

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE AGRONOMIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
CIÊNCIA DO SOLO**

**TESE**

**Controle Biológico de Fitopatógenos de Solo por  
Meio de Isolados de Fungos do Gênero *Trichoderma*  
e sua Contribuição para o Crescimento de Plantas**

**Pedro Paulo Dias**

**2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
CIÊNCIA DO SOLO**

**CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS DE SOLO POR  
MEIO DE ISOLADOS DE FUNGOS DO GÊNERO *Trichoderma* E SUA  
CONTRIBUIÇÃO NO CRESCIMENTO DE PLANTAS**

**PEDRO PAULO DIAS**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Ricardo Luís Louro Berbara**

*e Co-orientação da Pesquisadora*  
**Maria do Carmo de Araújo Fernandes**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor em  
Ciências**, no Curso de Pós-Graduação  
em Agronomia, Área de Concentração  
em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2011

632.9

D541c

T

Dias, Pedro Paulo, 1963-.

Controle biológico de fitopatógenos de solo por meio de isolados de fungos do gênero *Trichoderma* e sua contribuição no crescimento de plantas/Pedro Paulo Dias - 2011.

101 f.: il.

Orientador: Ricardo Luís Louro Berbara.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia.

Bibliografia: f. 68-81.

1. Fungos fitopatogênicos - Controle biológico - Teses. 2. fungos do solo - Controle biológico - Teses. 3. *Trichoderma* - Teses. 4. Crescimento (Plantas) - Teses. I. Berbara, Ricardo Luís Louro, 1957-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO**

**PEDRO PAULO DIAS**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

TESE APROVADA EM 23/02/2011.

---

Ricardo Luís Louro Berbara. Ph.D. UFRRJ  
(Orientador)

---

Margarida Gorete Ferreira do Carmo. Dra. UFRRJ

---

Arison José Pereira. Dr. UNITINS

---

Sonia Regina de Souza. Dra. UFRRJ

---

Cristina Maria Castro. Dra. APTA

*A todos os injustiçados.*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A DEUS.

À minha família: meus pais José Gonçalves Dias (*in memoriam*) e Enedina da Conceição Dias; meus irmãos: Henrique Adalberto, Antônio José, José Luíz, Luiz Alberto, Francisco Luiz, Deolinda Maria, Maria Isabel, Sérgio Augusto, Carlos Henrique; sobrinhos: Wellington, Aline, Paulo Henrique, Ana Paula, Vanessa, Roberta, Marceli, Marcela, Max, Fabiana, Gabriel, Luís Cláudio e Raquel; sobrinhos-netos: Miguel Ângelo, Jeniffer, Beatriz, Júlia, Luiz Ottávio, Maria Eduarda, Maria Gabriela, João Gabriel, Tainá, Maria Eduarda, Mayara, Yasmin, Bernardo e quem está por vir.

Ao meu orientador prof. Ricardo L.L. Berbara.

À minha co-orientadora Maria do Carmo de Araújo Fernandes.

À UFRRJ por todo apoio ao desenvolvimento da tese.

A CAPES pela concessão da bolsa.

Ao CPGA-CS e por todos aqueles que “agiram” nos bastidores para a liberação da(s) bolsa(s) principalmente a Sra. Lúcia Helena Cunha dos Anjos e os Srs. Nelson Moura do Amaral Brasil e Marcos Gervasio Pereira.

Aos membros da banca examinadora: Dr. Arison José Pereira, Dra. Sonia Regina de Souza e Dra. Cristina Maria Castro.

À PESAGRO-RIO/EES e ao Lab. Biologia do solo pelo espaço físico para a realização dos meus experimentos.

À diretoria da Fazendinha km 47 pela coleta de amostras de terra.

Ao Prof. Luiz Aguiar pela identificação dos fitopatógenos.

Ao Dr. José Antonio Espíndola pelo apoio, carta de recomendação, etc.

Aos funcionários da secretaria do CPGA-CS: Marcos, Roberto, Luciene “lú”, Cristiane “cris”.

Aos funcionários de campo da PESAGRO-RIO/EES, especialmente os Srs. Evanil e Anilton, pela ajuda e pelo reconhecimento de uma das minhas virtudes: a garra.

Aos funcionários da PESAGRO-RIO/EES Luís Carlos, Elizabeth “beth” Morenz, “zézinho”, Mario, Sérgio Trabali pela ajuda nos experimentos.

Aos amigos Paulo Sérgio, Natália Zatorre, Thaís neto, sra. Luíza...sem comentários !!!

Ao pessoal do Laboratório de Biologia do solo.

Ao aluno de doutorado Sael Sánchez pela amizade e doação de sementes.

Ao Marcelo Castilho: uma pessoa com quem se pode contar.

À Dra. Vera Lúcia Divan Baldani e ao Dr. Alexander Silva de Resende da EMBRAPA-CNPAB pelos conselhos iniciais.

À Dra. Janaína Rouws da EMBRAPA- CNPAB e prof. Nelson Mazur pela ajuda na análise estatística.

À bibliotecária Dorimar da EMBRAPA- CNPAB.

Ao prof. Raul de Lucena.

Aos prof. Aldir Carvalho (*in memoriam*), Margarida Gorete e Everaldo Zonta.

Aos doutorandos/2007: Rosa Maria, Ana Maria, Valdemir, Carlos Bucher e Gabriela Alves pela amizade e as “batalhas” desses anos...

À Mariluci Sudo-Martelleto e Jéssica Martins.

Por todos aqueles que torceram (e torcem) por mim ...e...

... Para minha amiga...irmã... Maria do Carmo: “a Maria”, pela ajuda, amizade, companheirismo, ética nesses quase 20 anos de convivência.

## RESUMO GERAL

DIAS, Pedro Paulo. **Controle biológico de fitopatógenos de solo por meio de isolados de fungos do gênero *Trichoderma* e sua contribuição no crescimento de plantas.** 2011. 101f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

O presente trabalho teve como meta selecionar entre doze isolados de fungo do gênero *Trichoderma* spp. Aquele(s) com habilidade para biocontrole *in vivo* de *Sclerotium rolfii* Sacc., *Rhizoctonia solani* Kuhn. e *Fusarium oxysporum* Schlecht. f.sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder. (FOP), todos fungos de solo, em pimentão (*Capsicum* sp.) cultivar “Casca Dura Ikeda”, alface (*Lactuca sativa* L.) cultivar “Regina”, e feijão-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar “Alessa”, respectivamente, quanto à ocorrência de *damping-off* ou “tombamento” de mudas, e doenças vasculares (murchas). Além disso, foi avaliada a contribuição desses isolados no crescimento de plantas. Foram realizados três experimentos, o primeiro para seleção *in vitro* de isolado(s) de *Trichoderma* spp. com ação antagonista, usando o teste de pareamento, o teste da produção de metabólitos voláteis e o teste da produção de metabólitos não-voláteis, sendo mensurada a inibição do crescimento dos patógenos. O segundo experimento testou em casa-de-vegetação o controle biológico dos fitopatógenos usados através de aplicações, em substrato comercial, de inoculantes contendo cada um dos isolados de *Trichoderma* spp. selecionados *in vitro*. A concentração usada foi a de  $10^9$  conídios.ml<sup>-1</sup> de suspensão, e os patógenos nas densidades de inóculo que promoveram maior percentual da doença nas plantas hospedeiras. No último estudo foram avaliados os isolado(s) de *Trichoderma* spp. com ação promotora no crescimento das culturas através de inoculação em substrato convencional, mensurando as variáveis indicadoras de crescimento vegetal a partir da produção de biomassa. Nos experimentos em condições de laboratório o teste de pareamento indicou que a maioria dos isolados antagonistas foram eficientes na competição por espaço e nutrientes, quando comparados a *Sclerotium rolfii* e *Rhizoctonia solani*. Nestes se destacou o isolado T-12, que promoveu redução total do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, além de ser responsável pela queda do crescimento de *Sclerotium rolfii* em 54,9 % e de *Rhizoctonia solani* em 44,8 %, através da produção de metabólitos voláteis e não-voláteis. Com relação aos experimentos em casa-de-vegetação, no teste de controle biológico de fitopatógenos o isolado T-03 foi o mais eficaz no controle de *R. solani* em alface cultivar “Regina”. Não foi verificado efeito antagonista com os isolados de *Trichoderma* spp. sobre *S. rolfii* em pimentão cultivar “Casca Dura Ikeda”. O isolado T-06 reduziu o percentual de severidade de “murcha” provocada por FOP em plantas de feijão-vagem cultivar “Alessa”. No teste de contribuição do crescimento de plantas, observou-se efeito de sazonalidade entre alguns isolados de *Trichoderma* spp. Houve influência de isolados de *Trichoderma* spp. no crescimento nos estádios de muda e de comercialização da cultivar de alface comparada à testemunha. Para braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf) a contribuição dos isolados no crescimento foi incipiente com poucos isolados se destacando no aporte à produção de biomassa em situações pontuais.

**Palavras-chave:** Biocontrole de patógenos. Testes *in vitro*. Testes *in vivo*. Produção de biomassa.

## ABSTRACT

DIAS, Pedro Paulo. **Biological control of plant pathogens by soil fungi isolated from *Trichoderma* spp. and its role in plant growth.** 2011. 101p. Thesis (Doctor Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

This study aimed to select among twelve isolates of the fungus *Trichoderma* spp. one (s) with the ability for *in vivo* biocontrol of *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum f.sp. phaseoli* (FOP), all soil fungi, in pepper (*Capsicum* sp.) cultivar "Casca Dura Ikeda", lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivar "Regina", and beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar "Alessa", respectively, for occurrence of *damping-off* or *damping-off*, and vascular diseases (wilted). Furthermore, the contribution of these isolates in plant growth was evaluated. Three experiments were planned, the first to select *in vitro* isolate(s) of *Trichoderma* spp. with antagonist action, using the pairing test, the production of volatile metabolites, and production of non-volatile metabolites, measuring the growth inhibition of pathogens. A second experiment tested, under green-house conditions, the biological control of the used phytopathogens, with applications of inoculants in commercial substrate, each containing inoculums of *Trichoderma* spp. selected *in vitro*. The concentration used was of  $10^9$  conidia mL<sup>-1</sup> suspension, and the pathogens in the inoculums densities that promoted a higher percentage of disease on the host crops. The third study aimed to evaluate the isolate(s) of *Trichoderma* spp. with ability to promote crop growth, through conventional inoculation in substrate and measuring the variables indicative of plant growth based on biomass production. In the laboratory experiments the pairing test indicated that most of antagonistic isolates were efficient in competition for space and nutrients, when compared to *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. The isolated T-12 stood apart, by promoting total reduction of mycelia growth of *Rhizoctonia solani*, besides it was responsible for declining in the growth of *Sclerotium rolfsii* of 54.9%, and of 44.8% in *Rhizoctonia solani*, through production of volatile and nonvolatile metabolites. With respect to the green-house experiments, the biological control of plant pathogens, the isolate T-03 was the most effective in controlling *R. solani* in lettuce "Regina." There was no antagonist effect with the isolates of *Trichoderma* spp. on *S. rolfsii* for bell pepper cultivar "Casca Dura Ikeda". The isolate T-06 reduced the percentage of "wilt" severity caused by FOP in plants of pole beans cultivar "Alessa". In the test of plant growth contribution, there was an effect of seasonality among some isolates of *Trichoderma* spp. *Trichoderma* spp. influenced the growth of lettuce cultivar compared to control. In the *Brachiaria decumbens* Stapf, the growth contribution of isolates was incipient and only a few isolated stood apart contributing to biomass production and in specific conditions.

**Keywords:** Pathogens biocontrol. *In vitro* tests. *In vivo* tests. Biomass production.



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Percentagem de colonização (% C) e grau de antagonismo (G) de 12 isolados de <i>Trichoderma</i> em relação à <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> , obtida pelo teste de antagonismo ou pareamento de culturas fúngicas <i>in vitro</i> .....	19
<b>Tabela 2:</b> Percentagens de colonização (% C) e de redução do crescimento (% RC) de três patógenos ( <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> ) por 12 isolados de <i>Trichoderma</i> , obtida pelo teste da produção de metabólitos voláteis <i>in vitro</i> .....	22
<b>Tabela 3:</b> Médias dos diâmetros das colônias (em cm) e percentual de redução de crescimento (% RC) de três patógenos ( <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> ) por 12 isolados de <i>Trichoderma</i> , obtidas pelo teste de metabólitos não-voláteis <i>in vitro</i> .....	24
<b>Tabela 4:</b> Médias do percentual de germinação (% G) de escleródios de <i>Sclerotium rolfsii</i> e da redução da germinação em relação à testemunha (% RG) pela ação de metabólitos não-voláteis de 12 isolados de <i>Trichoderma</i> spp. ....	25
<b>Tabela 5:</b> Síntese dos testes <i>in vitro</i> mostrando os melhores isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em relação <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> ....	28
<b>Tabela 6:</b> Classificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. de acordo com o valor do percentual de redução de crescimento micelial de <i>Sclerotium rolfsii</i> .....	29
<b>Tabela 7:</b> Classificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. de acordo com o valor do percentual de redução de crescimento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> .....	29
<b>Tabela 8:</b> Classificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. de acordo com o valor do percentual de redução de crescimento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> .....	30
<b>Tabela 9:</b> Percentuais de “tombamento”, de emergência de plântulas, e de sementes não germinadas de alface cultivar “Regina” de acordo com as densidades de inóculo de <i>Rhizoctonia solani</i> testadas. ....	40
<b>Tabela 10:</b> Percentuais de “tombamento”, de emergência de plântulas, e de sementes não germinadas de pimentão “Casca Dura Ikeda” de acordo com as densidades de inóculo de <i>Sclerotium rolfsii</i> testadas. ....	41
<b>Tabela 11:</b> Valores dos percentuais de “tombamento” e de emergência de plântulas de alface cultivar “Regina” promovidas por <i>Rhizoctonia solani</i> , perante tratamento com isolados de <i>Trichoderma</i> , e da redução desses valores em relação ao determinado pelo patógeno (%RP).....	42

<b>Tabela 12:</b> Valores dos percentuais de “tombamento” e de emergência de plântulas de pimentão cultivar “Casca Dura Ikeda” promovidas por <i>Sclerotium rolfsii</i> (SR), perante tratamento com isolados de <i>Trichoderma</i> , e da redução desses valores em relação ao determinado pelo patógeno (% RP) .....	43
<b>Tabela 13:</b> Avaliação da severidade de “murcha” e do percentual de emergência de plantas de feijão-vagem cultivar “Alessa” submetidos a <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> (FOP) e utilizando isolados de <i>Trichoderma</i> como antagonistas, e da redução desses valores em relação ao determinado pelo patógeno (% RSD e % RE).....	44
<b>Tabela 14:</b> Valores do percentual de sementes não germinadas (% SÑG), massa fresca de folhas (MFF), média da massa fresca de folhas (XMFF), comprimento do caule (COMPC), massa fresca da parte aérea (MFPA) e do percentual de crescimento relativo (% Cr) de alface cultivar “Regina” aos 30 dias após a semeadura. ....	54
<b>Tabela 15.</b> Valores da massa seca de caule (MSC), média da massa fresca da parte aérea (XMFPFA), comprimento de raiz (COMPR), média do comprimento de raiz (XCOMPR), massa seca de raiz (MSR) e do percentual de crescimento relativo (% Cr) de alface cultivar “Regina” aos 30 dias após a semeadura.....	55
<b>Tabela 16.</b> Valores da média de massa seca de raiz (XMSR), total das médias da massa fresca da planta (TXMFpl), total das médias da massa seca da planta (TXMSpl), relação parte aérea/raiz (PA/RAIZ) e do percentual de crescimento relativo (% Cr) de alface cultivar “Regina” aos 30 dias após a semeadura.....	56
<b>Tabela 17.</b> Valores da massa fresca de folhas (MFF), média da massa fresca de folhas (XMFF), média da massa seca de folhas (XMSF), comprimento do caule (COMPC), massa fresca do caule (MFC) e do percentual de crescimento relativo (% Cr) de alface cultivar “Regina” aos 35 dias após a semeadura.....	58
<b>Tabela 18.</b> Valores da massa seca de caule (MAC), massa fresca da parte aérea (MFPA), média da massa fresca da parte aérea (XMFPFA), massa seca da parte aérea (MSPA) e do percentual de crescimento relativo (% Cr) de alface cultivar “Regina” aos 35 dias após a semeadura.....	59
<b>Tabela 19.</b> Valores da média da massa seca da parte aérea (XMSPA), massa fresca de raiz (MFR), massa seca de raiz (MSR) e do percentual de crescimento relativo (% Cr) de alface cultivar “Regina” aos 35 dias após a semeadura .....	61
<b>Tabela 20.</b> Valores de comprimento de raiz (COMPR), total de massa fresca da planta (TMFpl), média do total das médias de massa fresca da planta (TXMFpl) e do percentual de crescimento relativo (% Cr) de alface cultivar “Regina” aos 35 dias após a semeadura.....	62
<b>Tabela 21.</b> Valores do total de massa seca de planta (TMSpl), total da média de massa seca de planta (TXMpl), relação parte aérea/raiz e do percentual de crescimento relativo (% Cr) de alface cultivar “Regina” aos 35 dias após a semeadura. ....	63
<b>Tabela 22.</b> Valores da massa fresca de raiz (MFR), massa seca de raiz (MSR), relação parte aérea/raiz (PA/RAIZ) e do percentual de crescimento relativo (% Cr) em plantas de braquiária da espécie <i>B. decumbens</i> .....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** A seta mostra esporulação abundante do isolado de *Trichoderma* spp. T-08 sobre a colônia de *Sclerotium rolfii*. ..... 18
- Figura 2:** Produção prematura de escleródios de *Sclerotium rolfii* diante da colonização de seu micélio pelo isolado de *Trichoderma* spp. T-12. .... 20
- Figura 3:** Aspecto final da montagem do teste de produção de metabólitos voláteis. Na tampa se coloca o patógeno, no caso um disco de micélio de *Rhizoctonia solani*, e no fundo da placa um outro disco contendo propágulos do antagonista. .... 23
- Figura 4:** Efeito de compostos não-voláteis no crescimento da colônia de *Rhizoctonia solani*. Na placa à esquerda o tratamento testemunha e na placa à direita meio de cultura com metabólitos do isolado T-12. .... 26

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REVISÃO DE LITERATURA .....	3
1.1. Principais Gêneros de Fungos Fitopatogênicos de Solo.....	3
1.2. Controle Biológico de Microrganismos e Principais Fungos Utilizados como Agentes de Biocontrole .....	3
1.3. Mecanismos de Ação de Agentes de Controle Biológico .....	4
1.4. Fungos do Gênero <i>Trichoderma</i> spp. como Produtores de Compostos Reguladores do Crescimento de Plantas.....	7
1.5. Testes Preliminares <i>in vivo</i> e Metodologias de Quantificação de Doenças de Plantas .....	10
2. CAPÍTULO I IDENTIFICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE ISOLADOS DE <i>Trichoderma</i> spp. COM POTENCIAL PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS DE SOLO .....	11
2.1. RESUMO .....	12
2.2. ABSTRACT .....	13
2.3. INTRODUÇÃO.....	14
2.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.4.1. Localização da Área de Estudo .....	15
2.4.2. Teste de Antagonismo (Pareamento).....	15
2.4.3. Produção de Metabólitos Voláteis.....	16
2.4.4. Produção de Metabólitos Não-Voláteis.....	16
2.4.5. Inibição de Germinação de Escleródios de <i>Sclerotium rolfii</i> .....	16
2.4.6. Análise Estatística .....	17
2.4.7. Percentual de Redução do Crescimento Micelial do Patógeno (% RC).....	17
2.4.8. Frequência Total nas Variáveis Testadas (FTVT).....	17
2.4.9. Seleção dos Isolados para o Teste de Controle Biológico.....	17
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	18
3.3.1. Teste de Antagonismo (Pareamento).....	18
3.3.2. Teste da Produção de Metabólitos Voláteis .....	21
3.3.3. Teste da Produção de Metabólitos Não-voláteis .....	23
3.3.4. Frequência Total nas Variáveis Testadas (FTVT).....	27
3.4. CONCLUSÕES .....	31
4. CAPÍTULO II AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DE ISOLADOS DE <i>Trichoderma</i> spp. COMO AGENTES DE BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS DE SOLO.....	32
4.1. RESUMO .....	33
4.2. ABSTRACT .....	34
4.3. INTRODUÇÃO.....	35
4.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.4.1. Localização da Área de Estudo .....	37
4.4.2. Teste para Determinação da Densidade de Inóculo.....	37
4.4.3. Testes de Biocontrole de Fitopatógenos.....	38

4.4.4. Delineamento Experimental .....	39
4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
4.5.1. Testes para Determinação das Densidades de Inóculo.....	40
4.5.2. Testes de Controle Biológico de Patógenos .....	41
4.4. CONCLUSÕES .....	45
5. CAPÍTULO III: CONTRIBUIÇÃO DE ISOLADOS DE FUNGOS DO GÊNERO <i>Trichoderma</i> spp. PARA O CRESCIMENTO DE PLANTAS.....	46
5.1. RESUMO .....	47
5.2. ABSTRACT .....	48
5.3. INTRODUÇÃO.....	49
5.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
5.2.1. Localização da Área de Estudo .....	50
5.2.2. Testes para a Verificação da Ocorrência de Contribuição de <i>Trichoderma</i> spp. no Crescimento de Plantas.....	50
5.2.3. Delineamento Experimental .....	51
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	52
5.4. CONCLUSÕES .....	66
6. CONCLUSÕES GERAIS .....	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68
8. ANEXOS .....	82

## INTRODUÇÃO GERAL

O Estado do Rio de Janeiro tem na horticultura a sua principal atividade agrícola. Porém, diversos problemas, principalmente pela ocorrência de fitopatógenos habituais do solo, vêm se tornando fator limitante à produção tanto de mudas quanto na área de cultivo. Dentro desse grupo de microrganismos se incluem fungos das espécies *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* e *Sclerotium rolfsii* que promovem doenças em uma gama de plantas cultivadas (KIMATI et al. 1995-1997).

Existem várias formas de controle desses microrganismos, todos com suas vantagens, desvantagens e limitações. Entre os quais o controle cultural, que inclui a rotação de culturas (PATRÍCIO, 2007; TOLÊDO-SOUZA, 2009; REIS e FORCELINI, 1995) e a incorporação de matéria orgânica no solo (AMBRÓSIO et al., 2008; REIS e FORCELINI, 1995).

O controle baseado na termoterapia ou na energia solar são amplamente utilizados e, por muitas vezes, alcançam os resultados desejados (GHINI e BETTIOL, 2000). Entretanto, o controle químico, através do uso de agrotóxicos é o mais utilizado. De acordo com KIMATI (1995), este tipo de controle, em situações pontuais, é imprescindível para alcançar uma maior produtividade associada a uma boa qualidade do produto comercial, e termina por ser um item obrigatório dentro do planejamento do plantio comercial de determinadas culturas. Em contrapartida o autor relata que tais produtos podem persistir no ambiente por um longo período de tempo acarretando problemas para o ambiente e os seres vivos.

Os defensivos agrícolas para o controle de fitopatógenos na maioria das vezes têm preços proibitivos, além de serem agressivos aos seres vivos, e tem sua eficiência reduzida com o tempo devido à capacidade de microrganismos patogênicos de adquirirem resistência a esses produtos entre outras limitações. Porém o uso de agentes microbianos antagonistas a fitopatógenos, vem se tornando uma prática de manejo alternativa interessante por ser relativamente simples, limpa e pouco onerosa quando comparada ao controle químico. Neste panorama, espécies de fungos principalmente do gênero *Trichoderma* Persoon ex Fries, por apresentarem determinados predicados como eficientes competidores por espaço e nutrientes (HARMAN, 2006; HARMAN et al., 2004; BENITEZ et al., 2004; MARTINS-CORDER e MELO, 1998), produtores de compostos antifúngicos (ALMEIDA, 2009; ETHUR et al., 2007; HOWELL, 2003; MELO, 1996), vêm sendo utilizadas com sucesso e são a base de vários produtos comerciais voltados para o controle biológico de fitopatógenos de solo, por exemplo, Biotrich<sup>®</sup>, Trichodel<sup>®</sup>, Triconen<sup>®</sup>, Ecotrich<sup>®</sup>, Agrotrich<sup>®</sup>.

Uma outra qualidade de determinadas espécies do gênero *Trichoderma* é a capacidade de promover o crescimento de plantas como resultado da síntese de substâncias estimuladoras do crescimento dessas e aumento na disponibilidade e estímulo na absorção de elementos nutricionais presentes no solo, entre outras (AVIS et al., 2008; BAKER, 1989).

Os testes *in vitro* têm sua importância na seleção de microrganismos com potencial antagonístico caracterizado pela visualização de efeitos destrutivos causados por esses no crescimento e desenvolvimento de fitopatógenos, embora frequentemente não exista estreita correlação quando comparando a ação do suposto antagonista em meio de cultura e em condições de campo (ANDREWS, 1985).

Uma das maneiras de se testar agentes antagonistas a fitopatógenos habitantes do solo, é o tratamento de solo onde é feita a introdução ou inoculação dos primeiros no substrato de plantio por um período necessário para que através dos seus mecanismos de ação, exerçam sua atividade deletéria aos patógenos (BETTIOL e GHINI, 1995).

Nesta tese, partiu-se da hipótese que determinadas espécies de fungos como do gênero *Trichoderma*, têm efeito supressor da atividade de patógenos de solo bem como contribuir para o crescimento e desenvolvimento vegetal.

Assim, os objetivos desse trabalho foram isolar e identificar fungos do gênero *Trichoderma* promissores no controle biológico de patógenos do solo *in vitro*; avaliar em condições de casa-de-vegetação, a eficiência dos isolados em reduzir infecções em algumas culturas anuais, causadas por fungos de solo como *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* e, verificar, nessas condições, a ação dos isolados de *Trichoderma* spp. selecionados quanto à promoção do crescimento de plantas.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. Principais Gêneros de Fungos Fitopatogênicos de Solo

Segundo BUENO e FISCHER (2007), vários patógenos atingem a maioria das culturas de importância econômica, entre estes muitos estão presentes no solo. Os autores reportam fitopatógenos específicos em promover danos a órgãos de reserva (sementes, frutos, etc.), no caule, nas raízes, no sistema vascular, assim como o “tombamento” de plântulas ou podridão de colo de plantas adultas, levando à sua morte, repercutindo em prejuízos financeiros para o produtor e com reflexo no preço final dos produtos.

Entre os fungos fitopatogênicos que tem o solo como seu habitat, estão espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Verticillium*. Entre as bactérias as mais comuns são *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. No grupo dos nematóides se destacam espécies do gênero *Aphelenchoides*, *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Heterodera*, *Globodera*, *Rotylenchulus*, *Radopholus*.

### 1.2. Controle Biológico de Microrganismos e Principais Fungos Utilizados como Agentes de Biocontrole

Para BETTIOL (1991a) o controle biológico ou biocontrole de microrganismos é simplesmente o controle de um microrganismo através de outro microrganismo. Um conceito mais amplo é o de COOK E BAKER (1983), citado pelo autor, que reportaram como “a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem”.

Um dos exemplos clássicos do uso de fungos antagonistas contra patógenos de solo é o experimento pioneiro de WEINDLING e FAWCETT (1936) citado por LIMA et al. (2000) que trabalharam com o fungo *Trichoderma* sp. no controle de doenças em citros provocadas por *Rhizoctonia solani*, obra esta que alavancou as pesquisas voltadas para o isolamento de cepas de fungos eficientes no controle de doenças fungicas em plantas.

Entre os principais fungos utilizados como agente de biocontrole se destacam *Trichoderma* spp., *Gliocladium roseum*, *Gliocladium virens*, *Talaromyces flavus*, *Pythium oligandrum*, *Sporidesmium sclerotivorum* e *Ampelomyces quisqualis*. Todavia, os mais importantes são os do gênero *Trichoderma* por serem antagonistas eficazes de uma ampla faixa de fungos fitopatogênicos, como, por exemplo, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* spp. e *Pythium* spp. (MELO, 1998), devido a algumas peculiaridades como a competição por espaço, nutrientes e oxigênio com determinados patógenos (HARMAN, 2006; HARMAN et al., 2004); BENITEZ et al., 2004; MARTINS-CORDER e MELO, 1998), na produção de metabólitos voláteis e não voláteis (antibióticos) (ALMEIDA, 2009; ETHUR et al., 2007; MELO, 1996; HOWELL, 2003a), pelo hiperparasitismo (MAY et al., 2002; CARVALHO et al., 2008; BRITO et al., 2010; MARTINS-CORDER e MELO, 1998; MELO e FAULL, 2000) entre outros atributos que serão detalhados mais adiante.

Uma outra propriedade importante de algumas espécies de *Trichoderma* é a de atuar também sobre fungos que produzem estruturas de resistência difíceis de serem atacadas por microrganismos. Dentro do gênero, a espécie *T. harzianum* é a mais pesquisada com a finalidade do seu uso como agente de biocontrole, mas existem outras espécies que exercem a mesma função como, por exemplo, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* e *T. pseudokoningii* (MELO, 1998).



Algumas espécies de *Trichoderma* foram aplicadas isoladamente ou associados com *Gliocladium virens* Miller, Giddens e Foster (YAQUB e SHAHZAD, 2008; LARKIN e FRAVEL, 1998; LEWIS et al., 1998) bactérias do gênero *Bacillus* spp. (AHMED et al. 2003) e no controle integrado de doenças junto com fungicidas (MEDEIROS et al. 2006; CASSIOLATO et al., 1997; GHINI, 1991) visando o biocontrole de fitopatógenos.

Nesse último, pensando em um programa de controle integrado, MEDEIROS et al. (2006) utilizando um composto fungicida (tiazolidina-2,4-diona) em conjunto com *Trichoderma* sp. na forma de produto comercial, no controle de *Monosporascus cannonballus*, que promove o ‘Colapso do meloeiro’, conseguiram êxito também com tal tratamento, e foi verificado que o produto sintético não afetou negativamente o desenvolvimento de *Trichoderma* sp. demonstrando seu efeito como fungicida apenas ao patógeno estudado, em condições de laboratório.

BRAGA et al. (2003) observaram que sementes de feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) tratadas com *T. harzianum* conseguiram transmitir *Macrophomina phaseolina*, agente causal da ‘Podridão cinzenta’ do caule do feijoeiro, para plântulas em solo previamente autoclavado. Resultado que se assemelhou ao tratamento de sementes da cultura com benomil e tiofanato metílico.

Em um experimento *in vivo*, voltado para o controle de *damping-off* em feijão (*Phaseolus vulgaris*) cultivar “Giza 3”, através do tratamento do substrato pré-infectado com *R. solani*, utilizando uma formulação constituída de três isolados de *Trichoderma* sp. em três intervalos de tempo distintos entre a inoculação do formulado ao substrato e a semeadura, NASHWA et al. (2008), notaram redução considerável da percentagem de “tombamento” de pré e pós emergência no feijoeiro, quando comparado com a testemunha, em todas as três situações. Todavia, a aplicação da formulação com o isolado Th 1 ao mesmo tempo em que a realização da semeadura foi a que promoveu uma maior redução da incidência da doença.

Em um trabalho envolvendo *Trichoderma* sp., *Pseudomonas fluorescens* e *Entrophospora colombiana* (uma endomicorriza) utilizados de forma impar ou em combinação, voltados para o controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* agente causal da “murcha” em feijão da cultivar “ICA Tuncama”, AVENDAÑO e RONDON (2006) detectaram que *Trichoderma* sp., sozinho, foi o tratamento que apresentou, entre as combinações, melhor proteção das plantas, embora não convincente.

Espécies de *Trichoderma* têm sido reportadas na produção de enzimas quitinolíticas que possuem atividade deletéria a *Fusarium* spp. (MELO, 1996) e *Rhizoctonia solani* (HARMAN, 2000). Além disso, espécies de *Trichoderma* podem prejudicar a viabilidade de escleródio de *Rhizoctonia solani* (MAFIA et al. 2003).

### 1.3. Mecanismos de Ação de Agentes de Controle Biológico

De acordo com LIMA et al. (2000), o controle biológico é fundamentado nas interações antagônicas que ocorrem entre as espécies. Todavia os mecanismos envolvidos nesta interação ainda não foram compreendidos. As interações mais estudadas e melhor caracterizadas são aquelas que envolvem fungos fitopatogênicos e seus antagonistas (CHET, 1992; HARAN et al., 1996). Segundo estes e outros autores, o fungo agente de biocontrole interfere na vida do fitopatógeno por diversos mecanismos de ação como a competição por espaço e nutrientes, a antibiose, o micoparasitismo, a predação, a indução de resistência, entre outros, cujas descrições seguem abaixo.

- **Competição:** representada pela luta para aquisição de espaço físico, nutrientes, microelementos, água e luz. Parece evidente que esta estratégia engloba várias outras.

ROBBS (1992) indicou que a competição por alimentos e a antibiose, são os mecanismos mais frequentemente utilizados por agentes de biocontrole.

BARBOSA e MEZA (2009) classificaram os isolados de *T. harzianum* utilizados em um experimento, como competentes na luta por nutrientes e espaço por apresentarem maior velocidade de crescimento.

- **Antibiose:** quando o antagonista inibe a ação do fitopatógeno pela produção de substâncias e antibióticos voláteis ou não voláteis.

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). *Trichoderma harzianum* promoveu a inibição do crescimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae* *in vitro*, por intermédio de mecanismos específicos como a difusão e produção de metabólitos voláteis e não-voláteis (ex: pirones, isocianatos, pépticos e trichocinas) e substâncias com propriedades inibitórias a fitopatógenos (HOWELL, 2003).

Em seu trabalho MICHEREFF et al. (1993) detectaram controle do crescimento de *Colletotrichum graminicola* por espécies de *Trichoderma*, através de metabólitos extracelulares, não-voláteis, termoestáveis, difusíveis em meio de cultura, onde a espécie *T. pseudokoningii* demonstrou maior inibição do fitopatógeno testado. O aumento da inibição do crescimento de *C.graminicola* foi diretamente proporcional ao tempo de exposição de *Trichoderma* no papel celofane.

- **Micoparasitismo:** envolve antibiose e canibalismo provocados pela ação de enzimas hidrolíticas, como quitinases, glucanases, proteases e lipases, que provocam a morte de um deles que, assim, servem de alimento para o sobrevivente. Espécies de *Trichoderma* têm sido consideradas na produção de enzimas quitinolíticas que possuem atividade deletéria em *Fusarium* spp. (MELO, 1996) e *Rhizoctonia solani* (HARMAN, 2000). Além disso, *Trichoderma* spp. podem prejudicar a viabilidade de escleródio de *Rhizoctonia solani* (MAFIA et al. 2003).

Os hiperparasitas atacam hifas e estruturas de reprodução e sobrevivência do fitopatógeno resultando com isso a redução da infecção e do inóculo deste último (BETTIOL, 1991a).

Conforme VAN DEN BOOGERT (1999), existem dois grupos de fungos envolvidos no processo de micoparasitismo. Os fungos micoparasitas biotróficos são aqueles que adsorvem nutrientes de células vivas. Já os fungos micoparasitas necrotróficos deletam células das plantas hospedeiras, muitas das vezes utilizando os detritos resultantes para a sua nutrição. Porém, na natureza, ambos são dependentes do micoparasitismo para o seu crescimento e desenvolvimento sendo classificados como micoparasitas obrigatórios ecologicamente (EOMs)(WHIPS, 1991). Por outro lado, micoparasitas facultativos ecologicamente (EFMs), têm uma fase inicial saprofítica no seu ciclo de vida, lançando mão de antibiose além do micoparasitismo como ferramentas para a competição com outros organismos (VAN DEN BOOGERT, 1999).

