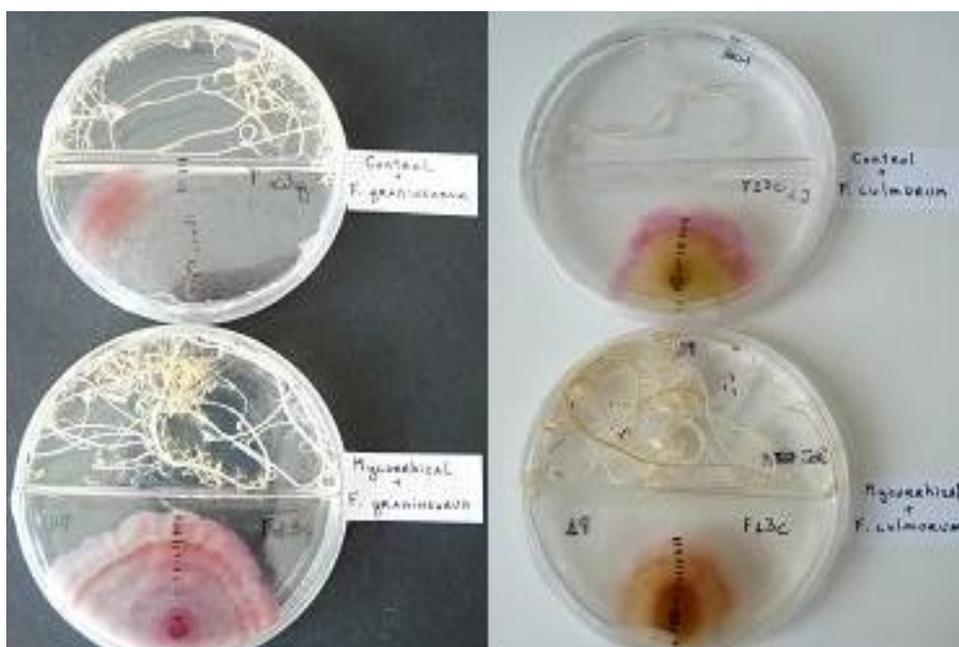
**Figura 10.** Desenvolvimento do fungo *Trichoderma atroviride* ao final do experimento em placas-de-petri com presença e ausência de fungo micorrízico. O compartimento superior continha a raiz de cenoura Ri T-DNA transformada micorrizada ou não (controle) e o inferior o fungo *Trichoderma atroviride*.



**Figura 11.** Diâmetro de crescimento diário de *Trichoderma atroviride* (Trich1), *Fusarium graminearum* (F23g) e *Fusarium culmorum* (F13c) nos diferentes tratamentos em placas-de-petri com dois compartimentos.

Em relação aos fungos do gênero *Fusarium* verificou-se que estes se desenvolveram mais lentamente, com *Fusarium graminearum* apresentando um diâmetro um pouco maior do que *Fusarium culmorum*, mas em nenhum dos casos tal crescimento difere ao verificado no tratamento controle (figura 12). Até o final do experimento nenhuma das duas espécies chegou a colonizar a parte da placa onde estava presente a raiz.

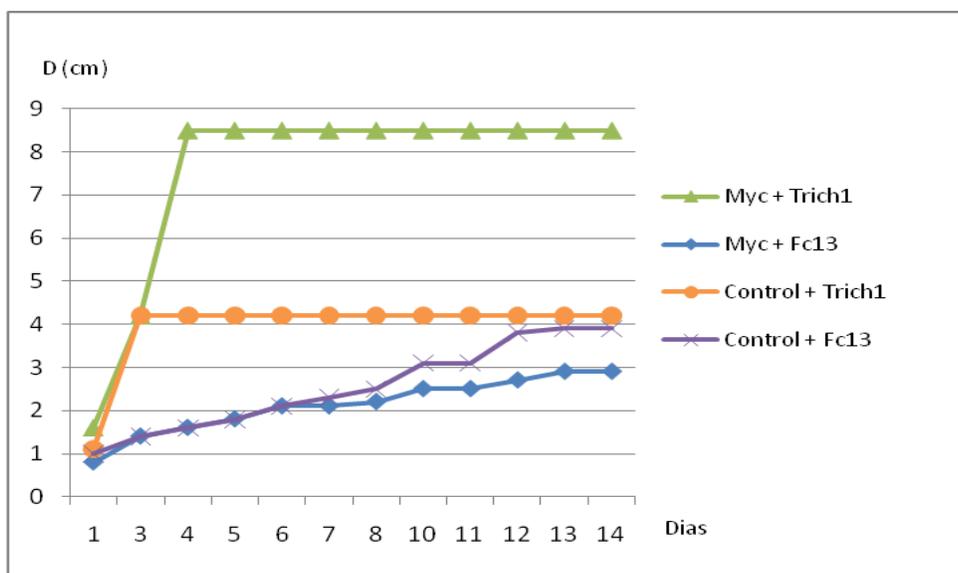
O fungo micorrízico pode ter influenciado positivamente o crescimento de *Trichoderma atroviride* visto que este apresentou maior desenvolvimento nas placas-de-petri com raiz micorrizada. Isso não ocorreu com os fungos do gênero *Fusarium*, que apresentaram crescimento similar ao tratamento controle, não sofrendo influência do fungo micorrízico.



