

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE SINOP
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais

**Sistemas integrados de produção revelando a biodiversidade fúngica
antagonista a *Rhizoctonia sp.*, *Fusarium sp.* e *Sclerotium rolfsii* no ecótono
Cerrado / Amazônia**

Gilcele de Campos Martin Berber

Sinop, Mato Grosso
02/2014

Gilcele de Campos Martin Berber

**Sistemas integrados de produção revelando a biodiversidade fúngica
antagonista a *Rhizoctonia sp.*, *Fusarium sp.* e *Sclerotium rolfsii* no ecótono
Cerrado / Amazônia**

Orientadora: Profa. Dra. Solange Maria Bonaldo

Co-orientador: Dr. Anderson Ferreira

Dissertação apresentada ao PPGCAM como
parte dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências Ambientais.

Sinop, Mato Grosso

02/2014

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

B484s Berber, Gilcele de Campos Martin Berber.

Sistemas integrados de produção revelando a
biodiversidade fúngica antagonista a *Rhizoctonia* sp.,
Fusarium sp. e *Sclerotium rolfsii* no ecótono Cerrado /
Amazônia / Gilcele de Campos Martin Berber Berber. -2014
ix, 40 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Solange Maria Bonaldo.

Co-orientador: Anderson Ferreira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato
Grosso, Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais,

Sinopse:

Estudou-se a diversidade e bioprospecção de fungos em sistemas integrados de produção no ecotóno Cerrado/ Amazônia contra os patógenos *Rhizoctonia* sp., *Sclerotium rolfsii*. e *Fusarium* sp..

Palavras-chave: Antagonismo, ITS e iLPF.

Ao meu esposo Rodolfo, pela paciência, amor, dedicação....

Você faz minha vida mais feliz.

*“No fim tudo dá certo, se não deu certo
é porque ainda não chegou ao fim”
Fernando Sabino & Rodolfo Berber.*

*Aos meus filhos Leonardo e Heitor
A Mamãe ama vocês...*

Dedico

Aos meus pais Selma e Odair e meus irmãos Leandro e Barbara, por me proporcionar o melhor do ser humano: a educação e o caráter.

Amo vocês

De todas as etapas da redação de uma dissertação, o item *Agradecimentos* é certamente o mais desafiador, pois, embora não dependa de embasamento científico, experimentação e comprovação estatística, é nele que exercitamos a memória para não nos esquecermos de retribuir em palavras a contribuição particular de cada pessoa ou instituição na realização do trabalho.

Assim, meus sinceros agradecimentos:

Ao Dr. Anderson Ferreira, pela orientação, motivação, apoio e amizade, durante estes dois anos de mestrado. As palavras abaixo de Paulo Coelho, encontradas em sua tese, representam o verdadeiro sentimento do “bom guerreiro” que você é: *“Lembre-se que um bom “guerreiro” compartilha com o outro o que sabe do caminho. Quem ajuda sempre é ajudado, e precisa ensinar o que aprendeu. Ele sabe que, se chegar ao final da jornada num paraíso vazio, sua luta não terá valido a pena.”* (Paulo Coelho). Obrigada!

À Dra Solange Maria Bonaldo, pela confiança, amizade, apoio e ensinamentos, valiosas sugestões, e pelos fungos fitopatogênicos cedidos neste experimento;

Ao meu querido marido Rodolfo, pela paciência, amor, dedicação e valiosas sugestões;

Aos meus filhos que tanto amo, Leonardo e Heitor, vocês fazem minha vida mais feliz;

As minhas queridas amigas, Fabieli, Deise e Marta, obrigada pelo companheirismo, seminários, estudos, festas..... Vocês são especiais!

Ao meu amigo Bruno Rafael, pelo auxílio durante a fase do experimento e transporte até São Paulo das minhas preciosas amostras. Muito obrigada, você fez meus dias de trabalho ficarem muito mais descontraídos;

Aos Professores Evaldo Pires e Leandro Battirola, os seus ensinamentos me mostraram o que realmente significa a palavra “PROFESSOR”;

Ao Dr. Maurel Behling pelo auxílio na análise dos dados

Às amigas de laboratório de microbiologia e biologia molecular: Anysia, Joyce, Kaynara, Tatiana, Valéria em especial Kellen, Maquella, Maira pelo auxílio no experimento;

À Embrapa pela liberação do uso do laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular e coleta das amostras;

Ao CNPq, CAPES e Embrapa, pelo apoio financeiro;

À Universidade Federal de Mato Grosso

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e que não estão listados aqui.

MUITO OBRIGADA!

“Jovens, cientistas do futuro, não se deixem esmorecer pela barreira do ceticismo, nem desanimar pela tristeza de certos momentos que caem sobre uma nação. Não se enraiveçam, com seus oponentes, porque nenhuma teoria científica foi aceita sem oposição. Habitem a paz serena das bibliotecas e laboratórios. Digam para si mesmos, primeiro: - O que fiz por minha instrução? E à medida que avançarem: O que estou realizando? Até chegar o momento em que possam sentir a imensa felicidade de pensar que contribuíram, de alguma forma, para o progresso e bem-estar da Humanidade”. Louis Pasteur

SUMÁRIO

Introdução	11
Materiais e métodos	13
<i>Local do experimento e delineamento experimental</i>	13
<i>Amostras do solo</i>	14
<i>Isolamento de fungos</i>	15
<i>Seleção de isolados antagonistas</i>	15
<i>Identificação molecular dos isolados antagonistas</i>	16
<i>Amplificação das regiões ITS dos isolados fúngicos</i>	17
<i>Sequenciamento e análise das regiões ITS dos isolados fúngicos</i>	18
Resultados	18
<i>Isolamentos de fungos</i>	18
<i>Seleção de isolados antagonistas</i>	20
<i>Identificação molecular dos isolados antagonistas</i>	25
Discussão	27
Referências	31
Anexo	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais características das áreas de coleta de amostras de solo.	13
Tabela 2. Características químicas e físicas do solo da área experimental da Embrapa Agrossilvipastoril no ano de 2011, no início do experimento.	15
Tabela 3. Médias de unidades formadoras de colônias (10^5 UFC.g ⁻¹ de solo) em sistemas integrados de produção e monocultivos em diferentes épocas de coleta.	19
Tabela 4. Contraste de médias entre os tratamentos	20
Tabela 5. Antagonismo a <i>Fusarium</i> sp., <i>Rhizoctonia</i> sp. e <i>Sclerotium rolfsii</i> em períodos de seca e chuva em amostras colhidas em diferentes sistemas integrados.	21
Tabela 6. Identificação de Fungos Isolados de solo sob Sistemas Integrados de produção, Monocultura, mata e pousio na época da chuva. A Identificação Molecular das espécies foi realizada por sequenciamento da região ITS e análises de comparação no BLASTn (National Center for Biotechnology information Website).	25
Tabela 7. Identificação de fungos isolados de solo sob sistemas integrados de produção, monocultura, mata e pousio na época da seca. A identificação molecular das espécies foi realizada por sequenciamento da região ITS e análises de comparação no BLASTn (National Center for Biotechnology information Website).	26

**Sistemas integrados de produção revelando a biodiversidade fúngica
antagonista a *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. e *Sclerotium rolfsii* no
ecótono Cerrado / Amazônia**

Autores:

Gilcele de Campos Martin Berber^{1,2}, Solange Maria Bonaldo², Kellen Banhos
do Carmo^{1,2}, Maquella Neves Garcia^{1,2}, Austeclínio Lopes de Farias Neto¹
Anderson Ferreira¹

Filiação:

¹*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Embrapa Agrossilvipastoril, ,
Sinop, MT, Brasil.*

²*Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Sinop, MT, Brasil.*

Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais – PPGCAM

*Correspondente: Anderson Ferreira, Lab. Microbiologia e Biologia Molecular,
MT 222 - Km 2,5, 78550-970, Sinop, MT, Brasil. Tel: +55 (66) 3211-4220 -
Fax: +55 (66) 3211-4220. E-mail: anderson.ferreira@embrapa.br*