De acordo com o autor, o controle biológico por EFMs depende parcialmente da aptidão intrínseca desses de obter compostos nutricionais da planta hospedeira e da capacidade competitiva com outros microrganismos por esses nutrientes. Encontram-se nesse grupo, os agentes de biocontrole dos gêneros *Trichoderma* e *Gliocladium* (PAPAVIZAS, 1985).

Por outro lado, EOMs têm sua eficiência no controle biológico dependente de sua habilidade de obter nutrientes das células do hospedeiro e, caracteristicamente, não são bons competidores em comparação com EFMs (VAN DEN BOOGERT, 1999).

Como exemplo de EOMs, VAN DEN BOOGERT (1989), cita *Verticillium biguttatum* W. Gams, que têm como hospedeiro específico *Rhizoctonia solani*, necessitando de biotina, e ainda a sua ineficácia em colonizar caule e raiz na ausência do micélio vivo do hospedeiro.

O autor observou que durante o micoparasitismo de *R. solani* a nível celular, a existência de uma interação entre micoparasita-hospedeiro, onde ocorre o crescimento direcionado às hifas do hospedeiro, sob ação de um gradiente nutricional. Na sequência, ocorrem reconhecimento e ligação em um local específico presente na parede celular do hospedeiro e desenvolvimento de uma estrutura no micoparasita semelhante a um apressório ao redor das hifas do hospedeiro, e destruição do citoplasma e morte da célula desse último.

Existe seletividade de determinados isolados de *Trichoderma* spp. a fitopatógenos. Isso é devido a fatores como reconhecimento inicial que desencadeiam reações inerentes ao micoparasitismo como a secreção de enzimas líticas. Foi observado em um estudo voltado para a determinação do mecanismo de ação de *Trichoderma* spp. utilizados no biocontrole de *Rhizoctonia* spp. e *Sclerotium* spp., a existência de uma interação inicial entre antagonista-patógeno mediado por lecitinas durante o processo de reconhecimento. Em seguida, houve liberação de várias enzimas quitinolíticas, celulolíticas, glucanolíticas e proteolíticas (CARSOLIO et al., 1999; EL KATATNY et al., 2001; INBAR et al., 1996). São enzimas que degradam estruturas do fitopatógeno utilizando os detritos resultantes dessa lise para a sua nutrição (GOLDMAN et al., 1994).

HOYOS-CARVAJAL et al. (2008) reportaram que na interação *Trichoderma*-planta-patógeno, a existência de uma mediação direta do antagonista sobre a planta protegendo esta da ação do patógeno. HOWELL (2006) descreve alguns mecanismos pelos quais o algodoeiro consegue repelir o patógeno. Sobre o processo, HANSON e HOWELL (2004) determinaram que *Trichoderma* spp. atua como modulador ou estimulador de alguma resposta da planta, como a produção de terpenóides, um metabólito secundário responsável pela proteção de plantas, elicitada por *T. virens* e com ação inibitória sobre *R. solani*.

Para ZHANG et al. (2000) e ZHANG e YUEN (2000), muitos dos microrganismos utilizados no controle biológico de fitopatógenos, são produtores de enzimas chamadas quitinases, o que os qualifica para essa técnica de controle de doenças, sendo dessa forma classificados como microrganismos quitinolíticos. São microrganismos que apresentam habilidade de intervir, de alguma forma, no crescimento de fungos que apresentam na sua estrutura a quitina (DE BOER et al., 1999).

Algumas espécies de *Trichoderma* spp. já foram comprovadas como potentes produtores de enzimas quitinolíticas contra *Fusarium* spp. (CHÉRIF e BENHAMOU, 1990; LORITO et al., 1993).

LIMON et al. (1999), REY et al. (2001), BESOAIN et al. (2007) e PÉREZ et al. (2007) apontam a existência de isolados mutantes de *Trichoderma* spp. com alta atividade de suas enzimas degradativas do que seus parentais selvagens.

Isolados mutantes de *T. harzianum* mostraram eficácia no controle biológico de *R. solani* causador da podridão de raiz na cultura do tomate, através da produção de endoquitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases (PÉREZ et al., 2007). Além de quitinases, *T. harzianum* tem a propriedade de produzir outras enzimas extracelulares como peptinases, glucanases e cutinases (DURAN et al., 2003).

Em um experimento *in vivo*, AHMED et al. (2003), comprovaram que a adição de quitina em associação com *Bacillus* spp. e *Trichoderma harzianum*, atenuou esses, acarretando na diminuição da severidade de podridão de raiz na cultura da pimenta, provocada tanto por *R. Solani* quanto *Phytophthora capsicii*.

Segundo BENÍTEZ et al. (2004), ocorre sinergismo entre enzimas líticas, e dessas com metabólitos produzidos por *Trichoderma* spp. Um exemplo é a inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia meloni* pela combinação de uma quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase, do que quando utilizadas isoladamente.

- **Predação:** quando determinado antagonista obtém seu alimento dos fitopatógenos e de outras fontes (BETTIOL, 1991a).
- **Hipovirulência:** consiste na introdução de uma linhagem do patógeno menos agressiva ou avirulenta que pode transmitir estas características para o fitopatógeno (BETTIOL, 1991a). De acordo com SNEH (1999) é possível o biocontrole de determinados fitopatógenos com o emprego de cepas desses quando avirulentos ou hipovirulentos. A estratégia de ação do patógeno avirulento é competir pelo mesmo sítio infectivo do patógeno virulento e, dessa forma, proteger plantas contra doenças deste último.
- **Indução de resistência:** mecanismo de interação que consiste na ação de um indutor no metabolismo da planta hospedeira, alterando-a de tal maneira que esta adquire resistência a determinados patógenos (MORAES, 1991). Segundo HARMAN et al. (2004), a indução de resistência por *Trichoderma* spp. incrementa a expressão de genes relacionados com a defesa da planta e é similar ao processo de resistência adquirida.
- **Supressividade de solos:** uma grande diversidade de microrganismos foi encontrada em solos onde houve decréscimo de doenças provocadas por *Rhizoctonia* quando em comparação com solos onde a ocorrência de doenças provocadas por esse era significativa (HYAKUMACHI, 1999). Segundo CHET e BAKER (1981), diversas espécies de *Trichoderma* spp. atuam como promotores de supressividade de doenças provocadas por *Rhizoctonia solani*.

Conforme HOITINK et al. (2006), nutrientes presentes na matéria orgânica (ex: carboidratos, quitina, lipídios) influenciam alguns dos modos de ação de *Trichoderma* spp. Como consequência, refletindo na sua capacidade supressora a fitopatógenos (DANIELSON e DAVEY, 1973).

A supressividade de um solo é influenciada diretamente ao sistema de produção empregado, conforme relato de LIU et al. (2008) que detectaram que em solos expostos ao sistema orgânico de produção, se mostrou mais supressivo a *Sclerotium rolfsii* do que solos submetidos ao manejo convencional, como resultado da maior diversidade de microrganismos presentes em solos utilizados para o cultivo orgânico, quando comparada à quantidade de estruturas propagativas de *Trichoderma* spp.

Conforme BETTIOL (1991b), um agente de biocontrole pode atuar utilizando um ou mais mecanismos de interação antagonica, entretanto aquele que apresentar mais mecanismos tem maior chance de êxito no controle biológico de um patógeno.

Assim sendo, o uso de agentes de biocontrole de doenças de plantas é uma importante área da pesquisa voltada para o combate a fitopatógenos, seja pela seleção de organismos antagonistas com elevado potencial de controle; usado diretamente sobre o patógeno; na indução de mutantes e na manipulação genética (PAPAVIZAS et al., 1982 citados por CASSIOLATO et al., 1996).

#### **1.4. Fungos do Gênero *Trichoderma* spp. como Produtores de Compostos Reguladores do Crescimento de Plantas**

Na rizosfera existem microrganismos capazes de produzir vitaminas, auxinas, giberelinas e compostos similares, além de enzimas estimuladoras do crescimento (SIQUEIRA e FRANCO, 1988), entre estes organismos, fungos do gênero *Trichoderma* que estão também envolvidos no controle biológico de fitopatógenos presentes neste ambiente.

Muitos trabalhos relatam a importância de isolados de *Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole de uma gama considerável de fitopatógenos encontrados no solo. Todavia, outra propriedade muito estudada é a relação de isolados de *Trichoderma* spp. com a melhoria do percentual germinativo e do crescimento de algumas culturas (BAKER, 1987).

Trabalhos voltados para estudar esta relação como o de CHANG et al. (1986) e WINDHAM et al. (1986) resultaram na observação de aumento de peso de matéria seca, do florescimento precoce e maior crescimento e rendimento de frutos.

Tem sido verificado, em condições de campo, que a aplicação do fungo antagonista *Trichoderma* spp. no substrato das mudas resulta em maior desenvolvimento da raiz pivotante e de radículas, maior enfolhamento da parte aérea das mudas, com coloração verde mais intensa das folhas (PRATES et al., 2006). RESENDE et al. (2004) constataram que a aplicação de *Trichoderma harzianum* em sementes de milho promoveu maior acúmulo de matéria seca das raízes das plantas com persistência do fungo nas raízes das plantas originadas de sementes inoculadas, independente do tratamento fungicida aplicado a estas.

Utilizando um isolado de *Trichoderma harzianum* (T-22), HARMAN e BJÖRKMAN (1998) e HARMAN (2000), constataram a colonização por hifas e não esporos do fungo, em pêlos radiculares de plantas jovens de milho. HARMAN (2000) acrescenta que T-22 tem a habilidade de se estabelecer e persistir no sistema radicular até o final do ciclo de uma cultura anual.

Sementes de feijão caupi tratadas com *Trichoderma harzianum*, geraram plantas mais alta com taxa de crescimento maior do que a testemunha (BRAGA et al., 2003).

KLEIFELD e CHET (1992) verificaram que na ausência de patógenos, a espécie *Trichoderma harzianum* provocou aumento da porcentagem de germinação de sementes de pimenta, da emergência de plântulas de tomate, pimenta, feijão, rabanete e pepino, comprimento de plantas e de área foliar na cultura da pimenta, e no peso de matéria seca de pepino.

Segundo DATNOFF e PERNEZNY (2001), a espécie *Trichoderma harzianum* afetou o crescimento de plântulas de tomate em casa-de-vegetação e após o transplante para o canteiro definitivo. Foi observado aumento do percentual de crescimento em altura de mudas, espessura do caule, área foliar, peso fresco de folha e de raiz. Em outro experimento usando tratamento de sementes de arroz com microrganismos entre os quais *Trichoderma virens* e *T. harzianum* promoveram aumento considerável no comprimento de raiz, altura e peso fresco de plântulas, além da melhoria no percentual de germinação (MISHRA e SINHA, 2000).

Existem várias hipóteses que procuram explicar esta habilidade de *Trichoderma* spp. na promoção do crescimento de plantas. PIEKIELEK e FOX (1992), notaram que às vezes plantas de milho originadas de sementes tratadas com um isolado de *Trichoderma* spp., o T-22, promoveu aumento na produção de folhas, fato este que estaria associado à altos níveis de absorção de nitrogênio. HARMAN (2000) acrescenta que o T-22 nas raízes colonizadas poderia ter aumentado a eficiência de fertilizantes, principalmente o nitrogênio. O controle de patógenos conduziria a um forte incremento na captação de nutrientes, a solubilização de nutrientes no solo e produção de hormônios de crescimento (OUSLEY et al., 1993; ALTOMARE et al., 1999 e WINDHAM et al., 1986, respectivamente, citados por OZBAY e NEWMAN, 2004) a mesma conclusão teve AVIS et al. (2008).

Sobre a ação de hormônios TSAVKELOVA et al. (2006) apontaram que moléculas semelhantes a citocininas, podem ser sintetizadas por *T. viride*. GRAVEL et al. (2007) reporta que *T. atroviride* sintetiza e tem ação deletéria a AIA presente em plantas e que pode possuir a atividade deaminase de ácido carboxílico aminociclopropano (ACC) que poderia controlar a produção de etileno. Os autores citam como exemplo o aumento do crescimento de tomates produzidos em cultivo hidropônico como reflexo da regulação de AIA e etileno na rizosfera, promovido por *T. atroviride*.

Em um experimento, PRATES et al. (2007) testaram a aplicação do fungo antagonista *Trichoderma* spp. no substrato, juntamente com a pulverização quinzenal das mudas, promoveu maior concentração de potássio (44,3 g kg<sup>-1</sup>) e de enxofre (3,5 g kg<sup>-1</sup>) nas folhas de mudas enxertadas de laranja pera/ limão-cravo. Entretanto, não houve efeito dos

tratamentos sobre a concentração de fósforo (2,4 a 2,6 g kg<sup>-1</sup>), cálcio (14,8 a 19,3 g kg<sup>-1</sup>) e magnésio (2,0 a 2,5 g kg<sup>-1</sup>). Existem na literatura vários relatos sobre o papel do potássio e do enxofre no aumento da resistência dos vegetais às pragas e doenças (MARSCHNER, 1995; MENGEL e KIRKBY, 2001; WILLIAMS et al., 2002; WILLIAMS e COOPER, 2004).

SNEH et al. (1986), reportaram que *R. Solani* avirulento, promoveu o crescimento vegetativo de muitas culturas como alface, cenoura, algodão e milho. Tal fato poderia estar relacionado com o aumento da captação de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> e da atividade fotossintética e a ação de substâncias com propriedades promotoras no crescimento de plantas produzidas por esse fungo (SNEH et al. 1989).

BAKER (1989) acrescenta além dos mecanismos já citados, a inibição e alteração da microflora natural da rizosfera, produção de compostos estimuladores de crescimento semelhantes a hormônios de crescimento, e decréscimo de substâncias inibidoras do crescimento de plantas neste ambiente.

BADR EL-DIN et al. (2000) verificaram em um trabalho envolvendo fertilização do substrato de plantio com NPK (testemunha), restos de cultura, dois compostos produzidos por microrganismos celulolíticos (*Trichoderma viride* e *Streptomyces aureofaciens*), um composto inoculado com *Glomus* sp. e um composto produzido sem inoculação de microrganismos, um aumento de 80 %, 75 % e 73 %, respectivamente por compostos produzidos por *T. viride*, *S. aureofaciens* e *Glomus* sp., na proteção de tomateiros, na comparação com a aplicação de NPK. Por Também, foi observado incremento na produção de matéria seca e na captação de P e N nesses três compostos.

Para REQUENA et al. (1996) citado por BADR EL-DIN et al. (2000), tal resultado está relacionado com a alta efetividade dos microrganismos na decomposição de celulose, aumentando a liberação de nutrientes para as plantas, associado à conhecida capacidade dos fungos utilizados no preparo dos compostos no biocontrole de patógenos.

MISHRA e SINHA (2000) acharam correlação entre o crescimento de plantas e as enzimas produzidas por agentes antagonistas a fitopatógenos. Eles acreditam que as enzimas têm o papel de degradar rapidamente materiais orgânicos presentes no solo liberando nutrientes para as plantas.

OZBAY e NEWMAN (2004) através da inoculação em substrato de dois isolados de *Trichoderma harzianum* (T-22 e T-95), e um produto comercial à base desses isolados (Plantshield), demonstraram 100 % de emergência de tomateiros tratados com esse produto, sendo o tratamento estatisticamente semelhante em relação aos demais e a testemunha. Os dois isolados de *T. harzianum* aumentaram significativamente o diâmetro do caule, sendo que o T-95 se mostrou eficaz no incremento na altura da gema apical.

Além disso, T-22 e T-95 incrementaram os pesos seco e fresco de parte aérea, e os dois isolados numericamente promoveram maior peso de raiz (OZBAY e NEWMAN, 2004). Os autores atribuem a expiração do tempo de prateleira no momento do experimento como a provável causa para o baixo desempenho do produto comercial.

NASEBY et al. (2000) acreditam que *Trichoderma* poderia, através de modificação de condições inerentes ao solo, contribuir para o crescimento de plantas.

PÁDUA et al. (2005a), realçaram a importância de algumas espécies de *Trichoderma* spp. atuando como agentes solubilizadores de nutrientes na rizosfera, aumentando a disponibilidade desses elementos para as plantas.

Porém, mesmo com essas características benéficas, é importante mencionar o relato de SUDO MARTELLETO (2009) que recomenda cuidados na manipulação de *Trichoderma* e outros microrganismos. A autora cita KUHLS et al. (1999) e KUBICEK e HARMAN (1998) sobre a ocorrência de infecções em humanos com sistema imunológico deficiente ou pacientes imunodepressivos, além de problemas alérgicos.

### 1.5. Testes Preliminares *in vivo* e Metodologias de Quantificação de Doenças de Plantas

Uma das premissas do controle biológico é a redução da densidade de inóculo de um agente patogênico por intermédio do seu antagonista (BAKER e COOK, 1974). Assim, é fundamental antes da realização de ensaios em casa-de-vegetação, mais precisamente aqueles onde se procuram testar a eficiência de determinado agente de biocontrole contra microrganismos fitopatogênicos, de testes para a determinação do valor da densidade de inóculo necessária para causar um percentual considerável de determinada doença ao qual se deseja reduzir.

Desta maneira, é essencial nestes testes, o uso de doses crescentes de inóculo de um patógeno e a sua planta hospedeira, com a finalidade de se detectar a concentração de inóculo adequada. Da mesma forma, devem-se ser feitos testes com intenção de se conseguir a dose do microrganismo antagonista necessário para inibir a ação do fitopatogeno.

Nesse escopo, uma revisão bibliográfica para se buscar o valor destas densidades, deve ser feita com cautela visto que mesmo se adotando um valor obtido em outros experimentos envolvendo o mesmo patógeno, a planta hospedeira e a doença promovida pelo primeiro, fatores bióticos (ex: variabilidade genética entre fitopatógenos e/ou populações deste; diferentes graus de patogenicidade) e fatores abióticos (ex: clima; planta hospedeira; características física, química e biológica do solo; metodologias de inoculação), podem influir de modo diferente e assim sub - ou superestimar o montante de inóculo necessário para a promoção de determinada doença.

Porém informações contidas nesses trabalhos servem para se ter um valor desta variável que poderá ser empregada como base para o uso de doses diferentes de inóculo.

Nestes testes, dependendo da fitodoença avaliada, pode-se lançar mão de algumas metodologias para a sua quantificação.

Existem vários trabalhos onde os autores utilizaram fórmulas matemáticas para a determinação do percentual de fitomoléstias, como foi o caso de OLIVEIRA et al. (2008), que contabilizaram o percentual de “tombamento” de plântulas de cenoura de acordo com diferentes densidades de inóculo de *R. solani*.

Escalas de notas podem ser utilizadas para se mensurar o grau de severidade de uma doença como aquela utilizada por ANDRADE et al. (2005) em um trabalho sobre a influência de diferentes densidades de inóculo de isolados de *R. solani* na severidade da rizoctoniose em melão, onde os autores utilizaram a escala de NORONHA et al. (1995) adaptada para esta cultura. Da mesma forma, MIRANDA et al. (2007) utilizaram a escala de notas de ABAWIE PASTOR-CORRALES (1990), onde avaliaram a severidade das podridões radiculares em cultivares de feijão causadas por *R. solani* ou *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*.

## **2. CAPÍTULO I**

### **IDENTIFICAÇÃO *IN VITRO* DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. COM POTENCIAL PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS DE SOLO**



## 2.1. RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo, através de testes em condições de laboratório, a identificação de isolado(s) de *Trichoderma* spp. quanto à eficiência no biocontrole de *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Rhizoctonia solani* Kuhn. e *Fusarium oxysporum* Schlecht. f.sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder. Para isso foram utilizados 12 isolados de *Trichoderma* spp. Foi realizado teste de antagonismo (pareamento), além de teste de produção de metabólitos voláteis e teste da produção de metabólitos não-voláteis ambos pelos agentes de controle biológico com efeito antagonista aos fitopatógenos testados. Foram utilizadas placas de Petri contendo meio de cultura BDA Difco, mantidas em BOD a 25°C de temperatura e fotoperíodo de 12 horas, as mensurações foram diárias do percentual de colonização dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre cada um dos patógenos no teste de antagonismo. Para o teste da produção de metabólitos voláteis, avaliou-se o percentual de colonização dos patógenos e no teste de produção de metabólitos não-voláteis, o diâmetro total das colônias desses últimos. Ao final de cada um dos testes, determinou-se o percentual de redução do crescimento micelial dos fitopatógenos promovidos pelos isolados de *Trichoderma* spp. No teste de antagonismo a maioria dos antagonistas testados demonstrou eficácia no controle de *Sclerotium rolfsii*, e *Rhizoctonia solani*, e o isolado T-12 conferiu 100 % na redução do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*. Este mesmo isolado reduziu em 54,9 % e 44,8 % o crescimento de *Sclerotium rolfsii* no teste de produção de metabólitos voláteis, e de *Rhizoctonia solani* no teste de produção de metabólitos não-voláteis, respectivamente. Nesse último teste, o antagonista T-04 através de metabólitos reduziu em 70 % a germinação de escleródios de *S. rolfsii*. T-07 mostrou produzir compostos capazes de inibir tanto o crescimento do micélio quanto a germinação de escleródios de *S. rolfsii* sendo assim considerados como promissores agentes de biocontrole dos microrganismos fitopatogênicos testados.

## 2.2. ABSTRACT

Through laboratory conditions, this study aimed at the identification of isolate (s) of *Trichoderma* spp. for efficiency in the biocontrol of *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Rhizoctonia solani* Kuhn. and *Fusarium oxysporum* Schlecht. f.sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder, using 12 isolates of *Trichoderma* spp. as antagonists. Antagonism test was performed by pairing and by production of volatile and non-volatile metabolites by biocontrol agents with antagonist effect on plant pathogens. It has been used Petri dishes containing Difco potato dextrose agar culture medium, incubated at 25°C temperature and photoperiod of 12 hours, with daily measurements were the percentage of colonization of *Trichoderma* spp. on each of the pathogens in the antagonism was tested. To measure the production of volatile metabolites, it was evaluated the percentage of colonization of pathogens and production of non-volatile metabolites. The overall diameter of the colonies was determined. At the end of each test, the percentage of reduction of mycelium growth of phytopathogenic promoted by *Trichoderma* spp. was calculated. In the antagonism test most of the antagonists demonstrated efficacy in control of *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. Isolated T-12 gave 100% reduction in mycelial growth of *Rhizoctonia solani*. This same strain decreased by 54.9% and 44.8% growth of *Sclerotium rolfsii* in the test production of volatile metabolites, and *Rhizoctonia solani* in production of non-volatile metabolites, respectively. In this last test, the antagonist T-04 decreased by 70% the germination of sclerotia of *S. rolfsii*. T-07 showed to produce compounds capable of inhibiting both mycelial growth and germination of sclerotia of *S. rolfsii*. Thus, they are considered promising biocontrol agents of pathogenic microorganisms.

## 2.3. INTRODUÇÃO

Devido a algumas qualidades importantes como a produção de compostos voláteis e antibióticos frutos do seu metabolismo (MELO, 1996; HOWELL, 2003a) e pela grande capacidade competitiva por espaço, nutrientes e oxigênio em relação ao grande número de fitopatógenos (MARTINS-CORDER e MELO, 1998), credenciam fungos do gênero *Trichoderma* spp. como eficientes agentes antagonistas.

Por essas características o controle biológico ou biocontrole utilizando fungos do gênero *Trichoderma* spp. há muito tempo é uma prática alternativa no controle de fitomoléstias causadas *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (GOMES et al., 2005; NASHWA et al., 2008; PODDAR et al., 2004; CHET e BAKER, 1981, HARMAN, 2000; HOYOS-CARVAJAL et al., 2008; YAKUB e SHAHZAD, 2008; PÁDUA et al., 2005 a e b).

A busca por esses agentes antagonistas, envolve o isolamento e posterior seleção *in vitro*, e são atividades primordiais em um programa envolvendo o controle biológico de fitopatógenos. O isolamento de microrganismos no campo pode ser feito tanto na planta quanto no solo. BETTIOL (1991b) relata que para grande parte dos patossistemas o melhor local para ser feita a seleção desses é na planta hospedeira e através de isolamentos no mesmo ambiente onde serão empregados com a finalidade do biocontrole de determinado patógeno. Embora já tenha se comprovado em diversos ensaios que um agente de biocontrole usualmente habitante do solo pode controlar um microrganismo fitopatogênico presente na parte aérea ou vice-versa e em um ambiente biologicamente equilibrado ou não.

Nessa etapa do trabalho foi seguida a primeira sugestão onde foram obtidos 12 isolados de *Trichoderma* spp. de amostras de terra na região da rizosfera de culturas anuais sadias cultivadas em um solo próximo ao equilíbrio biológico.

Assim, o objetivo deste trabalho foi detectar e comprovar *in vitro* fungos do gênero *Trichoderma* spp. promissores no controle biológico de patógenos do solo, mais especificamente de *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* para futuros testes em condições de casa-de-vegetação e no campo.

## 2.4. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.4.1. Localização da Área de Estudo

Os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados neste trabalho pertencem a coleção da Estação Experimental de Seropédica da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro, PESAGRO-RIO/EES, que foram coletados de amostras de terra junto ao Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA), também conhecido como Fazendinha Agroecológica Km 47 (ALMEIDA et al., 1999), situado no mesmo município, além de amostras oriundas dos municípios de Paraty (RJ) e Paty do Alferes (RJ) na PESAGRO-RIO/CEA, e na própria Estação Experimental de Seropédica (**Anexo A**).

Os isolados dos patógenos de solo foram obtidos por isolamento a partir de plantas infectadas com *Sclerotium rolfsii* em tomateiro, *Rhizoctonia solani* na cultura da alface e *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* no feijoeiro-comum.

### 2.4.2. Teste de Antagonismo (Pareamento)

O efeito antagonista dos isolados sobre os três patógenos foi avaliada através do método adaptado do trabalho de BELL et al. (1982). Foi feito o pareamento de colônias ou confrontação direta entre os 12 isolados de *Trichoderma* e cada um dos três patógenos. Discos de BDA Difco de 0,8 cm, contendo cultura pura de cada isolado de *Trichoderma* e do fitopatógeno, foram colocados em placas de Petri com o mesmo meio de cultura, a 1,0 cm da borda e observando a distância de 6,4 cm entre colônias dos respectivos microrganismos.

Entretanto esta inoculação foi realizada em intervalos de tempo diferentes, baseado na velocidade de crescimento micelial tanto dos isolados de *Trichoderma* spp. quanto dos fitopatógenos utilizados. Para o *Sclerotium rolfsii*, discos de micélio foram inoculados ao mesmo tempo que os antagonistas. No caso de *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, estes foram inoculados 24 e 96 horas antes do antagonista, respectivamente, visando a dar as mesmas condições de crescimento a antagonistas e patógenos.

As culturas foram colocadas em câmara de incubação BOD regulada para fotoperíodo de 12 horas, e temperatura de 25°C. As avaliações foram feitas seguindo a metodologia de CAMPOROTA (1985). Para tanto, foi considerado o cálculo do percentual de colonização (% C) de cada isolado antagonista, onde  $\% C = (DT/DE) \times 100$ , sendo DT a distância entre as colônias e DE a distância inicial entre os dois discos de micélio, a partir de medições diárias da distância entre as colônias dos microrganismos, até a estabilização do crescimento micelial.

Ao final desta fase cada relação antagonista/patógeno foi classificada de acordo com uma escala de notas de BELL et al. (1982) que determina o grau de antagonismo (G) onde 1 – O agente de biocontrole cresce completamente sobre o patógeno cobrindo a superfície total do meio de cultura; 2 – O agente de biocontrole cresce sobre no mínimo 2/3 da superfície do meio de cultura; 3 – O agente de biocontrole e o patógeno colonizam aproximadamente metade da superfície do meio de cultura (mais do que 1/3 e menos que 2/3) e nenhum deles aparece dominando o outro; 4 – O patógeno coloniza no mínimo 2/3 da superfície do meio de cultura e aparece resistindo ao agente de biocontrole; 5 – O patógeno cresce completamente sobre o agente de biocontrole e ocupa a superfície total do meio de cultura.

### 2.4.3. Produção de Metabólitos Voláteis

Utilizou-se o método modificado de BHARAT et al. (1980), no qual o meio BDA Difco foi vertido nas duas tampas da placa de Petri. Em seguida, na tampa inferior, na posição central, foi colocado um disco de micélio com 0,8 cm de diâmetro retirado de cultura pura de cada um dos isolados de *Trichoderma*. Para os fitopatógenos foi feito o mesmo procedimento anterior, utilizando a tampa superior, de modo que ambos os discos ficassem sobrepostos.

Para evitar a perda de supostos compostos voláteis, cada placa foi vedada com filme plástico e colocada para incubação em BOD em fotoperíodo de 12 horas na temperatura de 25°C, onde, foram feitas medições diárias do diâmetro da colônia dos fitopatógenos. O percentual de colonização dos patógenos (% Cp) foi calculado utilizando a fórmula:

$$\%Cp = ((\varnothing Cp / \varnothing T) \times 100$$

Onde  $\varnothing Cp$  é o diâmetro da colônia do patógeno, e  $\varnothing T$  o diâmetro interno da placa de Petri.

### 2.4.4. Produção de Metabólitos Não-Voláteis

Neste teste foi empregado o método modificado de MICHEREFF et al. (1993) onde o meio BDA contidos em placas de Petri foi coberto com discos de papel celofane de 9,0 cm de diâmetro. Em seguida, no centro de cada placa, foi colocado um disco de micélio de cada isolado de agente de biocontrole e cada um dos patógenos (testemunhas), que permaneceram incubadas por 72 horas a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Passado esse tempo, foi descartado o papel celofane com a colônia do microrganismo testado, e colocado na tampa superior de cada placa 5,0 ml de clorofórmio para a eliminação de possíveis estruturas reprodutivas do mesmo e outros contaminantes. As placas de Petri por inteiro foram colocadas em posição inversa ao normal, e deixadas em repouso para a evaporação do clorofórmio e recolocadas na posição correta.

Após 24 horas, procedeu-se a inoculação de cinco discos de micélio de 0,7 cm de cada patógeno sendo locado um disco no centro da placa e os demais à 1,0 cm da borda do recipiente e distantes 90° do propágulo seguinte. As repetições foram colocadas na BOD sob as mesmas condições já mencionadas, e foram feitas mensurações diárias do diâmetro das colônias de cada patógeno onde ao final se obteve o valor total desta variável, ou seja, o total dos diâmetros das colônias dos patógenos ( $\varnothing Cp_{Total}$ ) corresponde ao somatório do diâmetro das colônias do patógeno ( $\sum \varnothing Cp$ ) de cada repetição.

### 2.4.5. Inibição de Germinação de Escleródios de *Sclerotium rolfsii*

Neste teste foi repetida a metodologia de MICHEREFF et al. (1993) descrita no item 3.2.4, sendo que os escleródios foram previamente desinfetados com solução de hipoclorito de sódio à 10 % por 30 segundos, seguindo a inoculação de dez escleródios por cada uma das cinco placas com meio de cultura contendo supostos compostos não-voláteis produzidos pelos 12 isolados de *Trichoderma* spp., que foram colocadas para incubação na BOD sob as mesmas condições já mencionadas.

Foi mensurado diariamente o número de escleródios germinados e ao final se obteve o percentual de germinação dessas estruturas.

#### **2.4.6. Análise Estatística**

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. Nos testes, depois de atendida a distribuição normal dos dados assim como a homogeneidade entre as variâncias dos erros pelos testes de Lilliefors e de Cochran e Bartlett, respectivamente, procedeu-se a comparação entre as médias dos tratamentos utilizando o teste de Tukey após a obtenção da ANOVA.

Já para aquelas avaliações que não seguiram os dois primeiros testes citados, foram submetidas à ANOVA não-paramétrica utilizando para a comparação entre as médias o teste de Kruskal-Wallis. Todos os testes ao nível de 5 % de probabilidade e utilizando o programa estatístico SAEG (FUNDAÇÃO ARTUR BERNARDES, 2005).

#### **2.4.7. Percentual de Redução do Crescimento Micelial do Patógeno (% RC)**

Para o cálculo do percentual de redução do crescimento micelial do patógeno (% RC), em relação ao teste de antagonismo, foi utilizado a média do percentual de colonização dos isolados antagonistas. Já para os demais testes, a fórmula empregada foi:

$$\% \text{ RC} = (X\%C \text{ da Testemunha} - X\%C \text{ do tratamento} / X\%C \text{ da Testemunha}) \times 100$$

Onde X = média total.

#### **2.4.8. Frequência Total nas Variáveis Testadas (FTVT)**

O método de frequência total nas variáveis testadas (DIAS, 2004), é um teste de agrupamento que tem como meta demonstrar a frequência dos melhores tratamentos apresentados na análise estatística em cada teste de um experimento, para que se tenha uma visão ampla do desempenho desses tratamentos e assim apontar aqueles mais eficientes.

#### **2.4.9. Seleção dos Isolados para o Teste de Controle Biológico**

No que se refere aos antagonistas, foram selecionados, para o teste de biocontrole, os isolados de *Trichoderma* spp. representativos de acordo com o grau de biocontrole em relação a cada um dos fitopatógenos utilizados nos testes *in vitro*. Para atender tal critério, primeiramente foram selecionados aqueles isolados que demonstraram em cada um dos testes, um desempenho em destaque observada pelo percentual de redução de crescimento micelial do patógeno. O outro critério foi baseado na classificação dos isolados baseada no somatório deste mesmo percentual, em relação a todos os testes *in vitro* contra cada um dos fitopatógenos de solo (Tabelas 6, 7 e 8). Assim, foram selecionados os 6 isolados melhor colocados que junto com a testemunha e o tratamento que se mostrou mais ineficaz nas condições *in vitro* contra cada um dos fitopatógenos testados, além de um tratamento adicional isento de microrganismos.

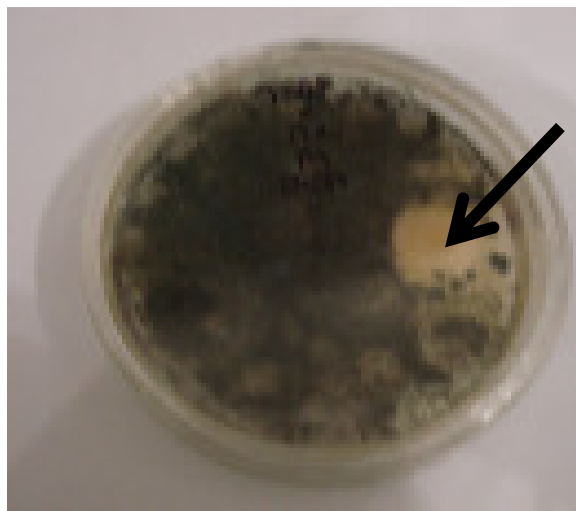
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1. Teste de Antagonismo (Pareamento)

##### a) *Trichoderma* spp. x *Sclerotium rolfii*

Os tratamentos T-06, T-05, T-03, T-07, T-02, T-12, T-08, T-09 e T-04, foram, estatisticamente, os tratamentos que apresentaram maior crescimento micelial em relação a *S. rolfii*, superior a 70 % de colonização (Tabela 1). Todavia, os demais tratamentos numericamente mostraram tendência a um bom desempenho na competição por alimento e espaço do meio de cultura refletindo no impedimento do crescimento da colônia do patógeno em questão. Na Figura 1 observa-se a repetição do pareamento entre o isolado T-08 e *S. rolfii*, onde o antagonista ocupa e inibe o crescimento do patógeno.

PÁDUA et al. (2005), testando 50 isolados de *Trichoderma* spp., observaram *in vitro* através do cultivo pareado, a inibição do crescimento de *S. rolfii* entre 17,7 e 59,7 %, e quanto ao grau de antagonismo, todos os isolados do antagonista foram classificados como altamente antagônicos ao patógeno. MACEDO et al. (2007) em seus estudos, detectaram que 2/3 dos isolados de *Trichoderma* spp. foram responsáveis pela redução do crescimento da colônia de *Sclerotium rolfii* acima de 50 %. Utilizando 20 isolados de *Trichoderma* visando o potencial de biocontrole desses *in vitro* de *Sclerotium rolfii* isolados em plantas de soja, GOMES et al. (2005) verificaram a redução do crescimento do patógeno entre 27 e 69 % no teste de pareamento dos fungos.