**Figura 12.** Desenvolvimento dos fungos *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum* ao final do experimento em placas-de-petri com presença e ausência de fungo micorrízico. O compartimento superior continha a raiz de cenoura Ri T-DNA transformada micorrizada ou não (controle) e o inferior os fungos *Fusarium graminearum* ou *Fusarium culmorum*.

O gráfico da figura 13 apresenta o crescimento dos fungos nas placas-de-petri com duas divisões e que apresentavam hifas de fungo micorrízico sobre toda a

superfície da placa-de-petri. O fungo *Trichoderma atroviride* apresentou crescimento mais rápido do que no tratamento anterior, tendo colonizado toda a placa-de-petri ao quarto dia após o início do experimento, ao inverso do tratamento controle que não chegou a colonizar toda a placa-de-petri. O fungo *Fusarium culmorum* apresentou crescimento semelhante tanto no tratamento com raiz micorrizada quanto no tratamento controle até o sexto dia após o início do experimento. Nos dias seguintes houve maior crescimento do fungo no tratamento controle e crescimento estável no tratamento com raiz micorrizada, dado contrário daquele obtido no experimento anterior onde o crescimento do fungo não diferiu entre os tratamentos.

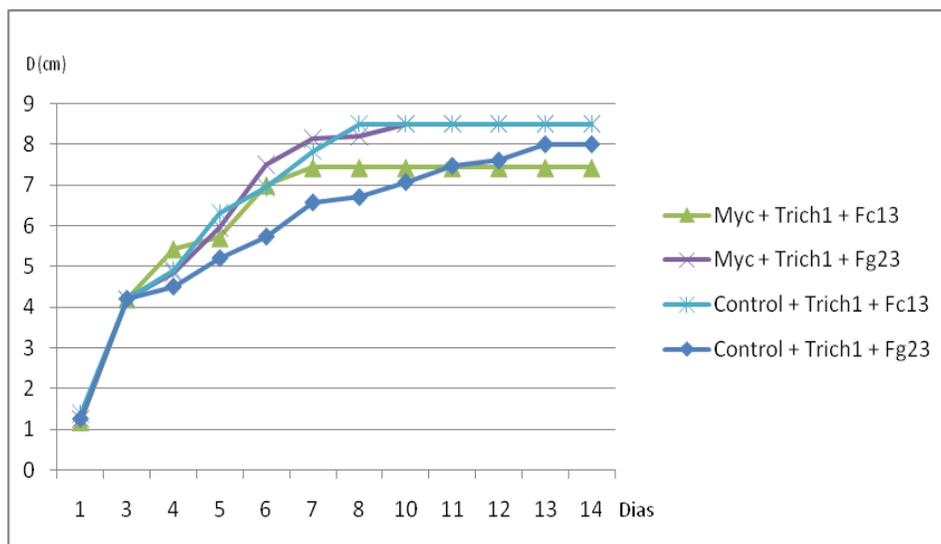


**Figura 13.** Diâmetro de crescimento de *Trichoderma atroviride* (Trich1) e *Fusarium culmorum* (F13c) nas placas-de-petri com duas divisões e que apresentavam micélio de micorriza sobre toda a superfície do placa.

Assim, pode-se presumir que quando em contato direto, o fungo micorrízico pode exercer uma ação inibitória ao fungo *Fusarium culmorum* e uma ação estimulante no fungo *Trichoderma atroviride*. Resultado similar foi encontrado por Filion *et al.* (1999), que observaram redução na germinação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* e aumento na germinação de *Trichoderma harzianum* quando em presença de FMA. Para obter resultados mais precisos seria necessária a realização de um novo experimento utilizando um maior numero de repetições.

As figuras 14 e 15 apresentam dados referentes ao crescimento dos fungos *Trichoderma atroviride*, *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum* nos tratamentos realizados nas placas-de-petri com três divisões. Verifica-se que em relação ao crescimento do fungo *Trichoderma atroviride* (figura 14) no tratamento com presença de fungo micorrízico e inoculação de *Fusarium graminearum*, houve maior crescimento do fungo em questão, colonizando toda a placa de petri por volta do oitavo dia após o início do experimento. O tratamento controle apresentou menor crescimento não colonizando toda a placa-de-petri. Dado contrário foi verificado no tratamento com presença de fungo micorrízico e *Fusarium culmorum* no qual o crescimento de *Trichoderma atroviride* foi menor que o tratamento controle, tendo este sido similar ao tratamento com micorriza e *Fusarium graminearum*.