Resumo

Os sistemas integrados têm sido considerados como alternativa para alcançar uma melhor rentabilidade e adequação dos sistemas produtivos agrícolas. No entanto, o sucesso depende do conhecimento dos processos envolvidos no manejo e na conservação da qualidade do solo. Nesse sentido, o antagonismo ou controle biológico entre microrganismos pode auxiliar na redução do crescimento de fungos patogênicos que causam prejuízos econômicos para as lavouras. O objetivo deste trabalho foi quantificar fungos presentes no solo e identificar os potenciais antagonistas a *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. e *Sclerotium rolfsii*, em monocultivos e sistemas integrados de produção. Durante os períodos de chuva e seca foram avaliados 10 modelos de produção, considerando desde o monocultivo até as interações entre lavoura, pecuária e floresta, além de uma área de pousio e outra de mata nativa. Considerou-se antagonismo positivo quando houve formação do halo de inibição durante a cultura pareada. As quantificações de unidades formadoras de colônia (UFC) diferiram estatisticamente entre os tratamentos e as épocas de coleta do solo, sendo que os sistemas integrados apresentaram maior número de UFC. Os isolados fúngicos provenientes do solo dos sistemas integrados apresentam potencial no controle biológico dos fitopatógenos *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. e *Sclerotium rolfsii*. As espécies obtidas nas amostras foram identificadas como pertencentes aos gêneros cultivados *Penicillium*, *Talaromyces*, *Eupenicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Acremonium*, *Curvularia*, *Purpureocillium*, *Bionectria*, *Paecilomyces*, *Plectospharella*, *Clonostachy*, *Mucor*, *Fennellia* e *Metarhizium*. O uso de sistemas integrados favorece o aumento da densidade de fungos. As

48 épocas de avaliação (seca e chuva) modulam o aumento da densidade de
49 fungos no solo em sistemas integrados, monocultivo e mata nativa. A estratégia
50 de estudos de fungos antagônicos possibilitou a identificação de diferentes
51 gêneros com potencial de uso biotecnológico para a agricultura.

52

53 Palavras-chave: Fitopatógenos; iLPF; Antagonismo; ITS; 18S DNAr.

54

Abstract

Integrated systems have been considered as an alternative to reach better profitability and suitability of agricultural production systems. However, success depends on the knowledge of the processes involved in the management and conservation of soil quality. The antagonism among microorganisms or biological control can reduce the growth of pathogenic fungi that cause economic damage to crops. The aim of this study was to quantify fungi in the soil and identify potential antagonistic to *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. and *Sclerotium rolfsii* in monoculture and integrated production systems. During rain and dry season was assessed 10 production models, since the monoculture until the interactions between farming, livestock and forestry, as well a fallow area and other native vegetation. Quantification of colony forming units (CFU) had statistical difference among treatment and season period of soil sampling, being observed higher number of CFU for integrated system. Fungal isolates from soil of integrated systems have potential for biological control of plant pathogens as *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. and *Sclerotium rolfsii*. Antagonism was considered positive on presence of inhibition zone formation during paired culture. Identification of antagonist fungi showed that species were *Penicillium*, *Talaromyces*, *Eupenicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Acremonium*, *Curvularia*, *Purpureocillium*, *Bionectria*, *Paecilomyces*, *Plectospharella*, *Clonostachy*, *Mucor*, *Fennellia* e *Metarhizium*.

Keywords: Phytopatogens; iLPF; Antagonism; ITS, 18S DNAr.

Introdução

As explorações agrícolas em regiões de transição entre Cerrado e Amazônia tem se caracterizado pela implantação de monoculturas em áreas anteriormente ocupadas por florestas nativas (FAO, 2012 e Zilli et al., 2013). Essas áreas de transição compõem um complexo sistema, ainda não bem compreendido, de ciclagem de nutrientes entre solo-plantas-animal. O desmatamento e a falta de diversidade de culturas resultaram em um sistema de produção pouco sustentável, caracterizado pela degradação progressiva do solo (Alves et al., 2011) pelo surgimento de pragas e doenças nas áreas agrícolas (Santos et al., 2012; Tonin et al., 2013), aumento de custos de produção e surgimento de fitopatógenos resistentes a fungicidas (Xiao et al., 2013).

Os sistemas de ILPF vindo sendo apresentado como uma alternativa sustentável, pois possibilitam a recuperação de áreas degradadas por meio da intensificação do uso da terra, potencializando os efeitos complementares ou sinérgicos existentes entre as diversas espécies vegetais e a criação de animais. Esses sistemas aperfeiçoam o uso do solo, com a produção de grãos em áreas de pastagens, melhorando a produtividade das pastagens em decorrência de sua renovação pelo aproveitamento da adubação residual da lavoura (Trecenti e Hassa, 2008).

Dentre os fungos fitopatogênicos mais frequentes em monoculturas podem ser destacados *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. e *Sclerotium rolfsii*, os quais tem ocasionado grandes prejuízos agrícolas, principalmente em monoculturas de milho (Stumpf et al., 2013), soja (Souza et al., 2013) e pastagens (Cortinovis et al., 2013). O controle dessas doenças é feito

geralmente através do uso de fungicidas, que podem ser prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente, podendo levar a redução da biodiversidade de organismos não alvo (Khot et al., 2012). Esse mecanismo de controle quando empregado de forma incorreta pode acarretar no desenvolvimento de fitopatógenos resistentes aos princípios ativos utilizados (Souza et al., 2013).

O controle biológico tem sido amplamente estudado em produções agrícolas tropicais da América do Sul (Souza et al., 2013; FAO, 2012; Silva et al., 2013) como estratégia para redução de fitopatógenos, pois possibilita uma gestão sustentável e ambientalmente aceitável. Dentre os fungos que apresentam potencial para uso no controle biológico podem ser destacados *Coniothyrium minitans*, *Ulocladium atrum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum*, os quais tem sido relacionados a redução de incidência de *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* sp. e *Sclerotium rolfsii* pela ação antagonista (Jones et al., 2011; Ferraz et al., 2011; Fernando et al., 2007; Carvalho et al., 2011; Zeng et al., 2012), relacionada a degradabilidade enzimática da parede celular (quitinase), inibição de crescimento micelial e esporulação (Santos 2012), antibiose, competição, parasitismo e hipovirulência (Geraldine et al., 2013).

Apesar dos relatos encontrados na literatura sobre a presença de fungos no solo em controle biológico (Zhang et al., 2013 e Gouba e Drancourt, 2013), é necessária a plena compreensão das possíveis interações fúngicas em sistemas integrados localizados no ecótono Cerrado/Amazônia. Pesquisas voltadas para esse propósito podem resultar em grande impacto econômico, ambiental e científico, uma vez que a identificação da diversidade fúngica pode

ser utilizada como ferramenta de proteção e conservação do solo (Souza et al., 2013).

O isolamento em meios de cultivo está entre as principais técnicas utilizadas para avaliar as comunidades fúngicas em solos, porém permite somente a quantificação desses fungos. Nesse sentido, uma das alternativas para identificação de espécies é o uso de estratégias moleculares como o sequenciamento do ITS (regiões intergênicas) para identificar os fungos de interesse (Meireles et al., 2009 e Manohar e Raghukumar, 2013).

No presente trabalho foram utilizadas análises clássicas e moleculares, como isolamento e análises de antagonismo, seguido de sequenciamento, com objetivos de: *i*) quantificar fungos presentes no solo usado para monocultivo, sistemas integrados de produção e mata nativa; *ii*) avaliar o potencial antagônico desses fungos sobre o *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. e *Sclerotium rolfsii*; *iii*) identificar as espécies de fungos com potencial antagônico presentes em solos cultivados e mata nativa do ecótono Cerrado/Amazônia.

Material e Métodos

Local do experimento e delineamento experimental

Foi estabelecido e avaliado um experimento composto por 10 modelos de sistemas agrícolas no município de Sinop-MT, implantado no ano de 2011. A área experimental pertence a Embrapa Agrossilvipastoril, e está localizada na região de transição entre o Cerrado e Amazônia, clima Tropical Chuvoso, com precipitação média anual de 2.500 milímetros e temperatura anual entre 27° C e 39° C. Os tratamentos são apresentados na tabela1.