**Figura 1:** A seta mostra esporulação abundante do isolado de *Trichoderma* spp. T-08 sobre a colônia de *Sclerotium rolfii*.

O resultado foi semelhante ao obtido em experimento *in vitro* de ROLLAN et al. (1999) que parearam 6 isolados de *Trichoderma* spp. com 3 fitopatógenos de solo entre os quais *Sclerotium rolfii*, e chegaram a conclusão que isolados do antagonista tiveram um maior percentual de colonização em faixa de temperatura entre 20 e 25° C. Todavia, em 30° C o percentual de colonização do patógeno foi bem maior confirmando a existência de uma faixa de temperatura ótima para o desenvolvimento dos fungos pelo menos nessas condições.

**Tabela 1:** Percentagem de colonização (% C) e grau de antagonismo (G) de 12 isolados de *Trichoderma* em relação à *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, obtida pelo teste de antagonismo ou pareamento de culturas fúngicas *in vitro*

Tratamentos	Patógenos					
	<i>Sclerotium rolfsii</i>		<i>Rhizoctonia solani</i>		<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i>	
	(%C)*	(G)	(%C)	(G)	(%C) <sup>1</sup>	(G)
<b>T-01</b>	67,30 C	2,0	95,27 A	2,0	43,20 A	3,0
<b>T-02</b>	76,15 ABC	2,0	96,40 A	1,4	47,07 A	3,0
<b>T-03</b>	77,22 ABC	2,0	96,80 A	1,2	49,83 A	3,0
<b>T-04</b>	71,82 ABC	2,0	65,88 BC	4,0	49,99 A	3,0
<b>T-05</b>	79,46 AB	2,0	83,20 AB	1,6	52,90 A	3,2
<b>T-06</b>	82,42 A	2,0	98,85 A	1,0	45,07 A	3,0
<b>T-07</b>	77,14 ABC	2,0	98,00 A	1,0	46,32 A	3,0
<b>T-08</b>	74,93 ABC	2,0	95,10 A	1,0	43,95 A	3,0
<b>T-09</b>	73,75 ABC	2,0	51,06 C	4,0	47,77 A	3,0
<b>T-10</b>	66,26 C	2,0	54,92 C	4,0	45,76 A	3,0
<b>T-11</b>	69,53 BC	2,0	57,88 C	4,0	50,00 A	3,0
<b>T-12</b>	75,52 ABC	3,0	100,00 A	1,0	48,39 A	3,0
<b>CV %</b>	6,80		13,74		-	
<b>DMS</b>	10,97		24,67		36,09	

\*Nas colunas, as letras iguais correspondem a médias não significativas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

(1) - Nas colunas, as letras iguais correspondem a médias não significativas pelo teste de Kruskal-Wallis a 5 de probabilidade.



Os isolados testados mostraram maior consistência em termos de competição por espaço e nutrientes chegando a esporular sobre a colônia do patógeno. O que confirma relato de BOOSALIS (1964) que aponta a abundância de esporulação de *Trichoderma* spp. como resultado do estímulo à reprodução, qualidade de certos hospedeiros, perante seus parasitas. Outra observação pertinente foi a rápida produção de escleródios na maioria das repetições, principalmente naquelas onde o crescimento da colônia do antagonista foi mais intenso, indicando que o patógeno estaria antecipando a sua fase de sobrevivência diante da situação adversa (Figura 2).



**Figura 2:** Produção prematura de escleródios de *Sclerotium rolfsii* diante da colonização de seu micélio pelo isolado de *Trichoderma* spp. T-12.

#### **b) *Trichoderma* spp. x *Rhizoctonia solani***

Com relação ao patógeno *Rhizoctonia solani*, os isolados T-12, T-06, T-07, T-02, T-01, T-08, T-03 e T-05 demonstraram domínio acentuado sobre o patógeno, chegando o isolado de *Trichoderma* spp. T-12, a ocupar 100 % da distância entre as colônias (Tabela 1), representando que este antagonista se sobrepõe à colônia do fitopatógeno. Por outro lado, quanto ao grau de antagonismo (G), os isolados T-04, T-11, T-10 e T-09 pouco inibiram o desenvolvimento do patógeno que ocupou boa parte do meio de cultura resistindo a estes isolados. Neste caso, pode parecer que os resultados do % C e do grau de antagonismo, ambas as colônias deveriam estar dividindo quase a metade da placa de Petri. Todavia, é importante salientar que com estes dois testes se avaliam a distância entre os dois discos de micélio (antagonista e patógeno), levando também em consideração a possibilidade de estender suas hifas e/ou esporular sobre o micélio do outro fungo.

Em dois testes de pareamento realizado por NAWAR (2007) entre um isolado de *Trichoderma harzianum* e outros de *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani*, o antagonista foi responsável pela redução do crescimento dos patógenos em 41,94 e 78,86 %, respectivamente.

AVENDAÑO e RONDON (2006) provaram em um teste de pareamento entre um isolado de *Trichoderma* sp. e outro de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, que o antagonista inibiu o crescimento do fitopatógeno em 64 %, com invasão abundante do micélio de *Trichoderma* sp. CARVALHO FILHO et al. (2005) apontam para a existência de variabilidade na inibição do crescimento de *R. solani* pelo teste de cultivo pareado dentro da espécie *T. harzianum*, onde 13 dos 17 isolados foram classificados como altamente antagonísticos segundo a escala de BELL et al. (1982).

Os resultados se assemelham ao encontrado por MELO e FAULL (2000) que verificaram a inibição do crescimento micelial de uma espécie de *Rhizoctonia solani* por algumas linhagens de *Trichoderma* spp.

### c) *Trichoderma* spp. x *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*

Os isolados mostraram desempenho semelhante não havendo variação, na maior parte das vezes, no percentual de colonização dos agentes de biocontrole utilizados (Tabela 1). Assim nenhum dos isolados de *Trichoderma* spp. exerceu domínio sobre *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* chegando os dois fungos a ocuparem aproximadamente a metade do meio de cultura, mostrando maior habilidade do patógeno em resistir ao antagonista e /ou menor capacidade de competição por espaço ou nutrientes pelo antagonista.

NASHWA et al. (2008) ao parearem isolados antagonistas da espécie *Trichoderma viride*, *T. harzianum*, *T. polysporium*, *T. pseudokoningii* e *T. spirale*, em um total de 15 populações, com *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* e *R. solani*, observaram a variação no percentual de inibição entre 17 e 51,7 % para *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* e de 13,2 até 42,5 % para *R. solani*, onde a maior porcentagem de inibição foi resultado do emprego do isolado Th 1 e *T. harzianum*.

Embora realizado com metodologia distinta a deste trabalho, os resultados são semelhantes ao encontrado por CRUZ et al. (2007) que relata a inibição de 49 % do crescimento do micélio do fungo *F. oxysporum*, e por LUCON et al. (2007). PEDRO et al. (2008) detectaram 15 isolados do antagonista inibindo entre 19 e 44 % do crescimento do mesmo patógeno. BARBOSA e MEZA (2009) lograram dados interessantes no controle *in vitro* de *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *passiflorae* com isolados de *Trichoderma harzianum* nativos e incluído na formulação de produto comercial através desse teste, devido à aptidão desses isolados em crescer mais rapidamente. Entretanto, não foi detectado a penetração nem o entrelaçamento entre hifas dos fungos tanto por isolados nativos quanto pelos comerciais (BARBOSA e MEZA, 2009). INBAR e CHET (1997) reportaram que *F. oxysporum* apresenta parede celular protegida por cobertura de natureza proteica que tem ação inibitória à quitinases e  $\beta$ -1,3- glucanases, secretadas por *T. harzianum*.

REIS et al. (1995) observaram que de 15 isolados de *Trichoderma* spp. utilizados no teste de pareamento contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, 60 % aferiram nível (grau) de antagonismo 3,0 (médio antagonismo), 20 % receberam nota 2,0 (eficiente antagonismo) e 20 % foram classificados como antagonistas muito eficientes a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. No presente trabalho todos os isolados receberam nota 3,0.

### 3.3.2. Teste da Produção de Metabólitos Voláteis

#### a) *Trichoderma* spp. x *Sclerotium rolfsii*

Na Tabela 2 verifica-se que o isolado T-12, numericamente, foi o tratamento que mostrou certa tendência, através da produção de compostos voláteis, na redução do crescimento (% RC) de micélio de *Sclerotium rolfsii*, chegando a promover aproximadamente em 55 % a redução quando comparado à testemunha, porém todos os tratamentos se igualaram estatisticamente quanto ao percentual de crescimento da colônia (% C) indicando que estes, pelo menos em condições *in vitro*, não demonstraram eficiência na produção de metabólitos voláteis que inibam o crescimento desse patógeno. Maior sucesso teve MACEDO et al. (2007) que demonstraram a inibição do crescimento colonial de *S. rolfsii* através dos 12 isolados de *Trichoderma* spp. testados.

**Tabela 2:** Percentagens de colonização (% C) e de redução do crescimento (% RC) de três patógenos (*Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*) por 12 isolados de *Trichoderma*, obtida pelo teste da produção de metabólitos voláteis *in vitro*

Patógenos						
	<i>Sclerotium rolfsii</i>		<i>Rhizoctonia solani</i>		<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i>	
Tratamentos	(% C)*	%RC	(% C)	%RC	(% C) <sup>(1)</sup>	%RC
Testemunha	100,00 A	0	100,00 A	0	99,33 A	0
<b>T-01</b>	100,00 A	0	100,00 A	0	95,33 A	4,0
<b>T-02</b>	76,22 A	23,8	90,20 A	9,8	93,77 A	5,6
<b>T-03</b>	97,33 A	2,7	94,40 A	5,6	99,11 A	0,2
<b>T-04</b>	81,11 A	18,9	76,40 A	23,6	99,11 A	0,2
<b>T-05</b>	100,00 A	0	86,00 A	14,0	90,00 A	9,4
<b>T-06</b>	90,44 A	9,6	96,80 A	3,2	93,11 A	6,3
<b>T-07</b>	86,88 A	13,1	89,40 A	10,6	89,33 A	10,1
<b>T-08</b>	94,00 A	6,0	93,00 A	7,0	95,11 A	4,3
<b>T-09</b>	91,11 A	8,9	87,40 A	12,6	100,00 A	-0,7
<b>T-10</b>	91,11 A	8,9	83,80 A	16,2	99,11 A	0,2
<b>T-11</b>	89,33 A	10,7	92,60 A	7,4	98,22 A	1,1
<b>T-12</b>	45,11 A	54,9	89,20 A	10,8	92,22 A	7,2
CV %	-		17,65		-	
DMS	39,61		34,95		39,61	

\*Nas colunas, as letras iguais correspondem a médias não significativas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

(1) - Nas colunas, as letras iguais correspondem a médias não significativas pelo teste de Kruskal-Wallis a 5 % de probabilidade.

### **b) Trichoderma spp. x Rhizoctonia solani**

Para *Rhizoctonia solani*, não houve um isolado do agente de biocontrole que produziu metabólitos voláteis com função inibitória no crescimento do fitopatógeno. Porém, numericamente o tratamento T-04 reduziu, embora de forma moderada, o crescimento micelial desse isolado do patógeno. A Figura 3 ilustra uma etapa do teste. Note que o patógeno tem o crescimento inibido pela presença do antagonista, provavelmente pela produção de compostos voláteis pelo último, o que não foi frequente na maior parte das repetições refletindo no resultado da análise estatística.



**Figura 3:** Aspecto final da montagem do teste de produção de metabólitos voláteis. Na tampa se coloca o patógeno, no caso um disco de micélio de *Rhizoctonia solani*, e no fundo da placa um outro disco contendo propágulos do antagonista.

### **c) Trichoderma spp. x Fusarium oxysporum f.sp. phaseoli**

Os isolados do agente de biocontrole mostraram ineficácia sobre FOP, pois não houve diferença significativa entre os tratamentos da mesma forma que para os outros dois fitopatógenos utilizados antes. Uma explicação seria a qualidade e/ou a quantidade do(s) metabólitos voláteis produzidos pelos isolados do antagonista com relação à inibição do crescimento da colônia dos fitopatógenos estudados. Os metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. inibiram o crescimento das colônias de *Fusarium* spp. entre 44 e 47 %, no laboratório (MATA, 2005). *Trichoderma viride* e *T. koningii* têm histórico positivo no biocontrole de fitopatógenos em condições de laboratório por intermédio da produção de metabólitos voláteis (DENNIS e WEBSTER, 1971) citado por ALMEIDA (2009), fato que não foi ratificado nesse teste.

#### **3.3.3. Teste da produção de metabólitos não-voláteis**

##### **a) Trichoderma spp. x Sclerotium rolfsii**

A maioria dos tratamentos se assemelhou estatisticamente à testemunha (Tabela 3). Porém, numericamente, o isolado T-07 alcançou no mínimo 50 % do valor do diâmetro da colônia do tratamento que atingiu a maior média na variável, incluindo o controle, assim como na redução em cerca de 50 % do crescimento micelial do *Sclerotium rolfsii*, podendo ser considerado promissor como produtor de compostos não-voláteis com ação inibitória no crescimento do patógeno em estudo. Os resultados se assemelham aos encontrados por ALVARENGA et al. (2007) que observaram em condições *in vitro* a inibição do crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii* por meio de um filtrado obtido de uma linhagem de *T. asperellum*, onde uma quitinase produzida por *T. harzianum* impediu o crescimento vegetativo desse patógeno.

**Tabela 3:** Médias dos diâmetros das colônias (em cm) e percentual de redução de crescimento (% RC) de três patógenos (*Sclerotium rolfii*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*) por 12 isolados de *Trichoderma*, obtidas pelo teste de metabólitos não-voláteis *in vitro*

Tratamentos	Patógenos						
	<i>Sclerotium rolfii</i>		<i>Rhizoctonia solani</i>		<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i>		
	Diâmetro <sup>(1)</sup> (cm)	%RC	Diâmetro <sup>(1)</sup> (cm)	%RC	Médias Transformadas <sup>(2)</sup>	Diâmetro* (cm)	%RC
Testemunha	14,32 AB	0	14,54 AB	0	1,169	14,78 A	0
T-01	14,68 A	-2,5	14,80 A	-1,8	1,159	14,50 A	1,9
T-02	14,12 AB	1,4	14,78 AB	-1,7	1,170	14,82 A	-0,3
T-03	14,18 AB	1,0	15,14 A	-4,1	1,167	14,72 A	0,4
T-04	14,24 AB	0,6	14,24 AB	2,1	1,156	14,34 A	3,0
T-05	13,58 AB	5,2	15,00 A	-3,2	1,183	15,26 A	-3,2
T-06	14,28 AB	0,3	14,58 AB	-0,3	1,171	14,86 A	-0,5
T-07	7,32 B	48,9	12,86 AB	11,6	1,174	14,96 A	-1,2
T-08	14,68 A	-2,5	13,32 AB	8,4	1,146	14,10 A	4,6
T-09	11,66 AB	18,6	12,76 AB	12,2	1,160	14,50 A	1,9
T-10	12,26 AB	14,4	14,46 AB	0,6	1,167	14,72 A	0,4
T-11	14,38 AB	-0,4	14,94 A	-2,8	1,174	14,96 A	-1,2
T-12	11,84 AB	17,3	8,02 B	44,8	1,168	14,74 A	0,3
CV %	-	-	-	-	2,21	-	-
DMS	39,61	-	39,61	-	0,056	-	-

\*Nas colunas, as letras iguais correspondem a médias não significativas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

(1) - Nas colunas, as letras iguais correspondem a médias não significativas pelo teste de Kruskal-Wallis a 5 % de probabilidade.

(2)- Os dados foram transformados em log x.

### **b) *Trichoderma* spp. x escleródios de *Sclerotium rolfsii***

Pelos resultados da análise estatística (Tabela 4), com exceção do isolado T-04, que reduziu em 70 % a germinação de escleródios, todos os demais tratamentos apresentaram resultados semelhantes. Os isolados T-07, T-09 e T-10, foram aqueles que inibiram a germinação dessas estruturas propagativas, variando entre 28 e 40 % nesse item.

Em uma comparação dos dois testes envolvendo metabólitos não-voláteis produzidos pelos agentes antagonistas contra *S. rolfsii*, nota-se que o tratamento com T-07, que reduziu em 48 % o crescimento micelial do patógeno, foi o único que repetiu o mesmo desempenho na redução da germinação de escleródios desse patógeno. Ao contrário de T-04 que foi o mais eficiente na inibição da germinação dessas estruturas, porém não demonstrou sintetizar metabólitos com ação inibidora do crescimento micelial de *S. rolfsii* em condições *in vitro*.

**Tabela 4:** Médias do percentual de germinação (% G) de escleródios de *Sclerotium rolfsii* e da redução da germinação em relação à testemunha (% RG) pela ação de metabólitos não-voláteis de 12 isolados de *Trichoderma* spp.

Tratamentos	Médias transformadas <sup>(1)</sup>	Percentual de germinação de escleródios (% G)	% RG
Testemunha	1,5708	100,00 A	0
T-01	1,5708	100,00 A	0
T-06	1,5708	100,00 A	0
T-02	1,5064	98,00 A	-2
T-03	1,5064	98,00 A	-2
T-12	1,4549	94,00 A	-6
T-08	1,3777	94,00 A	-6
T-11	1,3494	92,00 A	-8
T-05	1,3210	90,00 A	-10
T-07	1,0690	72,00 AB	-28
T-09	1,0562	70,00 AB	-30
T-10	0,9867	60,00 AB	-40
T-04	0,4704	30,00 B	-70
CV %	21,29		
DMS	0,604		

Nas colunas, as letras iguais correspondem a médias não significativas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

(1)- Os dados foram transformados em  $\text{arc sen } \sqrt{x/100}$ .

### **c) *Trichoderma* spp. x *Rhizoctonia solani***

Da mesma maneira que o teste anterior, grande parte dos isolados antagonistas se igualaram a testemunha. Entretanto, pelo percentual de redução do crescimento do patógeno, o isolado T-12 se destacou por diminuir em 44,8 % o diâmetro total de colônias de *Rhizoctonia solani* (Figura 4), confirmando os resultados encontrados por GEYPENS (1977) e MELO e FAULL (2000) onde três linhagens de *Trichoderma koningii* que produziram metabólitos potentes que inibiram em mais de 79 % o crescimento de *Rhizoctonia solani*.

Em um trabalho de MELO e FAULL (2000), todos os isolados de *Trichoderma* spp. reduziram o crescimento da colônia de *R. solani* no teste de pareamento antagonista-fitopatógeno, variando entre 48,9 e 62,4 %. Os isolados de *T. koningii* foram responsáveis pela inibição entre 79 e 82 % do fitopatógeno através da produção de antibióticos não-

voláteis. Todavia, todos os isolados de *T. harzianum* produziram pouco ou nenhum desses compostos com habilidade inibitória do crescimento do patógeno avaliado.

NAWAR (2007) detectou a ação de filtrados metabólicos de *T. harzianum* inibindo o crescimento de *R. solani* e *F. solani* em 52,78 e 80,95 %, respectivamente, demonstrando que *R. solani* apresentou maior capacidade de resistência ao antagonista do que *F. solani*.

De acordo com ELAD et al. (1980) e CLAYDON et al. (1991), *Trichoderma harzianum*, sintetizam substâncias que atuam como inibidores de microrganismos fitopatogênicos. Os autores classificaram esses compostos como antibióticos, Trichodermin, Trichodermol A e Harzianolide.

AHMED et al. (2003) verificaram em um trabalho produção de alto nível de quitinase por *T. harzianum* indicando-o como responsável pelo controle de *Rhizoctonia solani* na cultura da pimenta. Esta enzima atua hidrolisando a parede celular deste patógeno, entre outros, levando a sua morte. ALVARENGA et al. (2007b) indicam que a quitina presente na parede pode ter alguma relação estreita com a expressão de hidrolases durante o micoparasitismo.



**Figura 4:** Efeito de compostos não-voláteis no crescimento da colônia de *Rhizoctonia solani*. Na placa à esquerda o tratamento testemunha e na placa à direita meio de cultura com metabólitos do isolado T-12.

#### **d) *Trichoderma* spp. x *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli***

Observa-se que não houve diferença estatística entre os tratamentos testados (Tabela 3) e nenhum deles teve desempenho considerável na redução do crescimento do patógeno indicando não ser esta a melhor estratégia dos isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro*.

Pelos resultados dos testes, verifica-se que a produção de compostos ditos não-voláteis é a estratégia no controle biológico de fitopatógenos, promissora somente para alguns poucos isolados do antagonista, contudo é importante enfatizar, que os mesmos ficaram apenas 3 dias de incubação sobre o papel celofane. Mas mesmo assim alguns deles produziram quantidade suficiente de compostos que foram adicionados ao meio de cultura que conferiram certa inibição ao crescimento dos patógenos.

PEDRO et al. (2008), verificaram falta de inibição do crescimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* no teste de produção de metabólitos não-voláteis, por 15 isolados de *Trichoderma* spp. utilizados.

Os resultados não ratificam aqueles encontrados por SANTOS et al. (2007a), que utilizaram metabólitos não-voláteis (termoestáveis e não-termoestáveis) e voláteis produzidos por isolados de *Trichoderma* spp., onde concluíram como potentes na inibição *in vitro* da esporulação de *Fusarium* spp. Da mesma forma, conforme relatado anteriormente, através de metabólitos produzidos por isolados do mesmo gênero, houve controle efetivo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (PEDRO et al., 2008) e de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (SANTOS et al., 2007b).

Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar tais resultados contraditórios, como, a utilização de diferentes espécies de *Fusarium* spp. e/ou populações diferentes do fungo testado para o controle biológico, com diferentes graus de agressividade e as condições e metodologias empregadas nos experimentos que foram distintas.

#### **3.3.4. Frequência Total nas Variáveis Testadas (FTVT)**

Verifica-se pelo método de frequência FTVT, nos resultados do testes de antagonismo e da produção de metabólitos não-voláteis, com relação ao controle dos patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Rhizoctonia solani* (Tabela 5), grande parte dos isolados do antagonista foram responsáveis pela inibição do crescimento das colônias desses patógenos.

Nenhum dos tratamentos possibilitou a inibição do crescimento das colônias dos três patógenos, em relação a produção de metabólitos voláteis antifúngicos, assim como na competição por nutrientes e na produção de compostos não-voláteis com ação fungicida frente a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. Conforme DENNIS e WEBSTER (1971) citado por ALMEIDA (2009), um isolado potente na produção de compostos não-voláteis nem sempre sintetizam compostos voláteis.

Os isolados T-02, T-03, T-04, T-05, T-06 T-07 T-09 e T-12, demonstraram aptidão no controle *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* através da competição trófica e da produção de metabólitos não-voláteis com ação fungicida no meio de cultura. Nesses dois testes os isolados T-02, T-06, T-07, T-08 e T-12 revelaram habilidade na inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*.

Os resultados corroboram a observação de ROBBS (1992) que apontou a competição trófica e a antibiose, como mecanismos mais frequentemente empregados por microrganismos antagonistas.

Em se mantendo essa tendência de controle em condições de casa-de-vegetação e/ou em campo, esses isolados têm um bom potencial para o controle do crescimento de pelo menos esses dois fitopatógenos, pois apresentaram mais de uma estratégia antagônica, no caso, 2/3 baseado nos testes realizados em laboratório.



**Tabela 5:** Síntese dos testes *in vitro* mostrando os melhores isolados de *Trichoderma* spp. em relação *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*

Tratamentos	Testes										Frequência	%
	Antagonismo (pareamento)			Produção de metabólitos voláteis			Produção de metabólitos não - voláteis					
	Médias (%)			Médias (%)			Médias (cm)					
	SR	RS	FOP	SR	RS	FOP	SR	RS	FOP			
Testemunha	n	n	n				X	X			1/3	33,3
T-01		X									1/9	11,1
T-02	X	X					X	X			4/9	44,4
T-03	X	X					X				1/3	33,3
T-04	X						X	X			1/3	33,3
T-05	X	X					X				1/3	33,3
T-06	X	X					X	X			4/9	44,4
T-07	X	X					X	X			4/9	44,4
T-08	X	X						X			1/3	33,3
T-09	X						X	X			1/3	33,3
T-10							X	X			2/9	22,2
T-11							X				1/9	11,1
T-12	X	X					X	X			4/9	44,4

Obs: X = Melhores tratamentos.

n = Tratamento não testado.

SR = *Sclerotium rolfsii*; RS = *Rhizoctonia solani*; FOP = *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*.

**Tabela 6:** Classificação dos isolados de *Trichoderma* spp. de acordo com o valor do percentual de redução de crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii*.

Tratamentos	Teste de antagonismo	Teste de produção de metabólitos voláteis	Teste de produção de metabólitos não-voláteis	Total	Colocação
T-12	75,52	54,9	17,3	147,72	1 <sup>o</sup>
T-07	77,14	13,1	48,9	139,14	2 <sup>o</sup>
T-02	76,15	23,8	1,4	101,35	3 <sup>o</sup>
T-09	73,75	8,9	18,6	101,25	4 <sup>o</sup>
T-06	82,42	9,6	0,3	92,32	5 <sup>o</sup>
T-04	71,82	18,9	0,6	91,32	6 <sup>o</sup>
T-10	66,26	8,9	14,4	89,56	7 <sup>o</sup>
T-05	79,46	0	5,2	84,96	8 <sup>o</sup>
T-03	77,22	2,7	1,0	80,92	9 <sup>o</sup>
T-11	69,53	10,7	-0,4	79,83	10 <sup>o</sup>
T-08	74,93	6,0	-2,5	78,43	11 <sup>o</sup>
T-01	67,30	0	-2,5	64,80	12 <sup>o</sup>

**Tabela 7:** Classificação dos isolados de *Trichoderma* spp. de acordo com o valor do percentual de redução de crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*

Tratamentos	Teste de antagonismo	Teste de produção de metabólitos voláteis	Teste de produção de metabólitos não-voláteis	Total	Colocação
T-12	100,00	10,8	44,8	155,60	1 <sup>o</sup>
T-07	98,00	10,6	11,6	120,20	2 <sup>o</sup>
T-08	95,10	7,0	8,4	110,50	3 <sup>o</sup>
T-02	96,40	9,8	-1,7	104,50	4 <sup>o</sup>
T-06	98,85	3,2	-0,3	101,75	5 <sup>o</sup>
T-03	94,80	5,6	-4,1	98,30	6 <sup>o</sup>
T-01	96,05	0	-1,8	94,25	7 <sup>o</sup>
T-05	83,20	14,0	-3,2	94,00	8 <sup>o</sup>
T-04	65,88	23,6	2,1	91,58	9 <sup>o</sup>
T-09	51,06	12,6	12,2	75,86	10 <sup>o</sup>
T-10	54,92	16,2	0,6	71,72	11 <sup>o</sup>
T-11	57,88	7,4	-2,8	62,48	12 <sup>o</sup>

**Tabela 8:** Classificação dos isolados de *Trichoderma spp.* de acordo com o valor do percentual de redução de crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*.

Tratamentos	Teste de antagonismo	Teste de produção de metabólitos voláteis	Teste de produção de metabólitos não-voláteis	Total	Colocação
T-04	49,99	6,5	3,0	59,49	1 <sup>o</sup>
T-05	52,90	9,4	-3,2	59,10	2 <sup>o</sup>
T-06	52,90	6,3	-0,5	58,70	3 <sup>o</sup>
T-12	48,39	7,2	0,3	55,89	4 <sup>o</sup>
T-07	46,32	10,1	-1,2	55,22	5 <sup>o</sup>
T-08	43,95	4,3	4,6	52,85	6 <sup>o</sup>
T-02	47,07	5,6	-0,3	52,37	7 <sup>o</sup>
T-03	49,83	0,2	0,4	50,43	8 <sup>o</sup>
T-11	50,00	1,1	-1,1	50,00	9 <sup>o</sup>
T-01	43,20	4,0	1,9	49,10	10 <sup>o</sup>
T-09	47,77	-0,7	1,9	48,97	11 <sup>o</sup>
T-10	45,76	0,2	0,4	46,36	12 <sup>o</sup>

Foram então selecionados os isolados T-01, T-02, T-04, T-06, T-07, T-09 e T-12 para o teste de controle biológico de *S. rolfsii*; assim como T-02, T-03, T-06, T-07, T-08, T-11 e T-12 para *R. solani*, e os isolados T-04, T-05, T-06, T-07, T-08, T-10 e T-12 para *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*.

### 3.4. CONCLUSÕES

- A maioria dos isolados de *Trichoderma* spp. demonstrou bom desempenho na competição por espaço e nutrientes, em relação a *Sclerotium rolfsii* e *Rhizoctonia solani* verificado no teste de antagonismo. Entretanto, nenhum deles mostrou habilidade contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*.
- No que se refere ao teste da produção de metabólitos voláteis, apenas o isolado T-12 foi aquele que demonstrou tendência na redução do crescimento do micélio de *Sclerotium rolfsii*. Os demais isolados testados não produziram metabólitos voláteis em qualidade e/ou quantidade suficientes para inibição do crescimento dos patógenos.
- Os isolados T-12 e T-07 produziram compostos não-voláteis que promoveram inibição acentuada do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*, respectivamente, sendo que T-07 produz compostos com ação também na inibição da germinação de escleródios de *S. rolfsii*.

## **4. CAPÍTULO II**

### **AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. COMO AGENTES DE BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS DE SOLO**

#### 4.1. RESUMO

Os testes realizados nessa etapa, tiveram como finalidade verificar em condições de casa-de-vegetação a possibilidade do biocontrole dos fitopatógenos *Sclerotium rolfsii* (SR), *Rhizoctonia solani* (RS) e *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (FOP) em pimentão (*Capsicum* sp.) cultivar “Casca Dura Ikeda”, alface (*Lactuca sativa* L.) cultivar “Regina”, e feijão-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar “Alessa”, respectivamente, utilizando como agentes antagonistas isolados de *Trichoderma* spp. selecionados *in vitro*. Inicialmente foram feitos 2 ensaios visando determinar a concentração de patógenos que promovessem um percentual considerável de *damping-off* de pós-emergência nas culturas-alvo: o teste de densidade de inóculo onde um inoculante à base de arroz previamente colonizado por cada um dos patógenos e posteriormente triturado. As doses utilizadas para *Rhizoctonia solani* em alface foram 0, 18, 36, 72 e 144 mg.kg<sup>-1</sup> de substrato comercial. Para *Sclerotium rolfsii* em pimentão as concentrações de 0, 10, 20, 40 e 60 escleródios.kg<sup>-1</sup> substrato. Utilizou-se por recipiente 40 sementes de alface e 30 de pimentão com 5 repetições em um delineamento experimental blocos ao acaso. Como resultados a dose de 144 mg.kg<sup>-1</sup> de inoculante contendo *Rhizoctonia solani* proporcionou 43 % de *damping-off* na cultura da alface. A dose 4 de *Sclerotium rolfsii* promoveu 16,58 de “tombamento” e essas foram as concentrações de inóculo utilizadas junto com aquela determinada para *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em feijão-vagem, onde foram inoculadas em substrato comercial alíquotas de uma suspensão contendo 4,75 x 10<sup>6</sup> conídios.ml<sup>-1</sup>, no teste de controle biológico, quando foram confrontados com isolados de *Trichoderma* spp. na concentração de 10<sup>9</sup> conídios.ml<sup>-1</sup> onde foram observadas a ocorrência ou não da redução do percentual da doença nas culturas utilizadas. Nesse teste o isolado T-03 demonstrou habilidade no controle de *R. solani* em alface cultivar “Regina”; com relação ao biocontrole de *S. rolfsii* em pimentão cultivar “Casca Dura Ikeda”, nenhum dos isolados antagonistas utilizados conseguiu inibir a incidência de *damping-off*, e com relação ao percentual de severidade (% RSD), T-06 promoveu redução de 43,49 % em plantas de feijão-vagem cultivar “Alessa” com “murcha” provocada por FOP.

## 4.2. ABSTRACT

Tests conducted during this stage aimed to check conditions for biocontrol of plant pathogens *Sclerotium rolfsii* (SR), *Rhizoctonia solani* (RS) and *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (FOP) on pepper cultivar Casca Dura Ikeda, lettuce "Regina" and snap bean cultivar "Alessa", respectively. It was used as antagonistic *Trichoderma* spp. selected *in vitro*. Initially, two tests were done to determine the concentration of pathogens that could promote a considerable percentage of *damping-off* of post-emergence on crops target. The doses used for *Rhizoctonia solani* in lettuce were 0, 18, 36, 72 and 144 mg.kg<sup>-1</sup> of a commercial substrate. The concentrations for *Sclerotium rolfsii* in bell pepper were 0, 10, 20, 40 and 60 sclerotiums.kg<sup>-1</sup> substrate. The container received 40 and 30 lettuce seeds with five replicates in a randomized block design. As results, the dose of 144 mg.kg<sup>-1</sup> inoculant containing *Rhizoctonia solani* provided 43% of *damping-off* on lettuce. The fourth dose of *Sclerotium rolfsii* promoted "tumbling" were inoculated with commercial substrate aliquots of a suspension containing 4.75 x 10<sup>6</sup> conidia mL<sup>-1</sup>. The strain T-03 has demonstrated the ability to control *R. solani* in lettuce "Regina", in relation to biocontrol of *S. rolfsii* in bell pepper cultivar "Casca Dura Ikeda.". None of the isolates used as antagonists could inhibit the incidence of *damping-off*, and with respect to the percentage of severity (% RSD), T-06, it was found a decrease of 43.49 % in bean plants cultivar-pod "Alessa" to "wilt" caused by FOP.

### 4.3. INTRODUÇÃO

Os fungos das espécies *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Sclerotium rolfsii* Sacc. e *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* são chamados fungos imperfeitos, segundo MOREIRA e SIQUEIRA (2002) pertencentes à divisão Deuteromycota, cujos fungos são popularmente denominados deuteromicetos, vivendo no solo saprofiticamente ou exercendo parasitismo sobre diversas culturas anuais ou perenes, animais e outros fungos presentes neste ambiente. Causam danos ao sistema radicular os sintomas de “tombamento” de plântulas e podridão de raiz de plantas (LUCON, 2010).

*Rhizotonia solani* geralmente, é encontrado na forma micelial, pois não produz esporos e utilizam como forma de sobrevivência no solo a formação de estruturas globulosas denominadas escleródios ou esclerócios (KRUGNER e BACCHI, 1995) que podem sobreviver no solo por, no mínimo, um ano (PÁDUA et al., 2007).

A espécie *Sclerotium rolfsii* caracteriza-se pela produção de micélio vigoroso e presença de grampos de conexão nas hifas e que sobrevivem na matéria orgânica do solo. É uma espécie de fungo mais encontrada e beneficiada em locais de temperaturas elevadas e com alta umidade no solo (SANTOS et al., 1997). Uma das características marcantes dos fungos dessa espécie, segundo os autores, é a necessidade de passarem por uma fase saprofítica antes de estarem aptos para promoção de doenças. A penetração do fungo na planta pode ser diretamente na interface superfície do solo-tecido da planta, ou por injúrias provocadas por agentes diversos.

Assim como *R. solani*, produz escleródios como estrutura de sobrevivência que pode ficar no solo por um longo período de tempo. Já o *Fusarium oxysporum* Schlecht. f.sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder de acordo com BIANCHINI et al. (1995-1997) é uma espécie de fungo que atua invadindo frequentemente as pontas das raízes, contudo podendo penetrar no hospedeiro por aberturas naturais como verticelas ou em ferimentos provocados.

