

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**Controle Biológico do Mofo Branco por Isolados de *Trichoderma* nas  
Culturas de Soja e Feijão Comum**

**Leonardo Minaré Braúna**

**BRASÍLIA**

**2011**



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Fitopatologia  
Programa de Pós-graduação em Fitopatologia

## **Controle Biológico do Mofo Branco por Isolados de *Trichoderma* nas Culturas de Soja e Feijão Comum**

**Leonardo Minaré Braúna**

**Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Sueli Corrêa Marques Mello**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Fitopatologia.

**BRASÍLIA**

**2011**

Dissertação de Mestrado realizada junto ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília sob orientação da Pesquisadora Dr<sup>a</sup> Sueli Corrêa Marques de Mello. Apoio institucional da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e financeiro da CAPES.

**Banca examinadora:**

---

**Dra. Sueli Corrêa Marques Mello** (Orientadora)

Universidade de Brasília

Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

---

**Dr. Sebastião Pedro da Silva Neto**

Pesquisador da Embrapa Cerrado

---

**Dr. Helson Mario Martins do Vale**

Universidade de Brasília

*Aos meus pais Benedito Oliveira Braúna (in memoriam) e Maria Susana Minaré Braúna, aos meus irmãos Mikaela, Letícia e Rafael Minaré Braúna e minha adorada companheira Cristiane de Camargo Teixeira, **dedico.***

## AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial minha mãe, meus irmãos e minha companheira pelo amor, amizade, fraternidade, compreensão e confiança.

Agradeço a minha orientadora Dr<sup>a</sup> Sueli Corrêa Marques Mello, pelos anos de ensinamentos, orientação, conselhos e incentivos durante a realização, não somente deste trabalho, mas por todos os anos de convivência e dedicação, minha mãe acadêmica.

Aos meus cunhados Everson e Glauco pelo bons momentos e pelos debates da vida.

Aos grandes amigos Dr. Artur Ferreira Lima Neto (Tocatins), Dr. Gutemberg Barone de Araújo Nojosa (Ministro) e Dr. Marcos Freitas (Marcão) pela amizade, aprendizado na vida pessoal e profissional, assim como as críticas e sugestões.

Ao Dr. Antonio Hernandez Gutierrez, que me incentivou e me colocou na taxonomia dos fungos e que colaborou na determinação das espécies.

A Dra Joseane Padilha pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos professores, Café Filho, Cláudio Lúcio Costa, Carlos Inácio, Carlos Uesugi, Helson M. M. do Vale, José C. Dianese, Juvenil Cares, Luiz E. B. Blum, Marisa Ferreira, Marisa Sanches e Renato Rezende, pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia da UnB, principalmente Cesar e Ribamar e da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em especial aos pesquisadores Dr. João Batista Tavares da Silva e José Eustáquio de Menezes e à analista Irene Martins, pelo apoio, em diferentes formas.

Aos meus companheiros do Cenargen, Danilo, Gisele, Artur, Renato, Marcella, Deborah, Luiza e Carol pela alegria, colaboração e amizade, durante a condução de toda a dissertação.

Ao amigo Magno Rodrigues de Carvalho Filho pelo incentivo, amizade e a grande ajuda na revisão da dissertação.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação em Fitopatologia, pela amizade e companheirismo durante todo o curso.

Aos Pesquisadores da Embrapa Dra. Arailde Fontes Urban, Dr. Marcos Faria e Dr. Rogério Biaggioni Lopes pela amizade, confiança e incentivos para minha vida pessoal e profissional.

Aos meus amigos Shampoo, Jorginho, Julio Cesar, Pulga, Pedro, Seve, Caio, Hiucho, Dudu, Beavis, Patrick, Cabeça, Luiz, Segundo, pela amizade e incentivo.

A Universidade de Brasília, em especial ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade concedida para a realização do curso de Mestrado.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e toda sua equipe técnica, por oferecer a infra-estrutura para a execução dos experimentos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Empresa Sementes Farroupilha, em especial ao Dr. Alan Pomella e ao Técnico Agrícola Valdetino, pelo apoio nos experimentos realizados em Patos de Minas (MG) e bons conselhos para minha vida profissional.

A Empresa Nativa Agrícola pelo trabalho e pela entrada na nova etapa da minha vida profissional, especialmente aos amigos Joel Cenci, Jonatan Amorim, Tião, Silvano, José Emídio, Renato, Maurício, Michelly, Clécio, Jean, André, Linda, Anderson, Jarnane, Rosa, Rafael Whenshefelder, Edemar, Harlan, Edésio, Rubens, Gustavo, Elden e Fernando pela convivência, amizade, críticas e sugestões para este e os novos desafios que estão para acontecer.

E a todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

<b>RESUMO GERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>4</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>14</b>

### **CAPÍTULO I – Controle biológico do mofo branco por isolados de *Trichoderma* nas culturas de soja (*Glycine max* [L.] Merrill) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**

<b>RESUMO</b> .....	<b>21</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>22</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
Isolados e procedência dos antagonistas e do patógeno utilizados.....	<b>26</b>
Identificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> .....	<b>28</b>
Avaliação do antagonismo ao fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> por isolados de <i>Trichoderma</i> em cultivo pareado.....	<b>28</b>
Observações por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura do micoparasitismo exercido pelos isolados de <i>Trichoderma</i> sobre <i>S. sclerotiorum</i> durante o confronto direto de culturas.....	<b>29</b>
Avaliação do efeito inibidor de metabólitos não voláteis produzidos por <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>S. sclerotiorum</i> .....	<b>30</b>
Inibição da germinação miceliogênica dos escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> por isolados de <i>Trichoderma</i> .....	<b>31</b>
Efeito supressivo de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>S. sclerotiorum</i> e promoção de crescimento em plantas de soja e feijão comum, em casa de vegetação.....	<b>34</b>
Controle do mofo branco por <i>Trichoderma</i> spp. nas culturas de soja e feijão comum, em condições de campo.....	<b>35</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
Cultivo e identificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> .....	<b>38</b>
Avaliação do antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>S. sclerotiorum</i> .....	<b>41</b>

Visualização das interações por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEVA).....	42
Avaliação do efeito inibidor do crescimento micelial de <i>S. sclerotiorum</i> por metabólitos não voláteis produzidos por <i>Trichoderma</i> spp.....	46
Inibição da germinação miceliogênica dos escleródios por isolados de <i>Trichoderma</i> .....	50
Controle de <i>S. sclerotiorum</i> por <i>Trichoderma</i> spp. em soja e feijão comum e promoção de crescimento, em casa de vegetação.....	53
Controle de <i>S. sclerotiorum</i> por <i>Trichoderma</i> spp. nas culturas de soja e feijão comum, em condições de campo.....	57
CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

**CAPÍTULO II - Produção de inóculo de isolados de *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma harzianum***

RESUMO.....	71
ABSTRACT.....	71
INTRODUÇÃO.....	72
MATERIAL E MÉTODOS.....	73
Avaliação da Produção de Esporos de <i>T. asperellum</i> (CEN162), <i>T. harzianum</i> (CEN238, CEN223 e CEN241) em Arroz Parboilizado e Milheto sob Diferentes Condições de Umidade.....	73
Curva de Crescimento e Produção de Esporos de <i>T. asperellum</i> (CEN162), <i>T. harzianum</i> (CEN238, CEN223 e CEN241) em Arroz Parboilizado e Milheto.....	74
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
Avaliação da Produção de Esporos de <i>T. asperellum</i> (CEN162), <i>T. harzianum</i> (CEN238, CEN223 e CEN241) em Arroz Parboilizado e Milheto sob Diferentes Condições de Umidade.....	75
Curva de Crescimento e Produção de Esporos de <i>T. asperellum</i> (CEN162), <i>T. harzianum</i> (CEN238, CEN223 e CEN241) em Arroz Parboilizado e Milheto.....	78



CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

## ÍNDICE DE TABELAS

### **CAPÍTULO I – Controle biológico do mofo branco por isolados de *Trichoderma* nas culturas de soja (*Glycine max* [L.] Merrill) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**

**Tabela 1** – Isolados e locais de coleta dos isolados obtidos neste trabalho..... 27

**Tabela 2** – Classificação dos isolados de *Trichoderma* quanto ao antagonismo a *S. sclerotiorum* (CEN217), no teste de pareamento de culturas..... 36

### **CAPÍTULO II - Produção de inóculo de isolados de *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma harzianum***

**Tabela 1** – Valor predito máximo da densidade de esporos para cada isolado e tempo e umidade onde ocorre a maximização..... 75

## ÍNDICE FIGURAS

### CAPÍTULO I – Controle biológico do mofo branco por isolados de *Trichoderma* nas culturas de soja (*Glycine max* [L.] Merrill) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)

<b>Figura 1</b> – Cubos de cenoura não inoculados com escleródio (A) e inoculados (B).....	32
<b>Figura 2</b> – Meio de cultura de vermiculita + farinha de soja – (A) sem escleródios e (B) com escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> .....	33
<b>Figura 3</b> – Micrografias mostrando parasitismo de isolados de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	44
<b>Figura 4</b> – Atividade de metabólitos não voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. em relação ao crescimento micelial de <i>S. sclerotiorum</i> .....	46
<b>Figura 5</b> – Porcentagens com desvio padrão da inibição do patógeno <i>S. sclerotiorum</i> por isolados de <i>Trichoderma</i> independente da metodologia empregada.....	47
<b>Figura 6</b> – Dendograma do agrupamento dos isolados de <i>Trichoderma</i> em relação à inibição do crescimento de <i>S. sclerotiorum</i> .....	48
<b>Figura 7</b> – Médias com desvio-padrão da inibição do crescimento de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> por isolados de <i>Trichoderma</i> .....	52
<b>Figura 8</b> – (A) Escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> depositados no meio Neon-S; (B) coloração amarelada do meio caracterizada pela presença de ácido oxálico.....	52
<b>Figura 9</b> – Dendograma do agrupamento de isolados de <i>Trichoderma</i> obtido a partir dos dados de inibição da germinação de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> .....	53
<b>Figura 10</b> – Dados médios de altura (cm) de plantas de feijão comum resultante do tratamento de sementes com <i>Trichoderma</i> na ausência (*) e na presença (**) de <i>S. sclerotiorum</i> , obtidos em casa de vegetação.....	54
<b>Figura 11</b> – Dados médios de altura (cm) de plantas de soja resultante do tratamento de sementes com <i>Trichoderma</i> na ausência (*) e na presença (**) de <i>S. sclerotiorum</i> , obtidos em casa de vegetação .....	55
<b>Figura 12</b> – Dendograma do agrupamento dos isolados de <i>Trichoderma</i> e representação gráfica de alturas de planta de soja obtidas para cada isolado, em condições de campo.....	58

<b>Figura 13</b> – Dendograma do agrupamento dos isolados e representação gráfica da razão entre pesos seco e fresco para cada isolado de <i>Trichoderma</i> na cultura de soja, em condições de campo.....	<b>58</b>
<b>Figura 14</b> – Dendograma do agrupamento dos isolados de <i>Trichoderma</i> e representação gráfica de alturas de planta de feijão comum, em condições de campo.....	<b>59</b>
<b>Figura 15</b> – Dendograma do agrupamento dos isolados e representação gráfica da razão entre pesos seco e fresco para cada isolado de <i>Trichoderma</i> na cultura de feijão comum, em condições de campo.....	<b>60</b>

**CAPÍTULO II - Produção de inóculo de isolados de *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma harzianum***

<b>Figura 1</b> – Superfície de resposta pelo modelo obtido para o número de esporos por mL para os isolados <b>A</b> – CEN162; <b>B</b> – CEN223; <b>C</b> – CEN238; <b>D</b> – CEN241 submetidos ao tratamento de arroz.....	<b>76</b>
<b>Figura 2</b> – Superfície de resposta pelo modelo obtido para o número de esporos por mL para os isolados <b>A</b> – CEN162; <b>B</b> – CEN223; <b>C</b> – CEN238; <b>D</b> – CEN241 submetidos ao tratamento de milho.....	<b>77</b>
<b>Figura 3</b> – Crescimento dos isolados <b>A</b> – CEN162; <b>B</b> – CEN223; <b>C</b> – CEN238; <b>D</b> – CEN241 em arroz parboilizado.....	<b>78</b>
<b>Figura 4</b> – Crescimento dos isolados <b>A</b> – CEN162; <b>B</b> – CEN223; <b>C</b> – CEN238; <b>D</b> – CEN241 em milho.....	<b>71</b>

## RESUMO GERAL

O mofo branco, doença causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary possui em seu ciclo de hospedeiros 408 espécies dentro de 278 gêneros, distribuídas em 75 famílias botânicas e é responsável por perdas de rendimento que podem chegar a 100% em culturas agrônômicas. As medidas de controle na maioria das vezes são ineficazes. O uso de defensivos químicos é muito oneroso, tornando-se inviável. Quanto ao controle biológico, vários estudos têm sido realizados com fungos antagonistas e, dentre eles, espécies do gênero *Trichoderma* tem demonstrado atividade antagônica contra *S. sclerotiorum*, em testes conduzidos tanto em laboratório, quanto em condições de campo. Neste trabalho, 20 isolados de *Trichoderma* foram testados em laboratório e em casa de vegetação. Em campo, três desses isolados foram avaliados em termos de redução do impacto do patógeno sobre o desenvolvimento das culturas de feijão comum e soja. Nestes ensaios, utilizou-se além da microbiolização de sementes, aplicação no sulco de plantio com jato direto e aplicação na parte aérea por barra traçada, cuja concentração de propágulos na suspensão de inóculo para aplicação dos isolados foi de  $1 \times 10^9$  conídios – mL<sup>-1</sup>. Nos testes de laboratório, quatro isolados apresentaram grau máximo de antagonismo (classe 1), 10 isolados alocaram-se na classe 2 e quatro na classe 3, estas duas consideradas com potencial médio e moderado de biocontrole, respectivamente. Dois isolados exerceram baixa atividade antagônica contra *S. sclerotiorum* (classe 4). Quanto à germinação de escleródios, 10 isolados de *Trichoderma* inibiram pelo menos em 90%; quatro apresentaram índices de inibição entre 80% e 65%; dois apresentaram índices de 35% e 25% e os quatro restantes não apresentaram atividade inibitória sobre os escleródios. Já nos testes com metabólitos não voláteis, verificou-se diferença significativa na inibição do crescimento de *S. sclerotiorum*, com os valores médios da porcentagem de

inibição micelial variando desde zero (ausência de inibição) até 100%. Dentre os 20 isolados, seis apresentaram os melhores níveis de controle de doença. Os ensaios conduzidos em campo indicaram maior eficiência dos isolados quando o inoculo foi aplicado via barra, juntamente com as sementes microbiolizadas, seguindo-se a aplicação por meio de aspersão da suspensão de esporos e, por fim, onde só houve aplicação pela microbiolização das sementes, quanto ao desenvolvimento das plantas. Os resultados obtidos indicam que esses isolados são promissores para o desenvolvimento de um programa de controle biológico. Assim, foi avaliada a produção de esporos em laboratório, utilizando dois substratos preparados com diferentes teores de água e tempo de embebição. As maiores taxas de esporulação foram observadas com os CEN162 e CEN238, em arroz parboilizado. Adição de água na proporção de 80%, e períodos de embebição superiores a 15 horas favoreceram a esporulação, independentemente do substrato. Nestas condições, os isolados apresentaram diferentes picos de esporulação no decorrer de 30 dias.

## GENERAL ABSTRACT

White mold disease caused by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary has its cycle of hosts 408 species in 278 genera, distributed in 75 botanic families and is responsible for loss of income that can reach 100 % in agronomic crops. Control measures are most often ineffective. The use of pesticides is very expensive, making it unfeasible. As for biological control, several studies have been conducted on fungi and antagonists, among them species of the genus *Trichoderma* have demonstrated antagonistic activity against *S. sclerotiorum* in trials conducted both in laboratory and in field conditions. In this study, 20 isolates of *Trichoderma* were tested in laboratory and greenhouse. In the field, three of these

isolates were evaluated in terms of reducing the impact of the pathogen on the development of crops of beans and soybeans. In these tests, we used beyond microbiolization seed, application in furrow application with jet direct and shoot with a slash drawn, where the concentration of propagules in the inoculum suspension for application of the isolates was  $1 \times 10^9$  conidia -  $\text{mL}^{-1}$ . In laboratory tests, four isolates showed maximum degree of antagonism (class 1), 10 isolates allocated to the Class 2 and four in Class 3, these two considered potential biocontrol medium and moderate, respectively. Two isolates have had low antagonistic activity against *S. sclerotiorum* (class 4). As for the germination of sclerotia, 10 strains of *Trichoderma* inhibited at least 90%, four showed inhibition rates between 80% and 65% had two rates of 35% and 25% and the remaining four showed no inhibitory activity on the sclerotia. Already in the tests with non-volatile metabolites, there was significant difference in growth inhibition of *S. sclerotiorum*, with the mean percentage inhibition of mycelial ranging from zero (no inhibition) to 100%. Among the 20 isolates, six showed the highest levels of disease control. Tests conducted in the field suggest greater efficiency of the isolates when the inoculum was applied by bar, along with microbiolization seeds, followed by the application by spraying the spore suspension and, finally, where there was only applied by microbiolization seeds, for the development of plants. The results indicate that these isolates are promising for developing a biological control program. Thus, we evaluated the production of spores in the laboratory using two substrates prepared with different amounts of water and soaking time. The highest rates of spore production were observed with CEN162 and CEN238 in parboiled rice. Addition of water at a ratio of 80%, and soaking periods exceeding 15 hours favored sporulation, regardless of the substrate. Under these conditions, the isolates showed different peaks for spore collecting in the course of 30 days.

## INTRODUÇÃO GERAL

Conforme a população humana aumenta, cresce a demanda por alimentos. Para satisfazer a essa necessidade é necessário não só aumentar a área cultivada, mas também e, principalmente, a produtividade. As plantas cultivadas representam a principal fonte nutricional humana, entretanto, o modelo de exploração agrícola adotado ao longo dos anos tem privilegiado o cultivo de um número reduzido de espécies, com estreitamento da base genética infra-específica. Desta forma, maiores populações de uma mesma espécie indubitavelmente aumentam os riscos de ocorrência de epidemias (Reis et al., 2001). Para solucionar o problema invariavelmente se recorre aos agrotóxicos cada vez mais usados, a despeito de onerarem os custos da produção. Associado aos efeitos residuais tóxicos causados pelo uso contínuo desses produtos tem sido verificado um aumento de pressão seletiva, e conseqüente desequilíbrio ambiental (Jack, 1991). A constatação desse problema cada vez mais exacerbado vem ocasionando mudança no conceito de controle de doenças nas últimas décadas. Eliminar completamente o patógeno já não é mais a premissa da agricultura moderna.

A soja (*Glycine max* [L.] Merrill) e o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (Fabales: Fabaceae) encontram-se entre as leguminosas mais consumidas em todo o mundo, seja como alimento humano (caso do feijão na América Latina) ou como ração animal. Ambas constituem fontes proteínicas de baixo custo, carboidratos, lipídios, minerais, vitaminas e fibras (Messina, 1999). O Brasil é o segundo maior produtor de soja no mundo e ocupa o primeiro lugar no cultivo de feijão comum (Embrapa, 2006).

O gênero *Phaseolus* compreende aproximadamente 55 espécies, das quais apenas cinco são cultivadas: o feijoeiro comum (*P. vulgaris*), o feijão de lima (*P. lunatus*), o feijão



Ayocote (*P. coccineus*), o feijão tepari (*P. acutifolius*) e o *P. polyanthus* (EMBRAPA, 2006). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de feijão, porém, é o primeiro quanto ao gênero *Phaseolus*, seguido do México. Na maioria das regiões produtoras, a cultura do feijão é explorada por pequenos produtores, com uso reduzido de insumos, obtendo-se baixos rendimentos. No Brasil, o cultivo é realizado em três épocas do ano, de tal forma que, sempre haverá produção de feijão em algum ponto do país, o que contribui para o abastecimento interno (Yokoyama, 2006). Na safra 2010 – 2011 a área cultivada com feijão na primeira safra foi estimada em 1,42 milhão de hectares, o que configura um pequeno decréscimo de 0,7% em relação à safra anterior; a área na segunda safra foi estimada em 1,82 milhão de hectares, representando um crescimento de 26,2% em relação à safra anterior, enquanto a área plantada na terceira safra está estimada em 765,5 mil hectares, com crescimento de 1,6% em relação à safra passada. Considerando a soma das três safras, as lavouras de feijão do ciclo 2010/11 ocupam uma área de 4,01 milhões de hectares, sendo 11,1% maior que a safra passada. A produção nacional de feijão nas três safras deverá chegar a 3,79 milhões de toneladas, 14,0% maior que o volume colhido na safra 2009/10 (CONAB, 2011).

Com relação à soja, os Estados Unidos aparecem como maior produtor mundial (32%), seguidos do Brasil (28%), Argentina (21%), China (7%) e Índia (4%). A produção brasileira em 2010 – 2011 foi estimada em 75,32 milhões de toneladas, mantendo o ritmo de crescimento das últimas safras. Este volume é 9,7% (ou 6,64 milhões de toneladas) superior à produção obtida na safra 2009/10, quando foram colhidas 68,69 milhões de toneladas (CONAB, 2011). Além de ser amplamente empregada em rações animais, a soja presta-se à extração do óleo mais utilizado mundialmente no preparo de alimentos.

Um dos grandes problemas na produção dessas leguminosas tem sido a doença conhecida como mofo branco, causada pelo ascomiceto *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary (Helotiales: Sclerotiniaceae). Trata-se de um patógeno não específico que pode ser

encontrado parasitando 408 espécies em 278 gêneros, distribuídas em 75 famílias botânicas (CPC, 2007). Dentre estas, a família Fabaceae ocupa a segunda posição, em termos de número de hospedeiros, atrás apenas da família Asteraceae. Há relatos de mofo branco nos diversos continentes, ocorrendo praticamente em todos os países. As perdas na produção atribuídas ao mofo branco podem atingir proporções de até 100 % (Purdy, 1979).

Micro-organismos fitopatogênicos e pragas co-evoluem com as plantas desde os primórdios da agricultura. Apesar de tratar-se de um fenômeno natural, essa co-existência afetou negativamente a agricultura ao longo do tempo. Com o advento da tecnologia, métodos físico-químicos foram adotados para reduzir os impactos destes organismos na agricultura. O uso de agroquímicos, entre outros (Vincent et al 2003) são exemplos desses métodos de controle. No entanto, mais recentemente, a integração do controle biológico com esses métodos vem revolucionando o manejo fitossanitário, haja vista que as estratégias de controle biológico são compatíveis com os sistemas agrícolas auto-sustentáveis, cujas práticas contemplam a conservação dos recursos naturais (Sivan e Chet, 1992).