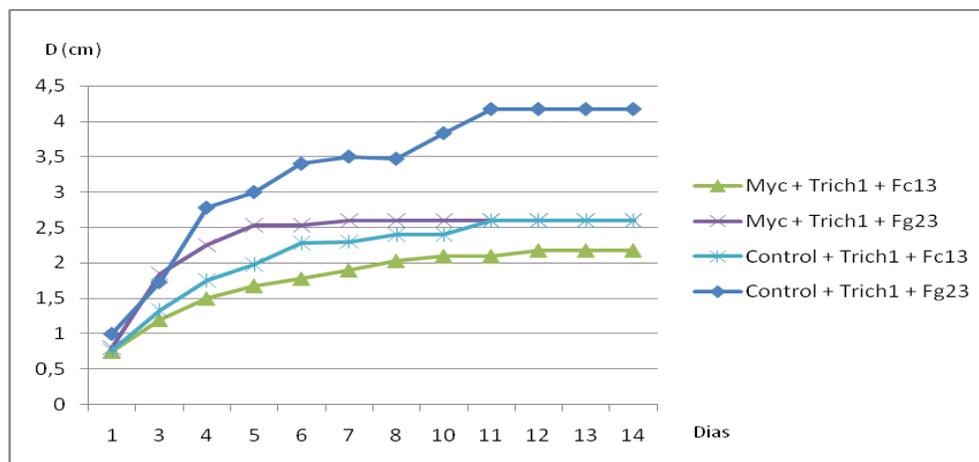
Assim, não pode-se afirmar, como no experimento das placas-de-petri com duas divisões, que o fungo micorrízico possui influência positiva no crescimento do fungo *Trichoderma atroviride*.



**Figura 14.** Diâmetro de crescimento diário de *Trichoderma atroviride* (Trich1) nas placas-de-petri com três divisões. Em cada compartimento foi inoculado: raiz de cenoura Ri T-DNA transformada micorrizada ou não, *Trichoderma atroviride* e *Fusarium culmorum* ou *F. graminearum*.

A figura 15 mostra o gráfico do crescimento dos fungos do gênero *Fusarium* quando inoculados nas placas de petri com três divisões e em cultivo conjunto com

*Trichoderma atroviride* e com ou sem a presença de fungo micorrízico. Os fungos *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum* apresentaram maior crescimento quando em cultivo sem a presença de fungo micorrízico (controle), tendo *Fusarium graminearum* apresentado maior crescimento que *Fusarium culmorum* tanto no tratamento controle quanto no tratamento com presença de micorriza.



**Figura 15.** Diâmetro de crescimento diário de *Fusarium graminearum* (Fg23) e *Fusarium culmorum* (Fc13) nas placas-de-petri com três divisões. Em cada compartimento foi inoculado: raiz de cenoura Ri T-DNA transformada micorrizada ou não, *Trichoderma atroviride* e *Fusarium culmorum* ou *F. graminearum*.

Pode-se assim concluir que *Fusarium graminearum* apresentou maior resistência à presença de micorriza e à presença de *Trichoderma atroviride*, e que a presença do fungo micorrízico, mesmo sem o contato direto com os fungos do gênero *Fusarium*, pode ter ajudado a inibir o crescimento dos mesmos, podendo ter influência, inclusive, da presença do fungo *Trichoderma atroviride*.



**Figura 16.** Exemplo do desenvolvimento dos fungos nas placas-de-petri com três divisões. Em cada compartimento foi inoculado: raiz de cenoura Ri T-DNA transformada micorrizada ou não, *Trichoderma atroviride* e *Fusarium culmorum* ou *F. graminearum*.

### 5.3.2 Atividade das enzimas fosfatase ácida e $\beta$ -glucosidade

A tabela 9 apresenta os dados médios da atividade enzimática de cada tratamento nas diferentes placas-de-petri utilizadas no experimento.

Nas placas-de-petri com duas divisões foi verificado que houve maior atividade enzimática das duas enzimas nas placas com tratamentos que apresentavam fungo micorrízico em relação àquelas com tratamento controle. Neste caso, mesmo sem a possibilidade da realização de uma análise estatística devido ao uso de diferentes valores de repetição e à presença de muitos valores negativos de atividade enzimática (estes retirados para o cálculo da média), pode-se concluir que não houve uma interação negativa dos fungos saprofitos sobre a atividade de *Glomus intraradices*.