Segundo BEDENDO (1995a), *damping-off* é um grupo de doença que incide além dos tecidos vegetais jovens (*damping-off* de pós-emergência), em sementes recém plantadas que apodrecem, devido à ação de patógenos presentes no solo ou veiculados na semente, antes da germinação e após o entumescimento deste órgão (*damping-off* de pré-emergência) reduzindo ambos o “stand” inicial de plantas no viveiro de produção de mudas ou no campo, sendo popularmente chamado de “tombamento”.

Como sintomas de *damping-off* de pós-emergência, nas plântulas são observados na região do colo, rente ao solo, o aparecimento de manchas encharcadas que com o tempo vão evoluindo para lesões profundas culminando com a constrição (contração) do caule, que por estar enfraquecido, tende a tombar.

As doenças vasculares ou “murchas” são aquelas onde o patógeno provoca danos ao sistema de transporte de seiva bruta (vasos xilemáticos), impedindo com isso a absorção de água e nutrientes pela planta. Como sintomas, em plantas adultas ocorrem clareamento das nervuras das folhas e mudança da tonalidade verde desse órgão que paulatinamente vai amarelecendo. Estes sintomas progridem das folhas mais velhas para as folhas mais jovens, podendo gradativamente promover a murcha das folhas ou brotos, necrose das bordas foliares, senescência de folhas, flores e frutos, a produção de raízes adventícias e, no último estágio, a destruição da planta (BEDENDO, 1995b).

Patógenos que provocam doenças vasculares, segundo o autor, são mais evoluídos que aqueles relacionados com *damping-off* e podridão de raízes, pelo fato dos primeiros serem específicos tanto em termos de hospedeiro, quanto ao tecido que infectam e como consequência, a classificação desses agentes chega ao grau de raças fisiológicas.



O controle biológico com isolados do fungo *Trichoderma* Persoon ex Fries, também deuteromiceto, é uma das alternativas para o combate desses microrganismos, visto que o uso de agrotóxicos em algumas situações, não demonstra controle satisfatório no controle das doenças por eles promovidas (DE CAL et al., 1995).

Assim sendo, os testes efetuados tiveram como meta verificar em condições de casa-de-vegetação a ocorrência do controle biológico dos fitopatógenos *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em pimentão “Casca Dura Ikeda”, alface “Regina” e feijão-vagem “Alessa”, respectivamente, nas concentrações de propágulo determinadas pelo teste de densidade de inóculo, com o emprego dos isolados de *Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole selecionados em condições de laboratório.

## 4.4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.4.1. Localização da Área de Estudo

Os testes inerentes a esta fase do trabalho foram conduzidos no Laboratório de Biologia do Solo da UFRRJ e em casa-de-vegetação da Área de Olericultura da PESAGRO-RIO/EES. Para a determinação da densidade de inoculo de *Rhizoctonia solani*, o teste foi realizado entre junho e setembro de 2009. No caso de *Sclerotium rolfsii*, o teste foi feito entre junho e agosto do mesmo ano. Os testes de controle biológico de *R. solani*, *S. rolfsii* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* foram realizados respectivamente entre julho e setembro de 2010, novembro de 2010 e janeiro de 2011 e dezembro de 2010 e fevereiro de 2011. Todos os microrganismos utilizados pertencem a micoteca da PESAGRO-RIO/EES cujo isolamento foi relatado nos testes *in vitro*.

### 4.4.2. Teste para Determinação da Densidade de Inóculo

Como relatado anteriormente, é necessário antes dos testes *in vivo* voltados para a confrontação entre os isolados de *Trichoderma* spp. e os fitopatógenos que se deseja controlar para se determinar a quantidade de inóculo de ambos.

Para os 3 patógenos (*R. solani*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* e *S. rolfsii*) foram realizados ensaios em casa-de-vegetação buscando um valor de densidade de inóculo necessário para causar um percentual satisfatório de *damping-off* em alface “Regina” e pimentão “Casca Dura Ikeda”, e de “murcha” em feijão-vagem “Alessa”.

Assim, inóculos desses patógenos foram repicados de tubos de ensaio da micoteca para placas de petri com meio BDA Difco mais chloramfenicol 98 %. As placas foram colocadas em BOD por 7 dias em 25°C com fotoperíodo de 12 horas.

O substrato para multiplicação de *R. solani* e antagonistas consistiu em arroz umedecido com água destilada (70 % p/v para colonização de acondicionados em sacos de polietileno de 20,5 x 12,0 cm lacrados, e autoclavados por 30 min a 120°C (1atm).

Um dia após o preparo do substrato, foram inoculados separadamente nesse substrato 3 discos de micélio de 8,0 cm das placas contendo *R. solani*. Os sacos foram colocados em BOD em 25°C de temperatura e fotoperíodo de 12 horas, sendo revolvidos diariamente até que se verificasse total colonização do fungo no substrato. Após o preparo dos substratos, estes foram colocados em sacos de papel e colocados para secagem em temperatura ambiente. Em seguida os substratos secos foram moídos em um triturador, e peneirados e se obtendo assim o inoculante de *R. solani*.

Foi feita autoclavagem em 120 °C (1 atm) por 30 minutos, do condicionador de solo Mecplant<sup>®</sup> (Anexo F) utilizado para o plantio dos hospedeiros (alface e pimentão), que foi distribuído em quantidades iguais em bandejas de alumínio medindo 22 x 17 x 3 cm. A partir do inoculante do patógeno foram inoculadas nas bandejas 5 doses (tratamentos). Todas as doses foram misturadas a 100 ml de solução de água destilada autoclavada + 1 gota de Tween 20, e espalhadas na superfície dos substratos.

Para *R. solani* testaram-se as doses 0, 18, 36, 72 e 144 mg.kg<sup>-1</sup> de substrato e acondicionados em casa-de-vegetação, onde após 4 dias seguiu-se o plantio de 40 sementes orgânicas de alface “Regina”.

Para *S. rolfsii*, foram feitas repicagens para placas de Petri contendo meio BDA Difco que foram colocadas em BOD em 25°C de temperatura e fotoperíodo de 12 horas, até que se verificasse a produção de escleródios nas placas.

As densidades de inóculo foram 0, 10, 20, 40 e 60 escleródios.kg<sup>-1</sup> substrato comercial Biomix<sup>®</sup> (Anexo F), respectivamente, onde 4 dias depois foi feito o plantio de 30 sementes orgânicas de pimentão “Casca Dura Ikeda” por recipiente. Para todos os testes foram feitas verificações diárias para se determinar o número de plântulas doentes durante 40 dias após a semeadura. No caso da cultura da alface e do pimentão, foi contabilizado o percentual de *damping-off* de pós-emergência.

Para o cálculo do % de *damping-off* de pós-emergência foi usada a fórmula: % T-PÓS = (Número de plântulas tombadas/Número de plântulas emergidas) x 100.

A partir da determinação dessas percentagens, foi escolhida para cada cultura a maior dose entre as melhores determinadas pela análise simples dos dados. Além dessa variável, foram avaliados os percentuais de emergência de plântulas e de sementes não germinadas que foram os outros critérios utilizados, nessa ordem, para a determinação da dose a ser empregada nos testes de controle biológico. O valor do percentual de emergência de plântulas foi determinado pela razão entre o número de plântulas emergidas (com e sem doenças) e o número total de sementes plantadas por recipiente.

O cálculo da percentagem de *damping-off* de pré-emergência foi impraticável devido ao tamanho diminuto das sementes e da dificuldade no resgate das mesmas. Quando isso ocorre, é difícil determinar ao certo qual dos microrganismos reisolados presentes na semente danificada influenciaram a não germinação desse órgão. Associado a isso, diversos fatores podem impedir a germinação além da ação de microrganismos como a falta ou excesso de água, embrião ou tegumento danificado, a profundidade de plantio (relacionado com a luminosidade), entre muitos outros.

#### 4.4.3. Testes de Biocontrole de Fitopatógenos

Para esta fase, foram reisolados os patógenos diretamente das plantas infectadas. Para isso, das plântulas lesionadas foram retirados fragmentos de tecidos que seguiram para desinfestação com solução de hipoclorito de sódio a 10 % por 1 minuto, sendo enxaguados com água destilada autoclavada para retirar o excesso da solução anterior. Os fragmentos de tecidos foram inoculados em placas de petri contendo meio BDA Difco mais chloramfenicol 98 % em câmara de fluxo laminar, e colocadas em BOD a25°C de temperatura e fotoperíodo de 12 horas onde após 3 dias realizou-se o processo de repicagem dessas placas, propágulos dos patógenos para meio BDA Difco que foram acondicionados novamente em BOD nas mesmas condições, para obtenção de culturas puras dos microrganismos, utilizadas para o preparo de inoculante à base de *R. solani*, para a produção de escleródios de *S. rolfsii* e para o preparo de uma suspensão de conídios de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*.

Assim, os ensaios desta etapa foram constituídos pelos tratamentos a seguir:

<b>Testemunha</b>		
<i>Sclerotium rolfsii</i> vs.:	<i>Rhizoctonia solani</i> vs.:	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> vs.:
T-01	T-02	T-04
T-02	T-03	T-05
T-04	T-06	T-06
T-06	T-07	T-07
T-07	T-08	T-08
T-09	T-11	T-10
T-12	T-12	T-12
Sem antagonistas (Testemunha adicional)		

Os isolados de *Trichoderma* foram repicados de tubos de ensaios onde se encontram conservados na micoteca para placas de petri contendo meio BDA Difco mais chloramfenicol 98% e acondicionados em BOD em 25° C de temperatura e 12 horas de fotoperíodo por 4 dias. Da mesma forma que foi feito para os patógenos, inoculados em arroz umedecido (70 % p/v) autoclavado para a multiplicação dos mesmos, que foram triturados e peneirados para obtenção dos inoculantes.

A concentração da suspensão de conídios dos isolados de *Trichoderma* spp. foi aquela utilizada por DE CAL et al. (1995), que utilizaram uma suspensão contendo 10<sup>9</sup> conídios.ml<sup>-1</sup> por cada 10 g de substrato. Para isso foram feitas soluções de água destilada + 1 gota de Tween 20 onde se aplicaram doses-padrões de cada inoculantes, preparando assim suspensões que se mantiveram em agitação contínua, de onde se retiraram alíquotas de 1 ml que foram transferidas para câmara de Neubauer e levadas à microscopia para contagem de conídios na suspensão, e por meio de transformações matemáticas, se estimar a quantidade de inoculante que contenha a concentração desejada de conídios de cada um dos isolados utilizados como antagonistas.

Assim como no teste para determinação da densidade de inóculo dos fitopatógenos, antes da inoculação das doses de antagonistas e fitopatógenos, foi utilizado substrato comercial autoclavado por 30 minutos em 120°C (1 atm) que foi distribuído nas bandejas de alumínio. Primeiramente foi feita a inoculação dos isolados de *Trichoderma* spp. nas quantidades de cada um dos inoculantes contendo o correspondente à 10<sup>9</sup> conídio.ml. adicionados em 100 ml de água destilada autoclavada + 1 gota de Tween 20, e misturados superficialmente ao substrato. Sete dias após realizou-se a inoculação do patógeno.

As bandejas de alumínio foram colocadas em casa-de-vegetação, onde após quatro dias executou-se o plantio das sementes das culturas utilizadas. As avaliações foram semelhantes ao teste e densidade de inóculo, onde semanalmente foi feita a contagem do número de plântulas tombadas (*damping-off* de pós-emergência) e ao final de cada experimento a estimativa, principalmente, do percentual de “tombamento” e do percentual de germinação utilizando as fórmulas e métodos utilizados nesse teste.

Para feijão-vagem se utilizou de uma escala de notas elaborada pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) (VAN SCHOONHOVEN e PASTOR-CORREALES, 1987) para se avaliar a severidade da doença onde: 1 – Plantas sem sintomas visíveis de “murcha”; 3 – Poucas folhas murchas (1 a 3) que representam 10 % ou mais de folhagem, sintoma acompanhado de descoloração vascular limitada aos tecidos radiculares e ao hipocótilo; 5 – Aproximadamente 25 % das folhas e hastes com “murcha” e clorose; 7 – Aproximadamente 50 % de folhas e hastes com “murcha”, clorose e necrose limitadas; planta com nanismo; 9 – Plantas mortas ou severamente infectadas com 75 % da folhagem e ramos com “murcha”, nanismo severo, clorose ou necrose com queda prematura.

#### 4.4.4. Delineamento Experimental

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso utilizando cinco repetições por tratamento. Para ambos os testes foram calculados a média com o desvio padrão. Para os testes de controle biológico foi feito o cálculo do percentual de redução dos valores das variáveis testadas comparando a média apurada para cada tratamento em relação ao quantificado pelo patógeno utilizando a fórmula:

$$\%RP = [( \% \text{ variável (x) do patógeno} - \% \text{ variável (x) do tratamento}) / \% \text{ variável (x) do patógeno}] \times 100$$

## 4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.5.1. Testes para Determinação das Densidades de Inóculo

#### a) *Rhizoctonia solani* x alface “Regina”

Os resultados obtidos nesse ensaio (Tabela 9) demonstram que as doses 3 e 4, que provocaram 43,27 e 41,03 % de “tombamento” de pós-emergência de plântulas de alface. Todavia, a dose 4 (144 mg.kg<sup>-1</sup> de substrato) foi a escolhida, seguindo o estabelecido como critério em “Material e Métodos”. Com esta mesma densidade de inóculo SANTOS et al. (2005) observaram entre 40 e 50 % de intensidade de “tombamento” em experimento envolvendo *Rhizoctonia solani* e feijão.

Uma observação a ser feita é o percentual de emergência de plântulas da testemunha (64 %) que pode ser considerado médio. Os valores encontrados para o percentual de germinação, ao contrário das outras variáveis avaliadas, foram inversamente proporcionais à dose de inoculante contendo *Rhizoctonia solani* aplicado no substrato, indicando a influência da densidade de inóculo desse patógeno na incidência da doença.

**Tabela 9:** Percentuais de “tombamento”, de emergência de plântulas, e de sementes não germinadas de alface cultivar “Regina” de acordo com as densidades de inóculo de *Rhizoctonia solani* testadas.

Tratamentos	Densidade de inóculo (mg.kg <sup>-1</sup> )	Percentual de “tombamento” (%)	Percentual de emergência de plântulas (%)
Dose 4	144	41,03±19,8	42,0±22,7
Dose 3	72	43,27±32,0	46,0±19,6
Dose 2	36	35,19±25,0	48,6±13,9
Dose 1	18	23,18±20,1	51,0±8,9
Testemunha	0	0	64,0±9,9

Não houve diferença significativa entre os tratamentos com relação ao percentual de emissão de plântulas (Tabela 9). Verificou-se, pelos valores das médias, que há um acréscimo do percentual de sementes desta variável com o aumento da concentração de inóculo, podendo ser considerado um indicativo da ação do fitopatógeno, principalmente com relação a incidência de *damping-off* de pré-emergência.

#### b) *Sclerotium rolfsii* x pimentão “Casca Dura Ikeda”

Para o ensaio *S. rolfsii* x pimentão, como resultado, observa-se na tabela 10 que não houve diferença marcante entre os melhores tratamentos, as doses 2 e 4, em relação ao percentual de doenças. Porém, a dose 4 por ter uma concentração maior de escleródios associado ao fato de ser um dos melhores tratamentos testados, foi escolhido para a sequência do experimento. Quanto ao percentual germinativo não houve diferença significativa entre os tratamentos empregados para essas variáveis.

**Tabela 10:** Percentuais de “tombamento”, de emergência de plântulas, e de sementes não germinadas de pimentão “Casca Dura Ikeda” de acordo com as densidades de inóculo de *Sclerotium rolfsii* testadas.

Tratamentos	Densidade de inóculo (mg.kg <sup>-1</sup> )	Percentual de “tombamento” (%)	Percentual de emergência de plântulas (%)
Dose 4	60	16,58±6,5	48,6±13,9
Dose 3	40	4,91±3,2	44,4 ±17,4
Dose 2	20	16,67±6,7	47,2 ±21,9
Dose 1	10	6,03±5,8	45,4 ±6,9
Testemunha	0	0	46,4 ±6,9

c) *Fusarium oxysporum f.sp. phaseoli* x feijão-vagem “Alessa”

Foi preparada suspensão de conídios de *Fusarium oxysporum f.sp. phaseoli* onde foram utilizadas culturas puras desse patógeno inoculadas em meio de cultura BDA Difco. Tal suspensão foi levada à leitura em uma câmara de Neubauer para se estimar a quantidade de conídios presentes por cada ml de suspensão. Tal procedimento determinou a concentração de  $4,75 \times 10^6$  conídios.ml<sup>-1</sup> de suspensão que foi utilizada no teste de biocontrole.

**4.5.2. Testes de Controle Biológico de Patógenos**

a) *Trichoderma spp. x Rhizoctonia solani*

Quanto ao controle de *R. solani*, observa-se através do percentual de *damping-off* de pós-emergência de plântulas de alface (Tabela 11) que os tratamentos T-06, T-08, T-02, T-12, T-11 e T-07 se aproximaram ao valor do percentual de doença da testemunha RS, e o isolado T-06 alcançou 32,41 % de “tombamento” a mais que RS.

Embora a literatura não mencione *Trichoderma spp.* como promotor de doenças, estudos devem ser realizados voltados para verificar se há interação de fitopatógenos com isolados deste agente de biocontrole resultando na promoção de fitomoléstias, no caso utilizando os isolados RS e T-06 juntos e isoladamente.

Os tratamentos com os isolados T-03 e T-07, além da testemunha, totalizaram menores percentuais de doença em comparação com o isolado RS, reduzindo em 86,32 e 31,18 %, respectivamente, na incidência de *damping-off*. Assim, o isolado T-03 demonstra habilidade no controle de *R. solani* em alface cultivar “Regina”.

Lembrando que este isolado, junto com quatro dos melhores tratamentos mencionados antes, foi aquele que teve o melhor desempenho no somatório total dos testes realizados *in vitro*, não repetindo o desempenho nessas condições. Por outro lado, o tratamento T-11, que demonstrou pouca habilidade no biocontrole de *R. solani* em condições de laboratório, foi um dos que estatisticamente se igualaram a RS, em termos de percentual de doença confirmando assim seu baixo desempenho no controle do patógeno em questão.

**Tabela 11:** Valores dos percentuais de “tombamento” e de emergência de plântulas de alface cultivar “Regina” promovidas por *Rhizoctonia solani*, perante tratamento com isolados de *Trichoderma*, e da redução desses valores em relação ao determinado pelo patógeno (% RP).

Tratamentos	Percentual de “tombamento” (%)	% RP	Percentual de emergência de plântulas (%)	% RP
Testemunha	1,38±6,9	97,47	73,0±4,1	2,09
RS	54,70±32,2	0	71,5±4,5	0
T-02	43,94±43,3	19,67	71,5±7,2	0
T-03	7,48±11,7	86,32	69,0±4,2	-3,49
T-06	72,43±31,4	-32,41	70,5±6,2	-1,39
T-07	37,64±36,9	31,18	63,0±5,7	-11,88
T-08	61,18±36,5	-11,84	72,0±13,4	0,69
T-11	40,05±28,0	26,78	70,5±8,2	-1,39
T-12	43,83±25,3	19,87	64,5±12,4	-9,79

Uma observação pertinente é que T-03 e T-07 foram isolados de amostras de terra coletadas da rizosfera de diversas culturas incluindo alface (**Anexo A**) o que pode representar em uma estreita relação desses isolados com a cultura.

Uma das hipóteses que poderia explicar o menor percentual de “tombamento” de plantas de pós-emergência no tratamento com o isolado T-06, pode ter sido o chamado efeito aditivo desses, ou seja, tais isolados estariam supostamente estimulando ou criando condições para a ocorrência da doença nas plantas de alface.

PEDROSA e TELIZ (1992) detectaram aumento de *damping-off* de pós-emergência em feijoeiro quando *R. solani* e *Phytophthora* spp. foram inoculados concomitantemente. Trabalhando com uso isolado ou em conjunto dos fungos *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* e *R. solani*, responsáveis pela podridão de raiz em feijoeiro, TOLEDO-SOUZA et al. (2009) comprovaram que a severidade dessa doença por FSP era potencializada por *R. solani* quando esses eram inoculados no mesmo recipiente.

Com relação ao percentual de germinação, além da testemunha, todos os isolados se comportaram semelhantes em relação ao tratamento utilizando RS. Por sua vez, nenhum tratamento obteve percentual de emergência de plantas maior que a testemunha absoluta. SUDO MARTELLETO (2009) desenvolveu um experimento voltado para o biocontrole de *Rhizoctonia* sp. utilizando cinco tratamentos incluindo três isolados de *Trichoderma* spp. através de microbiolização de sementes de duas variedades de tomate, e em substrato inoculado e não inoculado com o patógeno em questão, obteve percentual de emergência inferior com os isolados antagonistas em comparação com a testemunha (água + Tween).

### b) Trichoderma spp. x Sclerotium rolfsii

A incidência de “tombamento” de pós-emergência, com exceção do tratamento com T-12 e da testemunha, foi alta em comparação dos tratamentos mencionados com a testemunha adicional (*S. rolfsii*) (Tabela 12) onde foram observados valores entre 800 e 2.300 no percentual da doença.

**Tabela 12:** Valores dos percentuais de “tombamento” e de emergência de plântulas de pimentão cultivar “Casca Dura Ikeda” promovidas por *Sclerotium rolfsii* (SR), perante tratamento com isolados de *Trichoderma*, e da redução desses valores em relação ao determinado pelo patógeno (% RP)

Tratamentos	Percentual de “tombamento” (%)	% RP	Percentual de emergência (%)	% RP
Testemunha	0	-100	88,0±11,7	6,45
SR	1,57±2,1	0	82,6±7,6	0
T-01	17,33±35,2	1004,5	77,3±15,7	-6,45
T-02	43,79±43,4	2690,0	78,0±5,6	-5,64
T-04	14,46±30,4	821,7	75,3±16,3	-8,87
T-06	28,92±41,6	1743,1	83,3±9,4	0,80
T-07	20,42±31,5	1201,0	84,0±6,4	1,61
T-09	37,90±50,0	2315,4	68,0±20,1	-17,74
T-12	0	-100	81,3±15,0	-1,61

Conforme AGRIOS (1997), *Trichoderma* sintetiza enzimas como celulases, proteases, lípases e glucanases que podem estar envolvidas na maceração de tecido de plântulas colonizadas por este fungo com a promoção da degradação da parede celular. Em um experimento envolvendo o isolado RF1 de *T. viride*, MENZIES (1993), demonstrou patogenicidade desse isolado para a germinação de mudas de pimentão, além de pepino e tomate.

Diante desses fatos e dos resultados encontrados no teste de biocontrole, é possível concluir que o percentual de *damping-off* foi devido mais à ação deletéria dos isolados de *Trichoderma* utilizados do que *S. rolfsii*, visto que no tratamento onde se utilizou somente este isolado, houve um baixo percentual da doença.

Ao contrário do que foi apurado, em um trabalho empregando 20 isolados de *Trichoderma* visando o controle de *S. rolfsii* na cultura da soja em casa-de-vegetação, GOMES et al. (2005) verificaram controle desse patógeno com valores acima de 79 % de redução da doença.

### c) Trichoderma spp. x Fusarium oxysporum f.sp. phaseoli

Os resultados mostram que ocorreram plantas com sintomas de “murcha” em todos os tratamentos com a nota variando de 1,64 até 3,7 (Tabela 13). Além da testemunha adicional ou infectada (FOP) que atingiu 3,42, o tratamento com o isolado antagonista T-08 teve nota ligeiramente superior ao tratamento citado, com 3,7, e foi o único isolado que incrementou a taxa de severidade da fusariose. Em relação ao percentual de severidade (% RSD), além da testemunha principal (sem microrganismos), que totalizou em média 51,92 % de redução desse índice, T-04, T-05 e T-06 promoveram redução de 34,97; 37,19 e 43,49, nessa ordem, em comparação com a testemunha adicional (infectada).

NASHWA et al. (2008) detectaram redução da incidência de “Murcha de *Fusarium*” em feijão cultivar Giza 3 com o uso de formulações à base de *T. harzianum*, *T. viride* e *T. spirale* que atingiram, em média, as notas 3,7; 4,1 e 5,2, respectivamente, enquanto que a



testemunha infectada somente com FOP cuja atribuiu nota 8,0. Ainda sobre esse trabalho, embora havendo decréscimo na incidência da doença, os valores das médias das notas foram superiores aos encontrados nesse experimento.

PODDAR et al. (2004) reportaram que *T. viride* e *T. harzianum* têm habilidade antagonista comprovada através de vários experimentos de biocontrole de fitopatógenos de solo e de sementes. Verifica-se também que não houve influência considerável no percentual de emergência de sementes (% RE).

**Tabela 13:** Avaliação da severidade de “murcha” e do percentual de emergência de plantas de feijão-vagem cultivar “Alessa” submetidos a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (FOP) e utilizando isolados de *Trichoderma* como antagonistas, e da redução desses valores em relação ao determinado pelo patógeno (% RSD e % RE)

Tratamentos	Severidade de “murcha” (Notas)	% RSD	Percentual de emergência (%)	% RE
Test.	1,64±0,5	-51,92	88,12±7,1	2,91
FOP	3,42±2,2	0	85,62±4,7	0
T-04	2,22±1,0	-34,97	98,12±2,8	14,59
T-05	2,14±0,5	-37,19	95±4,2	10,94
T-06	1,93±0,5	-43,39	93,12±8,7	8,75
T-07	3,24±2,5	-5,26	91,87±8,4	7,29
T-08	3,70±2,4	8,24	90±10,5	5,10
T-10	3,10±3,0	-9,18	95,62±3,6	11,67
T-12	2,76±2,2	-19,23	94,37±4,1	10,21

AVENDAÑO e RONDON (2006) não foram bem-sucedidos no biocontrole de FOP em feijão da cultivar ICA Tundama, onde *Trichoderma* sp., entre outros tratamentos antagonistas, apresentou diminuição não satisfatória na incidência de “murcha vascular” nessa cultura.

Embora não tenha sido o objetivo desse trabalho, é interessante aproveitar experimentos como esse para se saber o grau ou nível de resistência do(s) genótipo(s) utilizado a determinado fitopatógeno. Assim, com o auxílio do índice de doenças de MACKINNEY, conforme BALARDIN et al. (1990), que considera três tipos de reação de plantas a um patógeno, sendo elas: resistente, intermediário e suscetível, com valores de até 33,3; 66,6 e 100,0 %, respectivamente. Esses valores foram encontrados através da fórmula para cálculo do índice de doença (ID) que inclui as notas dadas pela escala do CIAT. Usando apenas o tratamento testemunha infectada com FOP, verifica-se ID = 38,9 % em média, o que inclui o feijão-vagem cultivar “Alessa” como genótipo com resistência intermediária ao patógeno empregado, e pode justificar os valores baixos das notas referentes à severidade de FOP nessa cultivar.

#### 4.4. CONCLUSÕES

- Pelos resultados alcançados, pode-se afirmar que os isolados de *Trichoderma* spp. T-03 e T-07 contra *R. solani* assim como T-04, T-05 e T-06 para e *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* são promissores como agentes de biocontrole também em condições de casa-de-vegetação.
- É possível que exista uma interação entre o isolado T-06 e *R. solani* (RS) visto que houve um incremento na incidência de “tombamento” com esses tratamentos
- Existem diferenças entre isolados de *Trichoderma* spp. testados quanto à ação antagônica sobre os três patógenos empregados.
- Ensaios em condições de laboratório nem sempre refletem o que ocorre *in vivo*, pois foi visto que os melhores antagonistas *in vitro* nem sempre repetiram o desempenho no controle biológico de fitopatógenos em casa-de-vegetação.

## **5. CAPÍTULO III**

### **CONTRIBUIÇÃO DE ISOLADOS DE FUNGOS DO GÊNERO *Trichoderma* spp. PARA O CRESCIMENTO DE PLANTAS**

## 5.1. RESUMO

Nesta etapa do experimento, foi avaliada em condições *in vivo*, a contribuição do crescimento de duas culturas: alface (*Lactuca sativa* L.) “Regina” nos estádio de muda e no ponto de comercialização, respectivamente, aos 30 e 35 dias após a semeadura, e braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf) até o final da fase vegetativa (70 dias após a semeadura) por intermédio de 12 isolados de *Trichoderma* spp. incluídos individualmente em inoculante em pó à base de arroz inoculados em substrato comercial Holambra<sup>®</sup> autoclavado e acondicionados em vasos de plástico. A dose de cada um dos inoculantes teve o equivalente a  $10^9$  conídios.ml<sup>-1</sup> de uma suspensão de 100 ml preparada utilizando o inoculante mais água destilada autoclavada acrescida de uma gota de Tween 20. O delineamento experimental utilizado será o blocos ao acaso com 5 repetições. Ao final desse trabalho, foram mensurados alguns caracteres relacionados à produção de biomassa como percentual de germinação, altura da muda, diâmetro do caule, número de folhas, os massas médios e totais da matéria fresca e seca da folha, do caule, da raiz e da planta. Como resultados principais verificam-se no estádio de muda da cultivar de alface que os isolados de *Trichoderma* spp. T-01, T-02, T-07 e T-10, nas variáveis relacionadas com a folha, o caule, a raiz ou a planta inteira, promoveram aumento ou decréscimo em algumas situações do percentual de crescimento comparada à testemunha. Para esta mesma cultura na sua fase de comercialização, os isolados T-03, T-04 e T-06 promoveram maior crescimento relativo entre as variáveis utilizadas. Por outro lado, o isolado T-10 demonstrou habilidade inibitória especialmente no crescimento do sistema radicular. Em relação à braquiária foi verificado aumento de 20,11 % na produção de biomassa nos colmos pelo isolado T-05. Todavia, o tratamento T-01 foi responsável pelo decréscimo na média da massa fresca e na massa seca de raiz em 33,5% e 25,4 %, respectivamente. Nos três ensaios a maioria dos isolados de *Trichoderma* spp. promoveram aumentos consideráveis na relação parte aérea/raiz, e o destaque ficou coma o isolado T-10 que teve grande influência no aumento relativo em 178 % à mais de matéria seca na parte aérea quando comparado com o obtido pelo tratamento testemunha no trabalho envolvendo os isolados de *Trichoderma* spp. Este resultado se deve ao efeito inibitório desse isolado para a raiz.

## 5.2. ABSTRACT

At this stage of the experiment it was evaluated, *in vivo* conditions, the growth regulation of two crops: lettuce "Regina" and *Brachiaria decumbens* after inoculated with 12 isolates of *Trichoderma* spp. introduced in commercial substrate Holambra® autoclaved and packaged in plastic pots. The dosage of each inoculum was equivalent to 109 conidia mL<sup>-1</sup> of a suspension of 100 ml inoculum prepared in sterile distilled water plus one drop of Tween 20. The experimental design was blocks with five replications. At the end of this study, several traits were measured related to biomass production, such as: seed germination, seedling height, stem diameter, leaf number, the mean weight and total fresh and dry leaf, stem, root and plant. *Trichoderma* spp. T-01, T-02, T-07, and T-10 caused an increase or decrease in some plant variables, and in the percentage of growth compared to control. Isolates T-03, T-04, and T-06 caused the highest relative growth between the variables. On the other hand, the isolated T-10 showed inhibitory ability especially in root growth. Regarding *Brachiaria*, an increase of 20.11% in biomass production in shoots was caused by isolate T-05. However, the treatment T-01 was responsible for a decrease in dry and fresh weight of root by 33.5 % and 25.4 % respectively. In all studies most isolates of *Trichoderma* spp. promoted substantial increases in the ratio shoot / root, and the highlight was the isolated T-10 that had greater influence on the relative increase of 178% of shoot dry matter compared with that obtained by the control treatment. This result was attributed to the inhibitory effect of the isolated to the root.

### 5.3. INTRODUÇÃO

A agricultura é uma atividade primordial para o homem. Em um mundo onde a demanda por alimentos aumenta a cada momento, torna-se necessário o emprego de técnicas que maximizem a produtividade das culturas.

A aplicação adequada de fertilizantes associada ou não a outras práticas culturais busca levar a máxima produção de biomassa pelas plantas refletindo em uma maior produtividade por estas. Todavia, macro e micronutrientes podem ficar indisponíveis para as plantas devido à ocorrência de processos biológicos, físicos e químicos no ambiente solo.

O uso de fitorreguladores sintéticos é uma prática restrita a algumas áreas específicas dentro da agricultura como na propagação de plantas, na cultura de tecidos e no controle de ervas daninhas, promovendo ou inibindo o crescimento e o desenvolvimento de órgãos e tecidos vegetais. Entretanto, esses produtos estão mais acessíveis à grandes produtores pelo fato de serem caros, de exigirem mão-de-obra especializada para a sua aplicação quase exclusivamente para plantas perenes e/ou que acarretam alto retorno financeiro e cujo uso em plantas anuais seria antieconômico.

Microrganismos de solo que podem além de promover o controle biológico de patógenos de solo produzem substâncias reguladoras do crescimento de plantas (SRCP) do grupo das auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002) incluindo fungos do gênero *Trichoderma* spp. sendo que algumas dessas SRPCs são benéficas às plantas promovendo o seu crescimento.

Conforme mencionado anteriormente, diversos autores através de trabalhos apontam fungos do gênero *Trichoderma* spp. como responsável pela melhoria no percentual germinativo de sementes, além de promover maior produção de massa verde em quantidade, massa fresco e área foliar, no crescimento de plantas em altura e espessura do caule e no comprimento e massa fresco de raiz, como resultado da maior disponibilidade de nutrientes e da produção de substâncias promotoras de crescimento.

Diante desses aspectos, o objetivo dessa etapa foi estudar o efeito dos isolados de *Trichoderma* spp. na promoção do crescimento de alface cultivar “Regina” e braquiária espécie *Brachiaria decumbens*, através da sua produção de biomassa. A escolha dessas espécies foi baseada nos critérios: disponibilidade de sementes orgânicas; ciclo de vida diferente, e no órgão vegetal de maior interesse em relação à produção de biomassa (no caso a folha).

## 5.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1. Localização da Área de Estudo

Os experimentos relativos a esta fase do trabalho foram realizados no Laboratório de Biologia do Solo da UFRRJ e em casa-de-vegetação da Área de Olericultura da PESAGRO-RIO/EES, utilizando 12 isolados de *Trichoderma* spp. pertencentes à micoteca desta última. O experimento para a determinação da influência de *Trichoderma* spp. no crescimento de plantas de alface aos 30 e 35 dias após a semeadura foi realizado entre agosto e outubro de 2010. Já para braquiária o ensaio foi feito no período compreendido entre novembro de 2010 e janeiro de 2011.

### 5.2.2. Testes para a Verificação da Ocorrência de Contribuição de *Trichoderma* spp. no Crescimento de Plantas

Foi montado um experimento, para a alface cultivar “Regina” que consistiu em inoculação prévia em substrato da suspensão contendo cada um dos 12 inoculantes na concentração de  $10^9$  conídios.ml<sup>-1</sup> de suspensão. Para tal, de cada um dos inoculantes em forma de pó foi retirada uma alíquota correspondente à essa concentração e adicionada a 100 ml de água destilada autoclavada por 30 minutos em 120°C contendo Tween 20 (1 gota do produto por 2.000 ml de água).

Estas suspensões junto com a testemunha principal (água destilada autoclavada + Tween 20) e a testemunha adicional (arroz triturado + água destilada autoclavada + Tween 20) sendo este utilizado na maior quantidade ente os 12 inoculantes, foram inoculadas em vasos plásticos de 1 litro contendo 600 g de substrato comercial Hollambra® (Anexo F) autoclavado por 30 minutos em 120 °C. Sete dias após esta inoculação, foi feita a semeadura de alface “Regina” utilizando inicialmente 20 unidades propagativas por vaso de 1 litro, em um total de 5 repetições. Dez dias após a semeadura foi feito o levantamento do número de plântulas normais, do numero de plântulas anormais e de sementes não germinadas, para o cálculo do percentual de emergência de plântulas de cada um dos tratamentos.