154 Tabela 1. Principais características das áreas de coleta de amostras de solo.

Tratamento	Sigla	Nome	Espécies presentes no Ano (2012) de Coleta
1	F	Floresta Plantada	Plantio de eucalipto em monocultura
2	L	Lavoura	Lavoura de soja no período chuvoso seguido de milho safrinha
3	P	Pastagem	Área com braquiária <i>B. brizantha</i> cv. Marandu sem pastejo animal
4	iPL	Integração Pecuária e lavoura	Área com braquiária <i>B. brizantha</i> cv. Marandu sem pastejo animal
5	iLP	Lavoura e Lavoura consorciada com pasto	Lavoura de soja no período chuvoso seguido de milho safrinha
6	iLF	Integração Lavoura e Floresta Plantada	Área de plantio de eucalipto integrada com lavoura de soja (chuva) seguido de milho safrinha
7	iPF	Integração Pastagem e Floresta Plantada	Área de plantio de eucalipto integrada com braquiária <i>B. brizantha</i> cv. Marandu sem pastejo animal
8	iLFP	Lavoura, floresta e pecuária Floresta Plantada	Área de plantio de eucalipto integrada com Lavoura de soja no período chuvoso seguido de milho safrinha
9	iPFL	Pecuária floresta Plantada e lavoura floresta Plantada	Área de plantio de eucalipto integrada com braquiária <i>B. brizantha</i> cv. Marandu sem pastejo animal
10	iLPF	Lavoura Pecuária Floresta Plantada	Área com plantio florestal (<i>Eucalyptus urograndis</i>), cultivadas anualmente com soja no verão, e cultivo de milho juntamente com braquiária <i>B. brizantha</i> cv. Marandu sem pastejo animal na safrinha, com colheita do milho e estabelecimento da pastagem no inverno para pastejo animal.
-	M	Mata Nativa	Área florestal com vegetação natural, adjacente a área experimental.
-	P	Pousio	Área sem atividades agrícolas por 3 anos

155

156 Foram avaliadas duas épocas de coleta no ano de 2012 (chuva e seca).

157 Foram realizadas análises químicas e físicas do solo (Tabela 2) antes da

implantação do experimento. As parcelas experimentais foram organizadas em blocos casualizados com quatro repetições. A parcela experimental dos sistemas é de 2 ha. A área total do ensaio é de aproximadamente 78 ha. Priorizou-se a utilização de plantio direto e as recomendações técnicas para cada cultura conforme as espécies utilizadas.

Amostras do solo

Durante os períodos de chuva e seca o solo foi coletado na camada de 0-10 cm, com auxílio de um trado holandês. Foram coletadas 20 amostras simples para formar uma amostra composta. As amostras foram embaladas, identificadas acondicionadas a 4°C e transportadas até o laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Embrapa Agrossilvipastoril. Em sequência, o solo foi homogeneizado, peneirado em malha de 4 mm e armazenado em 4 °C até o momento das análises.

Tabela 2. Características químicas e físicas do solo da área experimental da Embrapa Agrossilvipastoril no ano de 2011, no início do experimento.

Análises Químicas										
pH água	pH CaCl ₂	H (cmolc/dm ³) a	P (mg/dm ³) a	K (mg/dm ³) a	Ca (cmolc/dm ³) b	Mg (cmolc/dm ³) b	C. org (g/dm ³) ^c	Soma bases	CTC	Sat. Base
5,7	4,9	3,8	14,4	57	2,6	0,6	16,0	2,7	6,5	41,5
Análises Físicas										
Areia %				Silte %				Argila%		
35				10				55		

^a - Mehlich-1; ^b - Ca⁺², Mg⁺², Al⁺³: KCl 1 mol L⁻¹; ^c - Org C. Walkley Black Black

Isolamento de fungos

Dez gramas de amostra de solo foram diluídas em 90 mL de solução tampão fosfato esterilizado (PBS, contendo [g L⁻¹] 1,44 Na₂HPO₄; 0,24 KH₂PO₄; 0,20 KCl; 8,00 NaCl; pH 7,4) e incubadas sob agitação (150 r.p.m.) por uma 1 hora. Posteriormente, diluições de 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴ foram aplicadas em meio de

cultura BDA (Batata – Dextrose - Ágar), previamente testadas para obtenção de amostragem de unidades formadoras de colônia e suplementado com 50 µg mL⁻¹ de tetraciclina. A incubação ocorreu a 28°C sendo monitorada por 15 dias e a eficiência do processo de esterilização do PBS foi testada por aplicação em meio de cultura seguindo o mesmo protocolo supracitado. O número de UFC (Unidade Formadora de Colônia) foi estimado em UFC/g de solo. Após a quantificação e purificação, os isolados fúngicos foram armazenados em microtubos com água autoclavada (Castellani, 1939 apud Figueiredo, 1967).

Seleção de isolados antagonistas

Isolados fúngicos cultivados das amostras foram submetidos a teste de antagonismo aos fitopatógenos *Fusarium* sp. obtido da cultura do milho, *Rhizoctonia* sp. obtido da cultura da soja e *Sclerotium rolfsii* obtido da cultura da soja. Os isolados fitopatogênicos foram cultivados e mantidos em meio de cultivo BDA. As avaliações seguiram o método de cultura pareada, confrontando diretamente, em meio sólido, os dois microrganismos (Mariano, 1993). Foram utilizados 20 isolados de cada tratamento, incluindo a área de mata nativa e o pousio, os quais foram inoculados em meio de cultura BDA a 28°C por 2 dias. Posteriormente, o isolado fitopatogênico foi inoculado na margem oposta da placa de Petri seguido de incubação por 10 dias. Na placa controle foi inoculado somente o fitopatógeno. Após o cultivo, a presença de zonas de inibição entre as culturas pareadas e o crescimento radial do fitopatógeno em relação ao controle indicou a inibição. Todas as avaliações foram realizadas em duplicata.

Identificação molecular dos isolados antagonistas

O DNA dos isolados fúngicos foi extraído utilizando o kit Wizard® Genomic DNA purification Kit (Promega, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. O protocolo de Raeder e Broda (1985) modificado também foi utilizado. Para tanto, os fungos foram incubados em 100 mL de BD (caldo de 200 g de batata, 20 g de dextrose em 1 L de água, [pH 6.0]), por 10 dias a 28°C. O micélio fúngico foi filtrado e triturado em nitrogênio líquido. Alíquotas de 200 mg do micélio foram usadas para execução dos protocolos de extração de DNA. Para o protocolo de Raeder e Broda (1985) foi adicionado 1 mL de solução tampão de extração (1% de SDS, 25 mM de EDTA, 250mM de NaCl e 200 mM de Tris-HCl, [pH 8.0]), incubado a 65°C por 20 min e centrifugado (16000Xg) por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo contendo 1 volume de fenol, homogeneizado e centrifugado por 5 min a 4°C. Após, o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 1 volume de fenol:clorofórmio (1:1 v/v), homogeneizado e centrifugado por 5 minutos a 4°C. Repetiu-se o passo anterior mais uma vez. O DNA foi precipitado em 0,6 volumes de isopropanol, centrifugado por 10 min a 4°C e secado a 37°C. Para ressuspensão foram usados 50 µL de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada. Para a utilização do kit Wizard® o protocolo de extração foi acrescido de uma etapa extra de desproteinação com fenol e clorofórmio (1:1). A integridade e a quantificação do DNA foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 0.8% v/v. seguida de coloração com Gel Red (Biotium) e observação sobre luz ultravioleta.

Amplificação das regiões ITS dos isolados fúngicos

A região ITS1-5, 8S-ITS2 do rDNA foi amplificada pela técnica de PCR com o uso de iniciadores ITS-1 5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), os quais anelam em posições específicas do 18S e 28S do rDNA, que amplificam uma região de aproximadamente 700 pares de bases (White et al., 1990). As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 5 ng de DNA, tampão 1x (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4)), 3,75 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxiribonucleotídeos trifosfato, 0,2 µM de cada iniciador e 0,05U. µ L⁻¹ de Taq DNA polimerase (Sigma). Um controle negativo (reação de PCR sem DNA) foi incluído em todos os eventos de amplificação. A amplificação foi realizada em termociclador (Bio Rad - T100) programada para desnaturação inicial em 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 30 seg. Após os ciclos, uma extensão final a 72°C por 10 min. A amplificação foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1,5% (v/v), seguida de coloração em Gel Red (Biotium) e observação do fragmento de 700 pb sobre luz ultravioleta.