De acordo com Cook e Baker (1983), controle biológico se define como redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, por um ou mais organismos, realizado naturalmente, ou através da manipulação do ambiente ou do hospedeiro, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas. Para Bettiol (1991) o controle biológico resulta da interação entre o patógeno, o hospedeiro e o antagonista, no qual sistema biológico sofre isolada ou conjuntamente a influência do ambiente.

O papel dos agentes de controle biológico na agricultura vem sendo reconhecido e tem se tornado cada vez mais crucial, em alguns casos, complementando ou substituindo os agroquímicos (Templeton & Heiny, 1989; Whipps & Lumsden, 2001). Entre os vários micro-organismos com ação antagonista, destacam-se os fungos, pela relativa facilidade de

identificação em nível de espécies e, também, pelo fato de que sua maioria apresenta facilidade de produção em meios artificiais (Copping & Menn, 2000). Neste contexto, os do gênero *Trichoderma* (Hipopocrales, Ascomycota) encontram-se entre os que atraem maior atenção (Ahmad & Baker, 1987; Bettiol & Ghini, 1995; Whipps & Lumsden, 2001). Segundo Heraux et al, (2005), os fungos do gênero *Trichoderma* representam quase 50% do mercado de agentes de controle biológico. O início das pesquisas no uso de *Trichoderma* para controle de doenças das plantas se deu a partir do trabalho pioneiro de Weindling, (1934) que constatou a capacidade de *T. lignorum* (Tode) Harz (= *Trichoderma viride* Pers.:Fr.) de parasitar importantes patógenos de solo. Trata-se de um gênero constituído de fungos cosmopolitas colonizadores de solo e frequentemente encontrado associado à madeira em decomposição. Há espécies que são eficientes produtoras de enzimas industriais e, por isso, economicamente importantes (Druzhinina & Kubicek, 2005).

Dentre as espécies de *Trichoderma* alguns isolados, podem atuar tanto contra patógenos de solo e de parte aérea durante desenvolvimento da cultura, quanto contra aqueles de pós-colheita, na fase de armazenamento. São inúmeros os relatos de sucesso com o uso de *Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole, sobretudo no que se refere ao controle de patógenos de solo, tais como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *S. sclerotiorum*, *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Cylindrocladium scoparium* e *Colletotrichum truncatum* (Naseby et. al., 2000; Cúndom et. al., 2003; Carvalho-Filho, 2008; El-Hasan et al. 2008; El-Hasan et al. 2009; Louzada et al. 2009; Reis Almeida et al. 2007). galhas (*Meloidogyne javanica* Treub) em tomateiro (Sharon et. al., 2001);

Na parte aérea dos vegetais temos relatos de controle na murcha verticilar (*Verticillium dahliae* Kleb) em berinjela (Corder & Melo, 1998); *Venturia* Sacc spp., *Botrytis* (Hjeljord et. al., 2001; Lisboa et. al., 2007), *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime &

Phillips-Mora [*Crinipellis pernicioso* Stahel], (Sanogo et. al., 2002). O controle de doenças na fase de pós-colheira é mais evidente em tubérculos (Okibo & Ikediugwu, 2000).

O gênero *Trichoderma* foi introduzido há mais de 200 anos por Person (1794). O Gênero pode ser reconhecido por suas características macroscópicas, tais como rápido crescimento em meio de cultura, micélio aéreo esparso e pústulas conidiogênicas verdes ou brancas. Rifai (1969) desenvolveu um delineamento genérico para as características microscópicas que é aceito até hoje no qual o conidióforo geralmente apresenta-se ramificado em diferentes níveis, podendo de acordo com a espécie, apresentar além da ramificação primária, uma secundária, terciária e assim por diante. Apêndices estéreis, que podem ser encontrados em algumas espécies, também são características do conidióforo. As células conidiogênicas (fiálides) variam de ampuliforme a lageniforme, geralmente com constrição na base e afinando abruptamente no ápice, estão dispostas em verticilos terminais nas ramificações do conidióforo. Os conídios podem ser hialinos ou mais frequentemente verdes, com parede lisa, rugosa ou estriada, de acordo com a espécie. Clamidósporos normalmente presentes, podendo ser intercalares ou terminais (Rifai, 1969; Gams & Bisset, 1998).

Rifai (1969) em sua classificação para o gênero, reconheceu nove espécies: *T. hamatum* Bain, *T. viride* Persoon, *T. aureoviride* Rifai, *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Lieckfeldt, *T. pseudokoningii* Rifai, *T. longibrachiatum* Bissett, *T. polysporum* Link e *T. glaucum* Rifai. Ao estudar a discriminação das espécies definidas por Rifai, Bisset (1991a,b), propôs o termo “seções” para separar espécies similares dentro das nove originalmente aceitas. De acordo com esse sistema taxonômico, os fungos do gênero *Trichoderma* distribuem-se em cinco seções: *Trichoderma* Bissett; *Longibrachiatum* Bissett; *Saturnisporum* Doi, Abe & Sugiyama; *Pachybasium* (Sacc.) Bissett e *Hypocreanum* Bisset.

Entretanto, os métodos de classificação pela taxonomia clássica propostos até o momento não permitiram uma efetiva separação das espécies de *Trichoderma*. Também a

relação com o teleomorfo não está completamente elucidada, assim como as diferenças na produção de metabólitos por isolados, o que motivou a utilização de marcadores moleculares, especialmente nas regiões correspondentes aos espaços transcritos internos ITS1 e ITS2 para determinação de espécies. Assim, uma análise do perfil dessas regiões tem permitido diferenciar 78 espécies de *Trichoderma* (Druzhinina & Kubicek (2005). Ainda segundo esses autores, esse método tornou possível separar com segurança as espécies dentro das seções *Trichoderma* e *Pachybasium*, as quais acomodam a maioria dos isolados habitantes do solo.

Mesmo com a utilização da biologia molecular, boa parte das espécies do gênero *Trichoderma* continua sendo determinada com base nas características macroscópicas e microscópicas, enquanto análises do sequenciamento genético têm sido apenas utilizadas como complemento na confirmação e diferenciação de isolados. A literatura apresenta diversas chaves para identificação de *Trichoderma*. Além das chaves publicadas por Rifai (1969), Bisset (1991a,b), Domsch et al. (1980) e Gams e Bisset (1998), pode-se lançar mão da chave interativa disponível na internet (<http://nt.ars.grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>).

A utilização intensa de espécies de *Trichoderma* nos programas de controle biológico de fitopatógenos apóia-se nas inúmeras estratégias de sobrevivência e desenvolvimento desses fungos, tais como: rápido crescimento, presença de clamidósporos, produção de antibióticos, micoparasitismo, eficiência na mobilização e absorção de nutrientes e como promotores do desenvolvimento das plantas (Chet et al., 1997) além da estimulação dos mecanismos de defesa dos vegetais (Van Driesche & Bellows, 1996; De Meyer et al, 1998; Yedidia et al, 2001).

Benítez et.al. (2004), demonstrou que isolados de *T. harzianum*, possuem a capacidade de estimular o crescimento de plantas de tomate, fumo e algodão e, ao mesmo tempo, as protegem contra vários fitopatógenos. Alguns isolados seriam capazes de colonizar raízes,

produzindo compostos que estimulam o crescimento e os mecanismos de defesa das plantas a doenças e a estresses abióticos. Ainda, de acordo com esses autores, junto com a síntese ou estimulação da produção de fitohormônios ou substâncias estimuladoras do crescimento, alguns isolados de *Trichoderma* acidificam o ambiente à sua volta, por secreção de ácidos orgânicos resultantes do metabolismo de compostos carbônicos, principalmente glicose, por isso seriam capazes de solubilizar fosfatos e micronutrientes. Embora a habilidade de isolados de *Trichoderma* como protetores de plantas a doenças radiculares seja atribuída aos efeitos diretos contra os patógenos, a própria associação do agente de biocontrole com as raízes também resultariam em efeitos benéficos nas plantas.

Os fungos do gênero *Trichoderma* vem sendo utilizados com sucesso no controle de várias doenças de plantas, devido à capacidade de reduzir a sobrevivência, crescimento ou infecções causadas pelos patógenos, dentre as quais, as podridões de raiz e colo causadas por *S. rolfsii* (Papavizas, 1985; Benitez, 2004; Carvalho Filho, 2008). Os mecanismos de biocontrole utilizados pelo *Trichoderma* são: a) **antibiose**, quando há envolvimento de compostos difusos de baixo peso molecular, os antibióticos que atuam na inibição do fungo alvo. Os metabólitos produzidos pelo antagonista inibem o crescimento normal do patógeno no solo (Denis e Webster, 1971a,b e Benítez, 2004). A maioria dos isolados de *Trichoderma* produzem metabólitos tóxicos voláteis e não voláteis, os quais atuam na supressão da colonização do organismo atingido. Dentre esses metabólitos, são conhecidos: ácido harziânico, alamethicinas, tricholina, antibióticos, glisopreninas, ácido heptelídico, gliovirina, viridina e massoilactona (Benítez et al., 2004). Weindling (1934) demonstrou a produção, por *T. lignorum*, de um metabólito descrito por ele como “princípio letal”, com capacidade de controlar o crescimento micelial de *R. solani* Kühn e outros fungos in vitro. Esse “princípio letal” foi identificado posteriormente como o antibiótico Gliotoxina (Weindling, 1941); b) **competição**, que tem sido considerada um dos mais eficientes mecanismos de ação usados

por *Trichoderma* e está relacionada à capacidade desses organismos em mobilizar e absorver prontamente os nutrientes à sua volta e de utilizar diferentes fontes, por exemplo, de carbono. Durante este processo, o antagonista pode suprimir o crescimento da população do patógeno na rizosfera e, assim, reduzir o desenvolvimento da doença. Além disso, várias espécies de *Trichoderma* se caracterizam por sua resistência a diferentes compostos tóxicos, não apenas àqueles produzidos e liberados pelas plantas em resposta ao ataque por patógenos, como também, a vários agrotóxicos comumente utilizados na agricultura (Chet et. al., 1997; Benítez et al., 2004). Também a competição por espaço ou sítios de infecção poderá ocorrer concomitantemente, contribuindo para a atividade de biocontrole (Benitez et al., 2004; Vinale et al., 2008). De acordo com Gullino (1992), o controle de *B. cinerea* Persoon ex Fries em videiras por *T. harzianum* é decorrente da colonização dos tecidos florais, que constituem os sítios de infecção do patógeno. Sivan & Chet (1989) postularam que a competição por nutrientes seja o principal mecanismo usado por *T. harzianum* no controle de *F. oxysporum* Schlecht f. sp. *melonis*; c) **micoparasitismo**, fenômeno em que determinado micro-organismo obtém nutrientes a partir das células vivas e funcionais do hospedeiro com quem vive em íntima associação. As interações micoparasíticas podem ser principalmente: necrotrófica – o micoparasita mata o hospedeiro, utilizando seu conteúdo celular como fonte de nutrição; biotrófica – o micoparasita obtém nutrientes das células do hospedeiro sem acarretar, a estes, danos imediatos (Melo, 1998 Cassiolato, 1998). Segundo Benítez et al. (2004) este mecanismo compreende um complexo processo que envolve eventos sequenciais: 1 – estímulo químico de fungos fitopatogênicos atraem os fungos antagonistas e induz uma resposta quimiotrópicas do antagonista; 2 – ocorre o reconhecimento entre antagonista e fitopatógeno; e 3 – presença das interações entre as hifas do patógeno e do antagonista; o antagonista cresce, enrolando-se ao longo das hifas do hospedeiro, secretando diferentes enzimas líticas, como quitinase, glucanase e pectinase; d) finalmente, a **indução de**

**resistência** é o mecanismo de controle biológico, pelo qual, a planta responde à agressão por patógenos por meio da produção de fitoalexinas, lignina adicional das células e compostos fenólicos (Horsfall & Cowling, 1980; Bailey, 1985). Tais respostas podem também ocorrer ao contato com organismos não patogênicos ou isolados não virulentos do patógeno (Van Driesche & Bellows, 1996).

Devido a esses mecanismos, *Trichoderma* apresenta um grande potencial de uso no controle biológico, além do que, determinadas espécies desse fungo são resistentes a doses de pesticidas (Chet, 1997 e Benitez, 2004), possibilitando potencializar baixas doses desses produtos, dentro de um esquema de manejo integrado, assim permitindo a redução do impacto ao meio ambiente ocasionada por aplicações de agrotóxicos em larga escala.

Muitos estudos com os fungos do gênero *Trichoderma* vêm indicando a capacidade de alguns isolados destes organismos em promover maior desenvolvimento de plantas. Melo (1996), trabalhando com duas linhagens mutantes de *T. koningii* antagônicas a *S. sclerotiorum* mostrou a eficiência na produção de celulase, além de ampliarem a taxa de emergência e o acréscimo de massa seca em plântulas de pepino. Resende (2004) observou que a microbiolização de sementes de milho com um isolado de *T. harzianum* promoveu incremento de massa seca nas raízes. Embora os mecanismos usados por isolados de *Trichoderma* na promoção de desenvolvimento de plantas não estejam claros, existem evidências de produção de fitohormônios, como o ácido Indolacético (AIA), cujas funções consistem no desenvolvimento dos vegetais pelo alongamento celular, produzindo as gemas apicais, laterais, ápice das raízes, formação de raízes secundárias, frutos e folhas jovens (Gravel, 2007). O mesmo autor sugere mecanismos de solubilização de nutrientes, especialmente fosfato e a consequente a disponibilização de fósforo, um nutriente importante para desenvolvimento das plantas.



O aumento da produtividade, assim como a redução dos custos de produção almejada pelos agricultores pode ser alcançada com um mínimo de impacto ao meio ambiente, utilizando o controle biológico (Rezende et. al., 2004; Cavalho Filho, 2008). No caso das doenças causadas por *S. sclerotiorum*, o controle químico mantém-se como método de controle mais utilizado para controle dos escleródios. Além disso, adotam-se práticas de manejo que incluem rotação de culturas, controle de espécies daninhas, irrigação eficiente, uso de cultivares resistentes e adequação do espaçamento entre plantas que, entretanto, na maioria das vezes são ineficazes. Atenção deve ser dada aos trabalhos conduzidos por Bin et al., (1991), Knudsen, et al., (1991) e Cassiolato (1995), os quais comprovam a eficiência na redução de incidência da doença por meio da ação micoparasítica sobre os escleródios ou hifas de *S. sclerotiorum* por *Trichoderma* de forma continuada, reduzindo assim o potencial de inóculo no solo.

Existe uma grande quantidade de produtos à base de fungos disponibilizada para comercialização, com registro, no Brasil e exterior. Esses produtos apresentam qualidade variável em termos de formulação, concentração do ingrediente ativo e vida de prateleira. Os biofungicidas são resultados de um processo que inclui a seleção do agente de biocontrole, com extensiva avaliação da eficácia, desenvolvimento do formulado, registro, “scale up” e avaliação do mercado (Tigano & Mello, 2006). Eles podem ser aplicados diretamente no solo ou em tratamento de sementes ou, ainda, como inoculantes de partes aéreas, tais como folhas e órgãos de propagação, a depender da parte da planta que se deseja proteger.

O desenvolvimento de formulações apropriadas é um pré-requisito importante para a implementação de programas de controle biológico de fitopatógenos, usando micro-organismos antagônicos (Lumsden & Lewis, 1989). A formulação de um agente de biocontrole depende da produção do organismo em larga escala e manutenção de sua viabilidade no final do processo (Adekunle et al., 2006). Diversas formulações comerciais de

*Trichoderma* spp. para o controle de doenças de plantas são essencialmente baseadas em suportes inertes (Papavizas, 1991). Multiplicar espécies de *Trichoderma* em substratos facilmente degradados e com um longo tempo de prateleira terá a aplicação no campo facilitada (Thangavelu et al. 2004).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEKUNLE AT, IKOTUN T, FLORINI DA, CARDWELL KF. 2006. Field evaluation of selected formulations of *Trichoderma* species as seed treatment to control damping-off of cowpea caused by *Macrophomina phaseolina*. **Afr. J. Biotechnol.** 5 (5): 419-424
- AHMAD JS, BAKER R. 1897. Competitive saprophytic ability and cellulolytic activity of rhizosphere-competent mutants of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathol** 77: 358–362.
- BAILEY JA. (ed). 1985. **Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions**. Springer-Verlag, Berlin, German.
- BENÍTEZ T, RINCÓN AM, LIMÓN MC, CODÓN AC. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology.** 7: 249-260.
- BETTIOL W. 1991. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol W. (Org.) **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna. Embrapa - CNPMA. pp. 179.
- BETTIOL W, GHINI R. 1995. Controle Biológico. In: BERGAMIN FILHO A, KIMATI H, AMORIM L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia**. 3° ed. Agronômica Ceres. p. 919.
- BIN L, KNUDSEN GR, ESCHEN DJ. 1991. Influence of an antagonistic strain of *Pseudomonas fluorescens* on growth and ability of *Trichoderma harzianum* to colonize sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. **Phytopathol.** 81: 994-1000.

- BISSETT J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma* II. Infragenetic classification **Can. J. Bot.** 69: 2357-2372.
- BISSETT J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma* III. Section Pachybasium. **Can. J. Bot.** 69: 2373-2417.
- CARVALHO-FILHO MR. 2008. *Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole de *Cylindrocladium scoparium* e como promotores de crescimento em mudas de eucalipto. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília.
- CASSIOLATO AMR. 1995. Parasitismo de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary por mutantes de *Trichoderma harzianum* Rifai. **Tese (Doutorado em Genética e melhoramento de Plantas)** Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. p.133.
- CASSIOLATO AMR. 1998. Ecologia de fungos fitopatogênicos formadores de escleródios. *In: MELO IS, AZEVEDO JL. Ecologia Microbiana*. Jaguariúna. Embrapa – CNPDA, p.139-165.
- CHET I, INBAR J, HADAR I. 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. *In: WICKLOW DT, SÖDERSTRÖM B. (eds) The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. Springer-Verlag, Berlin, p.165-184.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. 2011. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo segundo levantamento, setembro 2011**. Brasília : Conab, 41pp. Acessado em 10 de outubro de 2011 (<http://conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=>).
- COOK RJ, BAKER KF. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. **The American Phytopathological Society**. Minnesota. U.S.A. p.533.
- COPPING LG, MENN JJ. 2000. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Manage. Sci.** 56: 651–676.

- CORDER MPM, MELO IS. 1998. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahlia*. **Ciência Agrícola**. 55: 1-7.
- CPC, CABI *International*, 2007. **Crop Protection Compendium**. Wallingford, UK. CABI *International*. 2007 Edition.
- CÚNDOM MA, MAZZA SM, GUTIÉRREZ SA. 2003. Short communication. selection of *Trichoderma* spp. isolates against *Rhizoctonia solani*. **Spanish Journal of Agricultural Research**. 1: 79-81.
- DE MEYER G, BIGIRIMANA J, ELAD Y, HOFTE M. 1998. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinera*. **Eur J Plant Pathol**. 104: 279-286.
- DENNIS C, WEBSTER J. 1971a. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. **Trans. British. Mycol. Soc.** 57: 25-39.
- DENNIS C, WEBSTER J. 1971b. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. **Trans. British. Mycol. Soc.** 57: 41-48.
- DRUZHININA I, KUBICEK CP. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? **Journal of Zhejiang University Science**. 6: 100-112.
- EL-HASAN A, WALKER F, BUCHENAUER H. 2008. *Trichoderma harzianum* and its metabolite 6-pentyl-alpha-pyrone suppress fumaric acid produced by *Fusarium moniliforme*. **J. Phytopathol**. 156, 79–87.
- EL-HASAN A, WALKER F, SCHÖNE J, BUCHENAUER H. 2009. Detection of viridifungin A and other antifungal metabolites excreted by *Trichoderma harzianum* active against different plant pathogens. **Eur J Plant Pathol**. 124:457–470.

- GAMS W, BISSET J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: HARMAN G, KUBICET CP. ***Trichoderma and Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics***, Taylor & Francis, Londres, p.3-34.
- GRAVEL V, ANTOUN H, TWEDDELL RJ. 2007. 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 & Biochemistry***. 39: 1968-1977.
- GULLINO ML. 1992. Control of *Botrytis* rot of grapes and vegetables with *Trichoderma* spp. In: TJANOS EC, PAPAVIDAS GC, COOK RJ. (Eds) ***Biological Control of Plant Diseases, Progress and Challenges for the Future***. Plenum Press, New York, pp. 125-132.
- HERAUX FMG, HALLETT SG, WELLER SC. 2005 Combining *Trichoderma virens* inoculated compost and a rye cover crop for weed control in transplanted vegetables. ***Biol. Control***. 34: 21–26.
- HJELJORD LG, STENSVAND A, TRONSMO A. 2001. Antagonism of nutrient-activated conidia of *Trichoderma harzianum* (*atroviride*) P1 against *Botrytis cinerea*. ***Phytopathol.*** 91: 1172-1180.
- HORSFALL JG, COWLING EB. 1980. ***Plant Disease: An Advanced Treatise***. Vol. 2. How Diseases Develop in Populations. Academic Press, New York.
- KNUDSEN GR, ESCHEN DJ, DANDURAND LM, BIN L. 1991. Potential for biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* through colonization of sclerotia by *Trichoderma harzianum*. ***Plant Dis.*** 75: 466-470.
- LISBOA BB, BOCHESSE CC, VARGAS LK, SILVEIRA JRP, RADIN B, OLIVEIRA AMR DE O. 2007. Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na redução da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. ***Ciência Rural***. 37: 1255-1260.