Em seguida, foi feito o desbaste de plântulas deixando em cada uma das repetições cinco unidades entre as quais quatro permaneceram nesses recipientes até o estágio de muda (30 DAS) e uma planta até o ponto de comercialização (35 DAS). Todas essas plantas foram avaliadas quanto às variáveis de crescimento mencionadas abaixo.

Com relação ao experimento com braquiária, utilizou-se de vasos plásticos de 1 litro onde foram plantadas dez sementes por vaso e após o desbaste foram mantidas duas plantas que seguiram para avaliação quanto ao efeito dos isolados na promoção de crescimento após atingirem 45 dias do ciclo da cultura.

Para a alface foram mensurados:

% NPN – percentagem do numero de plantas normais = (número de plântulas normais/número de sementes plantadas) x 100

% SÑG – percentagem de sementes não germinadas = (número de sementes não germinadas/número de sementes plantadas) x 100

NF – número de folhas

MFF – massa fresca de folhas

XMFF – média da massa fresca de folhas = (massa fresca de folhas/ número de folhas)

MSF– massa seca de folhas

XMSF – média da massa seca de folhas = (massa seca de folhas/ número de folhas)  
 COMPF – comprimento de folhas  
 XCOMPF – média do comprimento de folhas = (comprimento de folhas/número de folhas)  
 COMPC – comprimento de caule  
 MFC – massa fresca de caule  
 MFPA – massa fresca da parte aérea  
 XMFPA – média da massa fresca da parte aérea = (média da massa fresca das folhas + média da massa fresca de caule)  
 MSC – massa seca de caule  
 MSPA – massa seca da parte aérea  
 XMSPA – média da massa seca da parte aérea = (média da massa seca das folhas + média da massa seca do caule)  
 COMPR – comprimento de raiz  
 XCOMPR – média do comprimento de raiz = (comprimento de raiz/número de raízes)  
 MFR – massa fresca de raiz  
 XMFR – média da massa fresca de raiz = (massa fresca de raiz/número de raízes)  
 MSR – massa seca de raiz  
 XMSR – média da massa seca de raiz = (massa seca de raiz/número de raízes)  
 TMFpl – total da massa fresca da planta = (massas fresca da parte aéreas + massa fresca de raiz)  
 TXMFpl – total das médias da massa fresca da planta = (média do total da massa fresca da parte aérea + média do total da massa fresca da raiz)  
 TMSpl - total da massa seca da planta = (massas seca da parte aéreas + massa seca de raiz)  
 TXMSpl – total das médias da massa seca da planta = (média do total da massa seca da parte aérea + média do total da massa seca da raiz)  
 PA/RAIZ – relação parte aérea/raiz = (massa seca da parte aérea/massa seca da raiz)

Para a braquiária, além das características acima, foram mensurados:

COMPP – somatório do comprimento dos perfilhos por planta.  
 XCOMPP – média do somatório do comprimento dos perfilhos por planta = (somatório do comprimento dos perfilhos/número de perfilhos)  
 MFP – massa fresca de perfilhos  
 MSP – massa seca de perfilhos  
 NPER – numero de perfilhos  
 XMFP – média da massa fresca de perfilhos = (massa fresca de perfilhos/ número de perfilhos)  
 XMSP – média da massa de materia seca de perfilhos = (massa seca de perfilhos/ número de perfilhos)

### 5.2.3. Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com cinco repetições por tratamento. Foram apurados os valores das médias dos tratamentos com o desvio padrão. Foi feito o cálculo do percentual de crescimento relativo (% Cr) onde as médias de cada tratamento foram comparadas àquela atingida pelo tratamento testemunha com a finalidade de verificar a existência de aumento ou decréscimo nos valores das variáveis testadas.

Para isso foi empregada a formula:

$$\% Cr = [(X. Tratamento - X. Testemunha) / X. Testemunha] * 100.$$



### 5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### a) Trichoderma + Alfaca “Regina” – estágio de muda

Em relação ao percentual de sementes não germinadas, não houve diferença marcante entre os isolados (Tabela 14), mas T-12 e T-03 conferiram menores índices dessa variável (35,29 e 29,41 %, respectivamente). Por outro lado, o isolado T-02 proporcionou 29,41 % a mais de sementes não germinadas em comparação com a testemunha.

Entre as variáveis testadas os resultados mais interessantes estão na variável massa fresca de folha (MFF) onde além da testemunha adicional (arroz triturado puro), T-01, T-07 e T-10 apresentaram entre 24 e 28 % de aumento em relação a testemunha. Além da testemunha adicional com 25,5 % de redução, nenhum dos isolados conferiu percentagem de crescimento em termos da média da massa fresca da folha (XMFF) indicando que, com exceção daquele primeiro tratamento, os demais não interferiram positivamente nessa variável.

Enquanto o isolado T-02 proporcionou redução de 28,1 % na altura das mudas por ele tratadas, houve 30,5 % de aumento de comprimento de caule (COMPC) de plantas submetidas ao isolado T-07, sendo assim considerado como agente promissor na formação de mudas de alface maiores.

Ainda na Tabela 14, nota-se que os tratamentos de alface com testemunha adicional, T-01, T-02, T-03, T-09 e T-10 promoveram decréscimo no percentual da média da massa fresca do caule (entre 20,6 e 34,9 %). Para a massa seca desse órgão (MSC), tratamento adicional, T-01, T-02, T-03, T-05 e T-10 formam grupo de tratamentos responsáveis pela queda de produção de biomassa entre 22 e 28 %.

Na parte aérea das mudas de alface “Regina” (Tabela 15) várias características apresentaram maiores percentuais de decréscimo quando comparado à testemunha principal. Houve diminuição da massa fresca (MFPA) e da média dessa (XMFPFA) para todos os tratamentos testados, onde testemunha adicional, T-01, T-07 e T-10 provocaram o decréscimo de 29,2; 25,0; 22,7 e 24,8, nessa ordem, na massa fresca (MFPA). Mais uma vez a testemunha adicional, T-01 e T-10 juntos com T-02, T-03 e T-05 conferiram redução na média da massa seca da parte aérea (XMFPFA), variando entre 20,1 e 29,7 %.

Os resultados apontam que as mudas de alface crescidas em substrato tratado com os isolados T-01, T-02 e T-03 apresentaram maior taxa de aumento na média do comprimento de raiz (25,0; 29,8 e 23,7 %, respectivamente). Entretanto, T-04, T-08, T-10 e T-11, conferiram entre 20 e 29 % de raízes menores que a testemunha principal.

Os isolados T-01 e T-02 apresentaram, respectivamente, 24,2 e 33,6 % de aumento na massa seca que influenciou na média da massa seca de raiz (Tabela 16), onde esses isolados conferiram incrementos de 24,1 e 27,2 %, respectivamente. Os isolados T-05, T-07, T-08, T-09, T-10 e T-11 promoveram redução na massa seca de raiz entre 26 e 53 %, repercutindo na razão entre essa variável e o número de raízes (XMSR).

REIS et al. (2006) relataram que plantas com sistema radicular pouco desenvolvido tem menor taxa de crescimento e estão sujeitas aos efeitos deletérios em ambientes onde o déficit hídrico ocorre com frequência.

Em se tratando da planta (Tabela 16) o isolado T-01 proporcionou mudas de alface “Regina” com decréscimo de 24,3 % em relação à massa fresca das mudas. Por sua vez, T-05 foi contribuiu para a redução relativa em 32,2 %, no percentual obtido pela testemunha no total das médias da massa fresca de plantas (TXMFpl).

Em ensaio envolvendo duas cultivares de alface, BAL e ALTINTAS (2008) obtiveram aumento significativo na massa fresca de plântulas de alface na cultivar Yedikule em substrato tratado com três doses de um produto comercial à base de *T. harzianum*, o TrichoFlow WP<sup>®</sup>, da Agrimm Technologies Ltd. na dosagem de 15g.m<sup>-2</sup>. Entretanto, não teve sucesso em aumento no comprimento de plântulas, no número de folhas, e em comprimento e massa de raiz. Nenhum incremento foi observado na outra cultivar testada, a Coolguard nas variáveis avaliadas.

Todos os tratamentos proporcionaram maior acúmulo de biomassa na parte aérea quando comparado ao sistema radicular, verificado nos valores encontrados para a relação parte aérea/raiz, onde os isolados T-04, T-05, T-07, T-08 e T-09 conferiram taxa de acréscimo na produção de biomassa entre 40 e 89,3 % em relação ao obtido pela testemunha nessa variável.

**Tabela 14:** Valores do percentual de sementes não germinadas (% SÑG), massa fresca de folhas (MFF), média da massa fresca de folhas (XMFF), comprimento do caule (COMPC), massa fresca da parte aérea (MFPA) e do percentual de crescimento relativo (% Cr) de alface cultivar “Regina” aos 30 dias após a semeadura.

<b>TRAT.</b>	<b>%SÑG</b>	<b>% Cr</b>	<b>MFF (g)</b>	<b>% Cr</b>	<b>XMFF (g)</b>	<b>% Cr</b>	<b>COMPC (cm)</b>	<b>% Cr</b>	<b>MSC (g)</b>	<b>% Cr</b>
<b>TEST</b>	34,00±6,52	0	8,16±1,08	0	0,27±0,04	0	17,26±3,12	0	0,047±0,012	0
<b>ARROZ</b>	39,00±19,81	14,71	5,82±1,52	-28,68	0,20±0,03	-25,51	16,72±2,19	-3,13	0,034±0,004	-28,48
<b>T-01</b>	38,00±12,04	11,76	6,2±0,62	-24,02	0,22±0,01	-17,28	14,78±3,09	-14,37	0,037±0,003	-22,22
<b>T-02</b>	44,00±7,42	29,41	7,78±1,29	-4,66	0,25±0,03	-6,49	12,40±2,08	-28,16	0,036±0,007	-23,97
<b>T-03</b>	24,00±11,94	-29,41	6,74±1,18	-17,40	0,22±0,03	-18,04	14,40±3,03	-16,57	0,034±0,009	-27,63
<b>T-04</b>	29,00±8,22	-14,71	7,44±1,00	-8,82	0,26±0,03	-3,02	19,38±3,50	12,28	0,047±0,004	0,38
<b>T-05</b>	37,00±7,58	8,82	7,32±1,14	-10,29	0,24±0,02	-10,34	14,22±2,67	-17,61	0,036±0,011	-24,18
<b>T-06</b>	35,00±12,75	2,94	8,18±0,82	0,25	0,27±0,02	-0,43	17,20±4,06	-0,35	0,045±0,006	-4,85
<b>T-07</b>	36,00±10,84	5,88	6,08±1,43	-25,49	0,22±0,05	-16,12	22,54±4,16	30,59	0,046±0,016	-2,26
<b>T-08</b>	31,00±11,94	-8,82	7,06±1,97	-13,48	0,24±0,06	-12,19	17,00±3,36	-1,51	0,040±0,014	-14,01
<b>T-09</b>	29,00±10,84	-14,71	7,76±0,76	-4,90	0,25±0,04	-5,28	15,66±7,27	-9,27	0,042±0,015	-10,00
<b>T-10</b>	33,00±5,70	-2,94	6,2±1,06	-24,02	0,21±0,02	-19,79	15,68±2,82	-9,15	0,034±0,006	-27,59
<b>T-11</b>	27,00±20,80	-20,59	7,88±1,54	-3,43	0,27±0,02	-0,33	17,12±5,86	-0,81	0,043±0,004	-8,90
<b>T-12</b>	22,00±9,75	-35,29	7,64±0,93	-6,37	0,25±0,05	-5,26	16,18±3,02	-6,26	0,043±0,014	-8,00

**Tabela 15.** Valores da massa seca de caule (MSC), média da massa fresca da parte aérea (XMFPa), comprimento de raiz (COMPR), média do comprimento de raiz (XCOMPR), massa seca de raiz (MSR) e do percentual de crescimento relativo (% Cr) de alface cultivar “Regina” aos 30 dias após a semeadura.

<b>TRAT.</b>	<b>MFPA (g)</b>	<b>% Cr</b>	<b>XMFPa(g)</b>	<b>% Cr</b>	<b>COMPR (cm)</b>	<b>% Cr</b>	<b>XCOMPR (cm)</b>	<b>% Cr</b>	<b>MSR (g)</b>	<b>% Cr</b>
<b>TEST.</b>	9,42±1,32	0	0,58±0,11	0	20,66±2,44	0	5,44±0,23	0	0,0112±0,002	0
<b>ARROZ</b>	6,66±1,68	-29,30	0,41±0,07	-29,74	19,76±5,17	-4,36	5,43±0,85	-0,31	0,0113±0,003	0,71
<b>T-01</b>	7,06±0,63	-25,05	0,44±0,03	-25,10	25,84±1,67	25,07	6,85±0,61	25,91	0,0139±0,004	24,24
<b>T-02</b>	8,64±1,33	-8,28	0,47±0,05	-20,14	26,82±2,44	29,82	6,71±0,61	23,22	0,0150±0,003	33,69
<b>T-03</b>	7,56±1,30	-19,75	0,42±0,06	-27,17	25,56±5,20	23,72	7,06±0,48	29,71	0,0134±0,004	19,61
<b>T-04</b>	8,66±1,12	-8,07	0,56±0,06	-3,10	15,32±4,43	-25,85	5,68±1,52	4,35	0,0083±0,005	-26,38
<b>T-05</b>	8,18±1,36	-13,16	0,46±0,08	-21,91	17,38±10,23	-15,88	4,74±2,07	-12,99	0,0075±0,005	-32,80
<b>T-06</b>	9,30±0,79	-1,27	0,55±0,05	-6,20	21,16±6,53	2,42	6,16±0,94	13,26	0,0115±0,006	2,67
<b>T-07</b>	7,28±1,77	-22,72	0,52±0,14	-9,98	21,16±5,04	2,42	5,08±0,48	-6,74	0,0053±0,004	-53,12
<b>T-08</b>	8,10±2,28	-14,01	0,50±0,15	-15,04	14,7±4,91	-28,85	4,60±0,81	-15,44	0,0059±0,003	-47,42
<b>T-09</b>	8,76±1,08	-7,01	0,50±0,14	-13,58	17,77±4,67	-13,96	6,17±0,94	13,36	0,0063±0,002	-44,07
<b>T-10</b>	7,08±1,16	-24,84	0,43±0,06	-25,39	16,35±5,27	-20,86	5,38±0,63	-1,19	0,0064±0,003	-43,40
<b>T-11</b>	9,06±1,48	-3,82	0,56±0,04	-3,58	14,56±7,52	-29,53	4,91±1,28	-9,71	0,0083±0,006	-26,03
<b>T-12</b>	8,74±1,03	-7,22	0,53±0,07	-9,28	22,76±4,63	10,16	6,81±1,67	25,05	0,0115±0,006	2,85

**Tabela 16.** Valores da média de massa seca de raiz (XMSR), total das médias da massa fresca da planta (TXMFpl), total das médias da massa seca da planta (TXMSpl), relação parte aérea/raiz (PA/RAIZ) e do percentual de crescimento relativo (% Cr) de alface cultivar “Regina” aos 30 dias após a semeadura.

<b>TRAT.</b>	<b>XMSR (g)</b>	<b>% Cr</b>	<b>TXMFpl (g)</b>	<b>% Cr</b>	<b>TXMSpl (g)</b>	<b>% Cr</b>	<b>PA/RAIZ</b>	<b>% Cr</b>
<b>TEST.</b>	0,00295±0,0004	0	0,628±0,127	0	0,035±0,005	0	146,0±34,7	0
<b>ARROZ</b>	0,00310±0,0006	5,26	0,443±0,045	-29,46	0,030±0,003	-15,44	111,8±42,1	-23,42
<b>T-01</b>	0,00366±0,0008	24,15	0,486±0,015	-22,50	0,034±0,005	-3,49	95,8±12,8	-34,39
<b>T-02</b>	0,00375±0,0007	27,26	0,525±0,038	-16,30	0,036±0,006	1,32	109,2±17,2	-25,15
<b>T-03</b>	0,00367±0,0007	24,60	0,519±0,061	-17,25	0,033±0,007	-7,70	98,7±11,5	-32,37
<b>T-04</b>	0,00315±0,0018	6,84	0,580±0,066	-7,66	0,032±0,006	-8,18	205,4±190,2	40,75
<b>T-05</b>	0,00202±0,0011	-31,62	0,465±0,090	-25,91	0,028±0,009	-21,43	276,3±230,1	89,31
<b>T-06</b>	0,00328±0,0015	11,20	0,600±0,035	-4,42	0,036±0,006	0,89	161,3±80,8	10,49
<b>T-07</b>	0,00148±0,0008	-49,77	0,535±0,159	-14,84	0,028±0,010	-21,16	266,8±100,4	82,79
<b>T-08</b>	0,00178±0,0007	-39,65	0,517±0,152	-17,57	0,027±0,008	-22,90	226,3±85,6	55,04
<b>T-09</b>	0,00217±0,0008	-26,40	0,543±0,147	-13,47	0,027±0,008	-22,15	206,7±58,7	41,63
<b>T-10</b>	0,00208±0,0009	-29,51	0,486±0,041	-22,64	0,024±0,006	-32,22	198,6±95,8	36,08
<b>T-11</b>	0,00270±0,0012	-8,54	0,589±0,051	-6,14	0,031±0,005	-10,83	186,8±107,7	27,98
<b>T-12</b>	0,00350±0,0021	18,78	0,569±0,106	-9,30	0,035±0,012	-0,68	144,4±54,1	-1,08

## **b) *Trichoderma* + Alface “Regina” – estádio comercial**

Nas avaliações feitas em alface no estádio de comercialização (Tabela 17), as plantas submetidas aos tratamentos T-04 e T-06 apresentaram maiores percentuais de acréscimo em relação à testemunha conferindo 21,1 e 28,8 %, na ordem, na massa fresca de folhas (MFF), o órgão da planta de interesse econômico nesse estádio da mesma. Ambos os tratamentos e T-03, com 31 %, repercutiram em maior crescimento relativo na média da massa fresca da folha (XMFF).

Os resultados se assemelham aos encontrados por OUSLEY et al. (1993) que detectaram o incremento das massas fresca e seca de parte aérea, e aumento do enraizamento em alface pela ação promotora de crescimento de *T. harzianum* e *T. viride*. LYNCK (1992) apontou *Trichoderma* spp. como responsável pelo aumento entre 54 e 100 % na produção de biomassa na cultura, quando este fungo foi aplicado a determinado composto utilizado como adubo.

A altura das mudas de alface na tabela X representada pelo comprimento do caule (COMPC), teve na testemunha adicional e nos isolados T-03, T-04, T-07, T-08, T-10 e T-12 os tratamentos promotores do crescimento desse órgão, pois incrementaram entre 23 e 120 % os valores dessa variável ficando a cargo do isolado T-04 o destaque, com um aumento relativo ao último valor na fase comercial.

MENEZES (1992) também obteve maior crescimento de plantas de alface originadas de sementes tratadas com *Trichoderma*. Em um experimento de MARTINS-CORDER e MELO (1997) pode ser verificada menor altura de plantas de berinjela coletadas aos 43 DAS em solo inoculado com dois isolados de *T. viride*, e menos de 20 % de incremento nessa variável no solo tratado com *T. koningii*.

Aumentos acima de 40 % foram observados por MISHRA e SINHA (2000) no comprimento da parte aérea de arroz devido à ação de *T. harzianum* e *T. virens* utilizados no tratamento das sementes com um pó cuja concentração de esporos foi equivalente a 500 mg.kg<sup>-1</sup> de sementes da cultura.

Entretanto, na cultura do tomate OZBAY e NEWMAN (2004) utilizando dois isolados de *T. harzianum* e um preparado comercial à base de fungo dessa espécie (Plantshield<sup>®</sup>), foi verificado em relação ao crescimento da parte aérea incrementos abaixo de 24 % em relação ao controle, apesar de atingirem maiores médias do que este tratamento com diferença estatística significativa.

Com exceção da testemunha adicional e dos isolados T-02, T-05, T-09, T-11, e de T-01 que proporcionou em média 20,45 % de plantas com menor massa fresca do caule (MFC), os demais tratamentos utilizados trouxeram aumentos entre 22,7 e 109 % dessa variável onde este último valor, mais uma vez, coube ao isolado T-04. Todavia, quanto à massa seca do caule (MSC), mais uma vez T-01 foi determinante, embora negativamente, por dar condições à produção de plantas mais leves (Tabela 18). Em contrapartida, aumentos de biomassa foram detectados em caules de plantas tratadas com os isolados T-03, T-04, T-06, T-07 e T-08, conferindo valores entre 23 e 90 %, sendo esse para o isolado T-04.

**Tabela 17.** Valores da massa fresca de folhas (MFF), média da massa fresca de folhas (XMFF), média da massa seca de folhas (XMSF), comprimento do caule (COMPC), massa fresca do caule (MFC) e do percentual de crescimento relativo (% Cr) de alface cultivar “Regina” aos 35 dias após a sementeira.

<b>TRAT.</b>	<b>MFF (g)</b>	<b>% Cr</b>	<b>XMFF (g)</b>	<b>% Cr</b>	<b>XMSF (g)</b>	<b>% Cr</b>	<b>COMPC (cm)</b>	<b>% Cr</b>	<b>MFC (g)</b>	<b>% Cr</b>
<b>TEST.</b>	4,64±1,21	0	0,371±0,11	0	0,026±0,010	0	6,20±1,77	0	0,88±0,33	0
<b>ARROZ</b>	3,90±1,49	-15,95	0,337±0,14	-9,11	0,024±0,006	-7,90	7,64±3,87	23,23	0,98±0,79	11,36
<b>T-01</b>	5,08±1,71	9,48	0,394±0,06	6,21	0,025±0,004	-0,83	6,74±3,97	8,71	0,7±0,20	-20,45
<b>T-02</b>	4,12±1,83	-11,21	0,365±0,15	-1,81	0,026±0,013	-0,36	7,30±4,63	17,74	0,82±0,61	-6,82
<b>T-03</b>	5,52±2,09	18,97	0,453±0,13	21,92	0,031±0,011	22,40	8,76±4,80	41,29	1,4±0,99	59,09
<b>T-04</b>	5,62±2,46	21,12	0,505±0,15	35,94	0,035±0,013	34,88	13,68±4,96	120,65	1,84±0,90	109,09
<b>T-05</b>	5,40±1,82	16,38	0,424±0,12	14,27	0,027±0,005	5,73	6,18±2,14	-0,32	0,92±0,38	4,55
<b>T-06</b>	5,98±1,09	28,88	0,487±0,09	31,08	0,032±0,008	24,45	7,14±2,62	15,16	1,18±0,34	34,09
<b>T-07</b>	4,84±1,27	4,31	0,406±0,13	9,41	0,028±0,007	7,83	9,06±2,65	46,13	1,26±0,27	43,18
<b>T-08</b>	5,26±0,92	13,36	0,418±0,03	12,54	0,029±0,005	13,96	7,90±4,01	27,42	1,12±0,28	27,27
<b>T-09</b>	5,08±2,67	9,48	0,400±0,12	7,86	0,028±0,006	7,27	7,40±2,61	19,35	1,04±0,21	18,18
<b>T-10</b>	4,08±1,25	-12,07	0,344±0,09	-7,29	0,023±0,008	-9,64	9,60±4,49	54,84	1,08±0,58	22,73
<b>T-11</b>	4,24±1,18	-8,62	0,321±0,06	-13,52	0,022±0,005	-12,95	5,36±0,94	-13,55	0,74±0,22	-15,91
<b>T-12</b>	4,42±1,54	-4,74	0,367±0,10	-1,06	0,025±0,006	-0,91	8,02±3,29	29,35	1,08±0,66	22,73

**Tabela 18.** Valores da massa seca de caule (MAC), massa fresca da parte aérea (MFPA), média da massa fresca da parte aérea (XMFPa), massa seca da parte aérea (MSPA) e do percentual de crescimento relativo (% Cr) de alface cultivar “Regina” aos 35 dias após a semeadura.

<b>TRAT.</b>	<b>MSC (g)</b>	<b>% Cr</b>	<b>MFPA (g)</b>	<b>% Cr</b>	<b>XMFPa (g)</b>	<b>% Cr</b>	<b>MSPA (g)</b>	<b>% Cr</b>
<b>TEST.</b>	0,0522±0,019	0	5,52±1,52	0	1,251±0,439	0	0,371±0,125	0
<b>ARROZ</b>	0,0524±0,034	0,31	4,88±2,25	-11,59	1,317±0,921	5,29	0,325±0,093	-12,45
<b>T-01</b>	0,0376±0,009	-28,05	5,78±1,81	4,71	1,094±0,243	-12,54	0,367±0,124	-1,20
<b>T-02</b>	0,0456±0,029	-12,64	4,94±2,38	-10,51	1,185±0,751	-5,33	0,336±0,183	-9,59
<b>T-03</b>	0,0673±0,060	28,97	6,92±2,98	25,36	1,853±1,098	48,06	0,452±0,226	21,68
<b>T-04</b>	0,0992±0,053	90,11	7,46±3,28	35,14	2,345±1,045	87,39	0,483±0,242	29,95
<b>T-05</b>	0,0486±0,012	-6,93	6,32±2,08	14,49	1,344±0,481	7,43	0,393±0,091	5,86
<b>T-06</b>	0,0661±0,022	26,55	7,16±1,04	29,71	1,667±0,402	33,20	0,453±0,065	22,09
<b>T-07</b>	0,0691±0,013	32,30	6,1±1,41	10,51	1,666±0,382	33,16	0,405±0,114	8,96
<b>T-08</b>	0,0646±0,013	23,72	6,38±0,81	15,58	1,538±0,292	22,90	0,432±0,079	16,37
<b>T-09</b>	0,0554±0,009	6,21	6,12±2,87	10,87	1,440±0,328	15,12	0,396±0,140	6,74
<b>T-10</b>	0,0608±0,035	16,44	5,16±1,81	-6,52	1,424±0,673	13,82	0,336±0,138	-9,64
<b>T-11</b>	0,0440±0,014	-15,67	4,98±1,37	-9,78	1,061±0,269	-15,20	0,339±0,103	-8,77
<b>T-12</b>	0,0616±0,031	18,05	5,5±1,94	-0,36	1,447±0,733	15,67	0,365±0,113	-1,83



Os dados na Tabela 18 demonstram que o isolado T-04 que junto com T-03 e T-06 influenciaram positivamente nas médias da massa fresca na parte aérea (XMFPA). Tais resultados com esses isolados podem ter repercutido no incremento da massa seca da parte aérea (MSPA) e na média da massa seca da parte aérea (XMSPA) (Tabela 19), onde os percentuais variaram entre 26 e 71 % e mais uma vez T-04 foi responsável pelo maior aumento de matéria seca.

Para o sistema radicular, os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados, ao contrário do ocorrido aos órgãos da parte aérea, não mostraram desempenho promissor. Entretanto, observa-se na tabela 19 que o isolado T-08 trouxe um incremento de 21,8 % no acúmulo de biomassa na raiz, baseado na massa seca dessa (MSR).

Os tratamentos com arroz triturado, T-02, T-04, T-06 T-07, T-09, T-10 e T-12 reduziram esta concentração entre 20 e 65 %, onde o isolado T-10 interferiu bastante nesse decréscimo. Este mesmo isolado também conferiu menor percentagem na massa fresca no sistema radicular (78,0 %), porém a maioria dos isolados promoveram o mesmo efeito. Um menor crescimento de raiz (COMPR) foi verificado na testemunha adicional (26,1 %), T-09 (21,2 %) e principalmente T-10 (49,6 %) (Tabela 20).

Essa mesma tabela demonstra que o isolado T-04 também foi importante no aumento das taxas de massa fresca e no total das médias da massa fresca da planta (TMFpl. e TXMFpl.), com incrementos em torno de 26,1 % e 39,2 %, respectivamente, e no percentual de crescimento relativo da massa seca e total das médias da massa seca da planta (TMSpl) e TXMSpl), com aumento de 26,4 e 47,7 %, respectivamente (Tabela 21).

Isolados de *Trichoderma* utilizados por MARTINS-CORDER e MELO (1997) promoveram maior quantidade de matéria seca em plantas de berinjela, sendo que o isolado TW6 da espécie *T. koningii* foi responsável pela formação de plantas com 89 % de incremento de massa seca.

Ainda no que tange a tabela 21, os isolados T-03, T-04, T-05, T-06, T-07, T-09 e T-10 proporcionaram acúmulo considerável na produção de biomassa na parte aérea em relação a raiz, conferindo valores entre 58 e 178 % quando comparados à testemunha, onde mais uma vez o isolado T-10 foi o extremo máximo, indicando para maior produção de matéria seca no somatório entre a folha e o caule do que na raiz.

**Tabela 19.** Valores da média da massa seca da parte aérea (XMSPA), massa fresca de raiz (MFR), massa seca de raiz (MSR) e do percentual de crescimento relativo (% Cr) de alface cultivar “Regina” aos 35 dias após a semeadura

<b>TRAT.</b>	<b>XMSPA (g)</b>	<b>% Cr</b>	<b>MFR (g)</b>	<b>% Cr</b>	<b>MSR (g)</b>	<b>% Cr</b>
<b>TEST.</b>	0,078±0,029	0	0,82±0,045	0	0,0274±0,004	0
<b>ARROZ</b>	0,076±0,039	-2,400	0,26±0,089	-68,29	0,0116±0,002	-57,51
<b>T-01</b>	0,063±0,012	-19,076	0,858±0,653	4,63	0,0303±0,017	10,58
<b>T-02</b>	0,071±0,040	-8,596	0,54±0,152	-34,15	0,0184±0,005	-32,70
<b>T-03</b>	0,099±0,070	26,802	0,68±0,409	-17,07	0,0236±0,011	-13,79
<b>T-04</b>	0,134±0,065	71,906	0,54±0,365	-34,15	0,0217±0,013	-20,80
<b>T-05</b>	0,076±0,016	-2,761	0,54±0,329	-34,15	0,0241±0,012	-11,97
<b>T-06</b>	0,098±0,029	25,858	0,44±0,241	-46,34	0,0211±0,010	-22,91
<b>T-07</b>	0,097±0,020	24,235	0,48±0,228	-41,46	0,0195±0,007	-28,83
<b>T-08</b>	0,094±0,015	20,501	0,82±0,349	0,00	0,0333±0,015	21,82
<b>T-09</b>	0,083±0,014	6,557	0,52±0,370	-36,59	0,0211±0,012	-22,77
<b>T-10</b>	0,084±0,042	7,840	0,18±0,084	-78,05	0,0093±0,004	-65,83
<b>T-11</b>	0,066±0,019	-14,773	0,82±0,342	0,00	0,0289±0,011	5,54
<b>T-12</b>	0,087±0,037	11,796	0,5±0,212	-39,02	0,0206±0,007	-24,52

**Tabela 20.** Valores de comprimento de raiz (COMPR), total de massa fresca da planta (TMFpl), média do total das médias de massa fresca da planta (TXMFpl) e do percentual de crescimento relativo (% Cr) de alface cultivar “Regina” aos 35 dias após a semeadura.

<b>TRAT.</b>	<b>COMPR (cm)</b>	<b>% Cr</b>	<b>TMFpl (g)</b>	<b>% Cr</b>	<b>TXMFpl (g)</b>	<b>% Cr</b>
<b>TEST.</b>	13,62±1,28	0	6,34±1,49	0	2,071±0,414	0
<b>ARROZ</b>	10,06±2,22	-26,14	5,14±2,33	-18,93	1,577±0,992	-23,84
<b>T-01</b>	13,18±4,42	-3,23	6,64±2,32	4,70	1,952±0,721	-5,74
<b>T-02</b>	13,36±1,04	-1,91	5,48±2,42	-13,56	1,725±0,802	-16,74
<b>T-03</b>	12,08±3,04	-11,31	7,60±3,06	19,87	2,533±1,108	22,28
<b>T-04</b>	13,08±4,90	-3,96	8,00±3,57	26,18	2,885±1,273	39,27
<b>T-05</b>	14,24±5,11	4,55	6,86±2,35	8,20	1,884±0,740	-9,03
<b>T-06</b>	13,26±5,39	-2,64	7,60±1,15	19,87	2,107±0,460	1,71
<b>T-07</b>	11,68±3,27	-14,24	6,58±1,60	3,79	2,146±0,489	3,62
<b>T-08</b>	15,84±3,05	16,30	7,20±0,95	13,56	2,358±0,182	13,84
<b>T-09</b>	10,72±4,18	-21,29	6,64±3,19	4,73	1,960±0,651	-5,35
<b>T-10</b>	6,86±1,73	-49,63	5,34±1,81	-15,77	1,604±0,661	-22,55
<b>T-11</b>	15,54±3,50	14,10	5,80±1,65	-8,52	1,881±0,544	-9,18
<b>T-12</b>	14,28±5,18	4,85	6,00±2,12	-5,36	1,947±0,838	-5,98

**Tabela 21.** Valores do total de massa seca de planta (TMSpl), total da média de massa seca de planta (TXMpl), relação parte aérea/raiz e do percentual de crescimento relativo (% Cr) de alface cultivar “Regina” aos 35 dias após a semeadura.

<b>TRAT.</b>	<b>TMSpl (g)</b>	<b>% Cr</b>	<b>TXMpl (g)</b>	<b>% Cr</b>	<b>PA/RAIZ</b>	<b>% Cr</b>
<b>TEST.</b>	0,399±0,127	0	0,105±0,030	0	13,5±4,55	0
<b>ARROZ</b>	0,337±0,095	-15,55	0,088±0,040	-16,75	27,7±4,81	104,32
<b>T-01</b>	0,397±0,135	-0,39	0,093±0,023	-11,36	16,3±9,69	20,41
<b>T-02</b>	0,354±0,185	-11,17	0,090±0,041	-14,87	18,4±8,86	36,27
<b>T-03</b>	0,476±0,228	19,24	0,122±0,072	16,24	21,6±10,92	59,31
<b>T-04</b>	0,504±0,253	26,46	0,156±0,075	47,78	25,8±11,49	90,43
<b>T-05</b>	0,417±0,098	4,64	0,100±0,019	-5,16	21,8±16,12	60,75
<b>T-06</b>	0,475±0,066	19,00	0,119±0,028	13,16	28,6±20,10	111,08
<b>T-07</b>	0,424±0,119	6,36	0,116±0,023	10,42	21,5±4,41	58,72
<b>T-08</b>	0,466±0,091	16,74	0,127±0,016	20,85	14,7±5,91	8,35
<b>T-09</b>	0,418±0,150	4,71	0,104±0,023	-1,08	22,3±9,99	64,97
<b>T-10</b>	0,345±0,141	-13,51	0,093±0,045	-11,34	37,6±12,31	178,06
<b>T-11</b>	0,368±0,111	-7,79	0,095±0,027	-9,48	12,5±4,10	-8,02
<b>T-12</b>	0,385±0,119	-3,39	0,108±0,041	2,34	18,1±3,19	33,93

### c) Trichoderma + Braquiária

Em comparação com o tratamento testemunha, nesse teste houve poucos resultados relevantes em termos de promoção/inibição do crescimento entre as características testadas por meio de isolados de *Trichoderma* spp. (Tabela 22). Entretanto o isolado T-01 foi responsável pelo decréscimo tanto na massa fresca quanto na massa seca de raiz em 33,5 % e 25,4 %, respectivamente, (Tabela 22). Em relação à massa fresca de raiz de tomate, OZBAY e NEWMAN (2004) observaram valores menores que a testemunha para as plantas cujas sementes tinham sido tratadas com isolados de *T. harzianum*, o T-95, e um preparado comercial à base desse. Apenas o isolado de *T. harzianum* T-22 promoveu incremento, embora incipiente, nessa variável, e estatisticamente não houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos.