Sequenciamento e análise das regiões ITS dos isolados fúngicos

Os produtos obtidos da PCR foram purificados com isopropanol. Os produtos de PCR foram precipitados em álcool Isopropanol 100%, centrifugados por 15 minutos a 9000 Xg. Posteriormente foram realizadas duas lavagens com etanol 70% e ressuspensão do DNA em 10 µl de água ultra pura. O DNA foi quantificado em nanodrop (Thermo Scientific) e sequenciado no Centro de Estudos do Genoma Humano, ICB, da Universidade de São Paulo.

As sequências obtidas foram comparadas por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1990) contra a base de dados do GenBank. Após a comparação, as sequências foram utilizadas para alinhamento e análise filogenética no programa MEGA versão 4.0 (Tamura, 2007).

Análise estatística

A normalidade dos dados e a homogeneidade de variâncias foram aferidas pelos testes de Lilliefors ($P < 0.05$) e Bartlett ($P < 0.05$), respectivamente. Após, os resultados foram desdobrados em contrastes de médias. Os testes foram realizados utilizando os softwares Statistica e Excel.

Resultados

Isolamentos de fungos

Foi avaliada a quantidade de fungos presentes em solos cultivados em sistemas integrados de produção, monocultivo, mata nativa e pousio. O método utilizado possibilitou a obtenção de isolados fúngicos de diferentes grupos morfocromáticos. Considerando as duas épocas de coleta (chuva e seca), foram isolados 1.440 fungos no total e não foram observadas colônias fúngicas nas placas controle do isolamento.

O número de unidades formadoras de colônias fúngicas observada nos tratamentos avaliados na época da seca foi de 10.1×10^5 UFC.g⁻¹ de solo e foi menor do que a observada na época da chuva 23.0×10^5 UFC.g⁻¹ de solo, sendo ($F = 77.23$ e $P = 0.01$) (Tabela3).

Tabela 3. Médias de unidades formadoras de colônias (10^5 UFC.g⁻¹ de solo) em sistemas integrados de produção e monocultivos em diferentes épocas de coleta.

Sistemas	Chuva	Seca
1 F	15.9	7.6
2 L	19.0	7.2
3 P	27.4	9.1
4 iPL	28.6	14.0
5 iLP	18.4	8.9
6 iLF	19.9	14.8
7 iPF	24.7	10.9
8 iLPF	28.8	8.0
9 iLPF	25.6	10.1
10 iLPF	21.5	10.6
Média $\pm$ DP	23.0 $\pm$ 4.6	10.1 $\pm$ 2.2
Mata	13.1	10.4
Pousio	19.9	14.3

1F-Floresta; 2L-Lavoura; 3P-Pecuária; 4-iPL-Pecuária (2 primeiros anos); 5-iPL-Pecuária (2 primeiros anos); 6-iLF-Lavoura Floresta; 7-iPF-Pecuária Floresta; 8-iLFP-Lavoura Floresta (2 primeiros anos); 9-iPFL-Pecuária Floresta (2 primeiros anos); 10-iLPF-Lavoura Pecuária Floresta. Médias de quatro repetições obtidas de 3 triplicatas. Números com letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente.

Os resultados dos tratamentos foram desdobrados e analisados por contraste de médias (Tabela 4). Observou-se que o número médio de UFC de fungos nos monocultivos (14.4×10^5) foi menor do que o número médio de UFC observado nos sistemas integrados de produção (17.5×10^5) (C1, F= 5.14 e P = 0.032). Os menores valores se mantêm até mesmo em comparações de monocultivos com os tratamentos onde se tem a integração de apenas dois componentes, como é o caso de floresta com lavoura e floresta com pastagem (C2, F= 4.32 e P =0.047). Também foi possível observar que o número médio de UFC de fungos observado na pastagem em integração (19.5×10^5) foi maior do que na lavoura em integração (15.5×10^5) (C5, F= 4.11 e P= 0.053).

305 Tabela 4. Contraste de médias de Unidades formadoras de colônias entre os
306 tratamentos

Contraste	Tratamento ⁺	F	P
C1	(F,L,P) vs (iLP, iPL,iLF,iPF,iLFP, iPFL, iLPF)	5.14	0.032*
C2	(F,L,P) vs (iLP, iPL, ,iLF,iPF)	4.32	0.047*
C3	(F,L,P) vs (iLFP, iPFL, iLPF)	3.53	0.071*
C4	(iLP, iPL,iLF,iPF) vs (iLFP, iPFL, iLPF)	0.005	0.945
C5	(iPL, iPF) vs (iLP, iLF)	4.11	0.053*
C6	(P) vs (iPL, iPF)	0.29	0.597
C7	(P) vs (iPL, iPF, iPLF)	0.10	0.754
C8	(F) vs (iLF,iPF,iLFP,iPFL,iLPF)	6.87	0.014*
C9	(L) vs (iLP,iLF, iLFP, iPFL, iLPF)	2.17	0.153

307 ⁺1F-Floresta; 2L-Lavoura; 3P-Pecuária; 4-iLP-Pecuária (2 primeiros anos); 5-iPL-Pecuária (2
308 primeiros anos); 6-iLF-Lavoura Floresta; 7-iPF-Pecuária Floresta; 8-iLFP-Lavoura Floresta (2
309 primeiros anos); 9-iPFL-Pecuária Floresta (2 primeiros anos);10-iLPF-Lavoura Pecuária
310 Floresta. *diferenças significativas.
311

312 Quando foi comparada a floresta (monocultivo) com os sistemas
313 integrados com a floresta como componente, o número médio de UFC de
314 fungos observado foi de (11.8×10^5) menor do que o observado nos
315 tratamentos que apresentavam a floresta como componente (17.5×10^5) (C8, F
316 = 6.87 e P = 0.014).

317

318 Seleção de isolados antagonistas

319 Para realização dos testes de antagonismo aos fitopatógenos *Fusarium*
320 sp., *Rhizoctonia* sp. e *Sclerotium rolfsii* foram selecionados 20 isolados por
321 tratamento em cada época avaliada. No total foram testados 480 isolados
322 fúngicos de solo para cada fitopatógeno, sendo que destes 173 apresentaram
323 potencial antagônico (Tabela 5). Dentre esses, 10 isolados apresentaram
324 potencial antagônico aos três fitopatógenos testados (Tabelas 5 e 6) e 37
325 apresentaram potencial antagônico a pelo menos 2 fitopatógenos (Tabelas 5 e

6). Adicionalmente, foram mensurados os tamanhos dos halos de inibição de cada fungo, os quais apresentaram tamanhos variando de 0,001 a 1 cm de diâmetro (Tabela 5).

Tabela 5. Antagonismo a *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. e *Sclerotium rolfsii* em períodos de seca e chuva em amostras coletadas em diferentes sistemas integrados.