- LOUZADA GAS, CARVALHO DDC, MELLO SCM, LOBO JÚNIOR M, MARTINS I, BRAÚNA LM. 2009. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. **Biota Neotrop.** 9(3): 145-149.
- MELO IS. 1996. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas.** 4: 261-295.
- MELO IS. 1998. **Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos.** In: Controle Biológico, (ed. Melo IS, Azevedo JL) Jaguariuna – SP, Embrapa, pp20-67.
- MESSINA MJ. 1999. Legumes and Soybeans: Overview of Their Nutritional Profiles and Health Effects. **American Journal of Clinical Nutrition.** 70: 439-450.
- NASEBY DC, PASCUAL JA, LYNCH JM. 2000. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. **Journ of Applied Microbiology.** 88: 161-189.
- OKIGBO RN, IKEDIUGWU FEO. 2000. Studies on biological control of postharvest rot in yams (*Dioscorea* spp.) using *Trichoderma viride*. **J of Phyto.** 148: 351-355.
- PAPAVIZAS GC. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol. **Ann. Rev. Phytopathol.** 23: 23-54.
- PURDY LH. 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, Diseases and Symptomatology, Host Ranges, Geographic Distribution and Impact. **Phytopathol.** 69(8): 875-880.
- REIS ALMEIDA FB, CERQUEIRA FM, NASCIMENTO SILVA R, ULHOA CJ, LIMA AL. 2007. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnol Lett.** 29: 1189–1193.
- REIS EM, FORCELINI CA, REIS AC. 2001. **Manual de Fungicidas: Guia para o controle químico de doenças de plantas.** 4ª ed, Editora Insular, Florianópolis, SC. 16-17.

- RESENDE ML.2004. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência Agrotecnologia**, 28: 793-798.
- RIFAI MA. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycol. Pap.** 16, 1-56.
- SANOGO S, POMELLIA A, HEBBAR PK, BAILEY B, COSTA JCB, SAMUELS GJ, LUMSDEN RD. 2002. Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipelis pernicioso* on cacao. **Phytopathol.** 92: 1032-1037.
- SHARON E, BAR-EYAL M, CHET AHE, KLEIFELD O, SPIEGEL Y. 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathol.** 91: 687-693.
- SIVAN A, CHET I. 1989. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. **Phytopathol.** 79: 198-203.
- SIVAN A, CHET I. 1992. **Environmental microbiology: microbial control of plant diseases**. New York: Wiley-Liss, 335-354.
- TEMPLETON GE, HEINY DK. 1989. Improvement of fungi to enhance mycoherbicide potential. In: WHIPPS JM, LUMSDEN RD.(Eds.). **Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth**. Cambridge University Press, UK, pp. 127–151.
- TIGANO MS, MELLO SCM. 2006. Fungos agentes de controle biológico. In: OLIVEIRA FILHO EC, MONNERAT RG (Eds). **Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**. Planaltina (DF), Embrapa Cerrados. p.157-174.
- VAN DRIESCHE RG, BELLOWS JR TS. 1996. **Biological Control**. Ed. Chapman & Hall, London. 539p.
- VINALE F, SIVASITHAMPARAM K, GHISALBERTI E L, MARRA R, WOO S L, LORITO M. 2008. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**. 40: 1-10.

- VINCENT C, HALLMAN G, PANNETON B, FLEURAT-LESSARD F. 2003. Management of agricultural insects with physical control methods. **Annu. Rev. Entomol.** 48: 261–281.
- WEINDLING R. 1934. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. **Phytopathol.** 24: 1153-1179.
- WEINDLING R. 1941. Experimental consideration of the mold toxin of *Gliocladium* and *Trichoderma*. **Phytopathol.** 31: 991- 1003.
- WHIPPS JM, LUMSDEN RD. 2001. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. In: BUTT T, JACKSON C, MAGAN N. (Eds.), **Fungal Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential**, CABI Publishing, Wallingford. pp. 9–22.
- YEDIDIA I, SRIVASTVA AK, KAPULNIK Y, CHET I. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and growth of cucumber plants. **Plant and Soil.** 235: 235-242.
- YOKOYAMA LP. 2006. **Cultivo do feijoeiro comum.** Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/importancia.htm>>. Acesso em 30 nov. 2006.



# **CAPÍTULO 01 - CONTROLE BIOLÓGICO DO MOFO BRANCO POR ISOLADOS DE TRICHODERMA NAS CULTURAS DE SOJA (*Glycine max* [L.] Merrill) E FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.)**

## **RESUMO**

A doença conhecida como mofo branco, causada pelo fungo de solo *Sclerotinia sclerotiorum*, afeta mais de 75 famílias botânicas e é responsável por perdas de rendimento que podem chegar a 100% em culturas agrônomicas. Por isso vem sendo estudada por diversos grupos de pesquisa em todo o mundo e possui elevada importância em programas de controle biológico. Neste trabalho, 20 isolados de *Trichoderma* foram testados em laboratório, pela técnica de confronto direto (pareamento) das culturas e também avaliados quanto à produção de metabólitos secundários e capacidade de inibição da germinação miceliogênica dos escleródios. Ensaio foram conduzidos em casa de vegetação com os mesmos isolados. Em campo, três desses isolados foram avaliados em termos de redução do impacto do patógeno sobre o desenvolvimento das culturas de feijão e soja, e efetivo controle da doença. Nesses ensaios, utilizou-se da microbiolização de sementes, cuja concentração de propágulos na suspensão de inóculo para aplicação dos isolados foi de  $1 \times 10^9$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ . Nos testes pareamento das culturas, a avaliação foi realizada com o auxílio de uma escala que varia de 1 a 5. Quatro isolados apresentaram grau máximo de antagonismo (classe 1), 10 isolados alocaram-se na classe 2 e quatro na classe 3, estas duas consideradas com potencial médio e moderado de biocontrole, respectivamente, enquanto os outros dois exerceram baixa atividade antagonista contra *Sclerotinia sclerotiorum* (classe 4). Quanto à germinação de escleródios, 10 isolados de *Trichoderma* inibiram pelo menos em 90%; quatro apresentaram índices de

inibição entre 80% e 65%, dois apresentaram índices de 35% e 25% e os quatro restantes não apresentaram atividade inibitória sobre os escleródios. Já nos testes com metabólitos não voláteis, verificou-se diferença significativa na inibição do crescimento de *S. sclerotiorum*, com os valores médios da porcentagem de inibição micelial variando desde zero (ausência de inibição) até 100%. Nos ensaios de casa de vegetação, observou-se diferença significativa entre os isolados estudados no controle da doença. Dos vinte isolados, seis apresentaram os melhores níveis de controle de doença. Os ensaios conduzidos em campo indicaram maior eficiência dos isolados quando o inóculo foi aplicado via barra, juntamente com as sementes microbiolizadas, seguindo-se a aplicação por meio de aspersão da suspensão de esporos e, por fim, onde só houve aplicação pela microbiolização das sementes, quanto ao desenvolvimento das plantas. Os resultados obtidos mostraram ser bastante promissores para o desenvolvimento de um programa de controle biológico.

## **ABSTRACT**

The white mold disease caused by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, affects more than 75 botanic families and is responsible for loss of income that can reach 100% in agronomic crops. So has been studied by several research groups around the world and has great importance in biological control programs. In this study, 20 isolates of *Trichoderma* were tested in the laboratory, the technique of direct confrontation (paired cultures) of crops and also analyzed for production of secondary metabolites and the capacity to inhibit germination of sclerotia. Tests were conducted in a greenhouse with the same isolates. In the field, three of them were evaluated in terms of reducing the impact of the pathogen on the

development of crops of beans and soybeans and effective disease control. In these tests, we used the microbiolization seed, and the concentration of propagules in the inoculum for application of the isolates was  $1 \times 10^9$  spores -  $\text{mL}^{-1}$ . In tests pairing of cultures, the evaluation was performed with the aid of a scale ranging from 1 to 5. Four isolates showed maximum degree of antagonism (class 1), 10 isolates allocated to the class 2 and four in class 3, the two considered potential medium-and moderate biocontrol, respectively, while the other two have had low antagonistic activity against *Sclerotinia sclerotiorum* (class 4). For germination of sclerotia, 10 isolates of *Trichoderma* inhibited at least 90%, four had rates of inhibition between 80% and 65%, two had rates of 35% and 25% and the remaining four did not show inhibitory activity on the sclerotia. Already in trials with non-volatile metabolites, there was significant difference in growth inhibition of *S. sclerotiorum*, with the mean percentage inhibition of mycelial ranging from zero (no inhibition) to 100%. In greenhouse trials, we observed a significant difference between the strains in disease control. Of the twenty isolates, six had the highest levels of disease control. Tests conducted in the field suggest greater efficiency of the isolates when the inoculum was applied by bar, along with seeds microbiolized, followed by the application of spraying the spore suspension and, finally, just where it was applied by microbiolization seeds, how to plant development. The results showed very promising for developing a biological control program.

## INTRODUÇÃO

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é um fungo fitopatogênico, causador da doença conhecida como mofo-branco em diversas culturas. Seu ciclo de hospedeiros abrange 408 espécies dentro de 278 gêneros, distribuídas em 75 famílias botânicas (CPC, 2007). O

patógeno ataca plantas jovens, causando tombamento (El-Helaly et al., 1970; Ivancheva-Gabrovska et al., 1978; Huang & Kozub, 1990). Frequentemente, *S. sclerotiorum* infecta os tecidos das raízes e, com o desenvolvimento da cultura, causa apodrecimento das raízes, cancro na base da haste e murcha (Dorrell & Huang, 1978; Adams & Tate, 1975, 1976); também pode colonizar os tecidos acima do solo, causando manchas aquosas na haste inicialmente marrons, próxima ao nível do solo, manchas foliares, podridão dos tecidos contaminados; com o desenvolvimento da cultura, os tecidos tornam-se recobertos por micélio branco, sinal característico da doença (Abawi et al., 1975; Huang & Kokko, 1992). Plantas com infecção nas raízes muitas vezes murcham e morrem prematuramente. As hastes afetadas tendem à queda devido à presença de ventos fortes.

O fungo produz estruturas de resistência conhecidas como escleródios, que podem sobreviver por até 10 anos no solo (Le Tourneau, 1979). Essas estruturas são compostas por camadas de hifas, cujas células são melanizadas e de paredes espessas, sendo responsáveis pela resistência do patógeno no solo (Le Tourneau, 1979).

Tombamento e murcha são ocasionadas pela germinação miceliogênica dos escleródios (Adams & Tate, 1976; Huang & Kozub, 1990), ao passo que os sintomas observados acima do solo, tais como manchas das folhas e podridão são resultantes da infecção por ascósporos liberados a partir da germinação carpogênica (Abawi et al., 1975; Huang & Kokko, 1992). Disseminação secundária da doença ocorre pelo contato direto com tecidos infectados durante o período vegetativo (Huang & Hoes, 1980). Plantas individuais, e, ocasionalmente, uma safra inteira, pode ser destruída pela doença.

Os métodos de controle disponíveis para esta doença são práticas de manejo que incluem rotação de culturas, medidas de limpeza da área, irrigação eficiente, uso de cultivar resistente e adequação do espaçamento entre plantas. Entretanto, tais medidas na maioria das vezes são ineficazes. O uso de defensivos químicos é muito oneroso, tornando-se inviável

(Steadman, 1979). Quanto ao controle biológico, vários estudos têm sido realizados com fungos antagonistas (Menendez & Godeas, 1998; Li et al., 2005; Yang et al., 2007) e, dentre eles, espécies do gênero *Trichoderma* tem demonstrado atividade antagônica contra *S. sclerotiorum*, em testes conduzidos tanto em laboratório, quanto em condições de campo (Huang et al., 2000). Papavizas (1982) já demonstrara que algumas espécies de *Trichoderma* são eficientes competidores da rizosfera. Esta é uma característica importante, pois o sucesso do agente de controle biológico depende em muito da sua habilidade de sobreviver e colonizar o solo rizosférico.

Em geral, a seleção de agentes de controle biológico de fitopatógenos é realizada em duas etapas. Primeiramente, os agentes candidatos podem ser testados como antagônicos em condições controladas (laboratório e casa de vegetação). Isolados que se mostrarem mais promissores são então testados em condições de campo para uma avaliação final. Na primeira triagem, utilizam-se métodos convenientes, com eficiência e segurança, quanto à padronização e reprodutibilidade das condições de testes, e a oportunidade de examinar diretamente as interações patógeno/antagonista. Na segunda, a avaliação ocorre de forma mais realista, mesmo com a possibilidade de diferentes respostas em função do local e época de cultivo.

Whipps (1997) observou que os agentes de controle biológico podem operar por diferentes modos de ação simultaneamente ou sequencialmente. Um dos mecanismos envolvidos na atividade antagônica do *Trichoderma* contra uma variedade de fungos fitopatogênicos é o micoparasitismo (Denis & Webster, 1971c), no qual enzimas hidrolíticas exercem importante papel na degradação de parede celular dos fitopatógenos (Elad et al., 1982). Por meio da ação micoparasítica sobre os escleródios ou hifas de *S. sclerotiorum* *Trichoderma* pode reduzir a incidência da doença e, de forma continuada, o potencial de inóculo no solo (Bin et al., 1991; Knudsen, et al., 1991).

Weindling (1932) estudou a produção de metabólitos tóxicos por *T. lignorum*, tendo identificado os antibióticos gliotoxina e viridina. De acordo com esse autor, a antibiose constitui um dos principais mecanismos envolvidos na atividade antagônica do fungo. Dennis & Webster (1971a,b) os metabólitos secundários produzidos por isolados de *Trichoderma* em voláteis e não voláteis, ambos com efeito inibitório sobre o crescimento de vários fungos.

O presente trabalho teve como objetivos determinar: o modo de ação de 20 isolados de *Trichoderma* contra *S. sclerotiorum*, por meio de testes conduzidos “in vitro”; o potencial de uso de isolados como agentes de biocontrole para o mofo branco, nas culturas da soja e feijão comum.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Isolados e procedência dos antagonistas e do patógeno utilizados**

Foram utilizados cinco isolados de *Trichoderma* pertencentes à coleção de culturas microbianas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: CEN142 (*T. harzianum*), oriundo de amostra da rizosfera de plantas do Cerrado, procedente do município de Goiânia (GO); CEN151 (*T. harzianum*), de solo coberto com a cultura do milho, coletado no município de Orizona (GO); CEN157 (*T. koningii*) e CEN162 (*T. asperellum*) obtidos de amostras de solo coberto com a cultura do arroz, de Goianira (GO) e CEN219 (*T. atroviride*), isolado de uma formulação comercial. Outros quinze isolados (Tabela 1) foram obtidos neste trabalho, a partir de amostras tomadas dos primeiros 5-7 centímetros do solo, após remoção da camada de matéria orgânica. Devido à formação de clamidósporos, colonização de matéria orgânica, rápido crescimento e abundante esporulação por parte dos isolados de *Trichoderma* (Gams & Bissett, 1998), utilizou-se, para isolamento, a técnica de lavagem de solo. Um grama

de solo foi serialmente diluído em água estéril e 0,08 mL das suspensões foram distribuídas em placas de 90 milímetros de diâmetro, contendo o meio Martin (1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 0,5 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 5 g peptona; 10 g dextrose; 0,03 g Rosa de Bengala; 16 g ágar e 1l água destilada). Após sete dias de incubação em B.O.D. (Fanen, mod. 347), à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas, as colônias características (coloração verde, aspecto flocoso) foram transferidas para meio de cultura BDA (200g de batata, 20g de ágar, 20g de dextrose, 1.000 mL de água destilada). As colônias foram purificadas e cultura monospóricas foram obtidas pela diluição de suspensão de esporos (10<sup>4</sup> esporos/mL) e semeio em placas contendo meio BDA. As culturas foram repicadas para tubos de ensaio contendo o mesmo meio, os quais foram mantidos a 4°C e, posteriormente, preservadas e armazenadas na coleção.

**Tabela 1:** Isolados e locais de coleta dos isolados obtidos neste trabalho.

Isolado	Rizosfera coletada	Localidade
CEN200	Chrysomalanaceae	Goiantis (GO)
CEN201	Vochysziaceae	Itacajas (GO)
CEN209	Copaíferas	Estação Ecológica de Águas Emendadas (DF)
CEN210	Copaíferas	Estação Ecológica de Águas Emendadas (DF)
CEN211	Taquara	Estação Ecológica de Águas Emendadas (DF)
CEN202	Algodão	Rio Preto (DF)
CEN223	Algodão	Rio Preto (DF)
CEN225	Algodão	Rio Preto (DF)
CEN226	Algodão	Rio Preto (DF)
CEN237	Algodão	Rio Preto (DF)
CEN238	Algodão	Rio Preto (DF)
CEN240	Algodão	Rio Preto (DF)
CEN241	Algodão	Rio Preto (DF)
CEN242	Algodão	Rio Preto (DF)
CEN248	Algodão	Rio Preto (DF)

Para os ensaios de biocontrole, utilizou-se um isolado de *S. sclerotiorum* (CEN217), procedente de solo cultivado com soja e cedido pela Embrapa Cerrados (DF).

## **Identificação dos isolados de *Trichoderma***

A identificação dos isolados foi realizada em conformidade com Samuels et al. (2011). Para tanto, foram observadas os aspectos culturais em meio apropriado (extrato de malte 2% = 20g de extrato de malte, 20g de ágar, 1.000 mL de água destilada) e analisadas as estruturas microscópicas de cada isolado (conidióforos, fiálides, conídios e clamidósporos) como proposto por Rifai (1969) e Bissett (1991a,b), a partir do cultivo em meio extrato de malte 2%. As colônias se desenvolveram nas mesmas condições descritas anteriormente. As características do conidióforo foram observadas no terceiro dia de cultivo e as dos conídios, aos 15 dias. Para tanto, foram confeccionadas lâminas com o corante *cotton blue* em ácido láctico. As medidas morfométricas (hifas, conidióforos, fiálides, esporos e clamidósporos), foram tomadas sob lente de aumento (100x), com óleo de imersão. Os conidióforos foram observados quanto à presença ou não de ramificações e as fiálides, quanto sua forma.

## **Avaliação do antagonismo ao fungo *S. sclerotiorum* por isolados de *Trichoderma* em cultivo pareado**

O antagonismo dos isolados de *Trichoderma* contra *S. sclerotiorum* foi avaliado em confronto direto de culturas, utilizando-se o método de pareamento em placas de Petri, de acordo com Dennis & Webster (1971c). Discos (5 mm de diâmetro) retirados das culturas puras do patógeno e do antagonista foram depositados opostamente nas placas, contendo o meio solidificado, a 10 mm das bordas. Como controle negativo, foram empregadas placas contendo apenas o patógeno. Os experimentos foram conduzidos duas vezes, utilizando-se quatro repetições.

Para as avaliações da ação antagônica dos isolados de *Trichoderma*, foram atribuídas notas de acordo com escala estabelecida por Bell et al. (1982):



Nota 1 – sobreposição de *Trichoderma* ao patógeno, colonizando toda a superfície do meio; Nota 2 – sobreposição de *Trichoderma* a patógeno, colonizando pelo menos 2/3 da superfície do meio; Nota 3 – *Trichoderma* e patógeno colonizaram mais que 1/3 e menos que 2/3 da superfície do meio; Nota 4 – patógeno colonizou ao menos 2/3 da superfície do meio e resistiu a invasão por *Trichoderma*; Nota 5 – sobreposição do patógeno ao antagonista colonizando toda a superfície do meio.

### **Observações por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura do micoparasitismo exercido pelos isolados de *Trichoderma* sobre *S. sclerotiorum* durante o confronto direto de culturas**

Amostras fúngicas obtidas da zona de encontro das colônias dos isolados CEN219, CEN237, CEN238, CEN240 e CEN241 e do patógeno *S. sclerotiorum* foram visualizadas por meio de microscopia eletrônica de varredura. Para o preparo do material, os discos de ágar contendo micélio foram fixados em solução (glutaraldeído 2%; paraformaldeído 2%), em tampão de cacodilato 0,05 M (pH 7,2), por 12 horas, a 4°C. Após a fixação, o material sofreu quatro lavagens no mesmo tampão de cacodilato, sendo então fixado em solução de tetróxido de ósmio (O<sub>8</sub>O<sub>4</sub>) a 1%, em tampão de cacodilato 0,01 M, retornando à geladeira (4°C) por mais 1 hora. Posteriormente, o material sofreu uma nova série de lavagens com tampão de cacodilato (pH 7,2) e, em seguida, foi desidratado em etanol (concentrações de 30, 50, 70, 85, 95 e 100%). O material permaneceu por 15 minutos em cada uma dessas concentrações de etanol, sendo que para a concentração final de 100%, o material recebeu duas lavagens de 10 minutos cada. A secagem a ponto crítico foi realizada em secador Elmitech Critical Point Drayer K850, usando CO<sub>2</sub> para retirar a fração líquida. Em seguida o material foi vaporizado com ouro, durante 150 segundos, usando-se o Elmitech K 550 Sputter Coater, completando-se

assim o preparo do material para observação ao microscópio eletrônico de varredura ZEISS DSM 962.

### **Avaliação do efeito inibidor de metabólitos não voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. sobre *S. sclerotiorum***

O efeito inibidor de metabólitos não voláteis dos isolados de *Trichoderma* sobre *S. sclerotiorum* foi testado de duas formas, ou seja, em filtrado estéril, conforme Dennis & Webster (1971a) e em papel celofane como proposto por Agrawal et al. (1977).

A primeira metodologia consistiu no cultivo dos isolados de *Trichoderma* em frascos Erlenmeyer, contendo 250 mL de meio líquido à base de batata-dextrose (BD). Cada frasco recebeu cinco discos (5 mm de diâmetro) retirados de culturas com sete dias de cultivo. A incubação ocorreu em agitador orbital (Lab-line Incubator-shaker modelo NT 711), a 150 rpm e temperatura de 25°C, em ausência de luz por cinco dias. A parte líquida foi coletada por filtração a vácuo em papel de filtro (J ProLab) e, após passagem por membrana estéril de celulose (0,00045 mm milique), foi incorporada ao meio BDA autoclavado, na proporção de 25% (v/v<sup>-1</sup>). Foram preparadas quatro placas com o filtrado de cada antagonista. No centro das placas de Petri, contendo o meio suplementado com os metabólitos, foi inoculado um disco da cultura de *S. sclerotiorum*. As placas foram incubadas a 25°C. A testemunha consistiu de placas contendo meio BDA sem filtrado de *Trichoderma* spp. As medições do crescimento radial foram tomadas quando toda a superfície do meio, nas placas testemunhas, apresentou-se colonizada pelo patógeno.

Na segunda metodologia, discos de 110 milímetros de diâmetro de papel celofane esterilizados foram autoclavados por 20 minutos, à 121°C. Esses discos foram colocados sobre placas de Petri, contendo meio BDA, deixando sobra do papel para facilitar sua posterior retirada. Em seguida, foram preparadas quatro placas com um disco de micélio do

antagonista, colocando-o sobre o papel celofane. A incubação ocorreu em câmara de crescimento do tipo B.O.D. (Fanen, mod. 347), à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas, por 48 horas. Após este período foi retirado o papel celofane e colocado disco de micélio do fungo *S. sclerotiorum*, no centro da placa. Novamente, as placas foram levadas para a B.O.D. e mantidas nas condições já descritas. A testemunha consistiu de placas contendo o papel celofane que não receberam disco de cultura do antagonista, mas inoculadas com *S. sclerotiorum*, após a retirada do papel celofane. As medições do crescimento radial foram tomadas quando toda a superfície do meio nas placas testemunhas se apresentou colonizada pelo patógeno. As medições do crescimento radial foram tomadas quando toda a superfície do meio nas placas testemunhas se apresentou colonizada pelo patógeno.