**Tabela 9.** Atividade da enzima fosfatase ácida e  $\beta$ -glucosidase em nmol/ $\mu$ g de raiz de cenoura Ri T-DNA transformada nos tratamentos dos três diferentes tipos de placas-de-petri utilizados.

<b>Placas-de-petri com duas divisões</b>		
<b>Tratamentos*</b>	<b>Fosfatase ácida</b>	<b><math>\beta</math>-glucosidase</b>
Mic + Fc13	2,94	0,38
Controle+ Fc13	2,92	0,36
Mic + Fg23	3,27	0,37
Controle+ Fg23	1,90	0,26
Mic + Trich1	28,53	1,73
Controle + Trich1	12,71	1,44
<b>Placas com duas divisões e micélio sobre toda a placa</b>		
<b>Tratamentos*</b>	<b>Fosfatase ácida</b>	<b><math>\beta</math>-glucosidase</b>
Mic + Trich1	5,40	0,59
Controle + Trich1	4,67	0,65
Mic + Fc13	1,48	0,14
Controle + Fc13	3,58	0,33
<b>Placas-de-petri com três divisões</b>		
<b>Tratamentos*</b>	<b>Fosfatase ácida</b>	<b><math>\beta</math>-glucosidase</b>
Mic + Trich1 + Fc13	3,58	0,75
Controle + Trich1 + Fc13	7,24	0,74
Mic + Trich1 + F23g	17,71	1,49
Controle + Trich1 + F23g	7,86	0,66

\*Nota: Fc13 – *Fusarium culmorum* 13; Fg23 – *Fusarium graminearum* 23; Trich1 – *Trichoderma atroviride* 1; Mic – raiz micorrizada; Controle – raiz não micorrizada.

Nas placas com duas divisões e com fungo micorrízico sobre toda a placa, o tratamento micorriza mais *Trichoderma atroviride* apresentou maior atividade da enzima fosfatase ácida e menor atividade da enzima  $\beta$ -glucosidase em comparação ao tratamento controle. Quando se comparam estes valores com os obtidos pelo mesmo tratamento utilizado nas placas-de-petri com duas divisões, verifica-se que neste caso a atividade enzimática das duas enzimas é muito menor. Este fato pode estar relacionado ao maior e mais rápido crescimento que o fungo *Trichoderma atroviride* apresentou quando em contato direto com o fungo micorrízico. Possivelmente *Trichoderma atroviride* possui uma ação inibitória sobre *Glomus intraradices* quando em contato direto com o fungo desde o início de seu desenvolvimento. O mesmo caso é observado para o tratamento com micorriza e

*Fusarium culmorum* 13, no qual a atividade das duas enzimas foi menor que no tratamento controle. Contudo, para confirmar a efetividade destes resultados é necessária a realização de um novo experimento utilizando placas-de-petri com micélios de fungo micorrízico sobre toda a superfície, além de aumentar o número de repetições.

Em relação à atividade enzimática apresentada pelos fungos presentes conjuntamente nas placas-de-petri com três divisões foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos. No tratamento com micorriza, *Trichoderma atroviride* e *Fusarium culmorum* houve menor atividade para as duas enzimas em relação ao tratamento controle que obteve maior atividade enzimática na ausência da micorriza. No tratamento micorriza, *Trichoderma atroviride* e *Fusarium graminearum* houve maior atividade para as duas enzimas que no tratamento controle. Neste caso não se pode concluir se houve ou não interferência negativa ou positiva, devido às divergências encontradas entre os resultados, estas presentes também na análise de diâmetro de crescimento. Dessa forma, para dar maior precisão e estes resultados o ideal é realizar um novo experimento com um maior número de repetições.

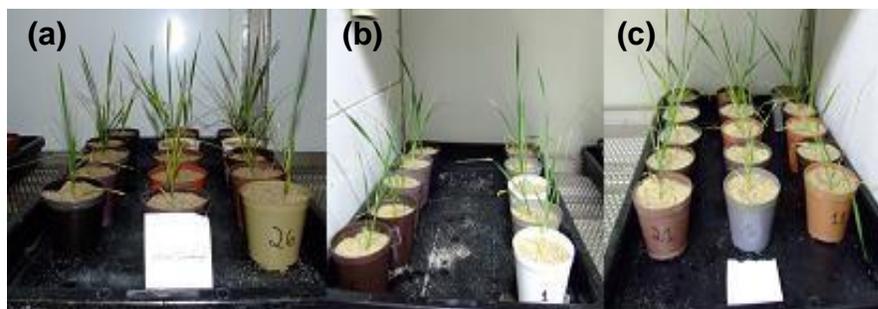
#### **5.4 Experimento 4: Interação *in vivo* (*Triticum aestivum* L.) entre *Glomus intraradices*, *Trichoderma atroviride* e *Fusarium culmorum*.**