Tratamento*	Época	Isolado ⁺	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Sclerotium rolfsii</i>
F 1	Chuva	7	++	-	-
		33	-	-	+
		46	-	++	-
		49	+	+	-
		57	+	-	+
		1	+	-	+++
		3	-	+	-
		8	-	-	+
		22	+	+	-
		23	-	+	-
F 1	Seca	27	-	++	+
		38	-	-	+
		53	-	-	+
		59	+	+	-
		51	-	-	+
		54	+	-	-
		9	-	+	-
		14	-	-	+
		22	-	-	+
		28 ^o	+	+	++
L 2	Chuva	36	+	-	-
		47	-	-	+
		53 ^o	+	+	+
		58	+	-	-
		4	++	-	+
		5	+	-	+
		17	+	-	-
		22	+	-	-
		31	+	+	-
		37	+	-	+
L 2	Seca	43	+	-	-
		45	+	++	-
		47	-	-	+
		2	-	+	-
		11	-	+	-
		16	-	-	++
		19	-	+	-
		22	-	+	-
		31 ^o	+	+	+
		32	+	+	-
P 3	Chuva	42	-	+	-
		43	-	+	-
		45	+	-	-
		48	+	-	-
		56	+	-	-
		3	+	-	-
		37	-	-	+
		42	-	-	+
		43	-	+	-
		45	+	-	-
P 3	Seca	48	+	-	-
		56	+	-	-
		3	+	-	-
		37	-	-	+
		42	-	-	+
		43	-	+	-
		45	+	-	-
		48	+	-	-
		56	+	-	-
		3	+	-	-
iPL 4	Chuva	37	-	-	+
		42	-	-	+
		43	-	+	-

		49	-	-	+
		50	+	-	-
		59 [□]	+	+	+
iPL 4	Seca	8 [□]	+	+	+
		15	-	-	+
		28	-	-	+
		36	-	-	+
		39	+	-	-
		52	-	-	+
		54	-	-	+
iLP 5	Chuva	5	+	-	-
		14	-	-	+
		17	+	-	-
		26	+	-	-
		31	+	-	-
		38	+	-	-
		48	+	-	-
		52	-	+	-
iLP 5	Seca	3	++	-	-
		11	+	-	-
		13	+	-	-
		14	+	-	-
		54 [□]	+	+	+
		59	+	-	-
iLF 6	Chuva	12	++	-	-
		32	+	-	-
		35	-	-	+
		36	+	-	-
		42	+	+	-
		46	+	+	-
		48	+	-	+
		51	-	-	+
		52	+	-	-
		57	+	-	-
iLF 6	Seca	12	-	+	-
		25	-	+	-
iPF 7	Chuva	7	-	-	+
		19	-	-	+
		32	-	+	-
		47 [□]	+	+	++
		53	-	-	+
		54	+	+	-
		56	-	-	+
		60	+	-	-
iPF 7	Seca	3	+	-	-
		13	-	-	+
		17	-	+	+
		24	+	+	-
		36	+	-	-
		44	-	+	+
		58	+	-	-
		59 [□]	+	+	+
iLFP 8	Chuva	2	+	-	-
		4	+	-	-
		14	++	-	-
		16	+	-	-
		24	+	-	-
		25	-	-	++
		28 [□]	+++	-	+
		41	+	+	-

		46	-	-	+
		50	-	-	+
		52	-	-	+
		54	+	-	+
		58	-	-	+
iLFP 8	Seca	10	+	-	-
		13	-	+	-
		22	+	-	-
		26	+	-	+
		34	+	-	+
		52	-	+	-
		57	+	-	-
iPFL 9	Chuva	2	-	+	-
		3	+	-	-
		4	+	+	-
		13	-	+	-
		23	++	-	-
		25	-	-	+
		31 ^a	+	+	++
		55	+	+	-
iPFL 9	Seca	2	-	+	-
		10	-	+	-
		19	-	+	+
		21	-	-	+
		26	-	-	+
		30	+	++	-
		32	+	-	+
		41	+	-	+
iLPF 10	Chuva	4	+	-	-
		27	+	+	-
		36	-	++	-
		43	-	-	+
		48	+	++	-
iLPF10	Seca	25	+	+	-
		26	-	-	+
		40	+	+	-
		48	+	-	-
		55	+	-	-
		58	+	-	-
Pousio	Chuva	4	-	-	+
		5	-	-	+
		10	+	-	-
		17	-	-	+
		25	-	-	+
		39	+	-	-
		45	-	-	+
		60	-	-	+
Pousio	Seca	10	-	+	-
		29	+	+	-
		32	+	-	-
		41	+	-	-
		46	-	+	-
		56	-	+	+
		58	-	+	+
		60	+	-	+
Mata	Chuva	6	+	-	-
		15	+	-	-
		28	+	-	-
		36	+	-	-
		40	+	-	-

		44	+	+	-
Mata	Seca	28	+	-	+
		32	-	-	+
		44	+	-	+
		45	+	-	-

* Isolados com potencial antagônico a *Rhizoctonia* sp, ou *Fusarium* sp ou *Sclerotium rolfsii*. * 1F-Floresta; 2L-Lavoura; 3P-Pecuária; 4-iLP-Pecuária (2 primeiros anos); 5-iPL-Pecuária (2 primeiros anos); 6-iLF-Lavoura Floresta; 7-iPF-Pecuária Floresta; 8-iLFP-Lavoura Floresta (2 primeiros anos); 9-iPFL-Pecuária Floresta (2 primeiros anos); 10-iLPF-Lavoura Pecuária Floresta. **halo de inibição + : 1 - 5mm, ++: 6mm a 10mm e +++ >10mm e sem inibição: -, ^oisolados antagonista 3 fitopatógenos, ^oisolados antagonistas aos três fitopatógenos.

Para o teste de antagonismo os dados demonstram uma tendência de menor percentual de isolados fúngicos antagonistas em sistemas integrados comparados as monoculturas na época da chuva. Esta tendência pode ter sido influenciada pela época de cultivo onde ocorre maior incidência/impacto de doenças, devido à intensificação das culturas agrícolas nessa época. Outro ponto observado foi à influência de UFC apresentados pelos tratamentos, onde os que apresentaram maior número de UFCs também apresentou maior percentual de antagonismo. Para a época da chuva o tratamento 3 (pastagem) apresentou maior percentual de antagonismo aos fitopatógenos citados, e para a época de seca o tratamento 8 (eucalipto integrado com Lavoura de soja) apresentou maior percentual de isolados antagonistas.

Identificação molecular dos isolados antagonistas

Foi realizada a identificação molecular dos isolados que apresentaram potencial antagônico a pelo menos um dos fitopatógenos apresentados na Tabela. Do total de 173 fungos, 85 foram identificados por meio de sequenciamento parcial do ITS rDNA. Essa identificação permitiu acessar as espécies de fungos presentes em amostras de solo dos sistemas integrados, mata nativa e pousio com potencial controlador biológico de fungos patogênicos.

Tabela 6. Identificação de Fungos Isolados de solo sob Sistemas Integrados de produção, Monocultura, mata e pousio na época da chuva. A Identificação Molecular das espécies foi realizada por sequenciamento da região ITS e análises de comparação no BLASTn (National Center for Biotechnology information Website).