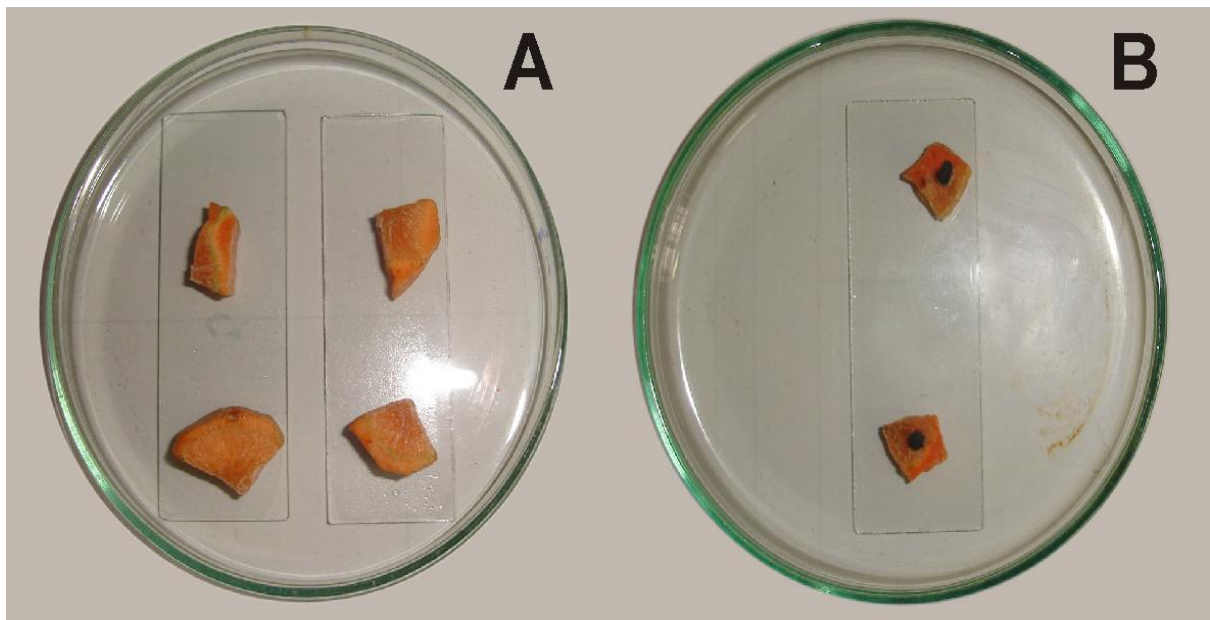
Os experimentos foram conduzidos duas vezes, em quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de agrupamentos para detectar eventuais grupos de isolados com melhor desempenho. Utilizou-se, nas análises, o algoritmo não hierárquico PAM (*Partitioning Around Medoids*) para os agrupamentos.

### **Inibição da germinação miceliogênica dos escleródios de *S. sclerotiorum* por isolados de *Trichoderma***

O inóculo para os ensaios de inibição da germinação dos escleródios de *S. sclerotiorum* consistiu de suspensão de esporos de culturas de *Trichoderma* desenvolvidas em meio BDA. Os ensaios foram conduzidos com os 20 isolados de *Trichoderma* spp. citados anteriormente. Para obtenção dos escleródios, o patógeno foi cultivado em meio BDA à temperatura de 21°C e fotoperíodo de 12 horas, durante 30 dias.

Empregaram-se pedaços de cenoura e meio de cultura de vermiculita + farinha de soja [8 g de farinha de soja e 5 g de vermiculita expandida superfina (0,6 mm)] como substrato. As

cenouras foram lavadas com água estéril, cortadas em cubos, flambadas dentro da capela de fluxo laminar, e colocadas sobre lâminas dentro de placas de Petri, ambas esterilizadas (Figura 1–A). Em cada placa, foram adicionados quatro pedaços de cenoura com um escleródio de *S. sclerotiorum*, totalizando 10 placas por isolado de *Trichoderma*. Cada escleródio foi mantido submerso por 1 minuto em uma suspensão de esporos do antagonista  $10^7$  conídios- $\text{mL}^{-1}$ , sendo que para a testemunha, utilizou-se água estéril (Mueller et al, 1985). Em seguida, as placas foram vedadas com filme de PVC, de modo que os escleródios não caíssem do substrato (Figura 1–B).

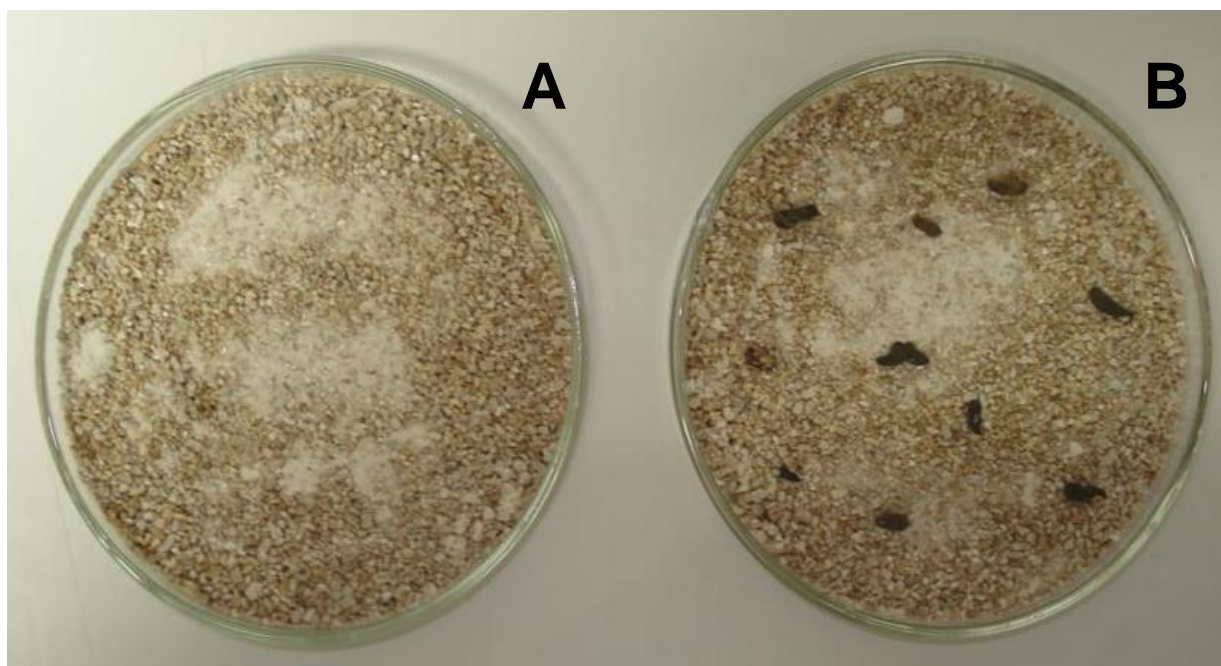


**Figura 1.** Cubos de cenoura não inoculados com escleródios (A) e inoculados (B).

Para os ensaios com meio de cultura de vermiculita + farinha de soja, o substrato foi homogeneizado e distribuído em placas de Petri. Essas foram envolvidas com papel alumínio e levadas para autoclave à temperatura de  $121^{\circ}\text{C}$ , por 30 minutos, por duas vezes, em um intervalo de 24 horas. Após oito horas da segunda esterilização, essas foram levadas para câmara de fluxo vertical e, com o auxílio de uma espátula esterilizada, descompactou-se o substrato, espalhando-o por toda a placa uniformemente (Figura 2–A). O substrato foi, então,

umedecido com 15 mL de água estéril e adicionado de 10 escleródios de *S. sclerotiorum* por placa (Figura 2–B).

As placas mantidas em câmara de crescimento do tipo B.O.D., à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas, por 20 dias, para observação do crescimento do patógeno.



**Figura 2.** Meio de cultura de vermiculita + farinha de soja - (A) sem escleródios e (B) com escleródios de *S. sclerotiorum*.

Após 20 dias, os escleródios de cada tratamento foram coletados de ambos os substratos (cenoura e vermiculita + farinha de soja), secos por pressão em papel toalha e lavados para desinfestação por 3 minutos em hipoclorito de sódio (1%), 1 minuto em álcool (70%) e três vezes em água destilada estéril (1 minuto cada), sucessivamente. Em seguida, os escleródios foram depositados, individualmente, sobre meio Neon-S proposto por Napoleão et al., 2006 (BDA + 50 mg de Azul de bromofenol + 50 mg de cloranfenicol), em placas de Petri, na quantidade de dois escleródios por placa (Figura 4–A). A viabilidade dos escleródios foi determinada pela presença de coloração amarelada em volta do escleródio, resultante da produção de ácido oxálico, dois a quatro dias, da incubação.

A análise de agrupamentos foi utilizada para detectar eventuais grupos de isolados com melhor desempenho, adotando-se o algoritmo não hierárquico PAM (*Partitioning Around Medoids*) para os agrupamentos.

### **Efeito supressivo de *Trichoderma* spp. sobre *S. sclerotiorum* e promoção de crescimento em plantas de soja e feijão comum, em casa de vegetação**

Para determinar o efeito de *Trichoderma* spp. no controle de *S. sclerotiorum* e promoção de crescimento de plantas, foram conduzidos experimentos em dois períodos: 1 – entre maio e junho, com temperatura entre 15°C e 28°C, para o cultivo de feijão comum (*P. vulgaris* L.) cv pérola e 2 – entre novembro e dezembro, com temperatura entre 20°C e 35°C, para o cultivo de soja [*G. max* (L.) Merr.] cv. Monsoy M8867RR. Em ambos os períodos, a umidade relativa manteve-se em torno de 80%. Utilizaram-se sementes (2ª peneira) fornecidas pela Empresa Sementes Farroupilha, localizada em Patos de Minas.

Para a reativação de *S. sclerotiorum*, inocularam-se discos de micélio, retirados de culturas desenvolvidas em meio BDA, em vasos de 1.000g de capacidade, contendo terra vermelha suplementada com 10% de matéria orgânica autoclavada. Os vasos foram submetidos à temperatura de 21°C e umidade de 90% por 15 dias em câmara úmida (Lab-Line Enviro-neers Inc, Mod. 705-A da Lab Line Instruments, Inc. Melrose Park, Illinois, USA) para produção de escleródios, os quais foram utilizados como fonte inicial de inóculo para os experimentos. Tanto *S. sclerotiorum* como *Trichoderma* spp. foram multiplicados em frascos Erlenmeyer de 500 mL de capacidade, utilizando 100g de arroz parboilizado como substrato. Este foi previamente umedecido em água destilada (60% p/v) e esterilizado a 120°C por 20 minutos. Quinze frascos contendo o arroz parboilizado receberam cada um, cinco discos retirados de colônias de *S. sclerotiorum* com sete dias de idade, desenvolvidas em meio BDA.

Colônias de *Trichoderma* spp., também desenvolvidas em meio BDA, forneceram esporos (suspensão em água, ajustada para concentração de  $2 \times 10^4$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ), os quais foram transferidos para outros vinte frascos (10 mL de suspensão de esporos/frasco). O cultivo ocorreu à temperatura de  $25^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas, durante oito dias. Vasos contendo solo estéril, com capacidade de 3.000g, foram contaminados com o patógeno na proporção de 5g de arroz parboilizado colonizado por 1.000g de solo. Após 96 horas, procedeu-se o plantio de sementes microbiolizadas com *Trichoderma*. Para avaliar a promoção de crescimento dos isolados, utilizaram-se as mesmas condições descritas anteriormente, porém não houve a contaminação do solo com o patógeno. Na microbiolização das sementes, utilizaram-se suspensões de esporos contendo  $1 \times 10^9$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ .

Os experimentos foram conduzidos duas vezes, com quatro repetições por tratamento, sendo a unidade experimental constituída de um vaso com cinco plantas. Os tratamentos consistiram de *Trichoderma* + planta e *Trichoderma* + mofo-branco + planta. A distribuição espacial das parcelas foi inteiramente ao acaso (DIC). As avaliações foram feitas aos 15 e 30 dias após o semeio, com base no comprimento de plantas e no rendimento de matéria fresca e seca (secagem em estufa a  $70^\circ\text{C}$  durante 72 horas).

Para análise dos dados, procedeu-se a modelagem da altura e da razão dos pesos seco e fresco em função da combinação de isolado e presença ou ausência do patógeno. Para isso, utilizou-se um modelo de efeito de tratamentos, assumindo distribuição normal para as variáveis respostas. As análises foram realizadas pelo programa estatístico R.

### **Controle do mofo branco por *Trichoderma* spp. nas culturas de soja e feijão comum, em condições de campo**

Os experimentos realizados em campo foram conduzidos em dois períodos: 1 – entre maio a agosto, com temperatura entre  $10^\circ\text{C}$  e  $27^\circ\text{C}$ , para o cultivo de feijão comum cv pérola e

2 – de outubro e fevereiro, com temperatura entre 18°C e 32°C, para o cultivo de soja cv. Monsoy M8867RR. O cultivo do feijão ocorreu sob irrigação, com bicos Turbo TeeJet Duo QJ90, operando com 5 bar de pressão. As sementes foram originadas dos mesmos lotes das daquelas utilizadas nos experimentos anteriores.

Os ensaios foram conduzidos em Patos de Minas – MG, na Fazenda Pirulito pertencente à Empresa Sementes Farroupilha Ltda, em um talhão sem subsolagem, com elevada ocorrência *S. sclerotiorum*. Como o desenvolvimento do mofo branco é altamente variável, já que depende de diversos fatores, tais como solo, condições climáticas, variedades e população, as concentrações do agente foram determinadas previamente por contagem do número de escleródios, estimando-se uma média de 16,5 escleródios por metro quadrado. Os tratamentos culturais realizados foram os recomendados para as culturas na Região. Agroquímicos registrados junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) foram utilizados quando necessário para o controle de doenças e pragas. Durante o desenvolvimento da cultura do feijão comum utilizou: Basagran 600, Cercobim 700 PW, Cerconil PM, Cruiser 700 w, Danimen 300 CE, Derosal 500 SC, Glifosato, Intrepid, Metamidofos, Standak, Sumidan 25 CE, Tiger 100 CE, Verdict R e para a cultura da soja utilizou: Aurora 400 CE, Basagran 600, Carbomax 500 SC, Cercobim 700 PW, Cipermetrina Nortox 250 CE, Classic, Derosal 500 SC, Maxim XL, Naja, Opera, Radiant 100 e Vitavax 750 PM BR.

A presença do mofo branco foi diagnosticada por observação visual dos sintomas (Purdy, 1979), durante os estágios de floração plena até o início de enchimento das vagens. A incidência da doença foi determinada em termos de porcentagem de plantas infectadas.

Foram utilizados quatro isolados de *Trichoderma*: três que apresentaram bom desempenho nos ensaios de laboratório e casa de vegetação (CEN162, CEN223 e CEN241) e um isolado comercial (SF 04) princípio ativo do Quality. Os isolados foram cultivados em sacolas de plástico polipropileno, contendo 1.000g de arroz parboilizado. Esse substrato foi



preparado como no item anterior. Cada sacola plástica contendo substrato recebeu 100 mL de suspensão de esporos de *Trichoderma* à concentração de  $2 \times 10^4$  conídios/mL<sup>-1</sup>, preparada a partir de culturas com sete dias de idade. O cultivo ocorreu em salas de crescimento, à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas, durante oito dias. Para aplicação no campo utilizou a concentração  $9 \times 10^{10}$  conídios/mL<sup>-1</sup>.

Na cultura de feijão, a aplicação de cada isolado foi realizada por três diferentes métodos: 1) sementes microbiolizadas; 2) sementes microbiolizadas + aplicação da suspensão de esporos diretamente no sulco de plantio e 3) sementes microbiolizadas + pulverização da suspensão de esporos com o auxílio de barra tracionada. Cada tratamento, que consistiu em isolado + forma de aplicação, foi conduzido em parcelas individualizadas de 100.000m<sup>2</sup>, totalizando 2.200.000 plantas com 8 – 10 sementes por metro linear, com distância de 45 cm entre as linhas de plantio. As avaliações de severidade da doença foram realizadas aos 30 e 50 dias após o semeio. Já a promoção de crescimento foi estimada em termos de tamanho da planta e peso fresco e seco após 72 horas em estufa a 70°C.

Na cultura da soja, utilizaram-se apenas os dois primeiros métodos para a aplicação do fungo: 1) sementes microbiolizadas e 2) sementes microbiolizadas + aplicação da suspensão de esporos no sulco de plantio. Como ocorreu o vazio sanitário para a cultura da soja, os ensaios foram conduzidos em blocos inteiramente ao acaso (DBC) com três repetições, sendo cada parcela experimental de 100 m<sup>2</sup>, totalizando 22.000 plantas com 10 – 12 sementes por metro linear. Adotou-se o espaçamento de 45 cm entre as linhas de plantio. As avaliações de severidade da doença foram realizadas aos 30 e 50 dias após o semeio. Promoção de crescimento de plantas foi baseada no tamanho da planta e no peso fresco e seco, após 72 horas em estufa a 70°C.

Para ambas as culturas, o tratamento testemunha consistiu de parcelas sem aplicação dos isolados de *Trichoderma*, apenas com os tratamentos culturais recomendados para a região.

Para a análise dos dados, procedeu-se modelagem da altura e da razão dos pesos seco e fresco em função da combinação de isolado e tratamento, utilizando-se um modelo de efeito de tratamentos. Assumiu-se a distribuição normal para as variáveis respostas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Cultivo e identificação dos isolados de *Trichoderma*

Foram identificadas cinco espécies entre os 15 isolados do gênero *Trichoderma*, obtidos das coletas nos solos das rizosferas de *Chrysomalanaceae*, *Copaíferas*, *Taquara* e de *Vochysiaceae*, e da cultura do algodão.

#### CEN226 – *Trichoderma fasciculatum* Bissett, 1991

Isolado obtido da rizosfera da cultura de algodão produzindo *Colônias* com crescimento moderadamente rápido, micélio aéreo esparso, flocoso, esverdeado, com reverso hialino, presença de pústulas. *Hifas* hialinas, septadas, paredes lisas, 0,9 – 5,8  $\mu$ . *Clamidósporos* muito abundante, subglobosos a periforme, hialinos, parede fina e maioria terminais 2,5 – 5,8  $\mu$ , podendo encontrar alguns intercalares 9,3 – 6,8  $\mu$ . *Conidióforos* hialinos, paredes lisas, ramificado com ângulos menores na ponta, com 7  $\mu$  de largura na base, diminuindo gradualmente 3 – 5  $\mu$  na sua extensão, saindo aos pares ou grupos de três, com ápice estéril; conidióforo secundário com 1 – 5 células cilíndricas. *Fiálides* lageniforme a ampuliforme, 4,5 – 7,8 x 2,2 – 3  $\mu$ , com constrição na base, cônica com ponta estreita produzindo conídios, solitárias ou em grupos de 2 – 5, fiálides com ponta restrita lageniforme 22  $\mu$  de comprimento e 2 – 2,5 de largura. *Conídios* elipsóides com ambas as pontas arredondadas, 3 – 4 x 2 – 2,7  $\mu$ , com paredes lisas, esverdeados.

**CEN211** – *Trichoderma fertile* Bissett, 1991

Isolado obtido da rizosfera de Copaífera produzindo *Colônias* de crescimento rápido micélio branco, sem pigmentação no meio e sem cheiro característico, formação de conídios em anéis concêntricos. *Hifas* hialinas a subhialinas. *Clamidósporos* subglobosos a elipsóides, subhialinos e presença de poucos intercalares ou terminais 8,6 x 7,5  $\mu$ . *Conidióforos* hialinos, paredes lisas, 5 – 6  $\mu$ , com ramificação secundária com 2 ou 3 fiálides, ramificação primária com até 3 células desde sua base, a secundária com até no máximo de 2 células, acima da porção fértil do conidióforo aparece uma hifa septada, não fértil com 70 – 115  $\mu$  encontrando no ápice uma única fiálide com 5  $\mu$ , existem relatos de ramificações dessas fiálides. *Fiálides* ampuliforme em sua maioria 3,5 – 6,8 x 2,3 – 3,8  $\mu$ , com constrição na base e afunilando abruptamente no ápice, algumas formas observadas com formato de gancho. *Conídios* elipsóides a oblongos 2,8 – 4,2 x 2 – 2,7  $\mu$ , paredes lisas, verdes, ambas as pontas arredondadas.

**CEN201, CEN202, CEN200, CEN223, CEN237, CEN238, CEN240, CEN241, CEN242 e CEN248** – *Trichoderma harzianum* Rifai, 1969

Os isolados CEN200 e CEN201 foram obtidos das rizosferas de Chrysomalnaceae e Vochysiaceae, os demais isolados foram obtidos do solo com cultura de algodão ambos produzindo *Colônias* com rápido crescimento, flocoso, conídios formados em anéis concêntricos, sem formação de pústulas, reverso sem cor. *Hifas* septadas, ramificadas, hialinas. *Clamidósporos* globoso, hialino, intercalares, 4,5 – 6 x 11 – 13  $\mu$ . *Conidióforos* com ramificações regulares em pares, dendritico, apresentam angulação de 90° do eixo em que origina. *Fiálides* ampuliformes, 5 – 6,5 x 2,5 – 3,5  $\mu$ , apresentando angulação de 90° da sua hifa. *Conídios* com parede mucosa, agregadas, subglobosa a ovóide, verdes, lisas, 2,2 – 3,5 x 2 – 3.