Na terceira semana após o início do experimento a média da colonização micorrízica foi de 77%, o que confirmou a efetividade da colonização micorrízica das raízes das plantas de trigo. A inoculação dos fungos *Trichoderma atroviride* 1 e *Fusarium culmorum* 13 foi realizada na terceira semana após o plantio e vinte dias após esta inoculação foi realizada a análise de confirmação da presença dos fungos nas raízes de cada planta. Todos os tratamentos apresentaram os fungos desejados e que foram inoculados (tabela 10). No entanto, foram observados também outros fungos não identificados, especialmente nos tratamentos com a presença de micorriza e no tratamento controle. Nos tratamentos com micorriza estes fungos podem ter se desenvolvido a partir de inóculos presentes internamente nos esporos

micorrizicos inoculados no solo, pois a desinfecção realizada nestes tem uma ação mais superficial, não sendo possível desinfetar totalmente a parte interna, portanto, possibilitando a presença de outros fungos indesejados (Tauschke 2010). Já em relação à presença de fungos no tratamento controle, uma suposição é que o solo não tenha sido esterelizado adequadamente ou que houve alguma contaminação durante o manuseio do material.

**Tabela 10.** Avaliação da presença de fungos na rizosfera de plantas de trigo inoculadas com *Glomus intraradices*, *Trichoderma atroviride* 1 e *Fusarium culmorum* 13.

Tratamentos	Fungos encontrados
Controle	<i>Fusarium</i> spp. (não identificado)
	<i>Fusarium proliferatum</i>
	<i>Trichoderma atroviride</i>
	<i>Cladosporium</i>
Micorriza	<i>Fusarium oxysporum</i>
	<i>Alternaria</i>
	<i>Cladosporium</i>
Micorriza + <i>T. atroviride</i>	<i>Trichoderma atroviride</i>
Micorriza + <i>F. culmorum</i>	<i>Fusarium culmorum</i>
	<i>Cladosporium</i>
Micorriza + <i>T. atroviride</i> + <i>F. culmorum</i>	<i>Trichoderma atroviride</i>
	<i>Fusarium culmorum</i>
<i>F. culmorum</i>	<i>Fusarium culmorum</i>
<i>T. atroviride</i>	<i>Trichoderma atroviride</i>
<i>T. atroviride</i> + <i>F. culmorum</i>	<i>Fusarium culmorum</i>
	<i>Trichoderma atroviride</i>



**Figura 17.** Visualização das plantas aos 46 dias após o plantio. (a) Sem micorriza, (b) controles, (c) com micorriza.

A avaliação das plantas na coleta final mostrou que o comprimento da parte aérea das plantas variou entre 22,6 e 27,5cm, a massa da matéria seca das folhas entre 0,19 e 0,35g e a massa da matéria seca das raízes variou entre 0,10 e 0,13g. Contudo não se verificaram diferenças significativas entre as médias dos tratamentos. Foram verificadas diferenças estatísticas somente nos dados da massa de matéria fresca das folhas e da raiz (tabela 11).

**Tabela 11.** Médias e análise estatística da massa de matéria fresca (MMF) das folhas e raízes das plantas de *Triticum aestivum* quando submetidas aos diferentes tratamentos.

Tratamentos	MMF folha (g)*	MMF raiz (g)*
Controle	0,79ab	1,39ab
Micorriza	1,10ab	1,76ab
Micorriza + <i>T. atroviride</i> 1	0,75ab	1,32b
Micorriza + <i>F. culmorum</i> 13	0,64b	1,21b
Micorriza + <i>T. atroviride</i> 1 + <i>F. culmorum</i> 13	1,24a	2,14a
<i>F. culmorum</i> 13	0,91ab	1,58ab
<i>T. atroviride</i> 1	0,67b	0,97b
<i>T. atroviride</i> 1 + <i>F. culmorum</i> 13	0,68b	1,28b

\*Nota: Valores seguidos pela mesma letra em cada coluna não diferem significativamente pelo teste Tukey 5%.

Na parte aérea, o tratamento com a presença dos três fungos (Mic+Trich+Fus) teve maior massa fresca que as plantas inoculadas com *Trichoderma atroviride* isoladamente, *T. atroviride* mais *F. culmorum*, e micorriza mais *F. culmorum*. Esse comportamento se repetiu na matéria fresca das raízes, onde o tratamento micorriza mais *T. atroviride* também apresentou média menor que o tratamento com os três fungos. Isso indica uma diferença na absorção/retenção de água pelas plantas entre os tratamentos, visto que não houve diferença nos valores de matéria seca. Em experimento similar realizado por Arriola *et al.* (2000) com plantas de aspargo, foi verificado aumento da massa seca da parte aérea quando a planta tinha sido inoculada por *Glomus intraradices*, *Trichoderma harzianum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*. Em experimento realizado por Martinez *et al.* (2003) foi verificado diminuição do peso seco da raiz e parte aérea de plantas de soja quando inoculadas

conjuntamente com *Gigaspora rosea* e *Trichoderma pseudokoningii*, o que não foi verificado em nosso experimento.