Tratamento*	Isolado	Gênero	Espécie (Blast –NCBI)	%*	Linhagem de referência
1F	49	<i>Eupenicillium</i>	-	96	GQ924907.1
1F	57	<i>Talaromyces</i>	sp	99	GU973739.1
2L	54	<i>Talaromyces</i>	<i>T. purpureogenus</i>	97	AB872825.1
3P	4	<i>Trichoderma</i>	-	93	GU048860.1
3P	5	<i>Aspergillus</i>	<i>A. terreus</i>	98	KC762934.1
3P	17	<i>Chaetomium</i>	<i>C. aureum</i>	98	JX186515.1
3P	22	<i>Trichoderma</i>	-	89	GU048860.1
3P	31	<i>Aspergillus</i>	<i>A. flavipes</i>	99	FR733808.1
3P	37	<i>Aspergillus</i>	<i>A. flavipes</i>	98	GU566238.1
3P	43	Uncultured soil fungus	sp	98	DQ421253.1
4 iPL	50	<i>Acremonium</i>	<i>A. cellulolyticus</i>	98	AB474749.2
4 iPL	59	<i>Clonostachys</i>	<i>C. rósea</i>	98	KC878702.1
5 iLP	14	<i>Aspergillus</i>	-	91	EF669591
5 iLP	17	<i>Talaromyces</i>	<i>T. purpureogenus</i>	97	AB872825.1
5 iLP	31	<i>Eupenicillium</i>	<i>E. chrosalmoneum</i>	100	EF626960.1
5 iLP	38	<i>Penicillium</i>	<i>P. citrinum</i>	91	HQ245157.1
5 iLP	48	<i>Curvularia</i>	<i>C. affinis</i>	98	J467361.1
5 iLP	52	<i>Purpureocillium</i>	<i>P. lilacium</i>	98	KC478538.1
6 iLF	27	<i>Aspergillus</i>	sp	98	FR733808.1
6 iLF	32	<i>Aspergillus</i>	<i>A. flavipes</i>	98	FR733808.1
6 iLF	35	<i>Bionectria</i>	sp	99	HM849058.1
6 iLF	42	<i>Aspergillus</i>	-	93	FJ545246.1
6 iLF	46	<i>Aspergillus</i>	-	95	JX556221.1
6 iLF	48	<i>Talaromyces</i>	sp	99	GU973739
6 iLF	51	<i>Aspergillus</i>	-	93	HD219673.1
6 iLF	57	<i>Acremonium</i>	<i>A. cellulolyticus</i>	97	AB474749.2
7 iPF	19	<i>Aspergillus</i>	<i>A. Brasiliensis</i>	98	JQ316521
7 iPF	54	<i>Purpureocillium</i>	<i>P. lilacinum</i>	98	KC157756.1
7 iPF	56	<i>Talaromyces</i>	<i>T. trachyspermus</i>	97	EU076917.1
7 iPF	60	<i>Talaromyces</i>	sp	99	JF714646.1
8 iLPF	14	<i>Purpureocillium</i>	-	91	KC478538.1
8 iLPF	24	<i>Aspergillus</i>	<i>A. Flavipes</i>	99	FR733808.1
8 iLPF	28	<i>Paecilomyces</i>	sp	97	HQ607808.1
9iLPF	25	<i>Talaromyces</i>	<i>T. purpureogenus</i>	97	AB872825.1
9iLPF	55	<i>Plectosphaerella</i>	<i>P. cucumerina</i>	99	KC93994.1
10 iLPF	4	<i>Talaromyces</i>	-	87	HQ60823.1
10 iLPF	27	<i>Talaromyces</i>	sp	99	GU973739.1
10 iLPF	36	<i>Aspergillus</i>	<i>A. Flavipes</i>	99	GU566238.1
10 iLPF	48	<i>Penicillium</i>	<i>P. verruculosus</i>	97	JN565299.1
Pousio	4	<i>Talaromyces</i>	sp	98	GU973739.1
Pousio	5	<i>Clonostachys</i>	<i>B. Rósea</i>	97	KC878702.1
Pousio	10	<i>Aspergillus</i>	<i>A. Flavipes</i>	98	GU566238.1
Pousio	25	<i>Aspergillus</i>	sp	98	KC007332
Pousio	39	<i>Chaetomium</i>	<i>C. cupreum</i>	98	AB509372.1
Mata	6	<i>Penicillium</i>	<i>P. citrinum</i>	97	HQ245157.1
Mata	15	<i>Talaromyces</i>	-	87	HD608123.1
Mata	28	<i>Trichoderma</i>	sp	88	JX416583.1
Mata	40	Fungal endophyte	-	89	EU977237.1
Mata	44	<i>Penicillium</i>	<i>P. pinophilum</i>	99	GU595046.1

* 1F-Floresta; 2L-Lavoura; 3P-Pecuária; 4-iLP-Pecuária (2 primeiros anos); 5-iPL-Pecuária (2 primeiros anos); 6-iLF-Lavoura Floresta; 7-iPF-Pecuária Floresta; 8-iLFP-Lavoura Floresta (2 primeiros anos); 9-iPFL-Pecuária Floresta (2 primeiros anos); 10-iLPF-Lavoura Pecuária Floresta. ** Similaridade com a linhagem de referência, isolados antagonistas aos três fitopatógenos.

Tabela 7. Identificação de fungos isolados de solo sob sistemas integrados de produção, monocultura, mata e pousio na época da seca. A identificação molecular das espécies foi realizada por sequenciamento da região ITS e análises de comparação no BLASTn (National Center for Biotechnology Information Website).

Tratamento *	Isolado	Gênero	Espécie (Blast –NCBI)	%**	Linhagem de Referência
1F	3	<i>Aspergillus</i>	sp	96	KC007332.1
1F	8	<i>Penicillium</i>	-	89	HQ245157.1
1F	22	<i>Penicillium</i>	<i>P. verruculosim</i>	96	JN565299.1
1F	27	<i>Penicillium</i>	sp	80	GU973810.1
1F	59	<i>Chaetomium</i>	<i>A. Aureum</i>	99	KF245432.1
2L	9	<i>Aspergillus</i>	<i>A. Flavipes</i>	97	GU5662238.1
2L	14	<i>Aspergillus</i>	<i>A. Flavipes</i>	97	FR733808.1
2L ^o	28	<i>Aspergillus</i>	-	88	FR733808.1
2L ^o	53	Fungal endophyte	-	99	KF673666.1
3P	11	<i>Aspergillus</i>	-	96	JF817254.1
3P	19	<i>Mucor</i>	sp	96	KF158220.1
3P ^o	31	<i>Talaromyces</i>	<i>T. trachyspermus</i>	99	EU076917.1
3P	45	<i>Aspergillus</i>	<i>A. brasiliensis</i>	97	JQ316521.1
5iLP	33	<i>Fennellia</i>	-	95	FJ155814.1
5iLP	44	<i>Penicillium</i>	<i>P. citrinum</i>	97	KF414682.1
5iLP	59	<i>Aspergillus</i>	-	94	HQ219673.1
6iLF	12	<i>Penicillium</i>	-	89	HQ245157.1
7iPF	3	<i>Aspergillus</i>	<i>A.flavipes</i>	98	GU566238.1
7iPF	13	<i>Aspergillus</i>	<i>A.candidus</i>	99	HQ607958.1
7iPF	24	<i>Talaromyces</i>	-	96	AB872825.1
9iLPF	19	Uncultured	-	85	KC143754.1
		<i>Aspergillus</i>	-	96	KC007332.1
9iPLF	21	<i>Aspergillus</i>	-	96	KC007332.1
9iLPF	26	<i>Bionectria</i>	<i>B.ochroleuca</i>	99	JQ794833.1
9iLPF	30	<i>Aspergillus</i>	-	95	JX556221.1
9iLPF	32	<i>Paecilomyces</i>	<i>P. formosus</i>	99	FJ389927.1
10iLPF	25	<i>Aspergillus</i>	Sp	98	KC007332
10iLPF	40	<i>Aspergillus</i>	<i>A. Flavipes</i>	98	GU5662238.1
10iLPF	48	<i>Aspergillus</i>	<i>A.brasililensis</i>	98	JQ316521.1
10iLPF	55	<i>Aspergillus</i>	<i>A. Flavipes</i>	98	GU5662238.1
Pousio	32	<i>Aspergillus</i>	<i>A.brasililensis</i>	98	JQ316521.1
Pousio	41	<i>Aspergillus</i>	Sp	99	KC007332.1
Pousio	58	<i>Aspergillus</i>	<i>A.brasililensis</i>	98	JQ316521.1
Pousio	60	<i>Metarhizium</i>	<i>M. anisopliae</i>	99	AJ608970.1
Mata	28	<i>Penicillium</i>	Sp	98	JN565301.1

* 1F-Floresta; 2L-Lavoura; 3P-Pecuária; 4-iLP-Pecuária (2 primeiros anos); 5-iPL-Pecuária (2 primeiros anos); 6-iLF-Lavoura Floresta; 7-iPF-Pecuária Floresta; 8-iLFP-Lavoura Floresta (2 primeiros anos); 9-iPFL-Pecuária Floresta (2 primeiros anos); 10-iLPF-Lavoura Pecuária Floresta. ** Similaridade com a linhagem de referência, isolados antagonistas aos três fitopatógenos. Espécies identificadas com similaridade de 97%

As espécies obtidas nas amostras foram identificadas como pertencentes aos gêneros cultivados *Penicillium*, *Talaromyces*, *Eupenicillium*,

Trichoderma, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Acremonium*, *Clonostachys*, *Curvularia*, *Purpureocillium*, *Bionectria*, *Paecilomyces*, *Plectosphaella*, *Clonostachy*, *Mucor*, *Fennellia* e *Metarhizium*. As identificações possibilitaram também a afiliação de isolados obtidos a fungos não cultivados até o momento e fungos endofíticos.