**CEN209 e CEN210** – *Trichoderma pseudokoningii* Rifai, 1969

Isolados obtidos da rizosfera de Copaífera *Colônias* com crescimento rápido, apresentando uma única zona de conidiogênese, verde, reverso branco, sem odor característico e formação de pústulas. *Hifas* hialinas, septadas, ramificadas. *Clamidósporos* globosos, terminais, 4,5 – 6 x 9 – 11,5  $\mu$ . *Conidióforos* com ramificações irregulares, presentes em hifas aéreas, aspecto cotonoso, eixo central comprido com ramificações laterais curtas, 2 – 2,5 x 3,4 – 4,5  $\mu$ . *Fiálides* subverticiladas, cilíndricas algumas apresentando alargamento da região mediana, nas ramificações secundárias apresenta uma única fiálide, e no eixo principal com 3 – 4 fiálides, nas fiálides das ramificações secundárias observam-se uma célula na base destas, 5,5 – 12 x 2,5 – 3,5  $\mu$ . *Conídios* com parede mucosa, agregadas, subcilíndrico a elipsóide, verdes, lisas, 3 – 5,5 x 2 – 3,5  $\mu$ .

**CEN225** – *Trichoderma spirale* Bissett, 1991

Isolado obtido da rizosfera da cultura de algodão produzindo *Colônias* com crescimento rápido, presença de micélio aéreo flocoso, sem odor característico, pigmentação amarela no meio, esporulação em anéis concêntricos de coloração verde. *Hifas* hialinas, com paredes lisas. *Clamidósporos* abundantes solitários, intercalares ou terminais em cadeias ramificadas, subglobosos a piriforme, hialinos, 6 – 13  $\mu$ , paredes lisas. *Conidióforos* hialinos, com paredes lisas, 5 – 6,5 x 4 – 5,5  $\mu$ , poucas ramificações aparecendo aos pares ou alternadas, com 1 -2 células, possui uma hifa estéril muito comprida, 30 – 110  $\mu$ . *Fiálides* maioria ampuliformes, subglobosas, 3,2 – 5 x 2,8 – 4,4  $\mu$ , constrição na base, verticilada. *Conídios* elipsóides para oblongos 3,5 – 4,5 x 1,8 – 3  $\mu$ , aparentemente com paredes lisas.

Das espécies trabalhadas, 60% foram classificadas como *T. harzianum* sendo esta considerada uma das mais comuns do gênero, encontrada nos mais diferentes tipos de solo

(Rifai, 1969; Bissett, 1991b; Corabi-Adell, 2004), principalmente aqueles onde há interferência antrópica. Por exemplo, Kullnig et al. (2000), estudando a variabilidade de 35 isolados de *Trichoderma* coletados na Rússia, Sibéria e Himalaia; Kubicek et al. (2002) com 76 isolados coletados do sul da Ásia; Bissett et al. (2003) com sete isolados provenientes do Norte da Ásia e Hoyos-Carvajal et al. (2009) com 182 isolados provenientes de América Latina, ao final das análises filogenéticas de todos esses isolados, verificou-se que o maior número de isolados eram pertencentes às espécies *T. asperellum* e *T. harzianum*. Esses trabalhos indicam que as regiões tropicais apresentam a maior biodiversidade de *Trichoderma*. A predominância de *T. harzianum* em diferentes ambientes pode ser explicado pela sua capacidade de assimilar uma matriz relativamente ampla de fontes de carbono. O conceito de *T. harzianum* como um complexo geneticamente variável, composto por uma espécie morfológica e, possivelmente, várias espécies filogenéticas como proposto por Gams & Bissett (1998) e Chaverri et al. (2003) é coerente com a faixa adaptativa deste táxon, principalmente em ambientes com atividades antrópicas. A complexidade dessa espécie é tal que já existem pesquisadores postulando existir variabilidade incluindo formas, devido à imensa variabilidade genética (Samuels, 1996; Siddiquee et al. 2007).

#### **Avaliação do antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *S. sclerotiorum***

Os resultados obtidos na inibição do crescimento micelial do isolado de *S. sclerotiorum* pelos 20 isolados de *Trichoderma*, quando em confronto de colônias, são mostrados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Classificação dos isolados de *Trichoderma* quanto ao antagonismo a *Sclerotinia sclerotiorum* (CEN217), no teste de pareamento de culturas <sup>(1)</sup>.

Classe atribuída	Isolados
1	CEN 162 – <i>T. asperellum</i> , CEN 209 – <i>T. pseudokoningii</i> , CEN 219 – <i>T. atroviride</i> , CEN 226 – <i>T. fasciculatum</i> .
2	CEN 142 – <i>T. koningii</i> , CEN 157 – <i>T. koningii</i> , CEN 200 – <i>T. harzianum</i> , CEN 201 – <i>T. harzianum</i> , CEN 202 – <i>T. harzianum</i> , CEN 210 – <i>T. pseudokoningii</i> , CEN 211 – <i>T. fertile</i> , CEN 223 – <i>T. harzianum</i> , CEN 237 – <i>T. harzianum</i> , CEN 238 – <i>T. harzianum</i> .
3	CEN 225 – <i>T. spirale</i> , CEN 240 – <i>T. harzianum</i> , CEN 241 – <i>T. harzianum</i> , CEN 242 – <i>T. harzianum</i> .
4	CEN 151 – <i>T. harzianum</i> , CEN 248 – <i>T. harzianum</i> .
5	CEN 217 – <i>S. sclerotiorum</i> .

<sup>(1)</sup> Classificação segundo a escala de Bell et al., 1982.

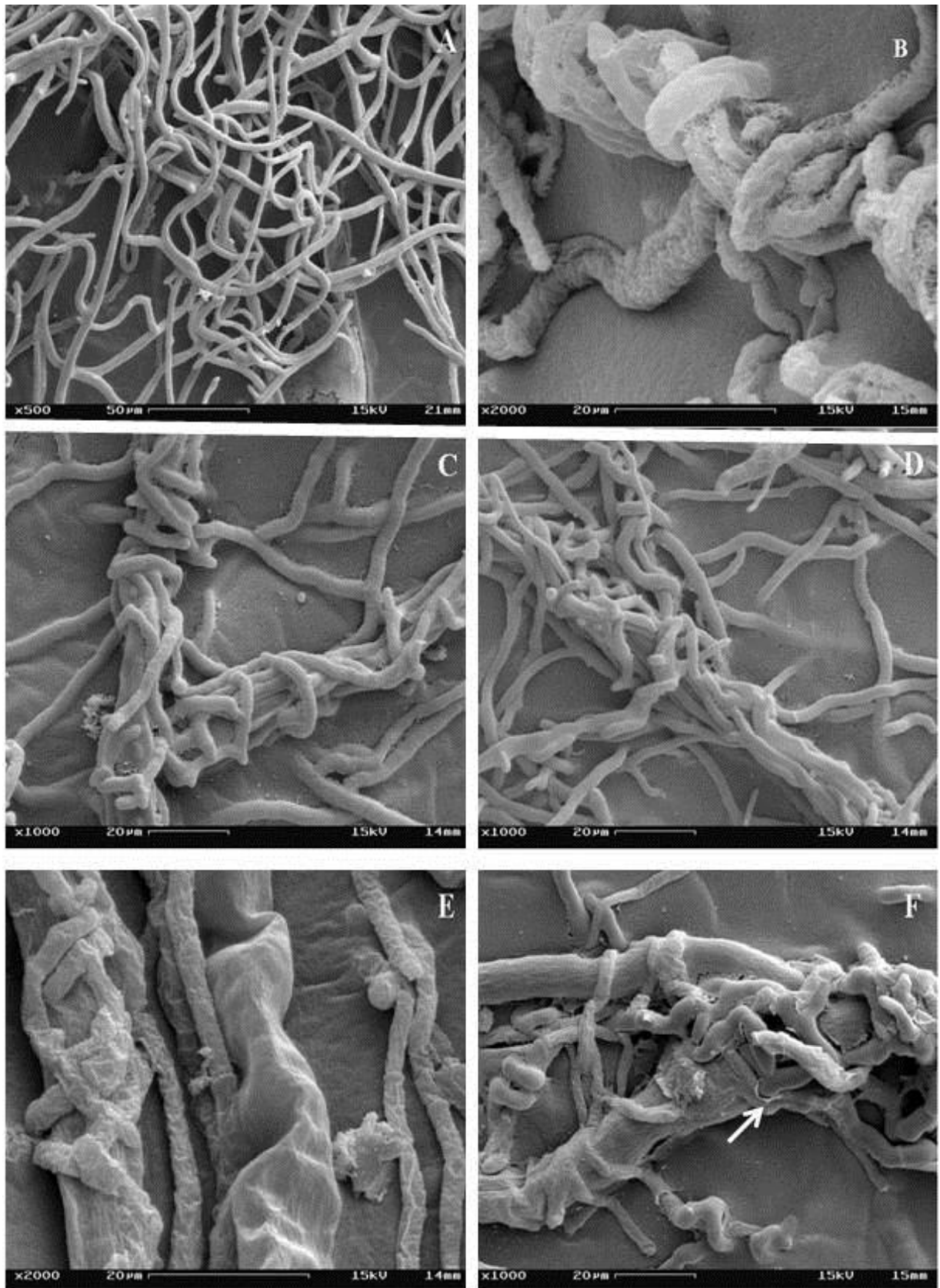
Os isolados CEN162, CEN209, CEN219 e CEN226 apresentaram grau máximo (classe 1) na escala de Bell et al. (1982), reduzindo o crescimento do patógeno e esporulando sobre toda a superfície do meio de cultura. Os isolados CEN142, CEN157, CEN200, CEN201, CEN202, CEN210, CEN211, CEN223, CEN237 e CEN238 colonizaram pelo menos 2/3 da superfície do meio (classe 2), apresentando também potencial de biocontrole, juntamente com os isolados que se colocaram na classe 1. Já os isolados CEN225, CEN240, CEN241 e CEN242 colonizaram metade da superfície do meio (classe 3), apresentando um potencial moderado no biocontrole. Os isolados CEN151 e CEN248 (Classe 4) foram os únicos que não exerceram qualquer atividade antagônica contra *S. sclerotiorum*, nos testes de pareamento de culturas. O patógeno colonizou 2/3 da superfície do meio, com estes dois isolados.

### **Visualização das interações por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEVA)**

Amostras retiradas da zona de encontro do patógeno com os isolados CEN219, CEN237, CEN238, CEN240 e CEN241 apresentaram claramente o enrolamento das hifas do *Trichoderma* sobre as hifas de *S. sclerotiorum*. Com os isolados CEN142, CEN151, CEN157,

CEN162, CEN200, CEN201, CEN202, CEN209, CEN210, CEN211, CEN223, CEN225, CEN226, CEN242 e CEN248 foram evidentes o crescimento de hifas lado a lado e algumas vezes, crescimento de *Trichoderma* em direção às hifas de *S. sclerotiorum*. Não foi observada a formação de escleródios em presença dos isolados de *Trichoderma* classificados em 1 e 2, nas observações realizadas aos cinco dias de cultivo.

Amostras originadas do pareamento do patógeno com os isolados CEN219, CEN237, CEN238, CEN240 e CEN241 exibiram, quando examinadas ao microscópio eletrônico de varredura, indícios de parasitismo, caracterizado por enrolamento de hifas e penetração (Figura 3 A–F). Esses achados evidenciam o micoparasitismo como mecanismo de ação desses isolados, com indicativo de que esta forma de atuação não apenas produz alterações nas hifas formadas, mas também inibe a formação de novas estruturas do patógeno. Os isolados CEN240 e CEN241, mesmo atingindo classificação inferior aos demais isolados na escala de notas atribuídas no cultivo pareado, apresentaram impacto significativo sobre as hifas de *S. sclerotiorum*, como observado nas Figura 3 – E e 3 – F.



**Figura 3.** Micrografias mostrando parasitismo de isolados de *Trichoderma* sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. A. *S. sclerotiorum*; B. enrolamento e penetração do isolado de *Trichoderma* CEN219; C. enrolamento do isolado CEN237; D. crescimento de hifas paralelas do isolado CEN238; E. penetração do isolado CEN240 e F. penetração e enrolamento do isolado CEN241, pode-se observar a ruptura da parede celular da *S. sclerotiorum*.

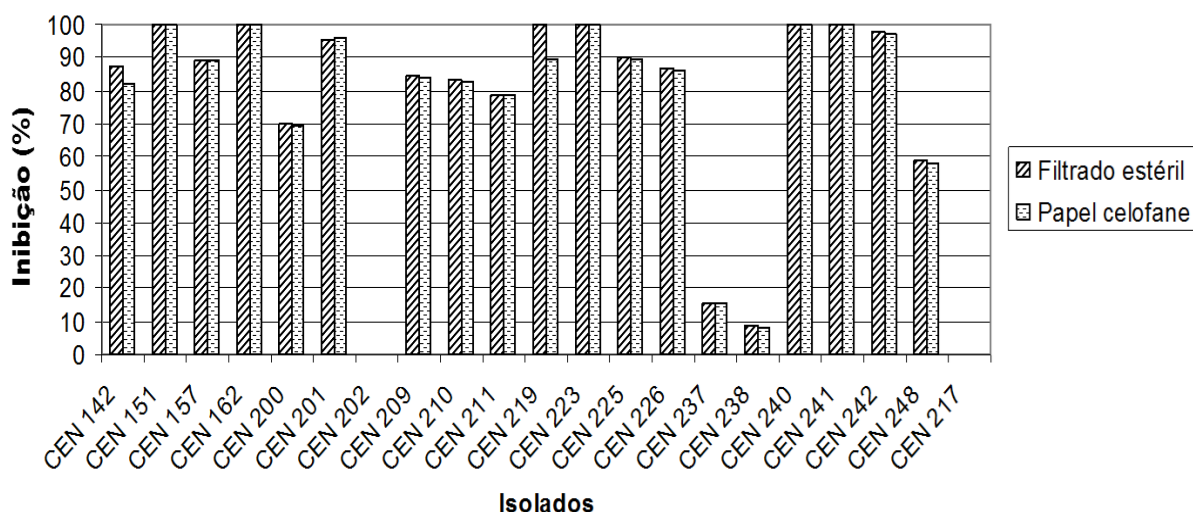


Alterações nas estruturas fúngicas como consequência de parasitismo têm sido amplamente descritas na literatura. Segundo Papavizas (1985), *Trichoderma* spp. ao parasitar as hifas de outro fungo induzem inúmeras mudanças fisiológicas, tais como: enrolamento, penetração da hifa no hospedeiro, desorganização do conteúdo celular e formação de haustórios. Tais alterações foram visualizadas por Rocha & Oliveira (1998) em *Colletotrichum gloeosporioides*, quando confrontado com isolados de *Trichoderma*. Já Inbar et al. (1996) descrevem o crescimento da hifa do *Trichoderma* spp. ao longo das hifas de *S. sclerotiorum* e, em alguns momentos, enrolamento de ramificações de hifas do antagonista no hospedeiro, cujo conteúdo exibe aparência granulada e vacuolização. Widyastuti et al. (2003) observaram, com espécies *T. reesei* e *T. harzianum* confrontadas com *Sclerotium rolfsii*, o crescimento paralelo e enrolamento de hifas, como descritos por Inbar et al. (1996). Reis Almeida et al. (2007) descrevem o micoparasitismo de *T. harzianum* sobre *Rhizoctonia solani* como enrolamento de hifas e degradando da parede celular do patógeno, graças à produção de enzimas hidrolíticas. Já a formação de apressórios foi constatada por Abdullah et al. (2008), ao descrever o micoparasitismo de *Trichoderma* contra *S. sclerotiorum*. Carvalho Filho (2008) relatou, além do enrolamento das hifas e crescimento paralelo, plasmólise nas hifas de *Cylindrocladium scoparium*. Entretanto, o estabelecimento de correlação entre a ocorrência desses eventos e sua eficácia no controle biológico é bastante complexo. Sathiyaseelan et al. (2009) ao estudarem o efeito direto de *T. viride* sobre algumas culturas de fitopatógenos, verificaram eficácia de 54%, 39%, 37% e 28% contra *R. solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium carthami*, respectivamente. Louzada et al. (2009) constatou que, a despeito de alguns isolados apresentarem potencial de controle, pelos testes de culturas pareadas, os mesmos não demonstraram parasitismo direto em exames de MEVA. É sabido, no entanto, que outros mecanismos podem estar envolvidos na atividade antagonista de *Trichoderma* spp., dentre os quais, a competição, que pode

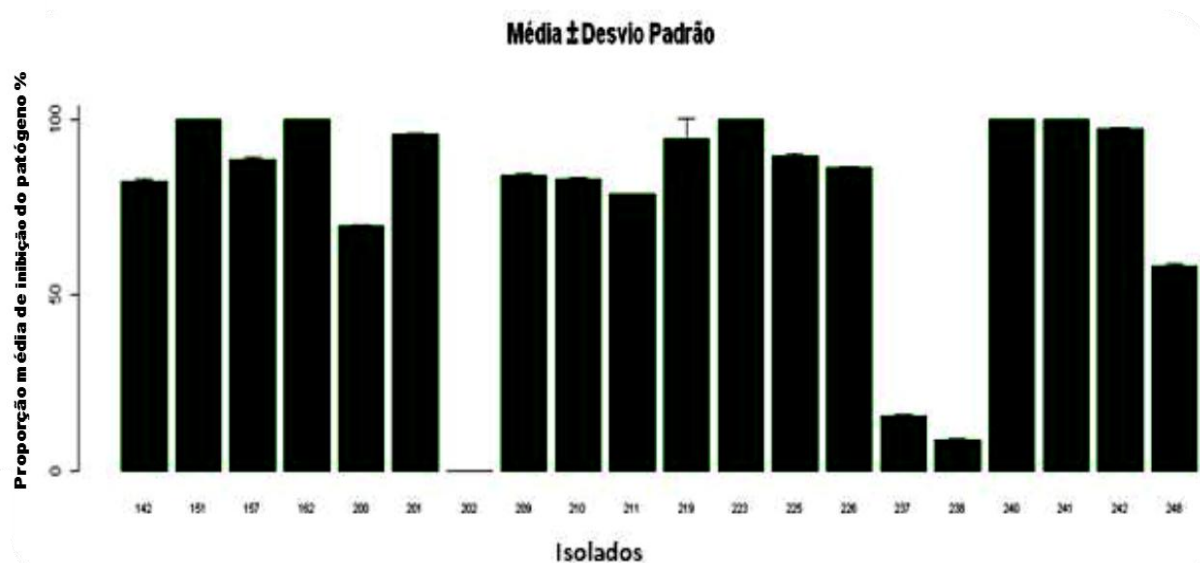
resultar em limitação, para o patógeno, de nutrientes e água, ou de sítios onde esses fatores nutricionais são mais abundantes (Perelló et al., 2003). Esse mecanismo também pode ser detectado em testes de pareamento de culturas, pois reflete na habilidade de colonização rápida do substrato. Ainda, Sathiyaseelan et al. (2009) comentam que tanto a competição quanto o micoparasitismo exercidos por fungos do gênero *Trichoderma* podem permanecer ativos mesmo sob condições ambientais desfavoráveis para o crescimento micelial, o que sugere a possibilidade de tolerância do fungo a estresses.

#### **Avaliação do efeito inibidor de crescimento micelial de *S. sclerotiorum* por metabólitos não voláteis produzidos por *Trichoderma* spp.**

Os resultados relativos aos experimentos com metabólitos não voláteis indicaram que praticamente não houve variação entre os tratamentos realizados com filtrado estéril e papel celofane (Figura 4). Desta forma, considerou-se para análises, apenas o fator “isolado” (Figura 5).



**Figura 4.** Atividade de metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. em relação ao crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*..



**Figura 5.** Porcentagens com desvio-padrão da inibição do patógeno *S. sclerotiorum* por isolados de *Trichoderma*, independente da metodologia empregada.

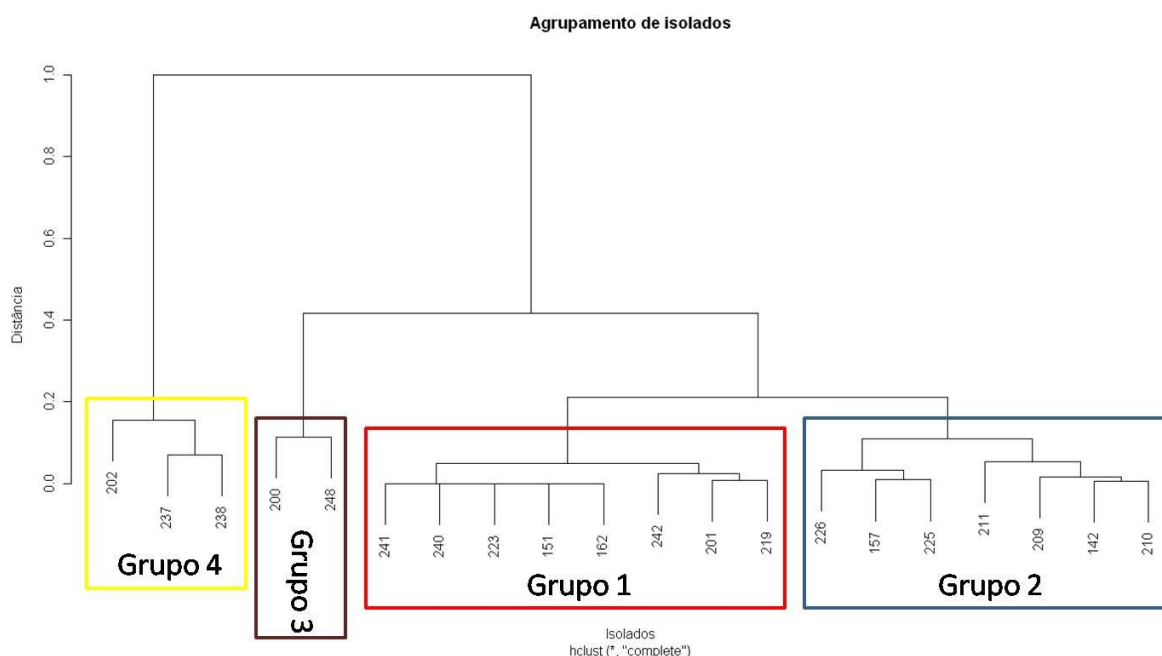
Assim, qualquer que seja a metodologia utilizada, os valores médios da porcentagem de inibição micelial exercida sobre *S. sclerotiorum*, variaram de 100% com os isolados (CEN151, CEN162, CEN223, CEN240 e CEN241) até ausência de inibição (0%) com o isolado CEN202 (Figura 4).

O dendograma resultante no agrupamento dos isolados de *Trichoderma* (Figura 6), evidenciou a existência dos quatro seguintes grupos: CEN151, CEN162, CEN201, CEN219, CEN223, CEN240, CEN241, CEN242 (Grupo 1); CEN142, CEN157, CEN209, CEN210, CEN211, CEN225, CEN226 (Grupo 2); CEN200, CEN248 (Grupo 3) e CEN202, CEN237, CEN238 (Grupo 4).