Em relação à massa fresca de raiz de tomate, OZBAY e NEWMAN (2004) observaram valores menores que a testemunha para as plantas cujas sementes tinham sido tratadas com isolados de *T. harzianum*, o T-95, e um preparado comercial à base desse. Apenas o isolado de *T. harzianum* T-22 promoveu incremento, embora incipiente, nessa variável, e estatisticamente não houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos. É possível que o efeito obtido no presente trabalho possa ter repercutido na média do total da massa fresca das plantas (XTMFpl.), onde o isolado T-01 conferiu 21,8 % de redução.

Diferente ao que foi mensurado nesse ensaio, RESENDE et al. (2004), verificaram um incremento de 32,6 % em termos de massa seca de raiz em plantas de milho híbrido cujas sementes tinham sido inoculadas com *T. harzianum*. BJÖRKMAN et al. (1995) também trabalharam com tal espécie e detectaram incremento significativo na massa seca de raiz de milho doce.

No item relação parte aérea/raiz, apenas os tratamentos com os inoculantes à base dos isolados T-07 e T-01 se destacaram dos demais, provocando aumento de 24,4 e 22,3 %, respectivamente, na produção de matéria seca na parte aérea quando comparados ao valor apurado para a testemunha em *B. decumbens*.

MISHRA e SINHA (2000) detectaram em plantas de milho-doce com 21 DAS incremento de 87 % de massa fresca. As plantas foram originadas de sementes tratadas com *T. viride* na dose 500 mg de pó à base desse fungo por quilograma de sementes de arroz.

**Tabela 22.** Valores da massa fresca de raiz (MFR), massa seca de raiz (MSR), relação parte aérea/raiz (PA/RAIZ) e do percentual de crescimento relativo (% Cr) em plantas de braquiária da espécie *B. decumbens*

<b>TRAT.</b>	<b>MFR (g)</b>	<b>% Cr</b>	<b>MSR (g)</b>	<b>% Cr</b>	<b>PA/RAIZ</b>	<b>% Cr</b>
<b>TEST.</b>	7,04±3,16	0	0,724±0,137	0	5,27±0,71	0
<b>ARROZ.</b>	7,75±3,65	10,09	0,715±0,126	-1,24	5,40±1,51	2,46
<b>T-01.</b>	4,68±2,03	-33,52	0,540±0,161	-25,41	6,44±0,79	22,34
<b>T-02.</b>	6,88±2,20	-2,27	0,622±0,210	-14,09	5,96±1,96	13,23
<b>T-03.</b>	7,24±3,56	2,84	0,854±0,313	17,96	5,13±1,48	-2,66
<b>T-04.</b>	8,1±2,29	15,06	0,806±0,188	11,33	5,28±0,97	0,29
<b>T-05.</b>	7,02±2,88	-0,28	0,688±0,236	-4,97	5,30±1,16	0,70
<b>T-06.</b>	6,2±1,51	-11,93	0,572±0,069	-20,99	6,18±1,31	17,31
<b>T-07.</b>	7,2±2,16	2,27	0,648±0,111	-10,50	6,55±0,47	24,41
<b>T-08.</b>	7,18±1,32	1,99	0,776±0,106	7,18	5,05±0,98	-4,08
<b>T-09.</b>	7,94±3,31	12,78	0,812±0,080	12,15	5,10±0,41	-3,18
<b>T-10.</b>	7,3±3,23	3,69	0,768±0,306	6,08	5,77±1,43	9,62
<b>T-11.</b>	6,84±3,07	-2,84	0,676±0,185	-6,63	5,74±1,15	8,97
<b>T-12.</b>	6,32±2,93	-10,23	0,604±0,124	-16,57	5,48±0,98	4,07

#### 5.4. CONCLUSÕES

- Diante dos resultados, há indícios que, seja na folha, no caule, na raiz ou na planta inteira, os isolados de *Trichoderma* spp. T-01, T-02, T-07 e T-10, tiveram influência no crescimento das plantas testadas visto que constantemente foram incluídos entre os tratamentos que promoveram aumento ou decréscimo da percentagem de crescimento comparada à testemunha, em boa parte das variáveis testadas.

- Entre as variáveis de crescimento testadas foi na relação parte aérea/raiz, onde em todos os experimentos houve maior acúmulo de matéria seca na parte aérea, onde foram verificados os maiores percentuais de acréscimo na produção de biomassa, assim como uma gama maior de isolados responsáveis por esse aumento.

- Para a alface cultivar “Regina”, na sua fase de colheita para alimentação, a inoculação prévia do solo com os isolados T-03, T-04 e T-06 imprimiram maior crescimento relativo entre as variáveis utilizadas. Por sua vez, o isolado T-10 demonstrou habilidade inibitória principalmente no crescimento do sistema radicular da cultura, influenciando diretamente no percentual de crescimento relativo no item relação parte aérea/raiz onde este isolado foi responsável por 178 % de crescimento relativo (% Cr).

- Os isolados de *Trichoderma* spp. não demonstraram de forma marcante, através de suas qualidades, contribuição no crescimento de plantas de *B. decumbens*.

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

- Nos testes *in vitro* a competição por espaço e nutrientes se mostrou a melhor estratégia da maioria dos isolados de *Trichoderma* spp. em relação a *Sclerotium rolfsii* e *Rhizoctonia solani* verificado no teste de pareamento. Todavía, nenhum deles foi eficiente no controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*.
- O isolado T-12 mostrou tendência à produzir compostos voláteis com ação inibitória sobre o crescimento de *Sclerotium rolfsii*.
- Substâncias não-voláteis oriundas do metabolismo dos isolados T-12 e T-07 produziram inibição expressiva no crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*, respectivamente, sendo que metabólitos produzidos por T-07 tiveram efeito na germinação de escleródios de *S. rolfsii*.
- Em condições de casa-de-vegetação os isolados de *Trichoderma* spp. T-03 e T-07 contra *R. solani* assim como T-04, T-05 e T-06 para e *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* se mostraram promissores como agentes de controle biológico.
- A ação antagônica é distinta entre os isolados de *Trichoderma* spp. testados e os fitopatógenos estudados.
- Nos estudos sobre a colaboração de *Trichoderma* spp. para o crescimento de plantas, os isolados T-01, T-02, T-07 e T-10, foram freqüentes na promoção de aumento ou decréscimo da percentagem de crescimento comparada à testemunha, em boa parte das variáveis testadas.
- Na relação parte aérea/raiz, foi onde foram verificados os maiores percentuais de incremento na produção de biomassa, proporcionados por grande parte dos isolados testados.
- Para a alface cultivar “Regina” aos 35 DAS, o substrato tratado com os isolados T-03, T-04 e T-06 foram responsáveis por maior crescimento relativo entre as características avaliadas. Por outro lado, o isolado T-10 demonstrou habilidade inibitória principalmente no crescimento do sistema radicular da cultura.
- Para *B. decumbens* os isolados de *Trichoderma* spp. demonstraram de forma discreta a contribuição no crescimento de plantas da espécie.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAWI, G.S.; PASTOR-CORRALES, M.A. Root rots in Latin America and Africa: diagnosis, research methodologies, and management strategies. CIAT, Cali. 114p. 1990.
- AGRIOS, G.N. Plant pathology, 5 ed., New York: Academic Press, 1997. 635p.
- AHMED, A.S.; EZZIYYANI, C.; SÁNCHEZ, C.P.; CANDELA, M.E. 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. 2003.
- ALMEIDA, D. L.; RIBEIRO, R. L. D.; GUERRA, J. G. M. Sistema Integrado de Produção Agroecológica (“Fazendinha Agroecológica km 47”). In: 2º SIMPÓSIO DE AGRICULTURA ECOLÓGICA E I ENCONTRO DE AGRICULTURA ORGÂNICA, 1999, São Paulo, SP. 1999. Agricultura Ecológica. Guaíba, RS: Livraria e Editora Agropecuária Ltda. 1999, v.2, p.152-159.
- ALMEIDA, W.K.D. da S. Antagonismo de *Trichoderma viride* sobre fungos fitopatogênicos *Colletotrichum spp.* *Cercospora musae* e *Asperisporium caricae* em fruteiras tropicais. Rev.Bras. de Agroecologia. v.4, n.2, 2009.
- ALTOMARE, C.; NORVWELL, W.A.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G.E. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai, 1295-22. Applied Environ. Microbiol., v.65, p.2926-2933, 1999.
- ALVARENGA, D.O.; QUEIROZ, P.R.; LIMA, L.H.C.; MELLO, S.C.M. Determinação dos mecanismos de antagonismo de *Trichoderma asperellum* a *Sclerotium rolfsii* em feijoeiro. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 9., 2007a, Campinas-SP. Anais... Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2007.
- ALVARENGA, D.O.; QUEIROZ, P.R.; LIMA, L.H.C.; MELLO, S.C.M. Expressão enzimática de duas espécies de *Trichoderma* em meio de indução contendo quitina ou micélio de *Sclerotinia sclerotiorum*. In: 9º REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 2007b, Campinas-SP. Anais... Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2007.
- AMBRÓSIO, M.M.de Q.; BUENO, C.J.; PADOVANI, C.R.; SOUZA, N.L. de. Controle de fitopatógenos do solo com materiais vegetais associados à solarização. Summa Phytopathol., Botucatu, v. 34, n. 4, p. 354-358, 2008.
- ANDRADE, D.E.G.T.; SILVA, C.F.B.; SILVA, L.G.C.; MICHEREFF, S.J.; SALES JÚNIOR, R.; ASSIS, T.C. Influência da densidade do inoculo e de isolados de *Rhizoctonia solani* na severidade da Rizoctoniose do meloeiro. CAATINGA, Mossoró, v.18, n.3, p. 164-168, 2005.

ANDREWS, J.H. Strategies for selecting antagonistic microorganisms from the phylloplane. In: WINDELS, C.L.; LINDON, S.E. (Eds.). Biological control on the phylloplane. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1985. p.31-44.

AVENDAÑO, C.; RONDON, W.A.G. Biological control of *Phaseolus vulgaris* bean vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* with combined *Entrophospora colombiana*, *Trichoderma* sp. and *Pseudomonas fl uorescens* action. Agron. Colomb., Bogotá, v. 24, n.1, p. 62-67, 2006.

AVIS, T.J.; GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWESSELL, R.J. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. Soil and Biochemistry, v.40, p. 1733-1740, 2008.

BADR EL-DIN, S.M.S.; ATTIA, M.; ABO-SEDERA, S.A. Field assessment of composts produced by highly effective cellulolytic micoorganisms. Biol. Fertil. Soils, v.32, p.35-40, 2000.

BAKER, R. Improved *Trichoderma* spp. for promoting crop productivity. Tibtech, v.7, p.34-38, 1989.

BAKER, R. Microparasitism: ecology and phisiology. Can. J. Plant Path., v.2, p.370-379, 1987.

BAKER, K.F.; COOK, R.J. Biological control of plant pathogens. San Francisco: W.H. Freeman, 1974. 433p.

BAL, U.; ALTINTAS, S. Effects of *Trichoderma harzianum* on lettuce in protected cultivation. Journal Central European Agriculture, v.9, n.1, p. 63-70, 2008.

BALARDIN, R.S.; PASTOR-CORRALES, M.A.; OTOYA, M.M. Resistência de germoplasmas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Fitopatologia Brasileira. Brasília, v.15, n.1, p.102-103, 1990.

BARBOSA, R.J.F.; MEZA, C.L.S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* rifai sobre *Fusarium oxysporum* schlecht f. sp *passiflorae* en maracuyá (*passiflora edulis* sims var. flavicarpa) del municipio zona bananera colombiana. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín, v.62, n.1, p.4743-4748, 2009.

BEDENDO, I.P. *Damping-off*. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995a. v.1, p. 820-828.

BEDENDO, I.P. Doenças vasculares. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995b. v.1, p. 838-847.

BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C.R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology, v.72, p.379-382, 1982.

- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CODÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol*, v.7, n.4, p.249-260, 2004.
- BESOAIN, X.; PÉREZ, L. M.; ARAYA, A.; LEFEVER, L.; SANGUINETTI, M.; MONTEALEGRE, J. New strains obtained after UV treatment and protoplast fusion of native *Trichoderma harzianum*: their biocontrol effect on *Pyrenochaeta lycopersici*. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 10, n. 4, p. 604-617, 2007.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). *Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos*. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.717-728.
- BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.). *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de defesa da Agricultura, 1991a. p. 1-3.
- BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. In: BETTIOL, W. (Org.). *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de defesa da Agricultura, 1991b. p. 223-236.
- BHARAT, R.; SINGH, V.N.; SING, D.B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus spp.* *Plant and Soil*, v.57, p.131-135, 1980.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). *Manual de fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas*. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995-1997. v.2, p.353-375.
- BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G.E.; BLANCHARD, L. Root development in sweet-corn inoculated with the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Amer. Soc. Horticult. Sci. Meeting*, Montreal. <http://nysaes.cornell.edu/hort/faculty/bjorkman/other/abstracts/corn95.html>, 1995
- BOSSALIS, M.C. Hyperparasitism. *Annual Review of Phytopathology*, v.2, p.363-375, 1964.
- BRAGA, N.A.; PESSOA, M.N.G.; TEÓFILO, E.M. - Tratamento químico e biológico de sementes de caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., visando o controle de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. *Revista Ciência Agronômica*, v. 34, n.2, p. 193 – 199, 2003.
- BRITO, F.S.; MILLER, P.R.M.; STADNIK, M. Presença de *Trichoderma* spp em composto e suas características para o controle de fitopatógenos. *Rev. Bras. de Agroecologia*, Porto Alegre, v.5, n.1, p.43-53, 2010.
- BUENO, C.J.; FISCHER, I.H. Manejo de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. Disponível em: <[http://www.aptaregional.sp.gov.br/artigo.php?id\\_artigo=459](http://www.aptaregional.sp.gov.br/artigo.php?id_artigo=459)>. Acesso em: 17 nov. 2007.
- CAMPOROTA, P. Antagonism *in vitro* of *Trichoderma* spp. vis-a-vis *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Agronomie*, v.5, p.613-620,1985.

CARSOLIO, C.; BENHAMOU, N.; HARAN, S.; CORTEZ, C.; GUTIERREZ, A.; HERRERA-ESTRELLA, A. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, *ech42*, in mycoparasitism. Appl. Environ. Microbiol., v.65, p.929-935, 1999.

CARVALHO, D.D.C.; OLIVEIRA, T.A.S.; BRAÚNA, L.M.; MELLO, S.C.M. Isolados de *Trichoderma* sp. antagônicos a *Fusarium oxysporum*. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. 5p. (Comunicado técnico / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 9192 - 0099; 178).

CARVALHO FILHO, M.R.; ALVARENGA, D.O.; ÁVILA, Z.R.; GOMES, D.M.P.A.; PÁDUA, R.R.; ALMEIDA, A.M.; MELLO, S.C.M. Variabilidade entre isolados de *Trichoderma harzianum* quanto à capacidade de inibir o crescimento de *Rhizoctonia solani*. In: 10 ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 10., 2005, Brasília-DF. Anais... Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

CASSIOLATO, A.M.R.; BAKER, R.; MELO, I.S. de. Ação de mutantes de *Trichoderma harzianum* na formação, germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* e sobrevivência de plantas de alface. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.22, p.34-38, 1997.

CASSIOLATO et al.,1996) CASSIOLATO, A.M.R.; BAKER, R.; MELO, I.S. Parasitismo de *Sclerotinia sclerotiorum* e *S. minor* por mutantes de *Trichoderma harzianum* em segmentos de aipo. Fitopatologia Brasileira, n.21, p.120-122,1996.

CHANG, Y.C.; CHANG, Y.; BAKER, R.; KLEIFELD, O.; CHET, I. Increased growth of plant in the presence of the biological control agent *T. Harzianum*. Plant Dis., v.70, p.145-148,1986.

CHÉRIF, M.; BENHAMOU, N. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. Phytopathology, v.80, p.1406-1414, 1990.

CHET, I. Microbial control of plant diseases. In: Environmental microbiology. New York: Wiley-Liss, 1992. p. 335-354.

CHET, I.; BAKER, R. Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. Phytopathology, St. Paul, v.70, p.994-998, 1980.

CLAYDON, N.; HANSON, J.R.; TRUNEH, A.; AVENT, A.G. Harzianolide, a butenolide metabolite from cultures of *Trichoderma harzianum*. Phytochem., v.30, p. 3802-3803, 1991.

COOK, R.J.; BAKER, K.F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1983. 539p.

CRUZ, T.M.L. ; SILVA, J.G. ;PESSOA, M.N.G. ; MELO, R.P. ; LIMA, I.O. ; SAMPAIO, K.M. Atividade antagônica de *Trichoderma* e controle de *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea* *in vitro*. In: 9º REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 9., 2007, Campinas-SP. Anais... Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2007.

DANIELSON, R.M.; DAVEY, C.B. Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. *Soil Biol. Biochem*, v.5, p.495-504, 1973.

DATNOFF, L.E.; PERNEZNY, K.L. *Paenibacillus macerans* and *Trichoderma harzianum* enhance transplant growth and suppress fusarium crown and root rot in Florida tomato production. In: CARIBBEAN DIVISION MEETING ABSTRACTS, La Habana, Cuba. Publication no. p-2002-2025-CRA, 2001.

DE BOER, W.; GERARDS, S.; KLEIN GUNNEWIEK, P.J.A.; MODDERMAN, R. Response of the chitinolytic microbial community to chitin amendments of dune soils. *Biology and Fertility of Soils*, v.29, p. 170–177, 1999.

DE CAL, A.; PASCUAL, S.; LARENA, I.; MELGAREJO, P. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici*. *Plant Pathology*. v.44, p.909-917, 1995.

DENNIS, L.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. *Transactions of the British Mycological Society*, v.57, p.363-369, 1971.

DIAS, P. P. Comportamento de mudas de genótipos de café (*Coffea arabica* L.) enxertadas e não enxertadas, submetidas ao nematóide *Meloidogyne exigua* Goeldi. 2004. 153 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2004.

DURÁN, E.; ROBLES, F.; MARTÍNEZ, J.; BRITO, M. *Trichoderma* un hongo combatiente de patógenos. *Revista Técnico Ambiental Teorema Ambiental*, v.42, p.23-26, 2003.

ELAD, T.; CHET, J.; KATAN, J. *Trichoderma harzianum* a biocontrol effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, v.70, p. 119-121, 1980.

EL-KATATNY, M.H.; GUDELJ, M.; ROBRA, K.H.; ELNAGHY, M.A.; GÜBITZ, G.M. Characterization of a chitinase and an endobeta-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.56, p.137-43, 2001.

ETHUR, L.Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.F.B.; FLORES, M.G.V. Seleção de antagonistas fúngicos a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* em substrato comercial para mudas. *Ciência Rural*, Universidade Federal de Santa Maria, v.37, n.6, p.1794-1797, 2007.

FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES. Sistema para análises estatísticas: SAEG 9.0. Viçosa: UFV, 2005. 301p.

GEYPENS, M. *In vitro* measurements of antagonism of *Trichoderma* spp. against *Rhizoctonia solani* and significance of nutritional factors. Bélgica: Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, p.997-1007. 1977.

GHINI, R. Integração do controle biológico com outros métodos de controle de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.). Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de defesa da Agricultura, 1991. p. 201-217.

GHINI, R.; BETTIOL, W. Proteção de plantas na agricultura sustentável. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, Brasília, v.17, n.1, p.61-70, 2000.

GOLDMAN, G.H., HAYES, C.; HARMAN, G.E. Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. Trends Biotechnol., v.12, p.478-482, 1994.

GOMES, D.M.P.A.; ÁVILA, Z.R.; PÁDUA, R.R.; ALVARENGA, D.O.; CARVALHO FILHO, M.R.; MELLO, S.C.M.; SILVA, J.B.T. Ação de *Trichoderma* spp. sobre o desenvolvimento de *Sclerotium rolfsii*. In: 10 ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 10., 2005, Brasília-DF. Anais... Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R.J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). Soil Biology and Biochemistry, v.39, p. 1968-1977, 2007.

HADAR, Y.; CHET, I. HENIS, Y. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology, v.69, p.64-68, 1979.

HANSON, L.E.; HOWELL, C.R. Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. Phytopathol., v.94, p.171-176, 2004.

HARAN, S.; SCHICKLER, H.; OPPENHEIM, A.; CHET, I. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. Phytopathology, v.86, p. 980-985, 1996.

HARMAN. G.E. Myths and dogmas of biocontrol changes iNPERceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease, New York, v.84, n<sup>o</sup>4, p.377-393, 2000.

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

HARMAN, G.E. The Nature and Application of Biocontrol Microbes II: *Trichoderma* spp. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp.. Phytopathology, v. 96. p.190-194, 2006.

HARMAN. G.E. Myths and dogmas of biocontrol changes iNPERceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *New York: Plant Disease*, v.84, n<sup>o</sup>4, p.377-393, 2000.

HARMAN, G.E.; BJÖRKMAN, T. Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. In: HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. *Trichoderma* and *Gliocladium*. London: Taylor & Francis, v.2, p. 229-265, 1998.

HOITINK, H.A.J.; MADDEN, L.V.; DORRANCE, A.E. Systemic resistance induced by *Trichoderma* spp: Interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. Phytopathology, v.96, p. 186-189, 2006.

HOWELL, C.R. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathol.*, v. 96, p.178-180, 2006.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, v.87, n.1, p.4-10, 2003a.

HOWELL, C.R. Relevance of mycoparasitism in the biological control of *Rhizoctonia solani* by *Gliocladium virens*. *Phytopathology*, v.77, p.992-994, 2003b.

HOYOS-CARVAJAL, L.; CHAPARRO, P.; ABRAMSKY, M.; CHET, I.; ORDUZ, S. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma spp.* contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. *Agronomía Colombiana*, v.26, n.3, p.451-458, 2008.

HYAKUMACHI, M. Supressão e prevenção: mecanismos envolvidos no declínio de doenças causadas por *Rhizoctonia*. *Summa Phytopathologica*, v.25, p.99-102, 1999.

INBAR, J.; CHET, I. The role of recognition in the induction of specific chitinases of during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, v.141, p.2823-2829, 1997.

INBAR, J.; MENENDEZ, A.; CHET, I. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. *Soil Biol. Biochem.*, v.28, p.757-763, 1996.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. Manual de fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas. 3.ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., v.2, 1995-1997, 776 p.

KIMATI, H. Controle químico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p. 761-785.

KLEIFELD, O.; CHET, I. *Trichoderma harzianum* – interacion with plants and effect on growth response. *Plant. and Soil*, v. 144, p. 267-272, 1992.

.KRUGNER, T.L.; BACCHI, L.M.A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p. 46-96.

KUBICEK, C.P. & HARMAN, G.E. *Trichoderma & Gliocladium*: Basic biology, taxonomy and genetics. 1ª ed. London: Taylor & Francis. 1998. 278p.

KUHLS, K.; LIECKFELDT, E.; BORNER, T.; GUEHO, E. Molecular reidentification of human pathogenic *Trichoderma* isolates as *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma citrinoviride*. *Medical Mycology*, Austrália, v.1, nº 37, p. 25-33, fev. 1999.

LARCHER, W. *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos: Rima, 2000. 531 p.

LARKIN, R.P.; FRAVEL, D.R. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* Wilt of tomato. Plant Disease, New York, v. 82, n° 9, p.1022-1028, 1998.

LEWIS, J.A.; LARKIN, R.P.; ROGERS, D.L. A formulation of *Trichoderma* and *Gliocladium* to reduce *damping-off* caused by *Rhizoctonia solani* and saprophytic growth of pathogen in soilless mix. Plant Disease, v.82, p.501-506, 1998.

LEWIS, J. A.; PAPAIVIZAS, G. C. A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils. Phytopathology, v. 74, n.10, p. 1240-1244, 1984.

LIMA, L.H.C.; De MARCO, J.L.; FELIX, C.R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L (Ed.). Controle Biológico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v.2. p. 263-304.

LIMON, M. C.; PINTOR-TORO, J.A.; BENÍTEZ, T. Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. Phytopathology, v. 89, n.3, p. 254-261, 1999.

LIU, B.; GLENN, D.; BUCKLEY, K. *Trichoderma* communities in soils from organic, sustainable, and conventional farms, and their relation with Southern blight of tomato. Soil Biology & Biochemistry, v. 40, p. 124–1136, 2008.

LOCKWOOD, J.L. Fungistase in soil. Biol. Rev., v.52, p.1-43, 1977.

LOPES, C.A. Biological control of *Pseudomonas avenae* with epiphytic bacteria isolated from corn plants. Thesis (PhD) - University of Florida, Miami: 1986. 103p.

LORITO, M.; HARMAN, G.E.; HAYES, C.K.; BROADWAY, R.M.; TRONSMO, A.; WOO, S.L.; DI PIEO, A. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. Phytopathology, v.83, p.302-307, 1993.

LUCON, C.M.M.; FERRARI, J.T. ; PEDRO, E.A.S. ; ANTUNES, K.R. Potencial de isolados de *Trichoderma* no controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, in vitro. In: 9º REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 9., 2007, Campinas-SP. Anais... Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2007.

LUCON, C.M.; KOIKE, C.M.; ISHIKAWA, A.I.; PATRÍCIO, F.R.A.; HARAKAVA, R. Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.44, n.3, p.225-232, 2009.

LUCON, C.M.M. *Trichoderma* no controle de doenças de plantas causadas por patógenos de solo. Disponível em: [http://www.biologico.sp.gov.br/artigos\\_ok.php?id\\_artigo=77](http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=77). Acesso em: Outubro de 2010.

LINCK, J. Pesquisa inglesa com agentes biológicos. Jornal Agroceres, São Paulo, v. 212, p. 2, 1992.



MACEDO, M.A.; MARTINS, I.; DELGADO, G.V.; MELLO, S.C.M.; MENÊZES, J.E. Influência de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento de *Sclerotium rolfsii*. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 11p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 - 1340; 213).

MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, L.A.; VENTURA, G.M.; SANFIENTES, E.A. Encapsulamento de *Trichoderma inhamatum* para o controle biológico de *Rhizoctonia solani* na propagação clonal de *Eucalyptus*. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.1, n. 28, p.101-105, 2003.

MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. 2 ed. New York: Academic Press, 1995, 889 p.

MARTINS, M.K. Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira. 2005. 110f. Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MARTINS-CORDER, M.P.; MELO, I.S. de. Antagonismo “in vitro” de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* KLEB. Scientia Agrícola, v.55, p.1-7, 1998.

MARTINS-CORDER, M.P.; MELO, I.S. Influência de *Trichoderma viride* e *T. koningii* na emergência de plântulas e no vigor de mudas de berinjela (*Solanum melongena* L.). Rev. Brasil. Biol., v.57, n.1, p. 39-45, 1997.

MATA, J.F. Efeitos bioativos de produtos de fungos do gênero *Trichoderma* spp. sobre fitopatógenos *Fusarium* e *Sclerotium*. 2005. 148f. Tese (Doutorado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

MAY, L.L.; GHINI, R.; KIMATI, H. Solarização e *Trichoderma* para controle de *Phytophthora parasitica* em mudas de citros. LARANJA, Cordeirópolis, v.22, n.2, p. 395-409, 2001.

MEDEIROS, E.V. de; ALBUQUERQUE, J.F.C. de; MICHEREFF, S.J.; SALES JÚNIOR, R.; NUNES, G.H. de S. Controle de *Monosporascus cannonballus* por tiazolidina-2,4-diona e efeito sobre o agente de controle biológico *Trichoderma* spp. CAATNGA, Mossoró, v.19, n.1, p.44-50, 2006.

MELO, I.S.; FAULL, J.L. Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. Scientia Agrícola, v.57, n.1, p.55-57, 2000.

MELO, I.S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L (Ed.). Controle Biológico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. v.1, p. 17-67.

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

MENEZES, M. Avaliação de espécies de *Trichoderma* no tratamento de feijão e do solo, visando o controle de *Macrophomina phaseolina*. In: 25 CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATLOGIA, Gramado, RS. Resumos... Brasília: SBS, p. 159, 1992.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. Principles of plant nutrition. 5. ed. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 2001. 849 p.

MENZIES, J.G. A strain of *Trichoderma viride* pathogenic to germinating seedlings of cucumber, pepper and tomato. Plant Pathology, Minnesota, v.42, p. 784-791, 1993.

MICHEREFF, S.J.; MENEZES, M.; MARIANO, R.L.R. Antagonismo de espécies de *Trichoderma* sobre *Colletotrichum graminicola*, agente da antracnose do sorgo em condições de laboratório. Summa Phytopathologica, v.19, p.14-17,1993.

MICHEREFF FILHO, M.; MICHEREFF, S.J.; SILVA, E.B.; ANDRADE, D.E.G.T.; ANTUNES SOBRINHO, S.; NORONHA, M.A.; MARIANO, R.L.R. Influência de tipos de solo do estado de Pernambuco na intensidade da doença induzida por *Rhizoctonia solani* em feijoeiro. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.21, n.4, p. 19-25, 1996.

MIRANDA, B.A.; LOBO JÚNIOR, M.; CUNHA, M.G. Reações de cultivares do feijoeiro comum às podridões radiculares causadas por *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*. Pesq Agropec Trop, Goiânia, v.37, n.4, p. 221-226, 2007.

MISHRA, D.S.; SINHA, A.P. Plant growth-promoting activity of some fungal and bacterial agents on rice seed germination and seedling growth. Trop. Agric. (Trinidad), v.77, n.3, p. 188-191, 2000.

MORAES, W.B.C. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. In: BETTIOL, W. (Org.). Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de defesa da Agricultura, 1991. p. 158-179.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Os organismos do solo. In: Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: Editora UFLA, 2002. 626p.

NASEBY, D.C.; PASCUAL, J.A.; LYNCH, J.M. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbiol communities and soil enzyme activities. Journal of Applied Microbiology, v. 88, n. 1, p. 161-169, 2000.

NASHWA, M.A.; SALLAM; K.A.M.; ABO-ELYOUSR AND HASSAN, M.A.E. Evaluation of *Trichoderma* Species as Biocontrol Agents for Damping-Off and Wilt Diseases of *Phaseolus vulgaris* L. and Efficacy of Suggested Formula. Egypt. J. Phytopathol., v. 36, n.1-2, p. 81-93, 2008.

NAWAR, L.B. Pathological and rhizospherical studies on root-rot disease of squash in Saudi Arabia and its control. African Journal of Biotechnology, v.6, n.3, p. 219-226, 2007.

NORONHA, M.A.; MICHEREFF, S.J.; MARIANO, R.L.R. Efeito do tratamento de sementes de caupi com *Bacillus subtilis* no controle de *Rhizoctonia solani*. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.20, n.2, p. 174-178, 1995.

OKEREKE, V.C.; WOKOCHA, R.C. Effects of sometropical plant extracts, *Trichoderma harzianum* and Captan on the damping-off disease of tomato induced by *Sclerotium rolfsii*. Agricultural Journal, v.1, n.2, p.52-54, 2006.

OLIVEIRA, A.C.C.; SOUZA, P.E.; POZZA, E.A.; MANERBA, F.C.; LOPES, M.F. Metodologias de inoculação de *Rhizoctonia solani* na cultura da cenoura. Ciênc. Agrotec., Lavras, v.32, p. 992-995, 2008.

OUSLEY, M.A.; LYNCH, J.M.; WHIPS J.M. Effect of *Trichoderma* on plant growth; a balance between inhibition and growth promotion. Microbial. Ecology, v.26, p.277-285, 1993.

OUSLEY, M.A.; LYNCH, J.M.; WHIPPS, J.M. Potential of *Trichoderma* spp. As consistent plant growth stimulators. Biology and Fertility of Soils, v.17, p. 85-90, 1994.

OZBAY, N.; NEWMAN, S.E. Effect of *Trichoderma harzianum* strains to colonize tomato roots and improve transplant growth. Pakistan Journal of Biological Sciences, v.7, n.2, p.253-257, 2004.

PÁDUA, R.R.; ALVARENGA, D.O.; QUEIROZ, P.R.; MELLO, S.C.M. Avaliação e caracterização de potenciais antagonistas de *Sclerotium rolfsii* pertencentes ao gênero *Trichoderma*. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 23 p. -- (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 - 1340; 165).

PÁDUA, R.R.; ÁVILA, Z.R.; GOMES, D.M.P.A.; ALVARENGA, D.O.; CARVALHO FILHO, M.R.; SILVA, M.C.F.; MELLO, S.C.M.; SILVA, J.B.T. Isolados de *Trichoderma* spp. pertencentes ao banco de fungos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e avaliação do seu potencial antagônico. In: 10 ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 10., 2005a, Brasília-DF. Anais... Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005a.

PÁDUA, R.R.; GOMES, D.M.P.A.; ÁVILA, Z.R.; CARVALHO FILHO, M.R.; ALVARENGA, D.O.; MELLO, S.C.M. Avaliação de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *Sclerotium rolfsii* em feijoeiro. In: 10 ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 10., 2005b, Brasília-DF. Anais... Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005b.

PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, v.23, p.23-54, 1985.

PAPAVIZAS, G.C.; LEWIS, J.A.; MOITY, A.E. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhance biocontrol capabilities. Phytopathology. v.72, p.126-132, 1982.

PAPAVIZAS, G.C. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and bean rhizosphere. Phytop., v.71, p.121-125, 1981.

PATRÍCIO, F.R.A. Controle de doenças de hortaliças - convencional vs. alternativo. Biológico, São Paulo, v.69, n.2, p.87-90, 2007.

PEDRO, E.A.S.; ANTUNES, K.R.; LUCON, C.M.M.; FERRARI, J.R.; NOGUEIRA, E.M.C. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. com potencial para o controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. Biológico, São Paulo, v.70, n.2, p.107-216, 2008.

PEDROSA, A.; TELIZ, D. Patogenicidad relativa de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Pythium* spp. y *Macrophomina phaseolina* en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) bajo condiciones de invernadero. Revista Mexicana de Fitopatología, Ciudad Obregón, v. 10, n. 2, p. 134-138, 1992.

PÉREZ, L. M.; POLANCO, R.; RIOS, J.C.; MONTEALEGRE, J.; VALDERRAMA, L.; HERRERA, R.; BESOAÍN, X. The increase in endochitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases in the mutant Th650-NG7 of the *Trichoderma harzianum* Th650, improves the biocontrol activity on *Rhizoctonia solani* infecting tomato. IOBC/wprs Bulletin, v. 30, n. 6, p. 135-138, 2007.

PIEKIELEK, W.P.; FOX, R.H. Use of a chlorophyll meter to predict sidedress nitrogen requirements for maize. Agron. J. v.84, p.59-65, 1992.

PODDAR, R.K.; SINGH, D.V.; DUBEY, S.C. integrated application of *Trichoderma harzianum* mutants and carbendazim to manage chickpea wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*). Indian J. Agric. Sci., v.74, p.346-348, 2004.

PRATES, H.S.; LAVRES JUNIOR, J.; ROSSI, M.L. Composição mineral de mudas cítricas com aplicações de *Trichoderma* spp.. Piracicaba: Informações Agronômicas POTAFOS, v.117, p.23-24, 2007.

PRATES, H. S.; CESMIK, R.; FERRAZ, J. M. G. *Trichoderma* spp. no controle de doenças de plantas. Folder Técnico SAA/Embrapa, 2006.

REIS, A.; OLIVEIRA, S.M.A.; MENEZES, M.; MARIANO, R.L.R. Potential of *Trichoderma* isolates on biocontrol of bean's *Fusarium* wilt. Summa Phytopathologica, v.21, p.16-20, 1995.

REIS, G.G.dos; REIS, M.das G.F.; FONTAN, I.da C.I.; MONTE, M.A.; GOMES, A.N.; OLIVEIRA, C.H.R. Crescimento de raízes e da parte aérea de clones de híbridos de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* e de *Eucalyptus camaldulensis* X *Eucalyptus* spp submetidos a dois regimes de irrigação no campo. R. Árvore, Viçosa-MG, v.30, n.6, p.921-931, 2006

REIS, E.M.; FORCELINI, C.A. Controle cultural. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p. 710-716.