Discussão

Ao longo de décadas, as regiões de transição do ecótono Cerrado/Amazônia foram ocupadas por explorações agrícolas de baixa tecnologia (Silva, 2012) e/ou sem sustentação ambiental, impactando de maneira gradual a diversidade biológica existente no solo (Teixeira, 2012). Aparentemente, a intensificação do uso da terra poder promover uma inversão desse quadro, uma vez que a diversificação de culturas pode influenciar a proliferação de microrganismos no solo.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que a intensificação do uso da terra, como por exemplo, uso de sistemas integrados de produção, favoreceu o aumento da quantidade de fungos presentes no solo em comparação com solos usados para monocultura de produção, principalmente no tocante ao componente florestal dentro do sistema. O aumento da quantidade de fungos no solo pode ser refletido em maior diversidade e gerar estabilidade do ecossistema e favorecimento de ciclagem de nutrientes (Tótola & Chaer, 2002; Mendes et al., 2009).

O maior número de fungos encontrados em sistemas integrados, do que em monocultivos pode ser pelo aspecto de maior complexidade ecológica nesses tratamentos. Segundo Moreira e Siqueira (2006), os exudatos de plantas podem interferir diretamente na composição da microbiota do solo. A

complexidade desses exudatos é proporcional à complexidade da cobertura vegetal na área. Os tratamentos de sistemas integrados são eficientes no aumento da quantidade de diversos fungos, mas com o mesmo potencial antagônico para todos os tratamentos aos fitopatógenos *Rhizoctonia* sp. *Fusarium* sp. e *Sclerotium rolfsii*. O antagonismo é a forma global que os fungos utilizam para competir com outros microrganismos no solo (Ownley e Windham, 2008). No presente trabalho, foram considerados antagônicos os fungos que apresentavam antibiose aos fitopatógenos, onde o antagonista inibe a ação do fitopatógeno pela produção de substâncias e antibióticos voláteis ou não voláteis. Os metabólitos com efeito fungicida difundido no meio de cultura são responsáveis pela inibição do crescimento do micélio, além de promover a desorganização de células e da lise de hifas de alguns fungos (AHMED et al., 2003).

A extração de DNA fúngico apenas pelo método de Rader e Broda (1985) foi ineficiente para alguns isolados fungicos e impossibilitando a amplificação por PCR mesmo em amostras que continham DNA quantificável. Para esses casos, se obteve sucesso apenas usando kits comerciais e também adequações da reação de PCR utilizada para fungos.

A diversidade fúngica cultivada de solos sob os diferentes modelos de produção estudados foi composta por *Eupenicillium shearii*, *Eupenicillium ochrosalmoneum*, *Talaromyces pupurogenus*, *Talaromyces tracyspermus*, *Trichoderma viride*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus niger*, *Chaetomium aureum*, *Chaetomium cupreum*, *Acremonium cellulolyticus*, *Clonostachys rosea*, *Penicillium citrium*, *Penicillium verruculosus*, *Penicillium pinophilum*, *Curvularia*

affinis, *Bionectria ochroleuca*, *Purpureocillium lilacinum*, *Plectosphaerella cucumerina*, *Fennellia nivea*, *Paecilomyces formosus*, *Metarhizium anisopliae*.

No entanto, ao confrontar os resultados, observou-se que o *Aspergillus flavipes*, Fungal endophyte, *Talaromyces trachyspermus*, *Clonostachys rosea* e outros seis isolados ainda não identificados apresentaram antagonismo aos três fitopatógenos, vale ressaltar que o fungo *Clonostachys rosea* já foi descrito como controlador de outros fitopatógenos como exemplo *Pythium aphanidermatum* (Corrêa, 2010) e o fungo denominado Fungal endophyte que foi descrito pela primeira vez como antagonista podendo ser alvo de futuras pesquisas. Ainda, pode ser observada a presença de fungos amplamente descritos como potenciais antagonistas a fitopatógenos. Os fungos *Trichoderma* sp., *Clonostachys* sp., *Curvularia* sp. e *Metarhizium* sp. por exemplo, são responsáveis pela produção de diferentes compostos antagonistas a fitopatógenos e tem sido utilizado no controle biológico de pragas agrícolas (Pérez, 2010; Teixeira, 2012; Vinale, 2013; Gao, 2013; Wang, 2013).

No presente trabalho foram observados fungos que produziram halos maiores do que 1.5 mm e que pode estar relacionado como potencial de liberação de metabólitos contra o fitopatógeno (Xiao, 2013).

Trichoderma sp. e *Gliocladium* sp. possuem atividade micoparasitária em fitopatógenos por produzirem enzimas, tais como quitinase, endoquitinase, glucanase, celulase e hemicelulase capazes de degradar materiais lignocelulolíticos e lisar a parede de células de fungos fitopatogênicos (Lahlali, 2010). Inclusive, alguns produtos a base de *Trichoderma* spp. tem sido comercializado para uso no controle biológico, como é o caso do Trichodel® (ECCB, 2013) e Trichodermil® (Itaforce, 2013).

Os fungos *Penicillium* sp., *Talaromyces* sp. e *Eupenicillium* sp. foram eficientes no antagonismo a *Rhizoctonia* sp. *Fusarium* sp. e *Sclerotium rolfsii*. Também possuem ação antibacteriana com a produção da penicilina (Veiga, 2013), aumentando assim, a gama de controle desses fungos e exemplificando a complexidade das interações entre microrganismos no solo. Nesse sentido, *Metarhizium* sp. e o *Paecilomyces* sp. têm sido descritos com potencial no biocontrole de outros organismos, os quais são descritos como controladores de insetos e de nematoides (Alves, 2013). Assim, é possível que sistemas de produção que favoreçam esses fungos sejam menos vulneráveis a ataques de doenças, insetos e nematoides. Diante desse cenário, a intensificação do uso da terra com sistemas integrados pode ser uma estratégia para favorecimento de fungos no solo e possível redução do uso de moléculas químicas que promovem degradação e efeitos residuais no meio ambiente (Santos, 2012).

No presente trabalho, também foram identificados fungos que além de possuírem potencial antagônico no controle dos fitopatógenos testados, são patógenos oportunistas de humanos e animais. Esses fungos são pertencentes aos gêneros *Purpureocillium* sp., *Chaetomium* sp., *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp. e *Fennellia* sp. (Laungsa-ard, 2011 e Soleiro, 2013) e devem ser estudados com cautela. Uma boa estratégia para estudos desses fungos é a busca de isolados não patogênicos que apresentem apenas a propriedade de ser controlador de fitopatógenos ou o uso como fornecedores de genes relacionados ao controle biológico.

Foi descrito pela primeira vez a interação entre fungos presentes no solo em sistemas integrados de produção e monoculturas com os fungos fitopatogênicos *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. e *Sclerotium rolfsii*. Ainda, este

trabalho pode direcionar estudos para outros fitopatógenos passíveis de ocorrência em culturas usadas em sistemas integrados de produção. Pois se os fungos benéficos presentes no solo dessas áreas oferecem características de proteção às plantas, esses poderiam aumentar a chance de sucesso das culturas quando cultivadas de forma integrada.

O uso de sistemas integrados favorece o aumento da densidade de fungos. As épocas de avaliação (seca e chuva) modulam o aumento da densidade de fungos no solo em sistemas integrados, monocultivo e mata nativa. A estratégia de estudos de fungos antagônicos possibilitou a identificação de diferentes gêneros com potencial de uso biotecnológico para a agricultura.

Referências

- AHMED, A.S.; EZZIYYANI, C.; SÁNCHEZ, C.P.; CANDELA, M.E. (2003) Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. *European Journal of Plant Pathology*, v.109, p.633-637.
- Alves R. T.; Bateman R P (2013) Evaluation of Formulation and Volume Application Rate on the Secondary Pick-Up of *Metarhizium acridum* (Driver & Milner) Bischoff, Rehner & Humber Conidia on *Schistocerca gregaria* (Forskål) (Orthoptera: Acrididae) BioAssay: 8:4.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.
- Alves T.S.A., Campos L L, Neto, N E, Matsuoka M, Loureiro M F (2011) Biomassa e Atividade Microbiana de Solo Sob Vegetação Nativa e Diferentes Sistemas de Manejos. *Acta Scientiarum Agronomy* 33, 341-347.
- Carvalho D.D.C., Mello S C M D, Lobo Junior M , Geraldine A M (2011). Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 46, 822–828.
- Cortinovis C., Pizzo F, Spicer L J & Caloni F (2013) *Fusarium* mycotoxins: Effects on reproductive function in domestic Animals – A review. *Theriogenology*, 80, 557–564.
- Corrêa L.E, Bettiol W., Morandi M.A.B (2010) Biological control of *Pythium aphanidermatum*. *Tropical Plant Pathology*. 35,7.
- FAO (Food and Agriculture Organization) of the United Nations, (2012). Agriculture and consumer protection department. Conservation agriculture, <http://www.fao.org/nr/cgrfa/cthemec/cgrfa-micro-organisms>.