Ao serem comparados os agrupamentos 1 e 2, pelo teste de Kruskal-Wallis, verificou-se diferença significativa, em nível, de 5% de significância, indicando que essa metodologia foi adequada para separar os isolados mais eficientes.

Entretanto, ao se confrontar os componentes do Grupo 1 entre si, pelo menos dois desses diferiram do restante, ao nível de 5% de significância. Quando comparados dois a dois,

os isolados CEN242, CEN201 e CEN219 diferiram significativamente dos isolados CEN241, CEN240, CEN223, CEN151 e CEN162.



**Figura 6.** Dendrograma do agrupamento dos isolados de *Trichoderma* em relação à inibição do crescimento de *S. sclerotiorum*.

De acordo com esses resultados apresentados, o isolado CEN162 distinguido nos testes de pareamento de culturas, agrupou-se com os que apresentaram os melhores resultados relativos à ação por metabólitos não voláteis. Entretanto, isolados que não sobressaíram nesses testes (CEN240, CEN241 e CEN242), e por isso foram alocados na Classe 3, agruparam-se entre os melhores (Grupo 1) nos testes de produção de metabólitos não voláteis ativos contra o patógeno. Particularmente vale destacar o isolado CEN151, cujo filtrado de cultura exerceu forte inibição no desenvolvimento de colônias de *S. sclerotiorum*, embora não apresentando qualquer interação com o patógeno pelo pareamento de culturas. Esse fato pode também ser observado com o isolado CEN225.

A inibição do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos por metabólitos de *Trichoderma* foi primeiramente relatado por Dennis & Webster (1971 a,b), sendo que os

mecanismos relacionados passaram a ser elucidados bem mais tarde (Haran et al., 1996; Inbar et al., 1994). A partir do início deste século, intensificaram-se os estudos na identificação e avaliação desses compostos. Assim, Küçük & Kivanç (2003) demonstraram que o efeito de metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *Drechslera sorokiniana*, *Fusarium moniliforme*, *F. culmorum*, *F. solani*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia solani*, *R. cerealis* e *Sclerotium rolfsii*. Redução do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* foi observado por Yang et al. (2007) com filtrado de culturas de *Coniothyrium minutans*, sem contudo observar inibição de germinação de escleródios. Já El-Hasan et al. (2008) isolaram o composto Alpha-6-pentil Pirona produzido por diferentes isolados de *Trichoderma* com efeito fungistático e fungicida sobre o desenvolvimento de *Fusarium moniliforme*; os mesmos autores (El-Hasan et al. 2009) observaram também efeito de viridiofungin A, quando usado em altas concentrações, como inibidor de: germinação de conídios de *Verticillium dahliae*, de esporângios de *Phytophthora infestans* e de escleródios de *S. sclerotiorum*. Vinale et al. (2009) isolaram o ácido harziânico a partir de filtrado de cultura de um isolado de *T. harzianum* procedente da Austrália, com efeito inibitório sobre *Pythium irregulare*, *S. sclerotiorum*, e *Rhizoctonia solani*, “in vitro”. Neste trabalho, filtrado de cultura de pelo menos um dos isolados aqui estudados (CEN201), quando submetido à extração, apresentou vários picos em cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com atividade contra *S. sclerotiorum*. Os trabalhos visando à purificação e identificação das moléculas bioativas presentes no filtrado vem sendo conduzidos por outros membros da equipe.

Recentemente, os metabólitos secundários produzidos por *Trichoderma* foram agrupados em famílias conhecidas (Reino et al., 2008). Assim as Antraquinonas apresentam os metabólitos pachybasina, chrysophanol, emodina, 1,3,6,8-tetrahidroxi antraquinona, 1-acetil-2,4,5,7-tetrahidroxiantraquinona, trichodermaol e xantona dimérica, Daucane

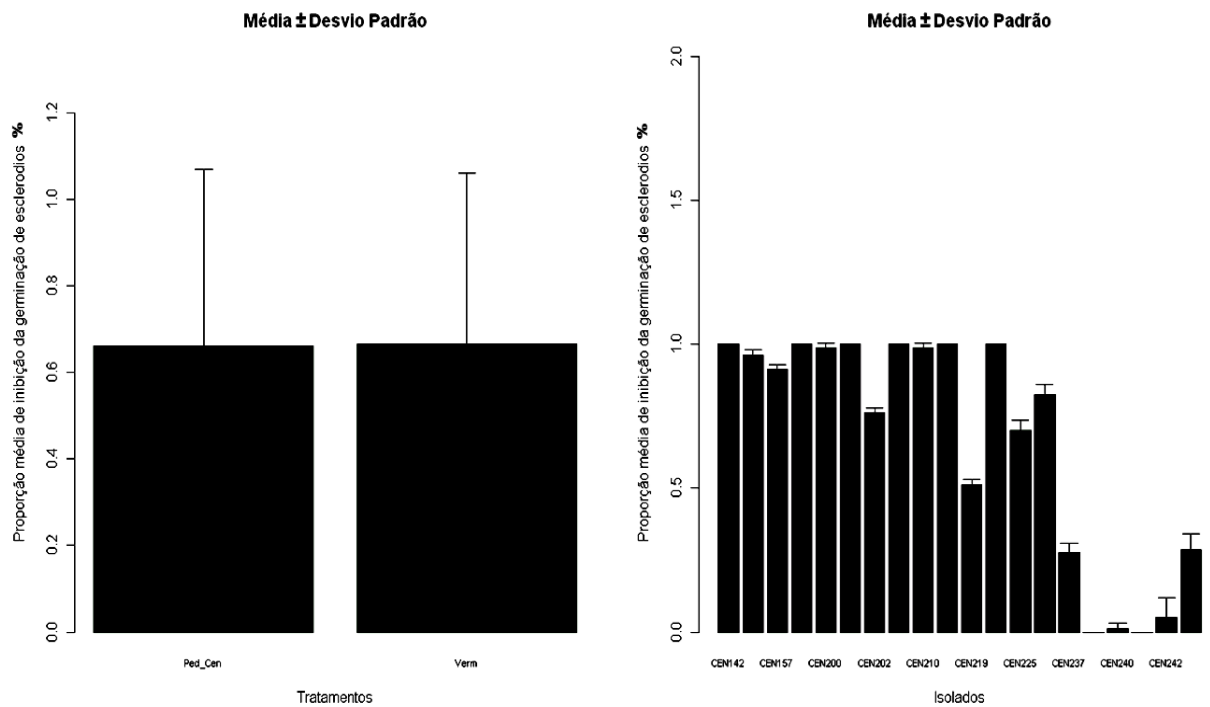
sesquiterpenes também conhecido como carotenos, foi produzido por um isolado de a *T. virens*, embora seja usualmente encontrado em plantas das famílias Umbelliferae e Compositae, e raramente detectado em filtrados de culturas fúngicas, as Pironas, como o 6-pentil-2H-pirona e as famílias Koninginas, Trichodermamidas, Viridinas e Viridiofunginas, restritas ao gênero *Trichoderma*. Dessa maneira, a biossíntese de uma grande variedade de metabólitos secundários com propriedades antifúngicas constitui um dos focos dos programas de controle biológico na atualidade. Importante ressaltar que, em muitos casos, a antibiose parece estar assonciada à ação combinada com enzimas hidrolíticas, responsável pela degradação de paredes fúngicas.

### **Inibição da germinação miceliogênica de escleródios por isolados de *Trichoderma***

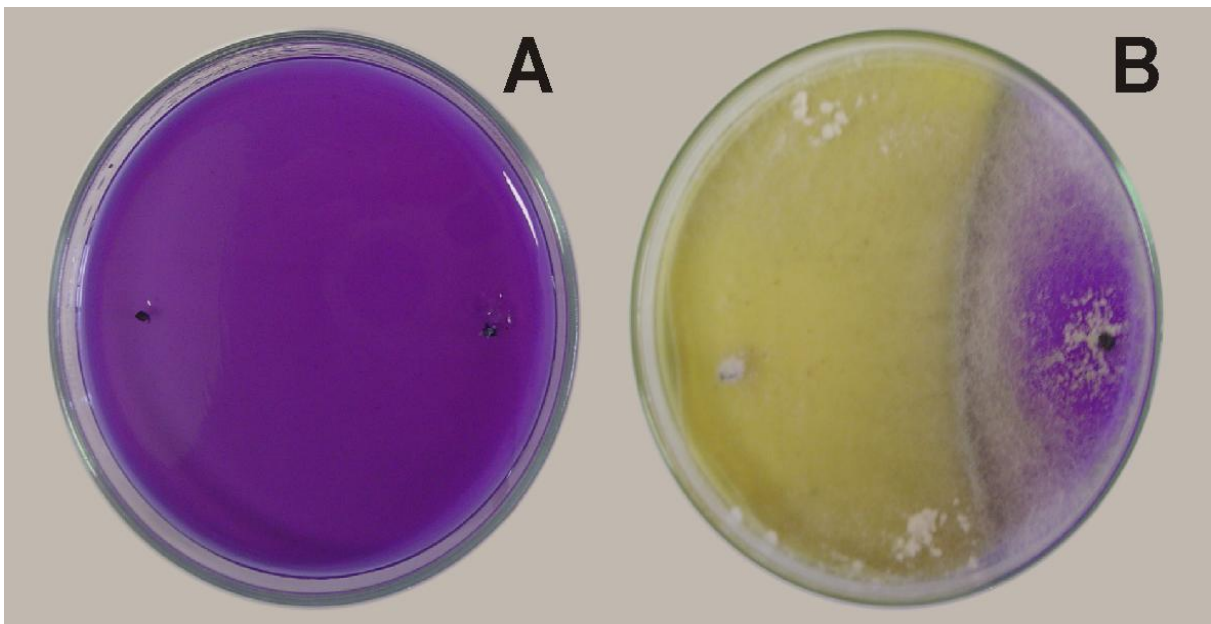
Quanto à inibição da germinação dos escleródios de *S. sclerotiorum*, observou-se que não houve variação nos resultados nos testes conduzidos nos substratos cenoura e farinha de soja + vermiculita. Dentre os 20 isolados de *Trichoderma* testados (Figura 7), CEN142, CEN162, CEN201, CEN209, CEN211 e CEN223 foram os que apresentaram 100% de inibição da germinação, indicada pela não alteração da cor do meio de cultura de azul para amarela (produção de ácido oxálico – Figura 8); os isolados CEN151, CEN157, CEN200 e CEN210 apresentaram inibição superior a 90%, enquanto com os isolados CEN226, CEN202, CEN225, CEN219, CEN248 e CEN237 os percentuais de inibição foram 80%, 75%, 70%, 50%, 28% e 25%, respectivamente. Já os isolados CEN238, CEN240, CEN241 e CEN242 não apresentaram atividade de inibição germinativa sobre os escleródios (Figura 7). Cabe destacar o isolado CEN162 como inibidor de germinação de escleródios de *S. sclerotiorum*, adicionalmente ao seu forte efeito nos ensaios anteriores, juntamente com os isolados CEN201, CEN209, CEN211 e CEN223.

A análise de agrupamento (Figura 9) apontou cinco grupos, em ordem decrescente de inibição de germinação de escleródios: Grupo 1 (CEN142, CEN151, CEN157, CEN162, CEN200, CEN201, CEN209, CEN210, CEN211, CEN223); Grupo 2 (CEN202, CEN225, CEN226); Grupo 3 (CEN219); Grupo 4 (CEN237, CEN248) e Grupo 5 (CEN238, CEN240, CEN241, CEN242). Pelo teste Kruskal-Wallis utilizado para comparar os Grupos 1 e 2, detectou-se diferença significativa entre os grupos ao nível de 5% de significância. Dentro do Grupo 1, os isolados não apresentaram diferença significativa entre si.

Vale mencionar que, mesmo não sendo visualizadas alterações resultantes do micoparasitismo dos escleródios por exames microscópicos após cortes em criomicrotomo, a não detecção da produção do ácido oxálico em meio de cultura determina a inviabilidade dos mesmos, confirmada pela ausência da germinação carpogênica ou miceliogênica dessas estruturas de resistência. De fato, a visualização de atividade micoparasítica de *Trichoderma* sobre escleródios de *S. sclerotiorum* tem sido relatada por diferentes autores Bae & Knudsen 2007; Tsahouridou & Thanassouloupoulos, 2001. Durman et al. (2005) utilizaram o meio de cultura BDA + Azul de Bromofenol, tendo constatado maiores níveis de liberação de ácido oxálico, evidenciado pelo maior diâmetro do halo amarelo, em isolados de *S. sclerotiorum* obtidos de soja do que em isolados de alface e girassol. De acordo com esses autores mesmo em baixos níveis de produção desse ácido, esse método pode ser útil para detecção visual de isolados de *S. sclerotiorum* em lotes de sementes.

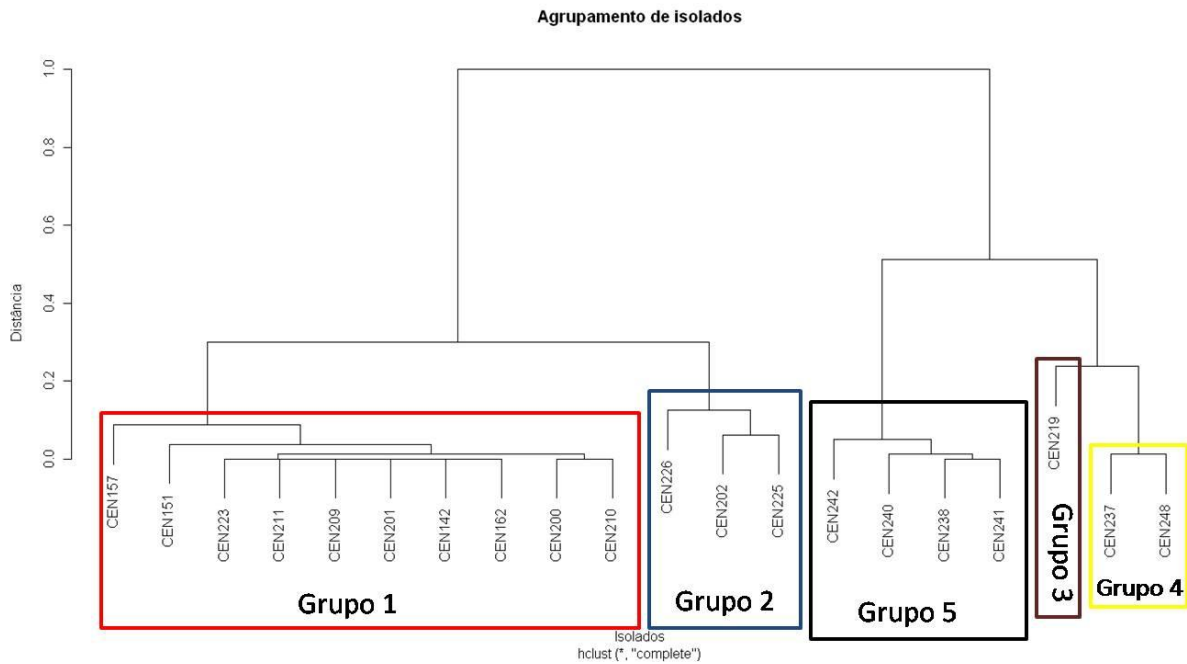


**Figura 7.** Médias com desvio-padrão da inibição do crescimento de escleródios de *S. sclerotiorum* por isolados de *Trichoderma*.



**Figura 8.** (A) Escleródios de *S. sclerotiorum* depositados no meio Neon-S; (B) coloração amarelada do meio caracterizada pela presença de ácido oxálico.





**Figura 9.** Dendrograma do agrupamento de isolados de *Trichoderma* obtido a partir dos dados de inibição da germinação de escleródios de *S. sclerotiorum*

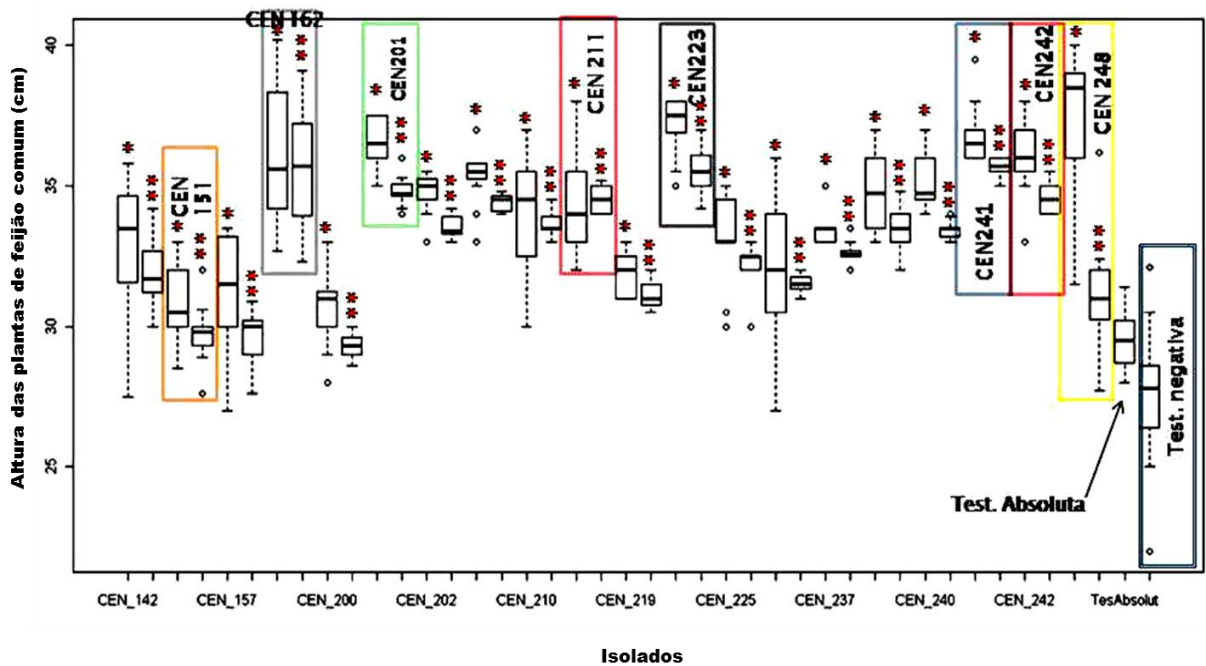
Este trabalho corrobora resultados obtidos por Singh (1991) e Louzada et al. (2009), entre outros autores, ao mostrar que alguns isolados de *Trichoderma* são capazes de parasitar os escleródios de *S. sclerotiorum*, a despeito destes serem considerados capazes de resistir ao parasitismo (Melo, 1998). O parasitismo exercido diretamente sobre escleródios seria um dos critérios mais eficientes e práticos para avaliar o grau de antagonismo ao fungo *S. sclerotiorum*, por constituírem essas importantes estruturas reprodutivas, cuja germinação poderá originar tanto micélio como apotécios, conforme Le Tourneau (1979).

### **Controle de *S. sclerotiorum* por *Trichoderma* spp. em soja e feijão comum e promoção de crescimento, em casa de vegetação**

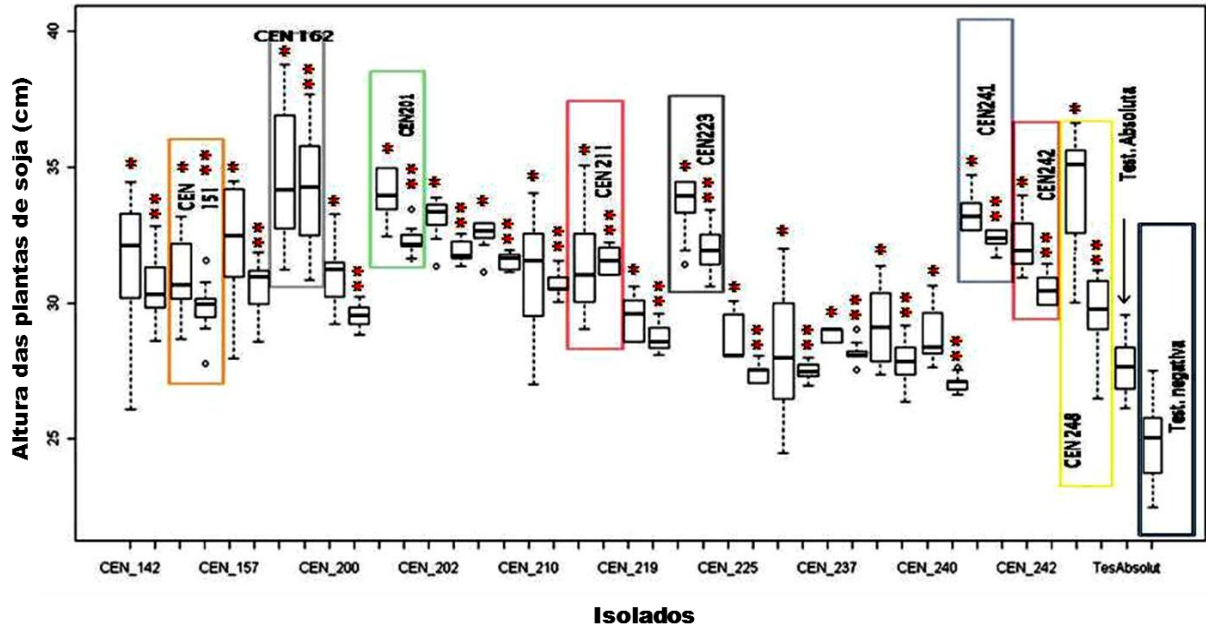
Os resultados obtidos nos ensaios conduzidos em casa de vegetação sobre o efeito de *Trichoderma* spp. no controle de *S. sclerotiorum* e como promotor de crescimento de plantas, indicaram variabilidade entre os isolados de *Trichoderma*, para ambos os critérios avaliados. Procedeu-se a modelagem (modelo de efeito de tratamentos, ou seja, *Trichoderma* + planta e

*Trichoderma* + mofo-branco + planta) para os dados de altura de plantas e peso seco obtidos com as duas culturas. Assumiu-se, para o modelo de efeito de tratamentos, distribuição normal para as variáveis respostas.

Com base nos valores estimados para cada isolado e tratamento, realizou-se uma análise de agrupamentos para identificar e agrupar os isolados com relação às variáveis de interesse. Obtiveram-se os dados de altura, as médias e os desvios padrões.



**Figura 10.** Dados médios de altura (cm) de plantas de feijão comum resultante do tratamento de sementes com *Trichoderma* na ausência (\*) e na presença (\*\*) de *S. sclerotiorum*, obtidos em casa de vegetação.