REQUENA, N.; AZCON, R.; BACA, M.T. Chemical changes in humic substances from compost due to inoculation with lingo-cellulolytic microorganisms and effects on lettuce growth. Appl. Microbiol. Biotechnol, v.45, p.857-863, 1996.

RESENDE, M. L.; OLIVEIRA, J. A.; GUIMARÃES, R. M.; VON PINHO, R. G.; VIEIRA, A. R. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. Ciência e Agrotecnologia, v. 28, p. 793-798, 2004.

REY, M.; DELGADO-JARANA, J.; BENÍTEZ, T. Improved antifungal activity of a mutant of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 which produces more extracellular proteins. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 55, n. 5, p. 604-608, 2001.

- ROBBS, F. C. Controle Biológico de doenças em plantas. In: NETO, A. M. A.; BARAN, C. L. (ed.). Manual de Controle Biológico. Rio de Janeiro: Lidador. 1992. p.46-51.
- ROLLAN, M.; MONACO, C.; NICO, A. Efecto de la temperatura sobre la interaccion *in vitro* entre espécies de *Trichoderma* Y *Sclerotinia sclerotiorum*, *S.minor* y *Sclerotium rolfsii*. Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg., v.14, p.1-2, 1999.
- SANTOS, H.A.; MELLO, S.C.M. ; PEIXOTO, J.R. ; MARQUES, G.A. ; MACEDO, M.A. ; MARTINS, I. Influência de metabólitos produzidos por *Trichoderma* sobre esporulação de *Fusarium*. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 9., 2007a, Campinas-SP. Anais... Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2007.
- SANTOS, R.L. ; BOMFIM, M.P. ; SANTOS, W.O. ; REBOUÇAS, T.N.H. Produção de metabólitos por *Trichoderma viride* no controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2 em tomateiro. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 9., 2007b, Campinas-SP. Anais... Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2007.
- SANTOS, F.S.; SOUZA, P.E.; OLIVEIRA, C.A.; MAGALHÃES, F.H.L.; LAURENTI, M.A. Ajuste do inoculo de *Rhizoctonia solani* em substrato para estudos de Rizoctoniose em algodoeiro e feijoeiro. Summa Phytopathologica, Botucatu, v.31, n.4, p.373-375, 2005.
- SANTOS, M.M.F.B.; STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Doenças da alcachofra (*Cynara scolymus* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (ed.). Manual de fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v.2, p. 15-17.
- SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. Biotecnologia do Solo: Fundamentos e Perspectivas. Brasília, MEC: ABEAS, Esal: FAEPE, 1988, 2003p.
- SNEH, B. Uso de isolados não patogênicos de *Rhizoctonia* no controle biológico. Summa Phytopathologica, v.25, p.102-106, 1999.
- SNEH, B.; ZEIDAN, M.; ICHIELEVICH-AUSTER, M.; BARASH, I.; KOLTIN, Y. Increase growth responses induced by a non-pathogenic *Rhizoctonia solani*. Canadian Journal of Botany, Ottawa, v.64, p.2372-2378, 1986.
- SNEH, B.; ICHIELEVICH-AUSTER, M.; PLAUT, Z. Mechanism of seedling protection induced by a hypovirulent isolate of *Rhizoctonia solani*. Canadian Journal of Botany, Ottawa, v.67, p.2135-2141, 1989.
- SUDO MARTELLETO, M. Tratamento de sementes de tomate associado à microbiolização com *Trichoderma* spp. 2009. 121 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- TOLÊDO-SOUZA, E.D. de; LOBO JÚNIOR, M.; SILVEIRA, P.M. da; CAFÉ FILHO, A.C. Interações entre *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* e *Rhizoctonia solani* na severidade da podridão radicular do feijoeiro. Pesquisa Agropecuária Tropical. v. 39, p.1, p. 3-17, 2009.

- TSAVKELOVA, E.A.; YU, S.; CHERDYNTSEVA, T.A.; NETRUSOV, A.I. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v.2, p. 117-126, 2006.
- VAN DEN BOOGERT, P.H.J.F. Micoparasitismo e biocontrole de *Rhizoctonia solani*. *Summa Phytopathologica*, v.25, p.107-110, 1999.
- VAN DEN BOOGERT, P.H.J.F. Colonization of roots and stolons of potato by the mycoparasitic fungus *Verticillium biguttatum*. *Soil Biol. Bioch, Exceter*, v.21, p.255-262, 1989.
- VAN SCHOONHOVEN, A.A.S.; PASTOR-CORRALES, M.A. Standard system for the evaluation of bean germplasm. Cali : CIAT, 1987. 54p.
- WEINDLING, R.; FAWCETT, W.S. Experiment in the control of *Rhizoctonia* damping-off of citrus seedling. *Hilgardia*, v.10, p.1-16, 1936.
- WHIPS, J.M. Effects of mycoparasites on sclerotia-forming fungi. In: BEEMSTER, A.B.R.; BOLLEN, G.J.; GERLAGH, M.; RUISSEN, M.A.; SCHIPPERS, B.; TEMPEL, A. (ed.). *Biotic interactions and soilborne diseases*. Amsterdam: Elsevier, 1991. p.129-140.
- WILLIAMS, J. S.; COOPER, R. M. The oldest fungicide and newest phytoalexin – a reappraisal of the fungitoxicity of elemental sulphur. *Plant Pathology*, v. 53, p. 263-279, 2004.
- WILLIAMS, J. S.; HALL, S. A.; HAWKESFORD, M. J.; BEALE, M. H.; COOPER, R. M. Elemental sulfur and thiol accumulation in tomato and defense against a fungal vascular pathogen. *Plant Physiology*, v. 128, p. 150-159, 2002.
- WINDHAM, M.T.; ELAD, Y.; BAKER, R. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathol.*, v.76, p.518-521, 1986.
- YAQUB, F.; SHAHZAD, S. Effect of seed pelleting with *Trichoderma* spp., and *Gliocladium virens* on growth and colonization of roots of sunflower and mung bean by *Sclerotium rolfsii*. *Pak. J. Bot.*, v.40, n.2, p. 947-953, 2008.
- ZHANG, Z.; YUEN, Y.; SARATH, G.; PENHEITHER, A.R. Chitinases from the plant disease biocontrol agent, *Stenotrophomonas maltophilia* C3. *Phytopathology*, v.91, p. 204–211, 2000.
- ZHANG, Z.; YUEN, Y. The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. *Phytopathology*, v.90, p. 384–389, 2000.

## 8. ANEXOS

### 8.1. Anexo A – Origem das Amostras de Terra para Aquisição dos Isolados de *Trichoderma* spp.

**Tabela 1.** Origem das amostras de terra para aquisição dos isolados de *Trichoderma* spp.

<b>Isolados</b>	<b>Localização</b>	<b>Município</b>	<b>Local de coleta</b>
<b>T-01</b>	Fazendinha Agroecológica km 47	Seropédica (RJ)	Rizosfera de alface, figo, maracujá
<b>T-02</b>	Fazendinha Agroecológica km 47	Seropédica (RJ)	Rizosfera de alface, figo, maracujá
<b>T-03</b>	Fazendinha Agroecológica km 47	Seropédica (RJ)	Rizosfera de alface, figo, maracujá
<b>T-04</b>	Fazendinha Agroecológica km 47	Seropédica (RJ)	Rizosfera de alface, figo, maracujá
<b>T-05</b>	Fazendinha Agroecológica km 47	Seropédica (RJ)	Rizosfera de alface, figo, maracujá
<b>T-06</b>	Fazendinha Agroecológica km 47	Seropédica (RJ)	Rizosfera de alface, figo, maracujá
<b>T-07</b>	Fazendinha Agroecológica Km 47	Seropédica (RJ)	Rizosfera de alface, figo, maracujá
<b>T-08</b>	Propriedade particular	Paraty (RJ)	Rizosfera de banana
<b>T-09</b>	Fazendinha Agroecológica km 47	Seropédica (RJ)	Rizosfera de alface, figo, maracujá
<b>T-10</b>	PESAGRO-RIO/EES	Seropédica (RJ)	solarizador
<b>T-11</b>	Fazendinha Agroecológica km 47	Seropédica (RJ)	Rizosfera de alface, figo, maracujá
<b>T-12</b>	PESAGRO-RIO/CEA	Paty do Alferes (RJ)	desconhecida

## 8.2. Anexo B – Síntese dos Quadros de ANOVA do Teste de Pareamento

**Tabela 2.** Quadrados médios e coeficientes de variação com base na média dos tratamentos para o percentual de colonização de isolados de *Trichoderma* spp. no teste de antagonismo ou pareamento *in vitro*.

FV	GL	QM		
		Percentual de colonização de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. (% C)		
		<i>Sclerotium rolfii</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> <sup>(1)</sup>
TRATAMENTOS	11	116,7369*	1878,320*	-
RESÍDUO	48	25,52813	129,1424	-
TOTAL	59			-
CV %		6,80	13,74	-

\*- Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F. (1) Foi usada ANOVA não-paramétrica.

## 8.3. Anexo C – Síntese dos Quadros de ANOVA do Teste de Produção de Metabólitos Voláteis por Isolados de *Trichoderma* spp.

**Tabela 3.** Quadrados médios e coeficientes de variação com base na média dos tratamentos para o percentual de colonização dos patógenos por isolados de *Trichoderma* spp. no teste da produção de metabólitos voláteis *in vitro*.

FV	GL	QM		
		Percentual de colonização dos patógenos (% Cp)		
		<i>Sclerotium rolfii</i> <sup>(1)</sup>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> <sup>(1)</sup>
TRATAMENTOS	12	-	217,5205 <sup>ns</sup>	-
RESÍDUO	52	-	256,5231	-
TOTAL	64			-
CV %		-	17,65	-

ns – Não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F. (1) Foi usada ANOVA não-paramétrica.

## 8.4. Anexo D – Síntese dos Quadros de ANOVA do Teste de Produção de Metabólitos Não-voláteis por Isolados de *Trichoderma* spp.

**Tabela 4.** Quadrados médios e coeficientes de variação com base na média dos tratamentos para o total dos diâmetros das colônias dos patógenos por isolados de *Trichoderma* spp. no teste da produção de metabólitos não-voláteis *in vitro*.

FV	GL	QM		
		Total dos diâmetros das colônias dos patógenos (Ø% Cp)		
		<i>Sclerotium rolfii</i> <sup>(1)</sup>	<i>Rhizoctonia solani</i> <sup>(1)</sup>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i>
TRATAMENTOS	12	-	-	0,000447 <sup>ns</sup>
RESÍDUO	52	-	-	0,000666
TOTAL	64			
CV %		-	-	2,21

ns – Não significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F. (1) Foi usada ANOVA não-paramétrica.



**8.5. Anexo E – Síntese do Quadro de ANOVA do Teste de Inibição da Germinação de Escleródios de *Sclerotium rolfii* por Metabólitos Não-voláteis Produzidos por Isolados de *Trichoderma* spp.**

**Tabela 5.** Quadrado médio e coeficiente de variação com base na média dos tratamentos para o percentual de germinação de escleródios de *S. rolfii* diante de metabólitos não-voláteis produzidos por isolados de *Trichoderma* spp. *in vitro*

QM		
FV	GL	Percentual de germinação de escleródios
TRATAMENTOS	12	0,5153245*
RESÍDUO	52	0,7584283E-01
TOTAL	64	
CV %		21,29

\* – Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

**8.6. Anexo F – Composição Química dos Substratos Comerciais Utilizados nos Testes em Casa-de-Vegetação.**

**Tabela 6.** Composição química dos substratos comerciais utilizados nos testes em casa-de-vegetação.

Substrato	pH em água	Cmol/dm <sup>3</sup>				mg/dm <sup>3</sup>	
		Al	Ca+Mg	Ca	Mg	P	K
MecPlant®	5,0	0,5	17,5	8,7	8,8	137	405
Biomix®	6,6	0	13,7	8,0	5,7	96,0	310
Holambra®	5,5	0,1	11,0	9,1	1,9	68,0	590

Obs: Análise química feita em substrato autoclavado.

### 8.7. Anexo G – Figuras Ilustrativas do Teste de Densidade de Inóculo



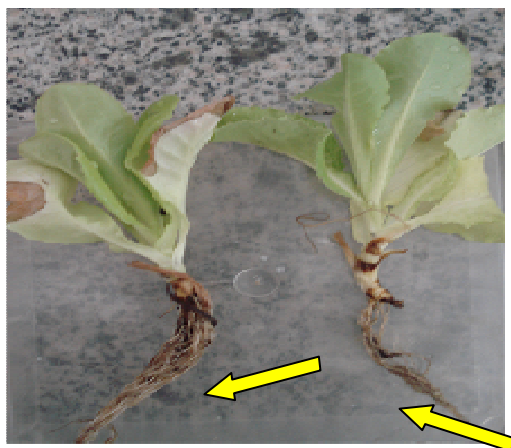
**Figura 1-G:** Fotografia demonstrando infecção no colo em plantas doentes em diferentes estádios de desenvolvimento vegetativo.



**Figura 2-G:** Imagem evidenciando diferenças no número de plantas, onde a dose de maior densidade promoveu um menor percentual de germinação e/ou maior incidência de tombamento.



**Figura 3-G:** Fotografia indicando lesão no colo e podridão de raiz promovidas por *Rhizoctonia solani* em alface.



**Figura 4-G):** Fotografia mostrando a incidência drástica de *R. solani* no sistema radicular de alface

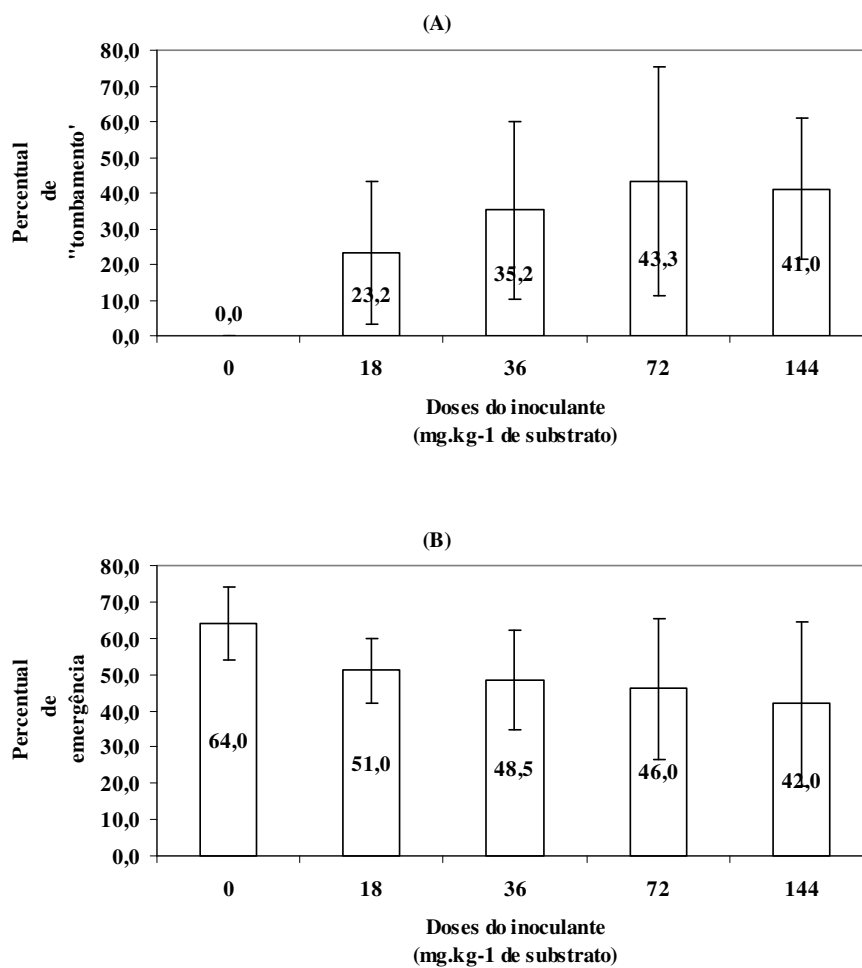


**Figura 5-G:** Diferenças na coloração de folhas das cultivares de feijoeiro. À esquerda a testemunha e a direita submetida à dose máxima de inoculante com *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*.



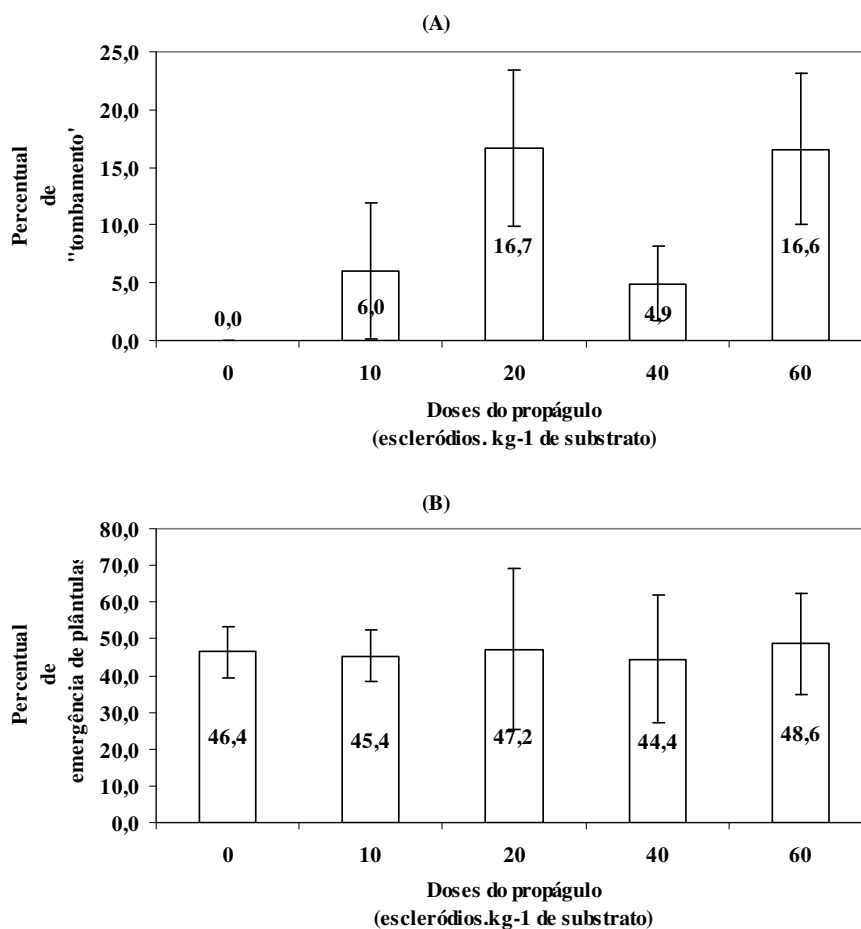
**Figura 6-G:** Fotografia mostrando a infecção por *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* na região do colo dos feijoeiros.

### 8.8. Anexo H – Gráficos dos Testes de Densidade de Inóculo de *Rhizoctonia solani*.



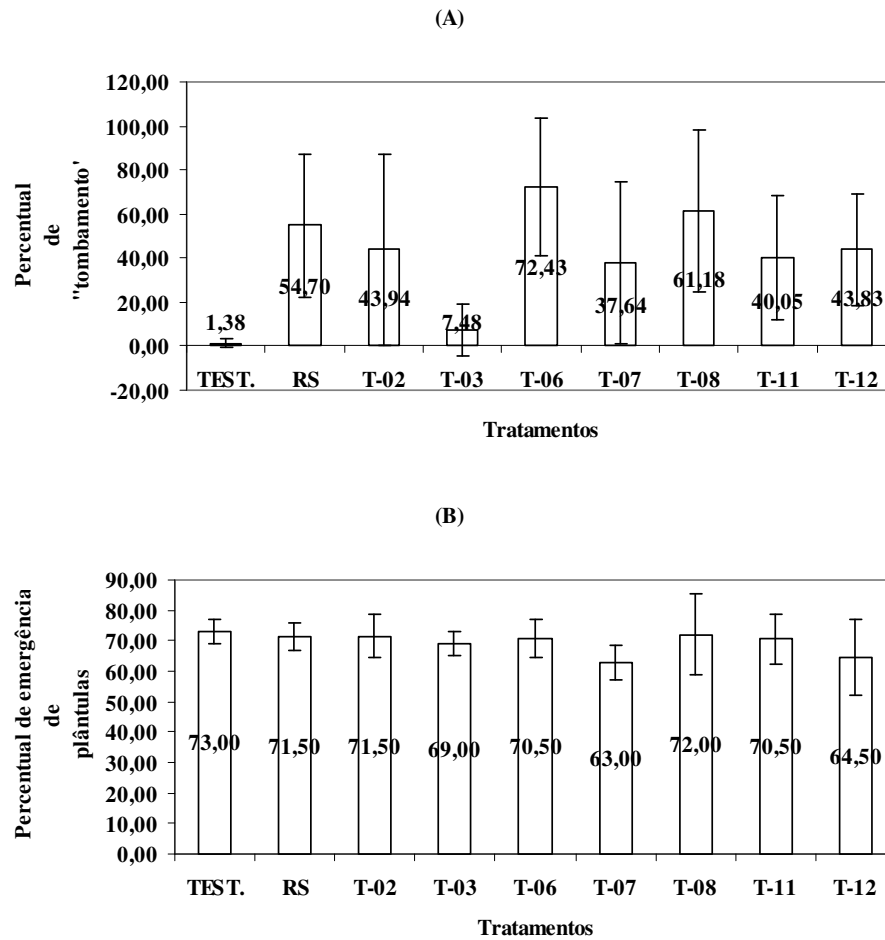
**Figura 1:** Percentual de “tombamento” (A) e percentual de emergência de plântulas (B) obtidos no teste de densidade de inóculo utilizando inoculante à base de *Rhizoctonia solani*.

### 8.9. Anexo I – Gráficos dos Testes de Densidade de Inóculo de *Sclerotium rolfsii*.



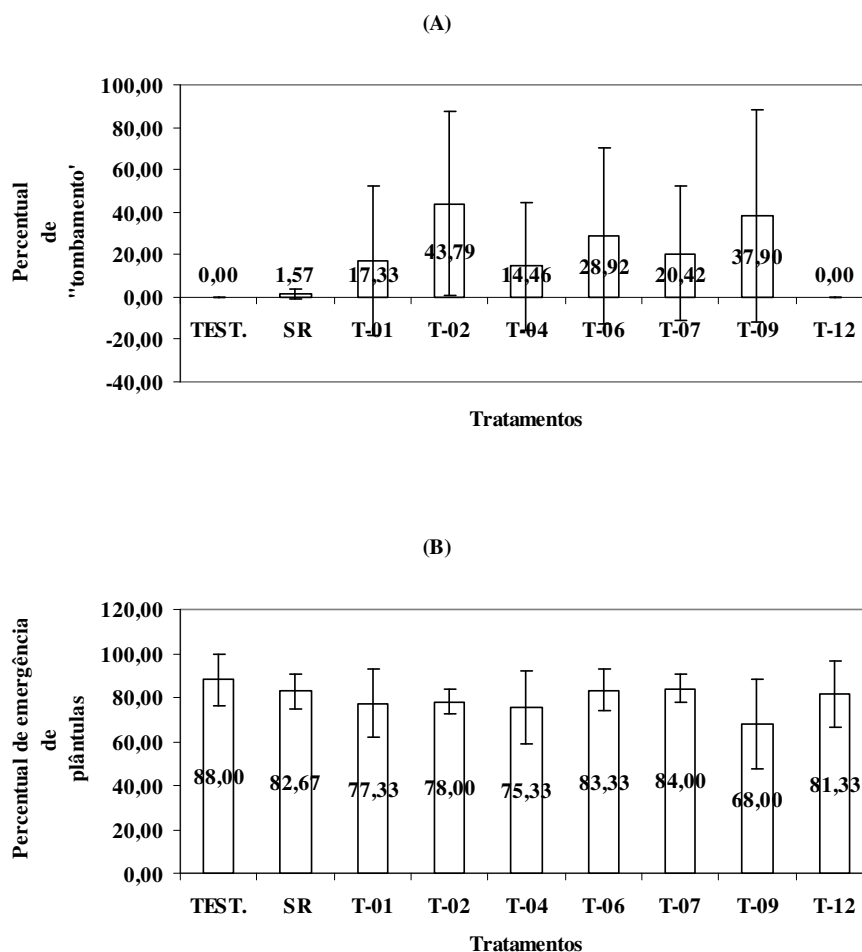
**Figura 2:** Percentual de “tombamento” (A) e percentual de emergência de plântulas (B) obtidos no teste de densidade de inóculo utilizando escleródios de *Sclerotium rolfsii*.

8.10. Anexo J – Gráficos dos Testes de Controle Biológico de *Rhizoctonia solani*.



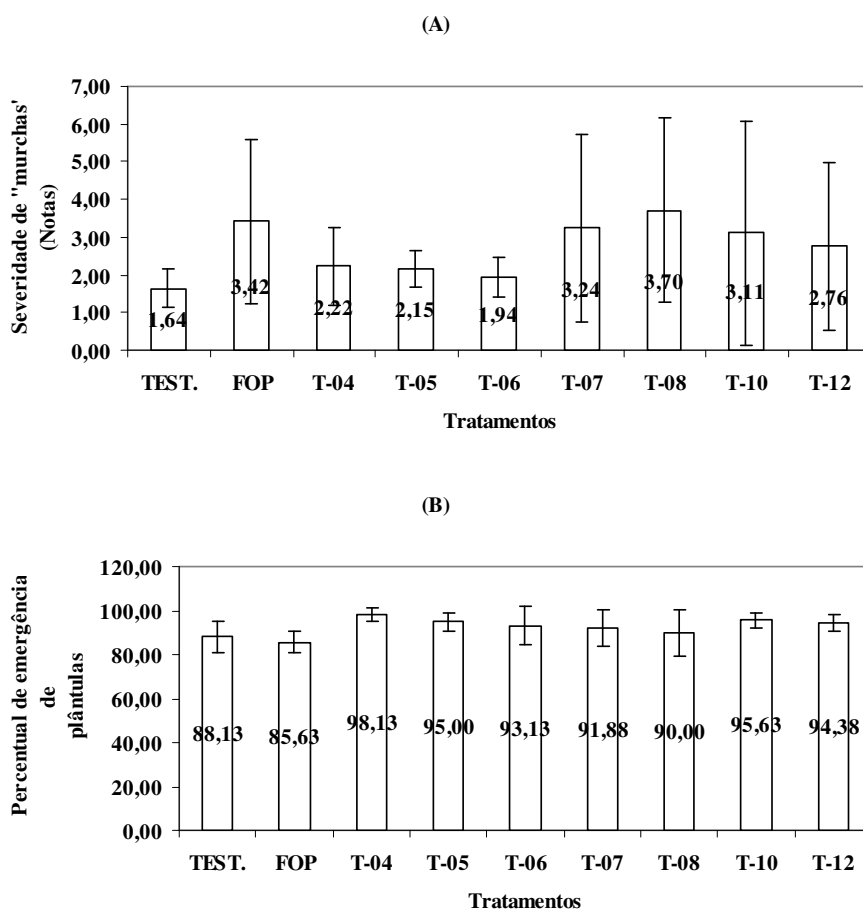
**Figura 3:** Percentual de “tombamento” (A) e percentual de emergência de plântulas (B) de alface cultivar “Regina” obtidos no teste de controle biológico de *Rhizoctonia solani* por isolados de *Trichoderma* spp.

### 8.11. Anexo K – Gráficos dos Testes de Controle Biológico de *Sclerotium rolfii*.



**Figura 4:** Percentual de “tombamento” (A) e percentual de emergência de plântulas (B) de pimentão cultivar “Casca Dura Ikeda” no teste de controle biológico de *Sclerotium rolfii* por isolados de *Trichoderma* spp.

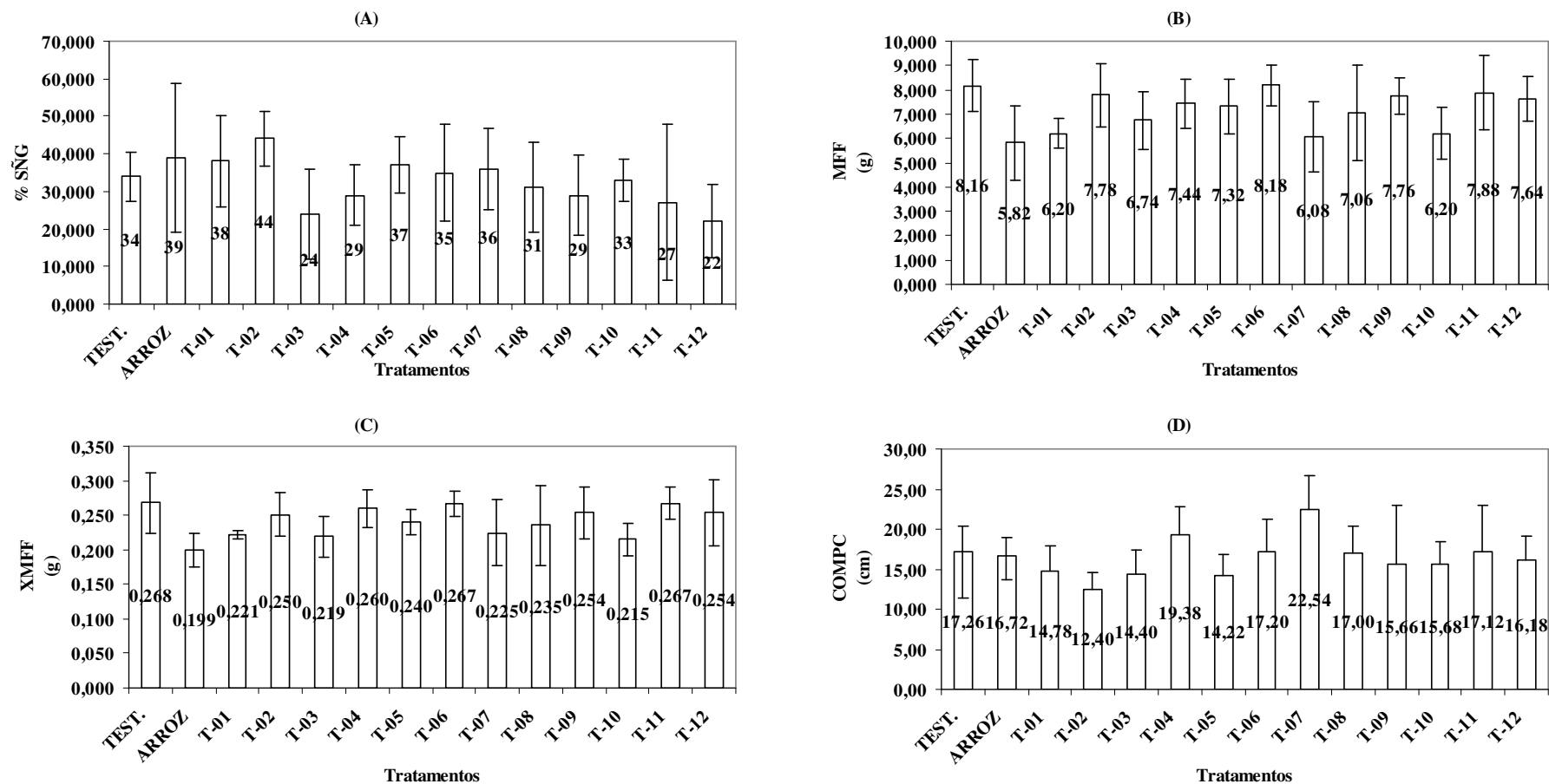
8.12. Anexo L – Gráficos dos Testes de Controle Biológico de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*.



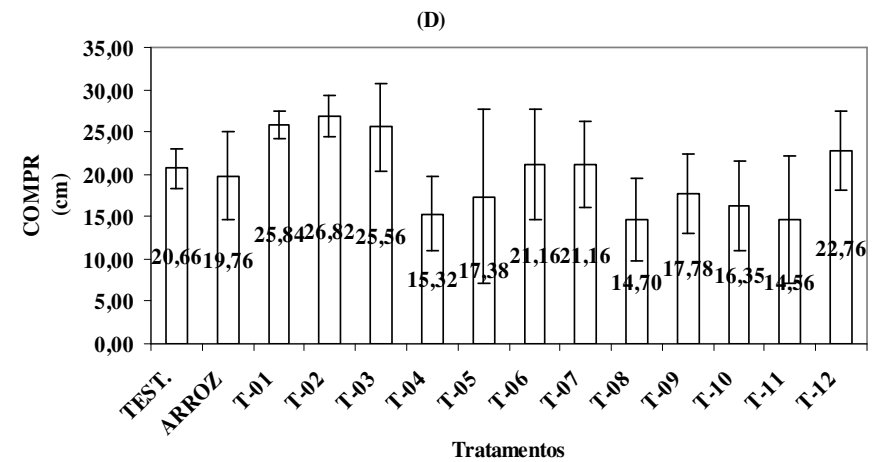
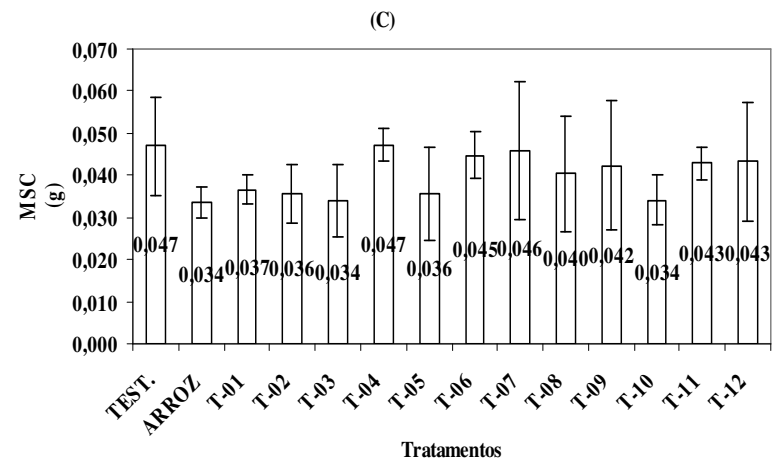
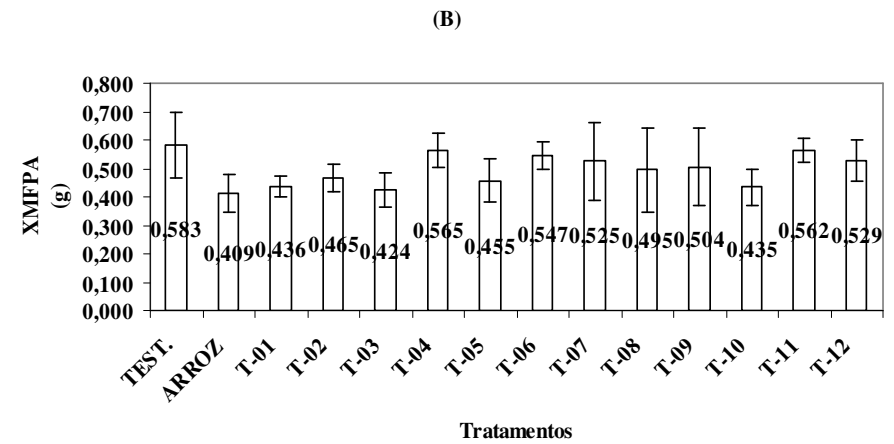
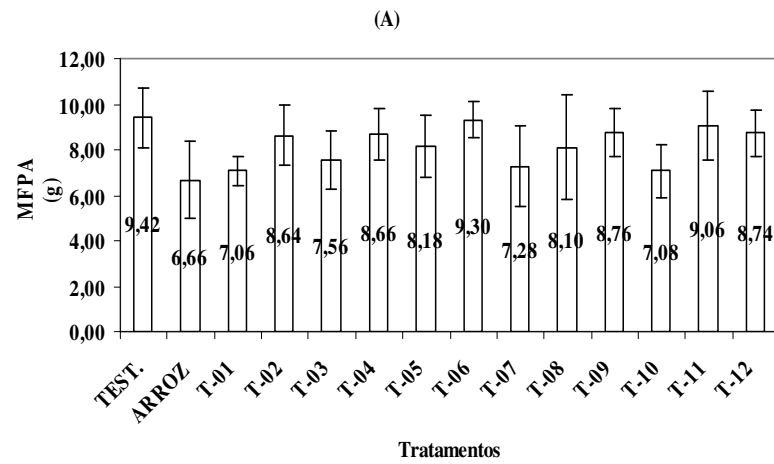
**Figura 5:** Notas dadas para a severidade de “murchas” (A) e percentual de emergência de plântulas (B) de feijão-vagem cultivar “Alessa” obtidos no teste de controle biológico de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* por isolados de *Trichoderma* spp.