Os dados obtidos de porcentagem de colonização micorrízica mostram que houve uma contaminação do tratamento controle, e que o nível de colonização não diferiu significativamente do tratamento inoculado somente com FMA. No entanto, nos tratamentos com inoculação dos três fungos (Mic+Trich+Fus) e com micorriza e *F. culmorum* obteve-se uma alta porcentagem de colonização fúngica onde pode estar presente o fungo micorrízico. Segundo Tauschke (2010) o título mais adequado seria porcentagem de infecção fúngica, pois no processo de coloração da raiz pode ocorrer a coloração dos outros microorganismos que colonizaram as raízes, sendo estes facilmente confundidos com a micorriza.

**Tabela 12.** Taxa de colonização micorrízica nas raízes de trigo (*Triticum aestivum*) submetidas aos diferentes tratamentos utilizados no experimento.

Tratamentos	%Myc*
Controle	13c
Micorriza	29bc
Micorriza + <i>T. atroviride</i>	57ab
Micorriza + <i>F. culmorum</i>	63a
Micorriza + <i>T. atroviride</i> + <i>F. culmorum</i>	65a
<i>F. culmorum</i>	45ab
<i>T. atroviride</i>	49ab
<i>T. atroviride</i> + <i>F. culmorum</i>	31bc

\*Nota: Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem significativamente pelo teste Tukey 5%.

As médias das atividades enzimáticas da fosfatase ácida mostra que há diferenças de valores conforme o tratamento utilizado, dado contrário àquele verificado para  $\beta$ -glucosidase, onde não houve diferenças significativas entre os tratamentos (tabela 13). Verifica-se que a enzima  $\beta$ -glucosidase não é muito indicada para a análise da presença de interações dos outros fungos sobre a atividade do fungo micorrízico, pois normalmente esta enzima não apresenta uma alta atividade nos fungos endomicorrízicos, sendo mais importante para os fungos ectomicorrízicos

(TAUSCHKE, 2010). Abrecht *et al.* (1996) também detectaram baixa atividade enzimática de  $\beta$ -glucosidase, similar ao controle, não sendo possível analisar diferenças entre plantas micorrizadas e não micorrizadas.

**Tabela 13.** Atividade da enzima fosfatase ácida e  $\beta$ -glucosidase em nmol/ $\mu$ g de raiz de *Triticum aestivum*.

Tratamentos	$\beta$ -glucosidase*	Fosfatase ácida*
	nmol/ $\mu$ g	nmol/ $\mu$ g
Controle	0,92a	3,0bc
Micorriza	1,07a	3,4bc
Micorriza + <i>T. atroviride</i>	0,89a	2,5c
Micorriza + <i>F. culmorum</i>	1,44a	6,2a
Micorriza + <i>T. atroviride</i> + <i>F. culmorum</i>	1,09a	2,6c
<i>F. culmorum</i>	0,95a	2,9bc
<i>T. atroviride</i>	0,99a	2,9bc
<i>T. atroviride</i> + <i>F. culmorum</i>	1,09a	5,5ab

\*Nota: Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem significativamente pelo teste Tukey 5%.

Em relação a enzima fosfatase ácida o tratamento micorriza mais *F. culmorum* apresentou maior atividade enzimática diferindo do tratamento controle e do tratamento micorriza. Estes dois últimos tratamentos apresentaram atividade enzimática semelhante, uma vez que apresentaram porcentagem similar de colonização micorrízica (tabela 12). Segundo Khade *et al.* (2010), a colonização micorrízica influencia positivamente a atividade das enzimas fosfatase. O tratamento com inoculação dos três fungos (Mic+Trich+Fus) e o tratamento micorriza e trichoderma apresentaram menor atividade enzimática, não diferindo estatisticamente dos tratamentos controle e micorriza. Através destes dados pode-se inferir que há interação entre os fungos, pois quando *Fusarium culmorum* é inoculado conjuntamente com a micorriza a atividade enzimática aumenta, mas quando o fungo patogênico foi inoculado conjuntamente com micorriza e *Trichoderma atroviride* a atividade enzimática de fosfatase ácida mostrou-se muito baixa. Dessa maneira verifica-se que o fungo *Trichoderma atroviride* apresentou ação inibitória à atividade do fungo micorrízico arbuscular, diminuindo sua atividade enzimática e agindo sobre

o fungo patogênico. Muitos experimentos têm demonstrado que os fungos do gênero *Trichoderma* tendem a inibir o desenvolvimento e atividade dos FMA (WYSS *et al.*, 1992; MARTINEZ *et al.*, 2003; MCALLISTER *et al.*, 1994a). No entanto, dados contraditórios foram obtidos por Green *et al.* (1999) onde o FMA *Glomus intraradices* suprimiu a densidade populacional e atividade de *Trichoderma harzianum*.