Fernando, W. G. D., Nakkeeran S, Zhang Y; Savchuk S (2007). Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. Crop Protection. 26, 100–107.

Ferraz L. D. C. L., Nasser L C B ; Café F A.C (2011). Viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* e incidência de fungos antagonistas em solo de Cerrado. Summa Phytopathol. 37, 208–210.

Figueiredo M. B. (1967). Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. O Biológico, São Paulo, 33, 1, 9-13.

Gao J. X Liu T & Chean J (2013) Insertional mutagenesis and cloning of the gene required for the Biosynthesis of the Non-Host Specific Toxin in *Cochliobolus lunatus* that causes maize Leaf Spot.

Geraldine A. L., Lopes F A C, Carvalho D. D., Barbosa E T, Rodrigues A R, Brandão R S, Ulhoa C J ; Junior M L (2013) Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. Biological Control 67, 308–316.

GOUBA N., Raoult D. ; DRANCOURT M. (2013). Plant and Fungal diversity in gut microbiota as revealed by molecular and culture investigation, Plos One, 8.

Jones E. E., Stewart A; Whipps J. M. (2011) Water potential affects *Coniothyrium minitans* growth, germination and parasitism of *Sclerotinia sclerotiorum*. Fungal Biology. 115, 871–88.

Khot L. R., Sankaran S, Maja, Ehsani R. ; Schuster E. W. (2012) Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review. Crop Protection, 35, 64-70.

Lahlali R. ; Hijri M (2010) Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants FEMS Microbiology Letters 311: 152–159

Luang sa-ard J, Houbrake J, Doorn T, Hong S B, Borma A M, Hywel-Jone N L & Samson R A (2011). *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus* FEMS Microbiology Letters. 321: 141–149

Manohar C. S. ; Raghukumar C (2013). Fungal diversity from various marine habitats deduced through culture-independent studies. FEMS Microbiology Letters. 341,69–78.

Mariano, R.L.R. (1993) Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas. Revisão Anual de Patologia de Plantas. Passo Fundo, 1, 369-409.

Meireles B. B., Oliveira S. M. A., Coelho R S B ; Beserra J. C. A. (2009) Identification and genetic variability of *Colletotrichum* isolates causing anthracnose in inflorescence of ornamental tropical plants. Ciência Rural, vol.39.

Mendes I. C., Hungria M., Reis J., Fernandes M. F., Chaer G. M., Mercante, F.M. ; Zilli J E (2009) Bioindicadores para avaliação da qualidade dos solos tropicais: utopia ou realidade? Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 31.

Moreira F. M. S. & Siqueira J. O. (2006) Microbiologia e Bioquímica do solo, 2 Editora UFLA, 729.

Pérez-Silvera A E, Valdebenito-Sanhueza R M, Santos P ; Felippeto J (2010) Controle do mofo cinzento com *Clonostachys rosea* na produção de mudas de fúcsia, Tropical Plant Pathology 35, 3.

Raeder, U. e Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Letters in Applied Microbiology 1: 17-20.

Santos C. C., Oliveira F. A., Santos M. S., Talamini V., Ferreira J. M. S. & Santos F J (2012) Influência de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa*. Scientia Plena 8.

Silva J A R, Araújo A A, Lourenço J, SANTOS N, Garcia A R ; Nahúm B S (2012) Conforto térmico de búfalas em sistema silvipastoril na Amazônia Oriental. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 46, 1364-1371.

Silva A P, Babujia L C, Matsumoto L S, Guimarães M F ; Hungria M (2013) Microbial diversity under different soil tillage and crop rotation systems in an oxisol of southern Brazil Open Agricola. J. 7, p 40–47.

Soleiro C. A., Pena G. A., Cavaglieri I. R., Coelho I., Kelles L. M., Dalcero A. M., Rosa C. A. R. (2013). Typing clinical and animal environment *Aspergillus fumigatus* gliotoxin producer strains isolated from Brazil by PCR-RFLP markers Letters in Applied Microbiology 57, 484 – 491.

Souza R. C., Cantão M E, Vasconcelos A. T. R., Nogueira M. A. ; Hungria M. (2013) Soil metagenomics reveals differences under conventional and no-tillage with crop rotation or succession. Applied Soil Ecology. 72, 49– 61.

Stumpf R, Santos J, Gomes L B, Silva C N, Tessmann D J, Ferreira F D, Machinski M J ; Del E M (2013). *Fusarium* species and fumonisins associated with maize kernels produced in Rio Grande do Sul State for the 2008/09 and 2009/10 growing seasons. Brazilian Journal of Microbiology v 44, p 89-95.

Tamura K., Dudley J., Nei M. ; Kumar S. (2007) MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 Molecular Biology and Evolution 24: 1596-1599.

Teixeira H., Júnior T. J. P., Vieira R. F., Silva M. B., Ferro C. G. F. ; Lehner M S (2012) *Trichoderma* spp. decrease Fusarium root rot in common bean, Summa Phyto pathologica v 38 n4.

Tótola M. R.; Chaer G. M. (2002). Microorganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: Avarez,V.H.; Schaefer, C.E.G.R.; Barros, N.F.; Mello, J.W.V.; Costa, L.M. (Ed.) Tópicos em Ciência do Solo, v.2 Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 195-276.

Tonin R F B, Reis E M, Delli A L D (2013). Etiologia e quantificação dos agentes causais de manchas foliares na cultura do trigo nas safras 2008 a 2011. Summa Phytopathol 39, 2, 102-109.

Trencenti M C. ; Hass G. (2008) Integração lavoura-pecuária-silvicultura: boletim técnico / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília MAPA/SDC, 54.

Trichodel® (ECCB, 2013) disponível em: <http://www.eccb.com.br>.

Trichodermil® (Itaforte, 2013) disponível em: <http://www.itafortebioproductos.com.br>.

Veiga T., Solis-Escalante D., Romagnoli G., Pierick A. T., Hanemaaijer M., Deshmukh D., Wahl A., Pronk J. T., Daran J M (2013) Resolving Phenylalanine Metabolism Sheds light on natural synthesis of Penicillin G in *Penicillium chrysogenum*. Eukaryot Cell. 12, 151.

Vinale F., Nigro M., Sivasithamparam K, Flematti G, Ghisalberti & Lorito M (2013) Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*, *FEMS Microbiology Letters*. 347, 123 – 129.

Wang Y, Yang P, Cui F ; Le Kang (2013) Altered Immunity in Crowded Locust Reduced Fungal (*Metarhizium anisopliae*) Pathogenesis PLOS Pathogens. 9.

Xiao Y, Li H L, Li C, Wang J X, Li J, Wang M H, ; Ye Y H (2013) Anfifungal Screening of Endophytic Fungi from *Ginko biloba* for Discovery of Potent anti-phytopathogenic fungicides. Fems.

White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York.

Zilli J D, Pereira G M D, Júnior I F, Silva K; Hungria M, Rouws J R C (2013) Dinâmica de rizóbios em solo do cerrado de Roraima durante o período de estiagem. *Acta Amazonica*. [online] 43, 2, 153-160.

Zhang T, Zhang Y Q, Liu H Y, Wei Y Z, Li H L, Su J, Zhao L Z ; L Y Yu (2013) Institute of Medicin Diversity and cold adaptation of culturable endophytic fungi from bryophytes in the Fildes Region, KingGeorge Island, maritime Antarctica FEMS Microbiology Letters v 341 p 52–61.

Zeng W, Kirk W ; Hao J (2012) Field management of Sclerotiniastem rot of soybean using biological control agents. *Biological Control* v 60, p 141–147.