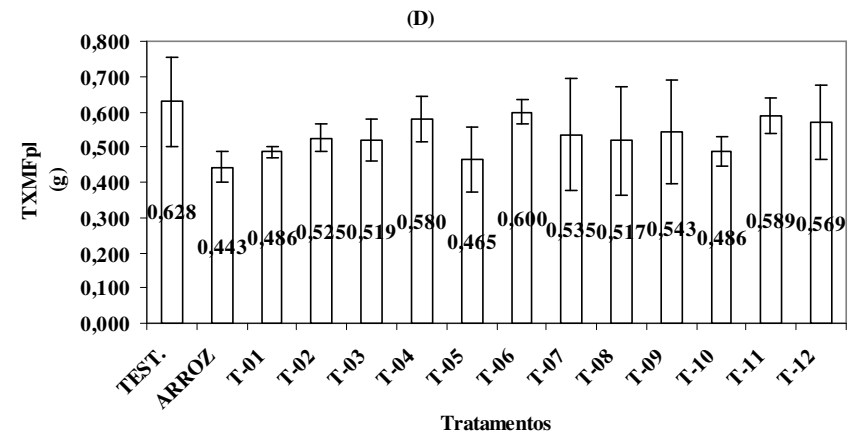
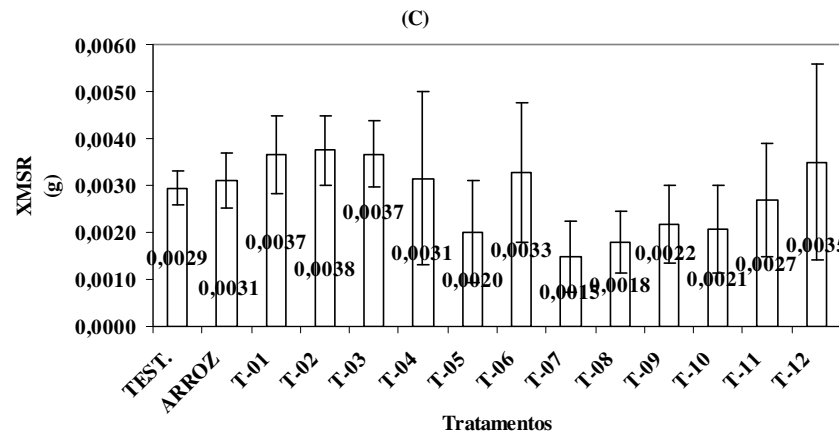
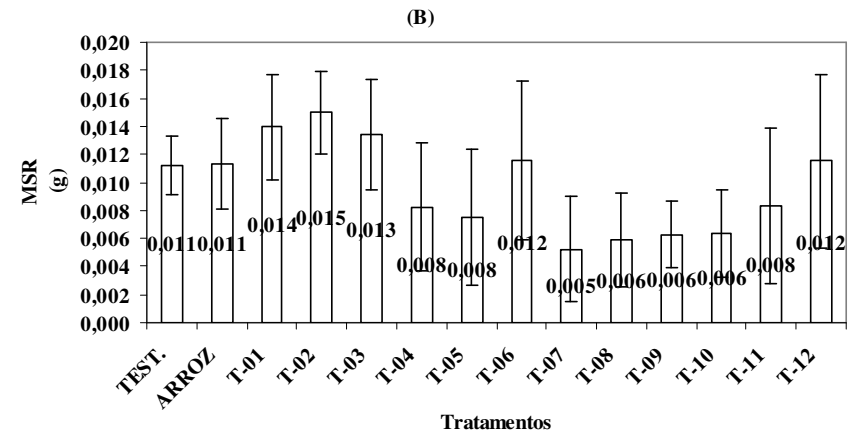
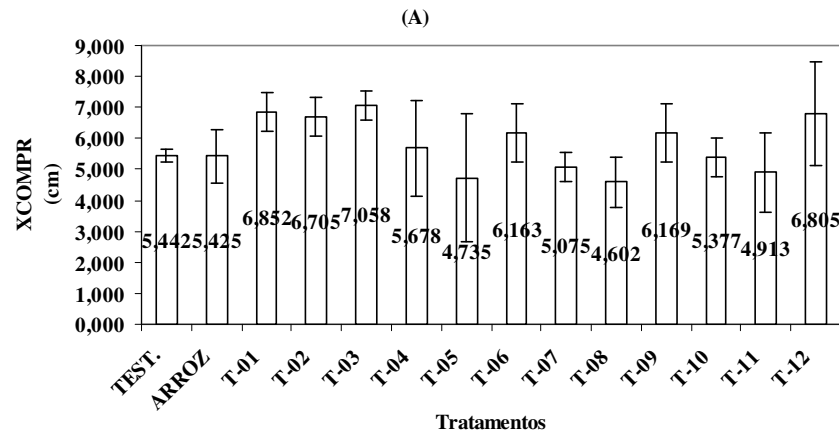
**8.13. Anexo M – Gráficos do Teste da Contribuição de *Trichoderma* spp. para o Crescimento de Plantas de Alface Cultivar “Regina” aos 30 DAS.**



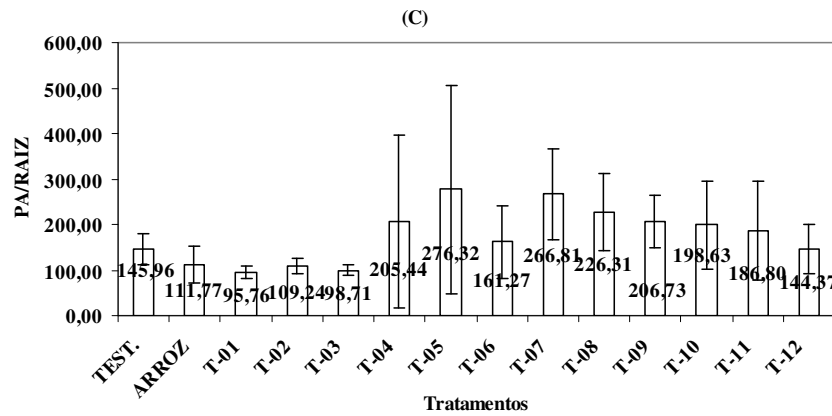
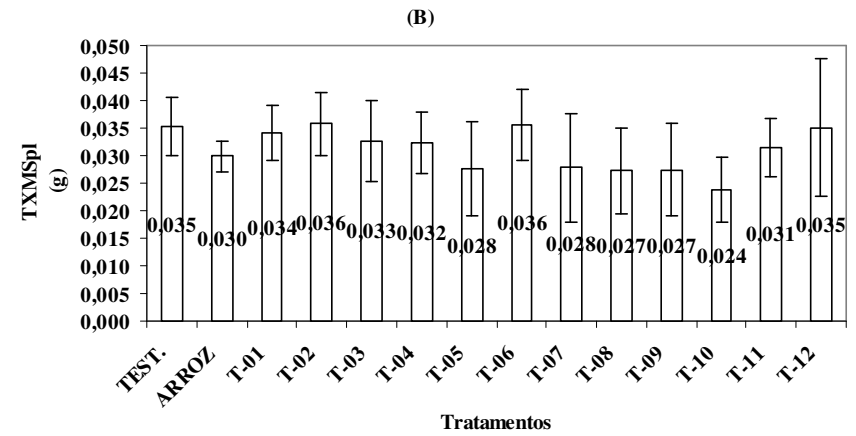
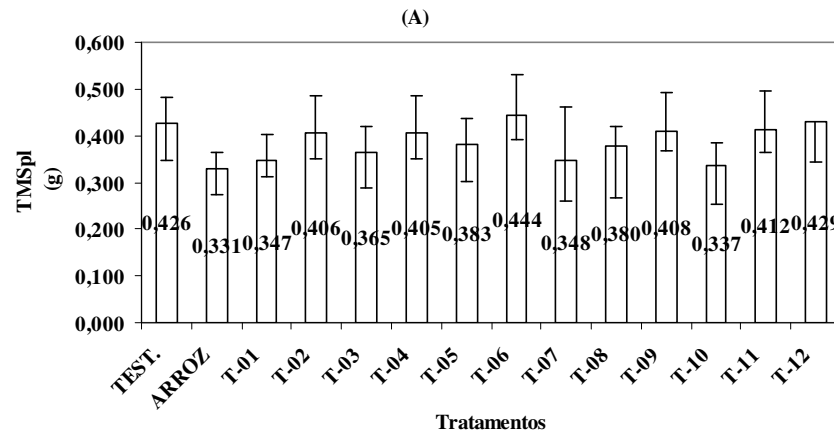
**Figura 1-M:** Valores do percentual de sementes não germinadas (A), da massa fresca de folhas (B), média da massa fresca de folhas (C) e do comprimento de caule (D) obtidos na avaliação da contribuição de isolados de *Trichoderma* spp. no crescimento de alface cultivar “Regina” aos 30 dias após a semeadura.



**Figura 2-M:** Valores da massa fresca da parte aérea (A), média da massa fresca da parte aérea (B), massa seca de caule (C) e comprimento de raiz (D) obtidos na avaliação da contribuição de isolados de *Trichoderma* spp. no crescimento de alface cultivar “Regina” aos 30 dias após a semeadura.

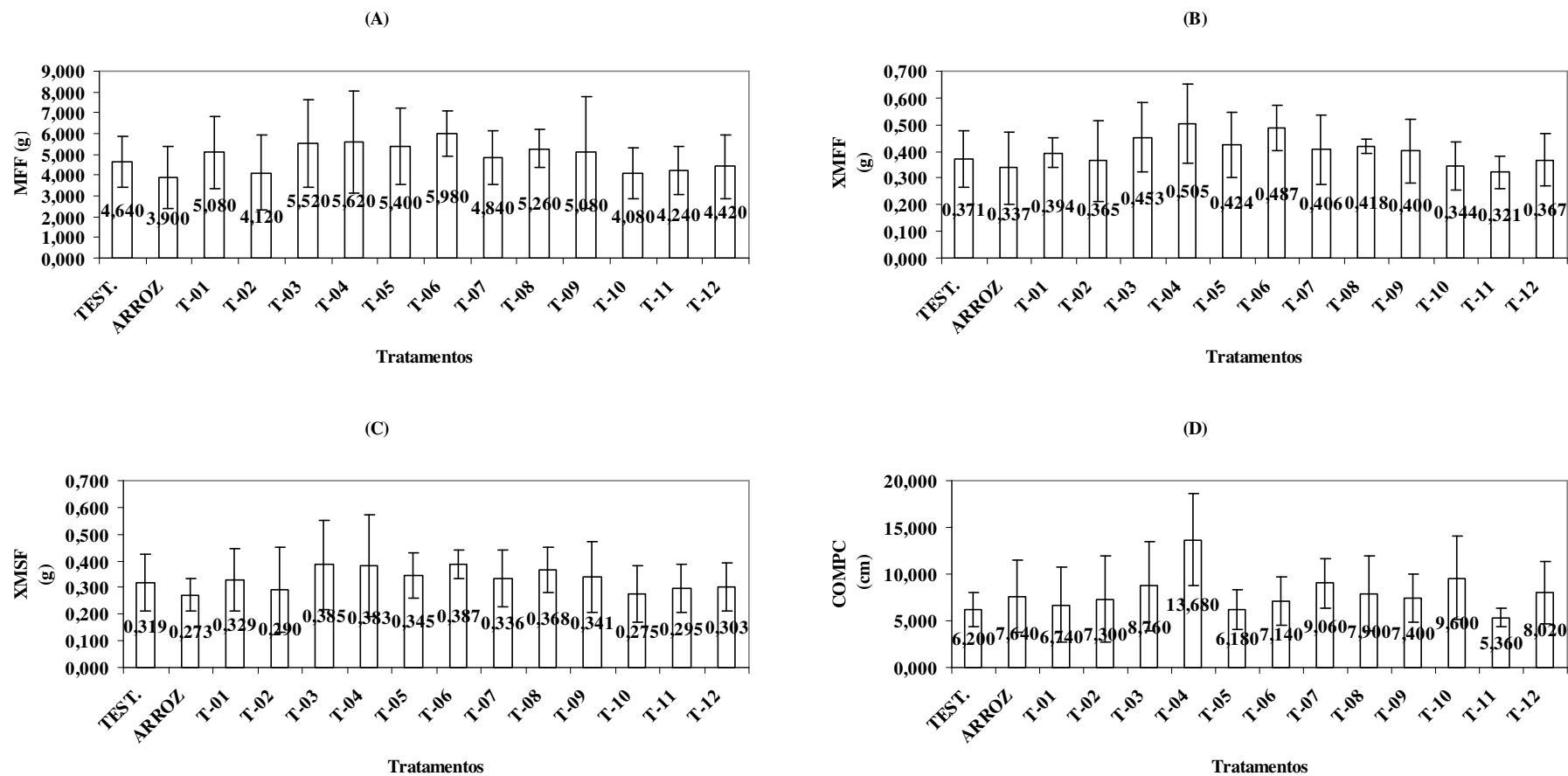


**Figura 3-M:** Valores da média do comprimento de raiz (A), massa seca de raiz (B), média da massa seca de raiz (C) e total das médias da massa fresca da planta (D) obtidos na avaliação da contribuição de isolados de *Trichoderma* spp. no crescimento de alface cultivar “Regina” aos 30 dias após a semeadura.

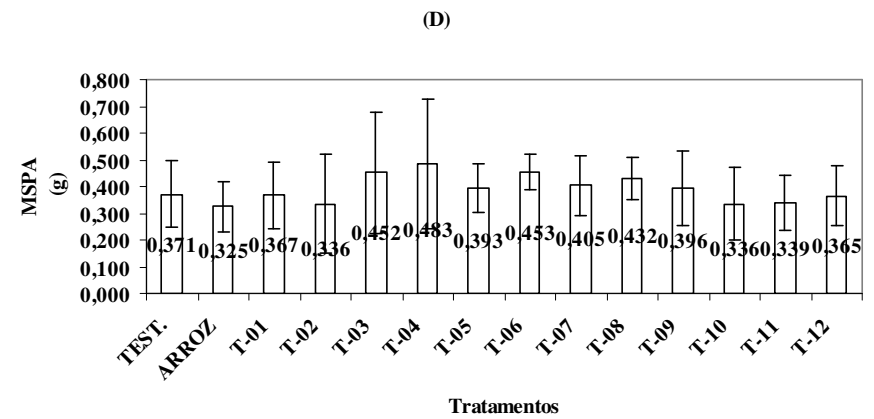
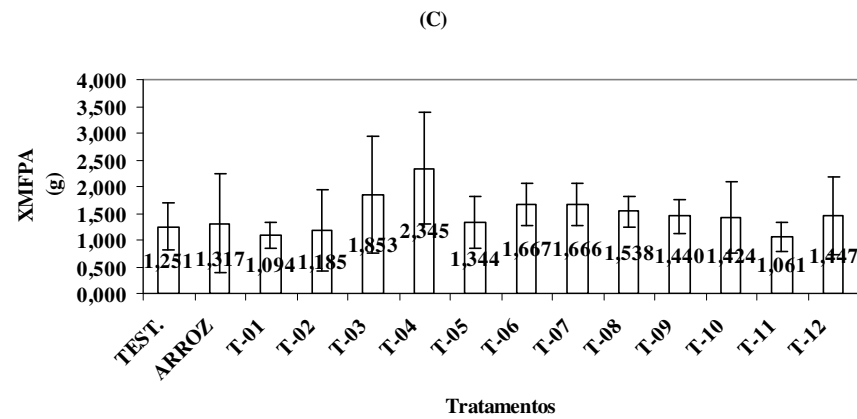
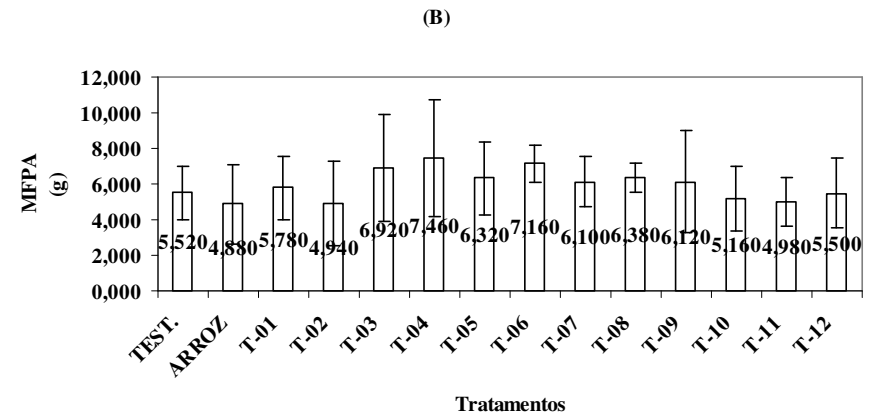
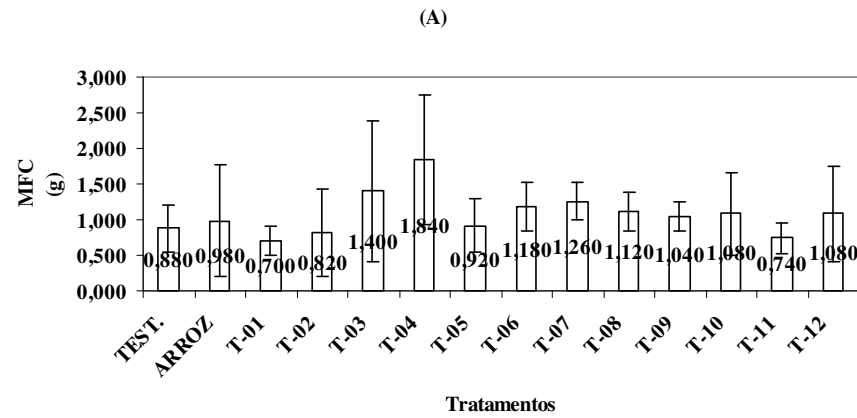


**Figura 4-M:** Valores do total da massa seca da planta (A), total das médias da massa seca da planta (B) e da relação raiz/parte aérea (C) obtidos na avaliação da contribuição de isolados de *Trichoderma* spp. no crescimento de alface cultivar “Regina” aos 30 dias após a semeadura.

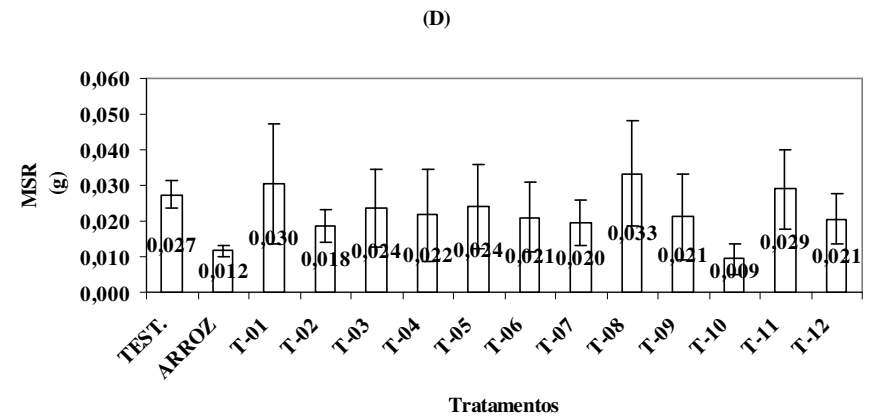
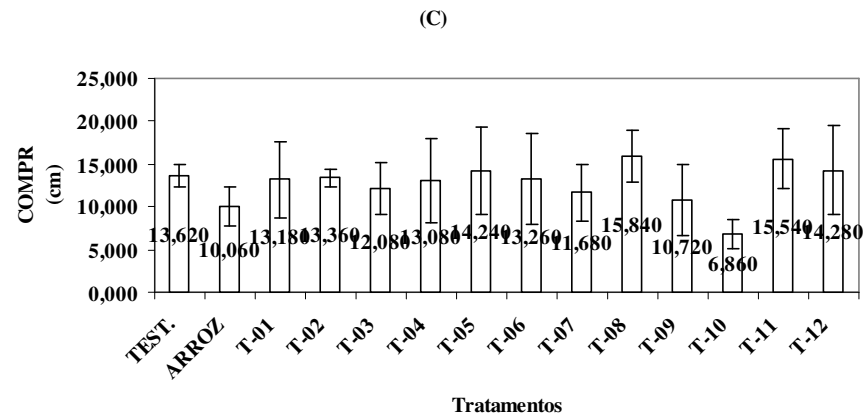
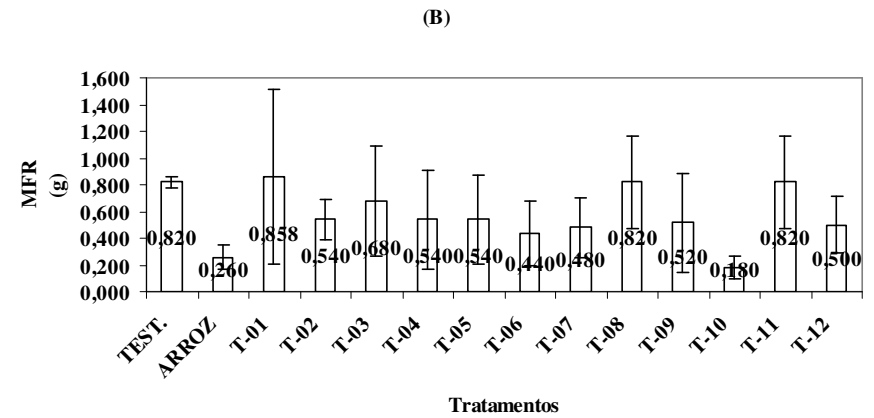
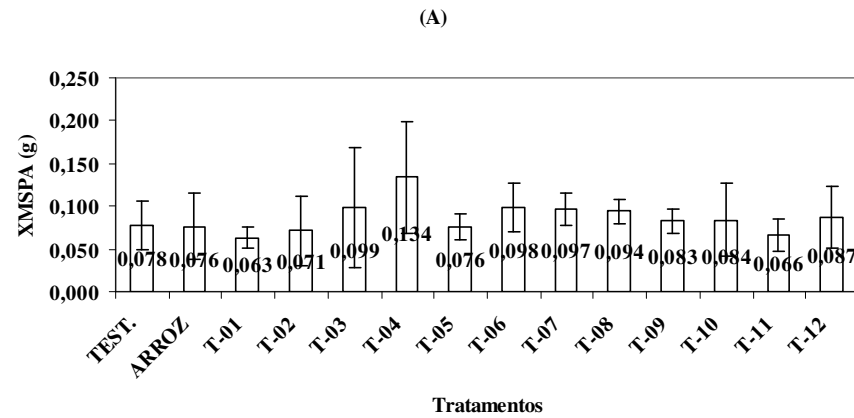
**8.14. Anexo N – Gráficos do Teste da Contribuição de *Trichoderma* spp. para o Crescimento de Plantas de Alface Cultivar “Regina” aos 35 DAS.**



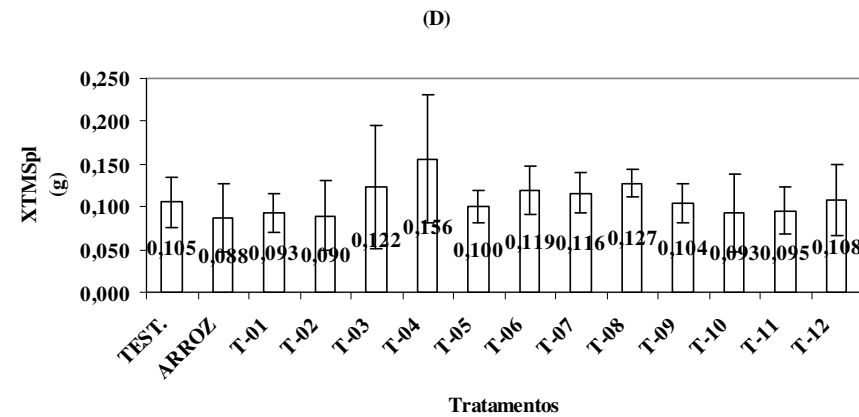
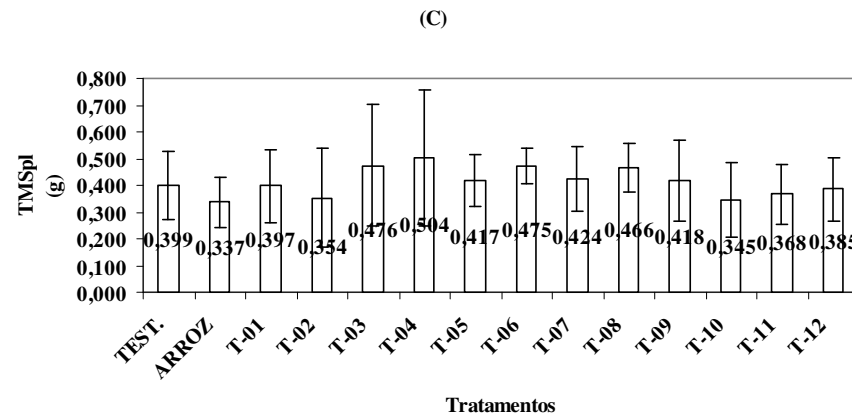
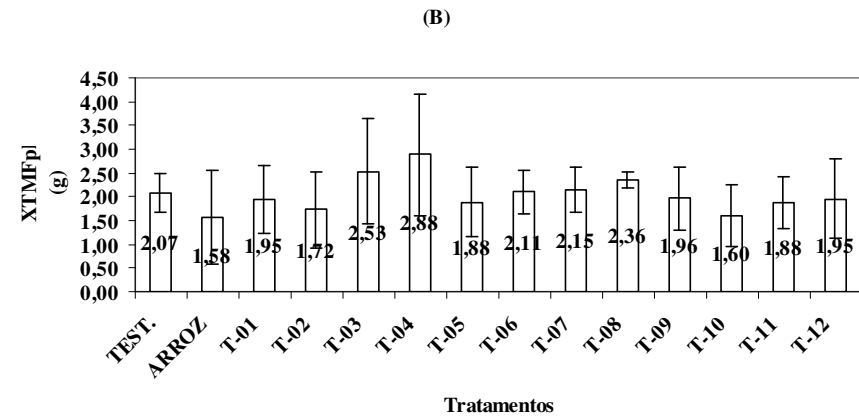
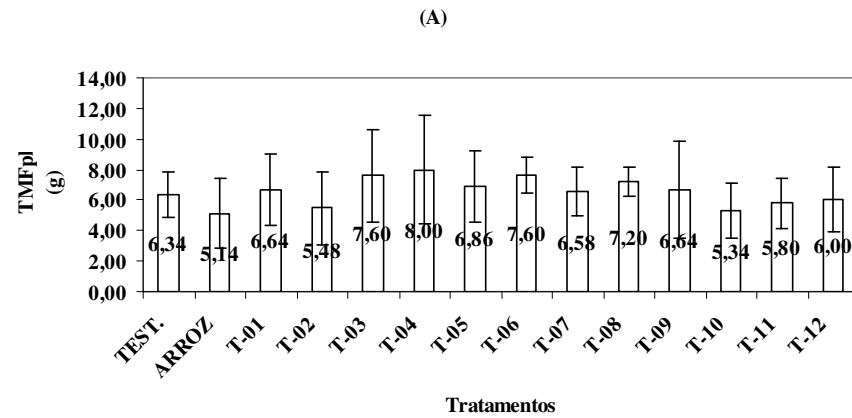
**Figura 1-N:** Valores da massa fresca de folhas (A), média de massa fresca de folhas (B), média de massa seca de folhas (C) e comprimento de caule (D) obtidos na avaliação da contribuição de isolados de *Trichoderma* spp. no crescimento de alface cultivar “Regina” aos 35 dias após a semeadura.



**Figura 2-N:** Valores da massa fresca de caule (A), massa fresca da parte aérea (B), média da massa fresca da parte aérea (C) e massa seca da parte aérea (D) obtidos na avaliação da contribuição de isolados de *Trichoderma* spp. no crescimento de alface cultivar “Regina” aos 35 dias após a semeadura.

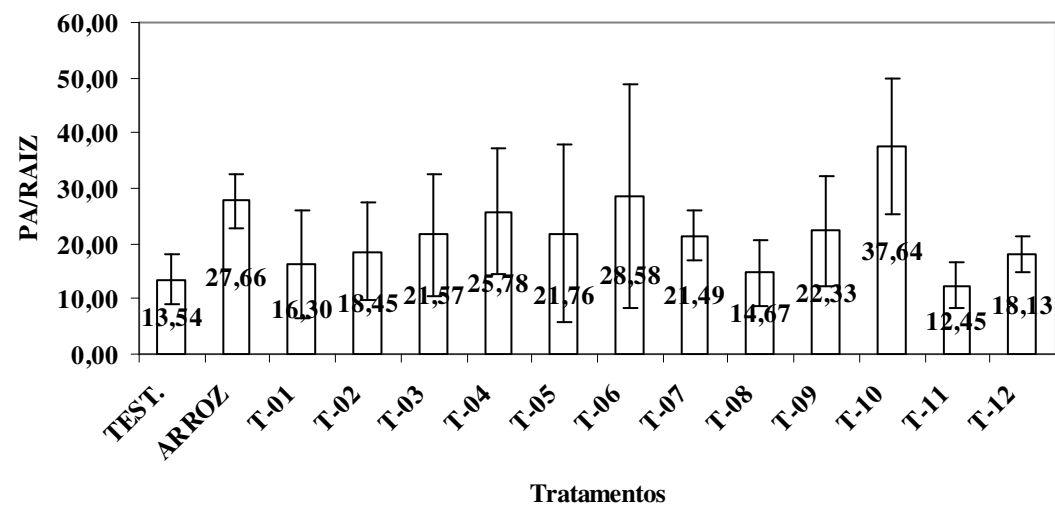


**Figura 3-N:** Valores da média da massa seca da parte aérea (A), massa fresca de raiz (B), comprimento de raiz (C) e massa seca de raiz (D) obtidos na avaliação da contribuição de isolados de *Trichoderma* spp. no crescimento de alface cultivar “Regina” aos 35 dias após a semeadura.



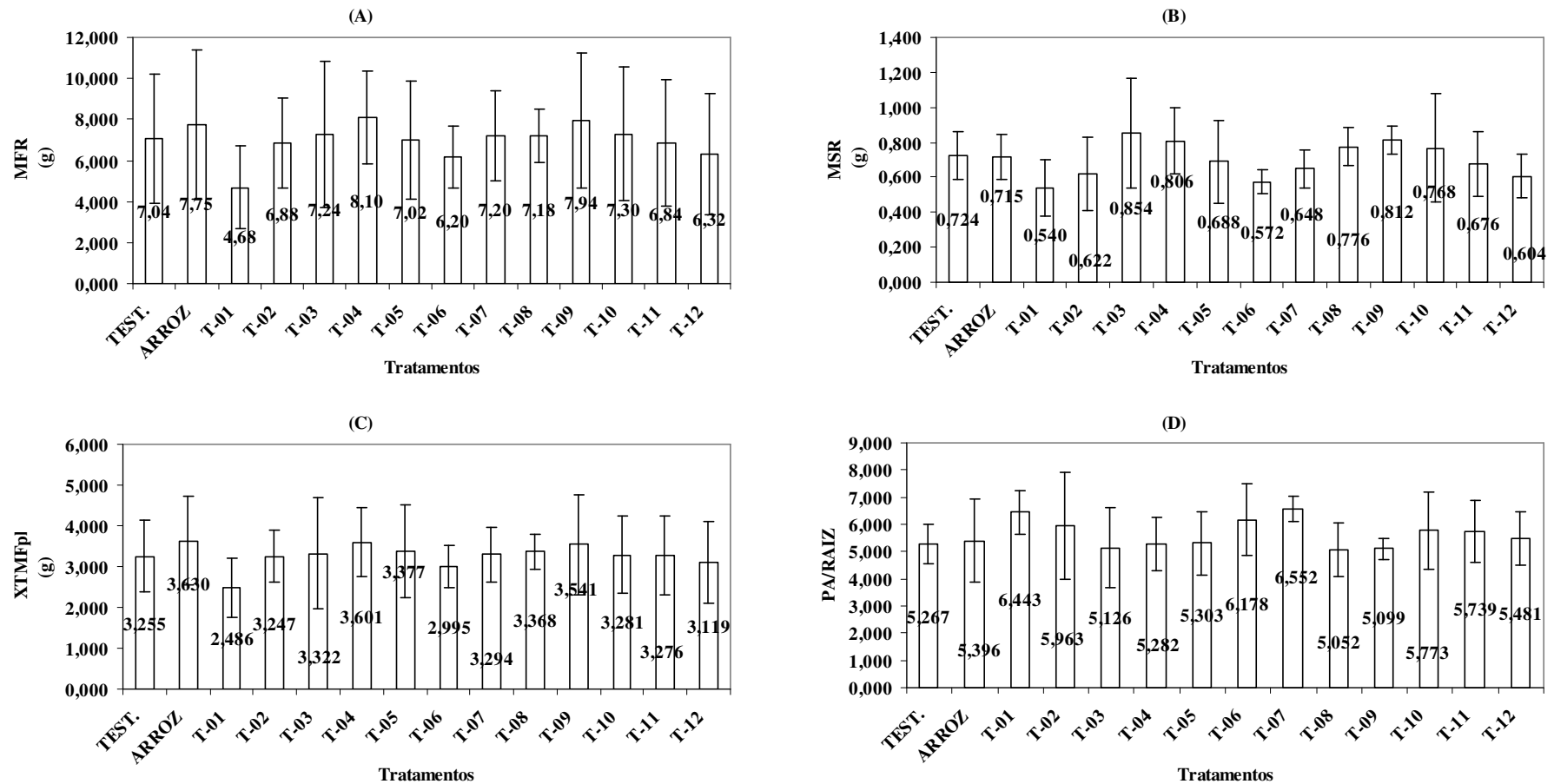
**Figura 4-N:** Valores do total da massa fresca da planta (A), total das médias da massa fresca da planta (B), total da massa seca da planta (C) e total das médias da massa seca de planta (D) obtidos na avaliação da contribuição de isolados de *Trichoderma* spp. no crescimento de alface cultivar “Regina” aos 35 dias após a semeadura.





**Figura 5-N:** Valores da relação parte aérea/raiz obtidos na avaliação da contribuição de isolados de *Trichoderma* spp. no crescimento de alface cultivar “Regina” aos 35 dias após a sementeira.

8.15. Anexo O – Gráficos do teste da Contribuição de *Trichoderma* spp. para o Crescimento de Plantas de Braquiária.



**Figura 6:** Valores da massa fresca de raiz (A), massa seca de raiz (B), total das médias da massa fresca da planta (C) e relação raiz/parte aérea (D) obtidos na avaliação da contribuição de isolados de *Trichoderma* spp. no crescimento de braquiária da espécie *B. decumbens*.