Afim de se confirmar este dado seria necessário caracterizar quantitativamente a presença deste fungo e do fungo patogênico nas plantas, verificando se há diminuição ou não da incidência da doença na planta.

## 6 CONCLUSÕES

A velocidade de crescimento dos fungos *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. foi influenciada diretamente pelo meio de cultura utilizado, tendo o meio Arroz-Agar proporcionado melhor desenvolvimento dos fungos.

*Fusarium culmorum* e *Fusarium graminearum* apresentaram maior agressividade de crescimento enquanto *Fusarium cerealis* apresentou menor agressividade de crescimento, tanto em cultivo conjunto com *Trichoderma* spp quanto em cultivo individualizado.

*Trichoderma atroviride* inibiu somente o crescimento de *Fusarium cerealis* devido, principalmente, ao fato de que essa espécie apresenta menor agressividade de crescimento.

O crescimento de *Trichoderma atroviride* foi influenciado positivamente pela presença de fungo micorrízico arbuscular.

Quando em contato direto, o fungo micorrízico exerceu uma ação inibitória sobre o fungo *Fusarium culmorum*. Contudo, são necessários mais estudos afim de obter-se maior precisão experimental.

No experimento *in vivo* o tratamento com inoculação do fungo micorrizico, *T. atroviride* e *F. culmorum* apresentou maior massa de matéria fresca da parte aérea e da raiz das plantas e maior porcentagem de colonização micorrízica.

$\beta$ -glucosidase apresentou baixos níveis de atividade enzimática, não diferindo entre os tratamentos.

Fosfatase ácida apresentou maior atividade no tratamento micorriza mais *F. culmorum* e menor atividade no tratamento com inoculação dos três fungos (Mic + Trich + Fus).

A presença do fungo patogênico estimulou a atividade do fungo micorrízico aumentando a atividade da fosfatase ácida. Contraditoriamente *Trichoderma atroviride* apresentou ação inibitória à esta atividade, influenciando negativamente a ação de *Glomus intraradices*.

*Trichoderma* spp. e o fungo micorrízico arbuscular, separadamente, possuem grande potencial como controle biológico. No entanto, quando em cultivo conjunto *Trichoderma* spp. pode influenciar negativamente a atividade micorrízica, prejudicando o controle do fungo patogênico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARLE, I. M., *et al.* Phosphatase activities of arbuscular mycorrhizal intraradical and extraradical mycelium, and their relation to phosphorus availability. **Mycological Research**. v. 106, n. 10, p. 1224-1229, oct. 2002

ABRECHT, H., *et al.* Increases in  $\alpha$ -monosidase activity in the arbuscular mycorrhizal symbiosis of *Allium schoenoprasum*. **Mycorrhiza**, v. 6, p. 31-34, 1996.

ALLEN, M. F. The ecology of arbuscular mycorrhizas: a look back into the 20<sup>th</sup> century and a peek into the 21<sup>st</sup>. **Mycological Research**, New York, v. 100, n. 7, p. 769-782, 1996.

ARRIOLA, L. L., *et al.* The effect of *Trichoderma harzianum* and arbuscular mycorrhizae on fusarium root rot in asparagus. **Hort Technology**. v. 10, n. 1, jan-march 2000.

CALISTRU, C., *et al.* *In vitro* studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. **Mycopathologia**, v. 139, p. 115-121, 1997.

DALLA COSTA, M. **Micorrização e resistência a *Fusarium oxysporum* Sch. f. sp. herbemontis em genótipo de porta-enxerto de videira**. 2010. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

DIOP, T. A. *In vitro* culture of arbuscular mycorrhizal fungi: advance and future prospects. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 692-697, 2003.

ETHUR, L. Z., *et al.* Seleção de *Trichoderma* spp. visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.5, p.885-887, 2001.

FILION, M., *et al.* Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rizosphere microorganisms. **New Phytologist.**, v. 141, p. 525-533, 1999.

GIOVANNETTI, M., *et al.* An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist** 84: 489-500. 1980.

GREEN, H., *et al.* Suppression of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* by mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in root-free soil. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1228-1434, 1999.