**Figura 11.** Dados médios de altura (cm) de plantas de soja resultante do tratamento de sementes com *Trichoderma* na ausência (\*) e na presença (\*\*) de *S. sclerotiorum*, obtidos em casa de vegetação.

Para ambas as culturas, feijão comum e soja, quando as sementes foram tratadas com *Trichoderma* spp., houve supressão do patógeno com redução dos sintomas da doença em diferentes níveis. Maior percentual de mortalidade ocorreu em plântulas originadas de sementes tratadas apenas com micélio de *S. sclerotiorum*. Houve diferenças significativas entre os tratamentos dos isolados para a mesma cultura. Também a porcentagem da redução de infecção e mortalidade foi significativa entre as culturas, com maior dano observado na soja.

O grupo de isolados que gerou plantas com melhor desenvolvimento foi constituído por CEN162, CEN242, CEN201, CEN241, CEN223 e CEN248, enquanto na testemunha negativa (TesNeg) foi observado menor crescimento das plantas, para ambas as culturas. O isolado CEN248 apresentou pouco efeito no controle de *S. sclerotiorum*, porém induziu incremento de altura e massa seca. Esse efeito de isolados de *Trichoderma* como promotores de crescimento de plantas foi tema de estudos conduzidos por Gravel et al. (2007) que

constatou estímulo no desenvolvimento de tomateiro, atribuído à produção de Ácido Indolacético (AIA) pelo antagonista. Neste trabalho a promoção de crescimento foi observada também com vários isolados identificados como potenciais agentes de biocontrole, ainda que, no caso específico do isolado CEN200, o efeito foi contrário no feijão comum, ao se constatar menor desenvolvimento vegetativo.

Quanto à soja, todos os isolados resultaram em crescimento de plantas superior à testemunha. Este efeito positivo provocado pelo *Trichoderma* pode ser observado em diferentes espécies vegetais. De acordo com Yedidia et al (1999; 2003) a base genética não teria forte influência nesta interação, embora Hanson e Howell (2004) postulem que essas interações, mediadas por elicitores de *Trichoderma*, ocorram como resposta da planta determinada pela expressão de genes envolvendo seu sistema de defesa, promovendo o crescimento do sistema radicular e a disponibilidade de nutrientes.

As interações planta - patógeno - antagonista são complexas, especialmente no caso de *Trichoderma*, cujos mecanismos de ação, diversificados, podem ocorrer simultaneamente. Seus efeitos podem ser diretamente sobre o patógeno ou indiretamente como consequência de suas interações no sistema radicular da planta e com o meio externo. Neste trabalho, as interações foram estudadas nos três sistemas planta-patógeno, planta-antagonista e planta-patógeno-antagonista, constatando-se a dificuldade em avaliar a interação tripartite. Embora alguns testes possam ser executados “in vitro”, nem sempre os resultados são reproduzidos em condições naturais. Entretanto, tais estudos são importantes para uma triagem adequada dos antagonistas, até a fase de campo.

Embora o tipo e a quantidade de substâncias não-voláteis não tenham sido determinados, estes resultados sugerem a produção de diferentes substâncias não-voláteis pelos isolados testados. Tais substâncias bioativas podem degradar os compostos liberados

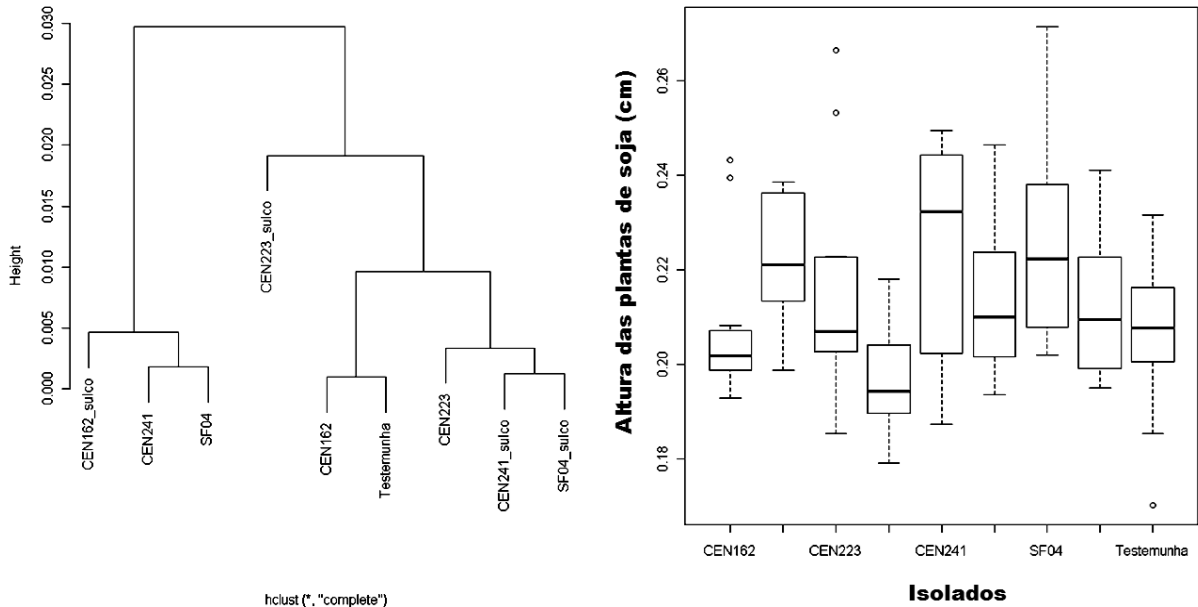
por *S. sclerotiorum*, como por exemplo, ácido oxálico liberado por escleródios e micélio dormente em sementes. Seletividade de alguns metabólitos secundários produzidos por *Trichoderma* em relação aos fitopatógenos foi relatada por Jash & Pan (2004a,b).

### **Controle de *S. sclerotiorum* por *Trichoderma* spp. nas culturas de soja e feijão comum, em condições de campo**

Na fase mais vulnerável da planta de soja à penetração do patógeno, entendido como plena floração (R2) até o início de enchimento de vagens (R3), não foram observados sintomas iniciais da doença, caracterizados por manchas aquosas na haste, próxima ao nível do solo, tampouco com o desenvolvimento da cultura se observou o micélio branco, sinal característico da doença. Apenas os tratamentos CEN223 e CEN241\_sulco apresentaram pequenas áreas com sintomas, além da presença do micélio branco nas hastes, contudo não ultrapassando 2% das plantas na área de plantio. Justifica-se esse fato pela baixa população de esclerócios/m<sup>2</sup> estimada por ocasião da implantação dos experimentos, há vista que, de acordo com Huang et al. (2000), para o desenvolvimento da doença é necessário um número mínimo de 145 escleródios/m<sup>2</sup>.

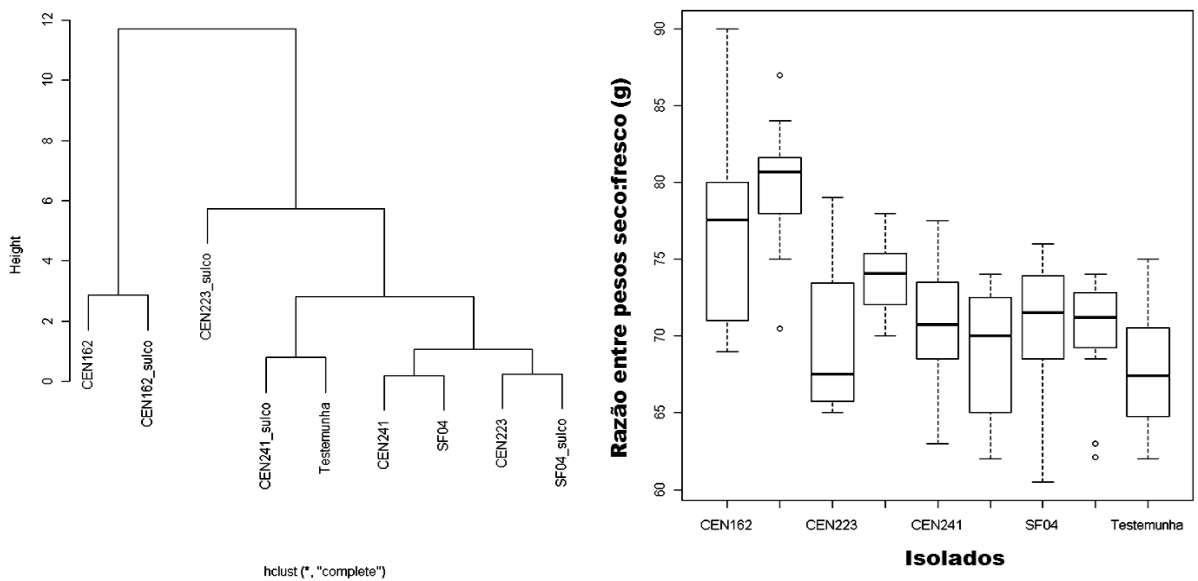
Segundo a análise de agrupamento (Figura 12) realizada para a cultura da soja, observou-se que os tratamentos CEN162 e CEN162\_sulco formaram o grupo nos quais houve maior crescimento das plantas. De fato, o contraste entre CEN162\_sulco com tratamentos utilizando outros isolados (outros agrupamentos), mostrou a significativa superioridade do primeiro em todas as comparações. Novamente, ao agruparem-se os tratamentos (Figura 13), verificou-se que os tratamentos CEN162\_sulco, CEN241 e SF04 apresentaram em média maior razão peso seco. Na sequência, o grupo de CEN223, CEN241\_sulco e SF04\_sulco, o

grupo de CEN162 e Testemunha e por fim CEN223\_sulco, apresentaram a menor razão peso seco.



**Figura 12.** Dendrograma do agrupamento dos isolados de *Trichoderma* e representação gráfica de alturas de planta de soja obtidas para cada isolado, em condições de campo.

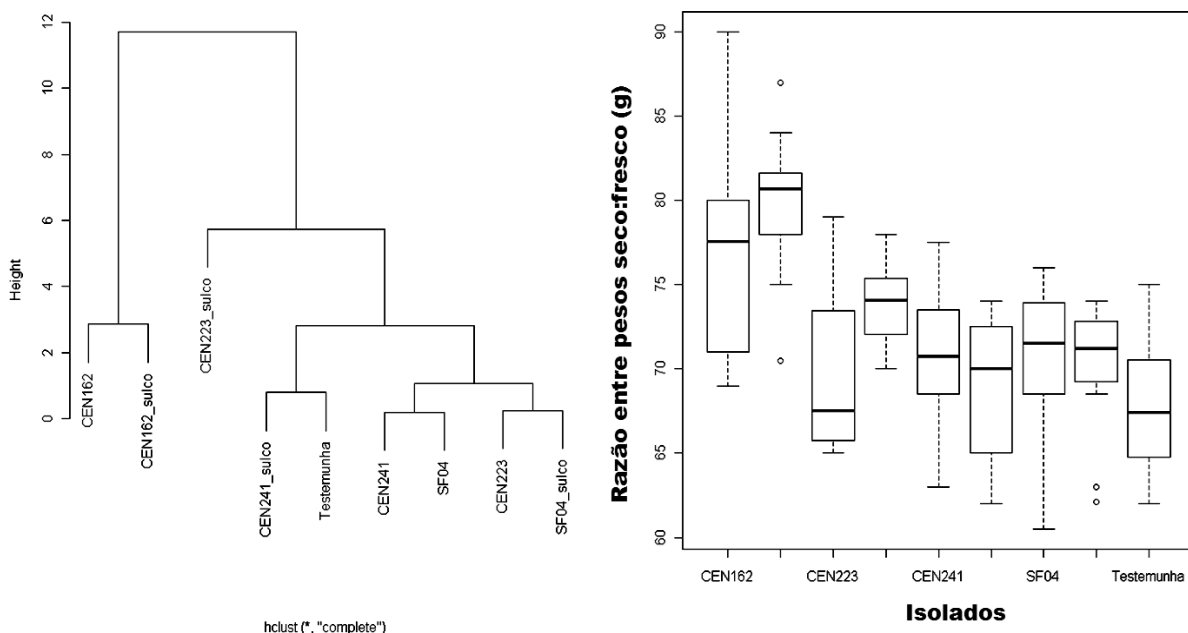
Os tratamentos com CEN162 também apresentaram menor variabilidade em termos de altura de planta.



**Figura 13.** Dendrograma do agrupamento dos isolados e representação gráfica da razão entre pesos seco e fresco para cada isolado de *Trichoderma* na cultura de soja, em condições de campo.

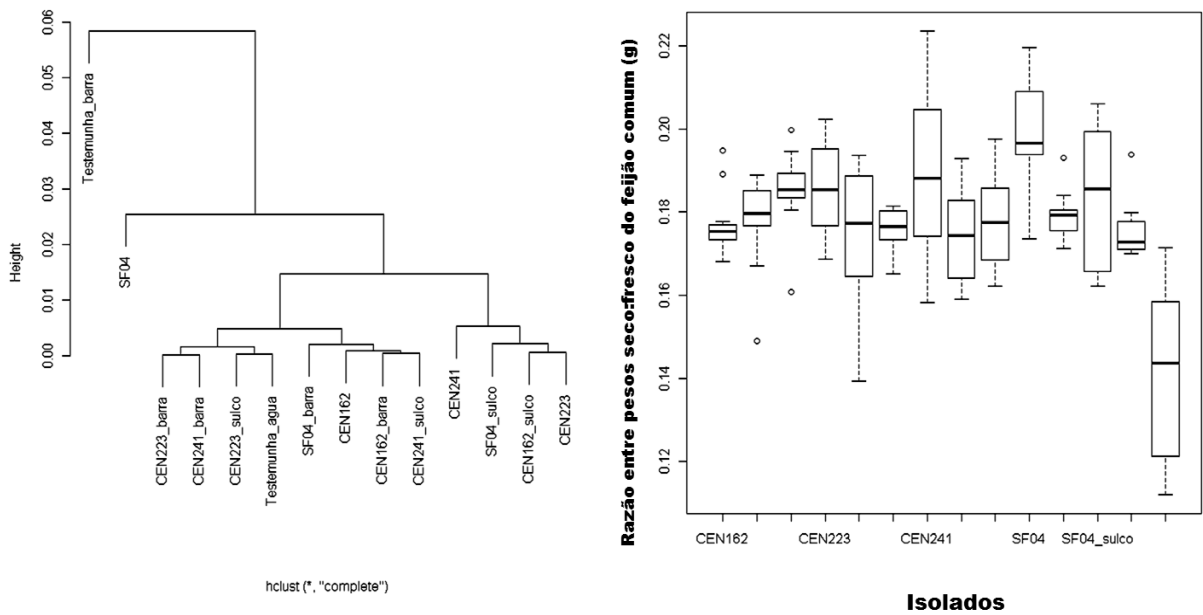
Para o feijoeiro, as avaliações dos sintomas foram realizadas durante os estágios de pré-floração (R5), após emissão do primeiro botão floral e formação e enchimento de vagens (R7/R8), (primeira vagem com a corola despreendida até o início de inchamento das vagens), mais vulnerável à penetração do patógeno. Neste período apenas os tratamentos CEN241 e CEN241\_barra apresentaram pequenas áreas com sintomas (micélio branco na haste), não ultrapassando 5,5% das plantas da área cultivada. Conforme mencionado anteriormente, a baixa população do patógeno não possibilitou o avanço da doença.

Para esta cultura, o tratamento CEN162\_barra foi o que apresentou maior média de altura e, conjuntamente com o agrupamento formado por CEN162, CEN162\_sulco e testemunha\_água, destacaram-se em termos de crescimento das plantas. Por outro lado, o agrupamento formado por SF04, CEN223 e CEN241 apresentou menores valores médios de crescimento (Figura 14).



**Figura 14.** Dendrograma do agrupamento dos isolados de *Trichoderma* e representação gráfica de alturas de planta de feijão comum, em condições de campo.

O tratamento SF04 se destacou com a maior razão peso seco, seguido do agrupamento formado por CEN241, SF04\_sulco, CEN162\_sulco e CEN223, enquanto a testemunha\_barra apresentou menor razão entre todos (Figura 15).



**Figura 15.** Dendograma do agrupamento dos isolados e representação gráfica da razão entre pesos seco e fresco para cada isolado de *Trichoderma* na cultura de feijão, em condições de campo.

Fungos do gênero *Trichoderma* têm sido testados no controle do mofo branco nas culturas de soja e feijão por outros pesquisadores (Inbar et al. 1996; Huang et al, 2000).

De modo geral, tem sido indicada a eficiência deste agente de controle biológico na redução de incidência de doença em testes em campo em diferentes países. Porém, na maioria dos experimentos anteriormente conduzidos, procedeu-se a aplicação do agente através de microbiolização das sementes, diferentemente do que se procurou realizar com este trabalho. Para a obtenção de resultados conclusivos, deverão ser conduzidos novos ensaios em áreas com elevada população do patógeno. Também deverão ser avaliadas diferentes formas de aplicações do agente de biocontrole, isoladas e associadas, mediante microbiolização das



sementes, aplicação do inóculo em sulcos de plantio, pulverização por barra tracionada, e via pivô. Cabe ainda avaliar diferentes épocas de aplicação, bem como a persistência do agente de biocontrole no campo.

O micoparasitismo sobre escleródios deve ser alvo de estudos mais detalhados, principalmente considerando-se a distribuição espacial desses propágulos no campo, bem como as interações químicas entre os dois organismos (patógeno e agente de biocontrole), tendo o solo como barreira física.

A população das espécies *Trichoderma* endêmicas não foi considerada neste trabalho. Bae & Knudsen (2000) Orr & Knudsen (2004) postulam que a adição de inóculo de *Trichoderma* ao solo pode ser responsável por níveis mais elevados de colonização do substrato por esse agente de biocontrole, mas que as populações pré-existentes estariam agindo em conjunto. Portanto, novos experimentos deverão dimensionar a população de *Trichoderma* já existente e avaliar os níveis de incremento populacional ao longo do ciclo da cultura.

Finalmente, diferentes mecanismos de ação podem atuar simultaneamente e a busca por isolados que apresentem mais de um desses mecanismos deve ser sempre priorizada na implementação de um programa de controle biológico.

## CONCLUSÕES

1. Os produtos metabolitos não voláteis produzidos por *Trichoderma* inibem o crescimento do micélio de *S. sclerotiorum* “in vitro” independente da metodologia adotada.
2. Com base nos resultados de micoparasitismo, podem ser indicados os isolados CEN162 e CEN209 como potenciais agentes de biocontrole do mofo-branco.

3. Com base nos resultados dos ensaios de metabólitos não voláteis, os isolados CEN240 e CEN241 são fontes de metabólitos secundários com propriedades antibióticas contra *S. sclerotiorum* e carecem de estudos para identificação desses compostos bio-ativos.
4. O isolado CEN248 possui potencial como promotor de crescimento de plantas de feijão comum e soja.
5. A utilização de mais de uma forma de aplicação do agente de biocontrole poderá resultar em melhores respostas do agente de biocontrole no campo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAWI GS, POLACH FJ, MOLIN WT, 1975. Infection of bean by Ascospores of *Whetzelinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, 65(6):673-678.
- ABDULLAH MT, ALI NY, SULEMAN P. 2008. Biological Control of *Sclerotinia Sclerotiorum* (Lib.) De Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**. 27 1354– 1359.
- ADAMS PB, TATE CJ, 1975. Factors affecting lettuce drop caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease Reporter**, 59(2):140-143.
- ADAMS PB, TATE CJ, 1976. Mycelial germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* on soil. **Plant Disease Reporter**, 60(6):515-518.
- AGRAWAL SC, KHARE MN, AGRAWAL PS. 1977. Biological control of *Sclerotium rolfsii* causing collar rot of lentil. **Indian Phytopathology**. 30: 176-179.
- Bae YS, Knudsen GR. 2000. Cotransformation of *Trichoderma harzianum* with b-glucuronidase and green fluorescent protein genes provides a useful tool for monitoring fungal growth and activity in natural soils. **Appl. Environ. Microbiol.** 66, 810–815.

- BAE YS, KNUDSEN GR. 2007. Effect of sclerotial distribution pattern of *Sclerotinia sclerotiorum* on biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. **Applied Soil Ecology**. 35: 21-24.
- BELL DK, WELLS HD, MARKHAM CR. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**. 72: 379-382.
- BIN L, KNUDSEN GR, ESCHEN DJ. 1991. Influence of an antagonistic strain of *Pseudomonas fluorescens* on growth and ability of *Trichoderma harzianum* to colonize sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. **Phytopathology**. 81: 994-1000.
- BISSETT J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma* II. Infragenetic classification **Can. J. Bot.** 69: 2357-2372.
- BISSETT J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma* III. Section Pachybasium. **Can. J. Bot.** 69: 2373-2417.
- BISSETT J, SZACAKS G, NOLAN CA, DRUZHININA I, GRANDIGER C, KUBICEK C. 2003. New species of *Trichoderma* from Asia. **Can. J. Bot.** 81, 570–586.
- CARVALHO-FILHO MR. 2008. *Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole de *Cylindrocladium scoparium* e como promotores de crescimento em mudas de eucalipto. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília.
- CHAVERRI P, CASTLEBURY LA, SAMUELS GJ, GEISER D. 2003. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. **Mol. Phylogen. Evol.** 27, 302–313.
- CORABI-ADELL C. 2004. **Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (HYPOCREALES – FUNGI) mediante técnicas moleculares e análises ecofisiográficas.** Tese de Doutorado. Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro UNESP.
- CPC, CABI *International*, 2007. **Crop Protection Compendium.** Wallingford, UK. CABI *International*. 2007 Edition.