KHADE, S. W., *et al.* Arbuscular mycorrhizal status and root phosphatase activities in vegetative *Carica papaya* L. varieties. **Acta Physiology Plant**, v. 32, p. 565-574.

LINDERMAN, R. G.; PAULITZ, T. C. Mycorrhizal interactions with soil organisms. In: **Handbook of applied Mycology – Soil and plants**. New York: Marcel Dekker, 1991.

LOCATELLI, L. M.; LOVATO, P. E. Inoculação micorrízica e aclimatização de dois porta-enxertos de macieira micropropagados. **Pesquisa agropecuaria brasileira**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 177-184, fev. 2002

MACALLISTER, C. B. *et al.* Interactions between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*: effects on plant growth, arbuscular mycorrhizas and the saprophyte inoculants. **Soil Biol. Biochemistry.**, v. 26, n. 10, p. 1363-1367, 1994a.

MACALLISTER, C. B., *et al.* *In vitro* interactions between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*. **Soil Biol. Biochemistry.**, v. 26, n. 10, p. 1369-1374, 1994b.

MAIA, L. C., *et al.* Interação entre fungos micorrizicos arbusculares e patógenos radiculares. In: MICHEREFF, S. J. *et al.* **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005.

MARTINEZ, A., *et al.* Interactions between *Trichoderma pseudokoningii* strains and the arbuscular fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*. **Mycorrhiza**, v. 14, n. 2, p. 79-84, 2003.

MELO, I.S. de. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna : EMBRAPA-CNPDA, 1991.

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

MELO, I. S., AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna : EMBRAPA-Meio Ambiente, v. 1, 2000.

MICHEREFF, S. J., *et al.* Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. In: MICHEREFF, S. J. *et al.* **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005.

MÜLLER, Marina. 2010 (comunicação oral)

PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society** 55 (1): 158-161. 1970.

POZO, M. J., *et al.* **Boosting plant defence by beneficial soil microorganisms**. Seção de Fitopatologia, Faculdade de Biologia, Universidade de Utrecht, Holanda, 2004. Disponível em: < <http://www.bio.uu.nl/~fytopath/PDF%20files/ProcMC-Pozo-2004.pdf>>

PRITSCH, K., *et al.* A rapid and highly sensitive method for measuring enzyme activities in single mycorrhizal tips using 4-methylumbelliferone-labelled fluorogenic substrates in a microplate system. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p. 233-241, 2004.

PUPPI, G. *et al.* Management of positive interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with essential groups of soil microorganisms. In: **Impact of arbuscular mycorrhizal on sustainable agriculture and natural ecosystems**. Basel, Switzerland: Birkhäuser, 1994.

ROJO, F., *et al.* Effect of *Trichoderma* species on growth of *Fusarium proliferatum* and production of fumonisins, fusaproliferin and beauvericin. **Mycotoxin research**, v. 23, n. 4, p. 173-179, 2007.

SAMSON, R., *et al.* **Introduction to food-and airborne fungi**. CBS: Utrecht, Netherlands. ed. 6, 2002.

SHALINI, S., *et al.* Parasitism of rhizoctonia solani by strains of trichoderma spp. **EJEAFChe**, v. 6, n. 8, p. 2272-2281, 2007.

SCHMALE, D.G. and BERGSTROM, G. C. **Giberela ou Fusariose da espiga de trigo**. 2003. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/FusariumPort.aspx>>. Acesso em 10/10/2010.

SCHUSSLER, A., *et al.* A new fungi phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycology Research**, v. 105, n. 12, p. 1413-1421, 2001.

SIEBERT, Susann. **Effekt von Trichoderma harzianum auf das Wachstum und Mykotoxinbildung von Fusarien**. 2010. Bachelorarbeit. Freien Universität, Berlin, Deutschland.

SIQUEIRA, J. O., *et al.* Fungos micorrizicos arbusculares. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 25, março/abril 2002.

SOUZA, V. C. de, *et al.* Estudos sobre fungos micorrízicos. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.** [online], v.10, n.3, p 612-618, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbeaa/v10n3/v10n3a11.pdf>> Acesso em: 23/05/2010.

TAUSCHKE, Marion. 2010 (comunicação oral).

WILLIAMS, S. C. K., *et al.* Effects of fertilizers and arbuscular mycorrhizal fungi on the post-vitro growth of micropropagated strawberry. **Agronomie**, Paris, v. 12, n. 10, p. 851-857, 1992.

WYSS, P., *et al.* Testing the effect of biological agents on the formation of vesicular arbuscular mycorrhiza. **Plant and soil**, v. 147, p. 159-162, 1992.

YATES, L. E., *et al.* *Trichoderma viride* supresses fumonisin B1 production by *Fusarium moniliforme*. **Journal of food protection**, v. 62, n. 11, p. 1326-1332, 1999.