- DENNIS C, WEBSTER J. 1971a. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. **Trans. British. Mycol. Soc.** 57: 25-39.
- DENNIS C, WEBSTER J. 1971b. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. **Trans. British. Mycol. Soc.** 57: 41-48.
- DENNIS C, WEBSTER J. 1971c. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interaction. **Trans. British. Mycol. Soc.** 57: 363-369.
- DHINGRA OD, SINCLAIR JB. 1985. **Basic Plant Pathology Methods**. CRC Press, Florida.
- DORRELL DG, HUANG HC, 1978. Influence of *Sclerotinia* wilt on seed yield and quality of sunflower wilted at different stages of development. **Crop Science**, 18(1):974-976.
- Dos SANTOS AF, DHINGRA OD. 1982. Pathogenicity of *Trichoderma* spp. on the *Sclerotinia sclerotiorum*. **Can. J. Bot.** 60: 472-475.
- DURMAN SB, MENENDEZ AB, GODEAS AM. 2005. Variation in oxalic acid production and mycelial compatibility within field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Soil Biol. Biochem.** 37: 2180-2184.
- EL-HASAN A, WALKER F, BUCHENAUER H. 2008. *Trichoderma harzianum* and its metabolite 6-pentyl-alpha-pyrone suppress fumaric acid produced by *Fusarium moniliforme*. **J. Phytopathol.** 156, 79–87.
- EL-HASAN A, WALKER F, SCHÖNE J, BUCHENAUER H. 2009. Detection of viridifungin A and other antifungal metabolites excreted by *Trichoderma harzianum* active against different plant pathogens. **Eur J Plant Pathol** 124:457–470.
- EL-HELALY AF, ELAROSI HM, ASSAWAH MW, ABOL-WAFA MT, 1970. Studies on damping-off and root rots of bean in U.A.R. (Egypt). **United Arab Republic Journal of Phytopathology**, 2:41-57.
- ELAD Y, CHET I, HENIS Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. **Can. J. Microbiol.** 28: 719-725.

- GAMS W, BISSETT J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: KUBICEK P & HARMAN GE. (eds.) ***Trichoderma and Gliocladium: basic biology, taxonomy and genetics***. Vol 1. Taylor & Francis, London, p.3-34.
- GRAVEL V, ANTOUN H, TWEDDELL RJ. 2007. 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 & Biochemistry***, v.39, p.1968-1977.
- HANSON LE, HOWELL CR. 2004. Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. ***Phytopathology*** 94, 171–176.
- HARAN S, SCHICKLER H, CHET I. 1996. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. ***Microbiology***. 142: 2321-3131.
- HOYOS-CARVAJAL L, ORDUZ S, BISSETT J. 2009. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. ***Fungal Genetics and Biology***. 46:(9) 615–631.
- HUANG HC, HOES JA, 1980. Importance of plant spacing and sclerotial position to development of *Sclerotinia* wilt of sunflower. ***Plant Disease*** (formerly *Plant Disease Reporter*), 64(1):81-84.
- HUANG HC, KOKKO EG, 1992. Pod rot of dry peas due to infection by Ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. ***Plant Disease***, 76(6):597-600.
- HUANG HC, KOZUB GC, 1990. Cyclic occurrence of *Sclerotinia* wilt of sunflower in western Canada. ***Plant Disease***, 74(10):766-770.
- HUANG HC, BREMER E, HYNES RK, ERICKSON RS. 2000. Foliar Application of Fungal Biocontrol Agents for the Control of White Mold of Dry Bean Caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. ***Biological Control*** 18, 270–276.

- INBAR J, ABRAMSKY M, COHEN D. 1994. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedling grown under commercial conditions. **Eur. J. Plant Pathol.** 100: 337–346.
- INBAR J, MENENDEZ A, CHET I. 1996. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role biological control. **Soil Biol. Biochem.** 28: 757-763.
- IVANCHEVA-GABROVSKA T, ILIEVA E, KADIR SR, 1978. Pathogens of damping-off of tobacco seedlings in Bulgaria. **Rasteniev"dni Nauki**, 15(8):113-120.
- JASH S, PAN S. 2004a. Evaluation of mutant isolates of *Trichoderma harzianum* against *Rhizoctonia solani* causing seedling blight of green gram. **Indian J. agric. Sci.** 74: 190–193.
- JASH S, PAN S. 2004b. Stable mutants of *Trichoderma virens* for biological control against *Rhizoctonia solani* that causes seedling blight in green gram. **J. Mycol. Pl. Pathol.** 34: 476–480.
- KNUDSEN GR, ESCHEN DJ, DANDURAND LM, BIN L. 1991. Potential for biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* through colonization of sclerotia by *Trichoderma harzianum*. **Plant Dis.** 75: 466-470.
- KUBICEK C, BISSETT J, DRUZHININA I, KULLNIG-GRANDIGER C, SZAKACS G. 2002. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South East Asian isolates. **Fungal Genet. Biol.** 38: 310–319.
- KÜÇÜK Ç, KIVANÇ M. 2003. Isolation of *Trichoderma* spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological features, **Turk. J. Biol.** 27: 247-253.
- KULLNIG C, SZAKACS G, KUBICEK C. 2000. Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. **Mycol. Res.** 104: 1117–1125.
- LE TOURNEAU D. 1979. Morphology, cytology, and physiology of *Sclerotinia* species in culture. **Phytopathology** 69: 887-890.

LI GQ, HUANG HC, ACHARYA SN, ERICKSON RS 2005. Effectiveness of *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma atroviride* in suppression of sclerotinia blossom blight of alfalfa.

**Plant Pathology** 54: 204–211.

LOUZADA GAS, CARVALHO DDC, MELLO SCM, LOBO JÚNIOR M, MARTINS I, BRAÚNA LM. 2009. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. **Biota Neotrop.** 9(3): 145-149.

MELO IS. 1998. **Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos.** In: Controle Biológico, (ed. Melo IS, Azevedo JL) Jaguariuna – SP, Embrapa, pp20-67. MENENDEZ AB, GODEAS A. 1998. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* attacking soybean plants. Degradation of the cell walls of this pathogen by *Trichoderma harzianum* (BAFC 742). **Mycopathologia.** 142: 153-160.

MUELLER JD, CLINE MN, SINCLAIR JB, JACOBSEN BJ. 1985. An in vitro test for evaluating efficacy of mycoparasites on sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Dis.** 69 (7): 584-587.

NAPOLEAO R L, NASSER LCB, LOPES CA, CAFÉ FILHO A. 2006. Neon-S, novo veio para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes. **Summa phytopatol.** 32: 180-182.

ORR KA, KNUDSEN GR. 2004. Use of GFP and image analysis to quantify proliferation of *Trichoderma harzianum* in nonsterile soil. **Phytopathology** 94, 1383–1389.

PAPAVIZAS GC. 1982. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in pea and bean rhizosferes. **Phytopathology.** 72: 121-125.

PAPAVIZAS GC. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol. **Ann. Rev. Phytopathol.** 23: 23-54.

- PERELLÓ A, MÓNACO C, SIMÓM MR, SISTERMA M, DALL BELLO G. 2003. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan spot of wheat in Argentina. **Crop Protection**. 22: 1099-1106.
- PURDY LH. 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. **Phytopathology** 69(8):875-880.
- REIS ALMEIDA FB, CERQUEIRA FM, NASCIMENTO SILVA R, ULHOA CJ, LIMA AL. 2007. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnol Lett**. 29: 1189–1193.
- REINO JL, GUERRERO RF, HERNÁNDEZ-GALÁN R, COLLADO IG. 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. **Phytochem. Rev.** 7, 89–123.
- RIFAI MA. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycol. Pap.** 16, 1-56.
- ROCHA JR, OLIVEIRA NT. 1998. *In vitro* antagonistic potential of *Trichoderma* spp. against *Colletotrichum gloeosporioides* agent of anthracnose in the passion fruit (*Passiflora*). **Boletín Micológico**. 13: 103-110.
- SAMUELS GJ. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. **Mycol. Res.** 100 (8): 923-935.
- SAMUELS GJ, CHAVERRI P, FARR DF, MCCRAY EB. 2011. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved January 22, from <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>
- SATHIYASEELAN K, SIVASAKTHIVELAN P, LENIN G. 2009. Evaluation of Antagonistic Activity and Shelf Life Study of *Trichoderma viride*. **Bot. Res. Intl.** 2:(3) 195-197.
- SIDDIQUEE S, ABDULLAH F, SOON GUAN T, MIN SEE L. 2007. Allozyme Variations of *Trichoderma harzianum* and its Taxonomic Implications. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1(1): 30-37.



- SINGH D. 1991. Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Trichoderma harzianum*. **Tropical Pest Management**. 37: 374-378.
- STEADMAN JR. 1979. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**. 69: 875-880.
- TSAHOURIDOU PC, THANASSOULOPOULOS CC. 2001. *Trichoderma koningii* as a potential parasite of sclerotia of *Sclerotium rolfii*. **Cryptogamie, Mycologie**. 22: 289-295.
- VINALE F, FLEMATTI G, SIVASITHAMPARAM K, LORITO M, MARRA R, SKELTON BW, GHISALBERTI EL. 2009. Harzianic Acid, an antifungal and plant growth promoting metabolite from *Trichoderma harzianum*. **J. Nat. Prod.** 72 (11):2032–2035.
- WEINDLING R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. **Phytopathology**. 22: 837-845.
- WIDYASTUTI SM, HARJONO, SUMARDI, YUNIARTI D. 2003. Biological Control of *Sclerotium rolfii* Damping-off of Tropical Pine (*Pinus merkusii*) with Three Isolates of *Trichoderma* spp. **OnLine J. Biol. Sci.** 3(1):95-102.
- WHIPPS JM. 1997. **In Advances in Botanical Research**. Academic Press. London, pp: 1-134.
- YANG R, HAN YC, QING LI G, JIANG DH, HUANG HC. 2007. Suppression of *Sclerotinia sclerotiorum* by antifungal substances produced by the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. **Eur. J. Plant Pathol.** V. 113: xxxx–xxx.
- YEDIDIA I, BENHAMOU N, CHET I. 1999. Induction of defence responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied Environmental Microbiology** 65, 1061–1070.
- YEDIDIA I, SHORESH M, KEREM Z, BENHAMOU N, KAPULNIK Y, CHET I. 2003. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in

cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. **Applied Environmental Microbiology** 69, 7343–7353.

## **CAPÍTULO 02 - Produção de inoculo de isolados de *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma harzianum***

### **RESUMO**

A produção de esporos de isolados de *Trichoderma* spp. foi avaliada em dois substratos preparados com diferentes teores de água e tempo de embebição. As maiores taxas de esporulação foram observadas com os CEN162 e CEN238, em arroz parbolizado. Adição de água na proporção de 80%, e períodos de embebição superiores a 15 horas favoreceram a esporulação, independentemente do substrato. Padronizando a umidade em 80% com o período de embebição de 15 horas, os isolados apresentaram diferentes picos de esporulação no decorrer de 30 dias.

### **ABSTRACT**

The production of spores of *Trichoderma* spp. was evaluated in two substrates prepared with different amounts of water and soaking time. The highest spore production rate was observed with CEN162 and CEN238 isolates in parboiled rice. Addition of water at a ratio of 80%, and soaking periods exceeding 15 hours favored the spore production, regardless of the substrate. Moisture in 80% with soaking period of 15 hours, the isolates had different peaks for spore collecting in the course of 30 days.

## INTRODUÇÃO

Existe uma grande quantidade de produtos à base de fungos disponibilizada para comercialização, com registro, no Brasil e exterior. Esses produtos apresentam qualidade variável em termos de formulação, concentração do ingrediente ativo e vida de prateleira. Os biofungicidas são resultados de um processo que inclui a seleção do agente de biocontrole, com extensiva avaliação da eficácia, desenvolvimento do formulado, registro, “scale up” e avaliação do mercado (Tigano & Mello, 2006). Eles podem ser aplicados diretamente no solo ou em tratamento de sementes ou, ainda, como inoculantes de partes aéreas, tais como folhas e órgãos de propagação, a depender da parte da planta que se deseja proteger.

O cultivo de fungos em larga escala, na maioria dos casos, tem-se baseado no uso de substratos sólidos (Jackson, 1997; Thangavelu et al., 2004; Fortes et al., 2007). Grãos de cereais oferecem a vantagem de serem prontamente biodegradáveis, facilitando as aplicações no campo (Thangavelu et al., 2004). Adicionalmente, eles apresentam facilidade para quantificação dos propágulos produzidos.

Entretanto a capacidade de crescimento e esporulação é uma característica fortemente dependente de isolado e faz parte da triagem quando se deseja selecionar o agente de biocontrole, face à necessidade de produção de grande quantidade de biomassa quando o objetivo é sua utilização em larga escala. Ademais, fatores ambientais e nutricionais são importantes para a sobrevivência do agente e são determinantes para desenvolvimento de formulações.

Este trabalho visou ao ajuste da metodologia de produção de inóculo de *Trichoderma* spp., principalmente no tocante às condições ideais para esporulação do fungo, utilizando o arroz e o milho como substratos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Avaliação da Produção de Esporos de *Trichoderma asperellum* (CEN162), *Trichoderma harzianum* (CEN238, CEN223 e CEN241) em Arroz e Milheto sob Diferentes Condições de Umidade.**

Para a produção dos esporos, foram utilizados os isolados CEN162 (*T. asperellum*) e CEN223, CEN238 e CEN241 (*T. harzianum*), todos pertencentes à coleção da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Empregaram-se, como substratos para a multiplicação do fungo, grãos dos cereais arroz parboilizado e milheto forrageiro, distribuídos em frascos Erlenmeyer. Cada frasco de 125 mL de capacidade, recebeu 20 g de substrato. Na preparação do substrato, este foi umedecido com água destilada e, para tanto, as seguintes proporções (v/m) foram testadas: 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%. Cada frasco foi vedado com tampão de algodão e deixado em repouso pelos seguintes períodos de tempo: 3, 6, 12, 15, 18, 21 e 24 horas, antes da autoclavagem (120°C por 20 min).

Como inóculo semente utilizaram-se suspensões de esporos (10% do volume de substrato) à concentração de  $1 \times 10^4$  conídios – mL<sup>-1</sup>. Os esporos foram obtidos de colônias com sete dias de idade, desenvolvidas em meio BDA.

Após incorporação da suspensão de esporos, os frascos foram acondicionados em câmara de crescimento B.O.D. (Fanen, mod. 347), à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas, durante seis dias. A cada dois dias, os frascos com substrato foram revolvidos para promover a aeração e quebra do micélio, desta forma promovendo um aumento da superfície de contato com o ar, no intuito de favorecer a esporulação do fungo (Jackson, 1997).

Para avaliação, foram retiradas amostras de 01 (um) grama da massa produzida, que foi então diluída em solução Tween 0,05%, de forma a obter concentrações  $10^3$ - $10^4$  conídios – mL<sup>-1</sup>, para contagem do número de esporos com o auxílio de câmara de Neubauer.

Os experimentos foram conduzidos com quatro repetições e os dados obtidos, submetidos à análise, utilizando-se o método de superfície de resposta (MSR) para determinar o número máximo de conídios – mL<sup>-1</sup>, em função de isolado, tipo de substrato, tempo de embebição e teor de umidade a que foram submetidos. A equação estimada foi obtida através do modelo de regressão polinomial aplicando-se o método dos mínimos quadrados, supondo distribuição normal para a variável resposta. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 0.05.

**Curva de Crescimento e Produção de Esporos de *Trichoderma asperellum* (CEN162), *Trichoderma harzianum* (CEN238, CEN223 e CEN241) em Arroz parboilizado e Milheto.**

Os isolados foram crescidos nos substratos: arroz parboilizado (20g) e milho (20g), previamente umedecidos com água destilada (80%) e deixados em repouso por 15 horas antes da autoclavagem. O substrato foi distribuído em frascos Erlenmeyer de 125 mL de capacidade e foram utilizados 60 frascos para cada isolado. Os frascos contendo os substratos foram vedados com tampão de algodão e autoclavados a 120 °C por 20 minutos.

Cada frasco recebeu 2 mL de suspensão de esporos ( $1 \times 10^4$  conídios – mL<sup>-1</sup>), sendo as condições de incubação as mesmas descritas no item anterior.

Para determinar a curva de crescimento, a partir do segundo dia de incubação, a cada dois dias foram retirados 04 (quatro) frascos de cada isolado e determinado o número de esporos produzidos. O experimento foi encerrado aos 30 dias. Adotou o mesmo método de amostragem descrito anteriormente. Para análise da taxa de crescimento, considerou-se cada combinação de isolado x substrato, confeccionando-se os gráficos referentes aos tratamentos ao longo do tempo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Avaliação da Produção de Esporos de *Trichoderma asperellum* (CEN162), *Trichoderma harzianum* (CEN238, CEN223 e CEN241) em Arroz e Milheto sob Diferentes Condições de Umidade.

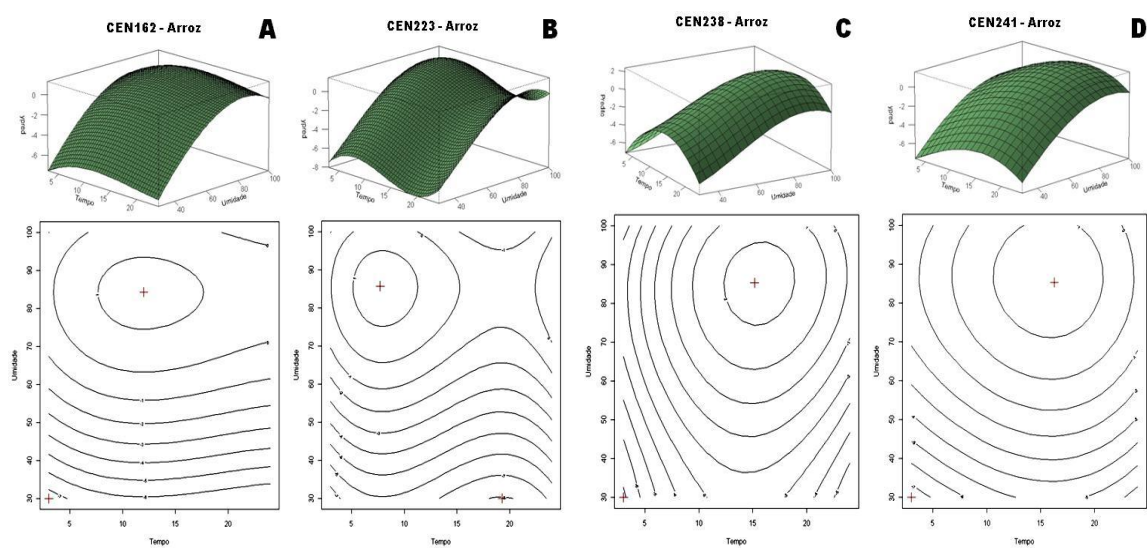
Houve interação entre os fatores (isolado, substrato, quantidade de água e tempo de embebição), conforme Tabela 1. Para os isolados CEN162 e CEN238, as maiores taxas de esporulação foram obtidas em arroz parboilizado, sendo que os valores médios de número de esporos foram de  $3,63 \times 10^{10}$  conídios/grama e  $10,91 \times 10^{10}$  conídios/grama, respectivamente. Com respeito ao tempo de embebição, a melhor taxa de esporulação foi obtida com 12 e 15 horas (Tabela 1). Já para os isolados CEN223 e CEN241 as maiores taxas de esporulação foram obtidas em milheto, sendo que os valores médios de número de esporos foram de  $13,83 \times 10^9$  conídios/grama e  $8,10 \times 10^9$  conídios/grama, respectivamente. Para esses dois isolados, a melhor taxa de esporulação foi obtida com 18 e 19 horas de embebição do substrato em água (Tabela 1).

**Tabela 1.** Valor predito máximo da densidade de esporos para cada isolado e tempo e umidade onde ocorre a maximização

Isolado	Tratamento	Valor Predito Máximo	Tempo e Umidade
CEN162	Arroz	3.63	12h e 84%
CEN162	Milheto	0.49	18h e 85%
CEN223	Arroz	4.14	8h e 85%
CEN223	Milheto	13.83	18h e 83%
CEN238	Arroz	10.91	15h e 85%
CEN238	Milheto	9.29	18h e 85%
CEN241	Arroz	4.90	16h e 85%
CEN241	Milheto	8.10	19h e 90%

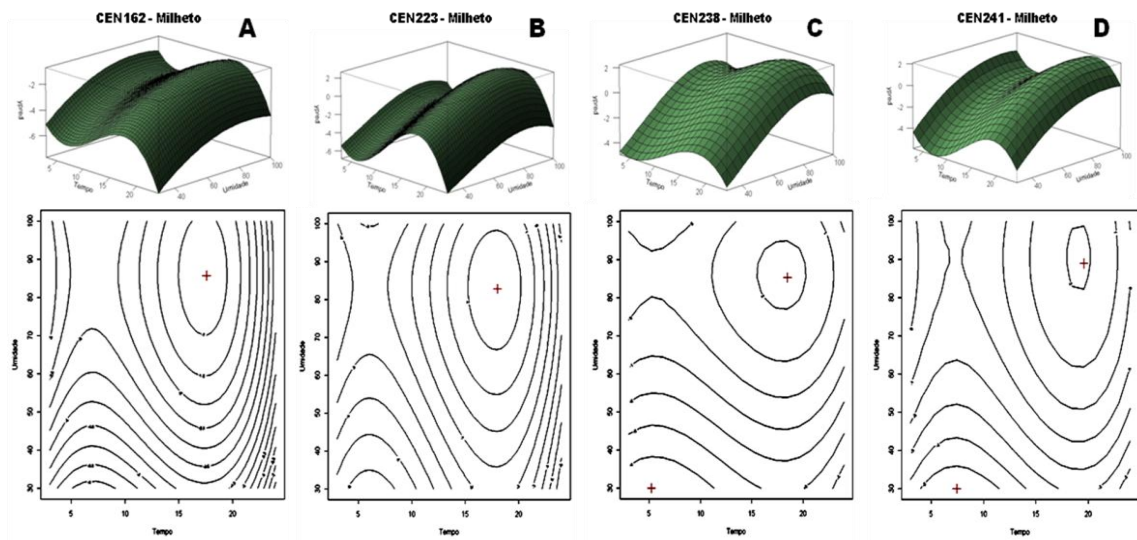
Quanto ao teor de água, diferenças significativas foram detectadas nos tratamentos com volume de água inferior a 60%. Além disso, os resultados indicaram a adição de água na proporção de 80%, com períodos de embebição superiores a 15 horas como melhores tratamentos, por apresentarem as maiores taxas de esporulação dos isolados trabalhados em ambos substratos utilizados.

Observa-se, para os diferentes isolados e tratamentos, que dentre os valores máximos esperados, o isolado CEN223 submetido ao tratamento de milho é aquele que parece ter o melhor desempenho, seguido do isolado CEN238 com arroz e milho, respectivamente. Observou-se variabilidade quanto ao tempo de embebição para esporulação máxima, porém em todos os casos, há a indicação de que níveis de umidade entre 80 e 90% sejam os mais adequados. As representações gráficas tridimensionais de número de conídios predito pelos modelos estatísticos podem ser observadas nas Figuras 1 e 2.



**Figura 1.** Superfície de resposta pelo modelo obtido para o número de esporos por mL para os isolados **A** – CEN162; **B** – CEN223; **C** – CEN238; **D** – CEN241 submetidos ao tratamento de arroz



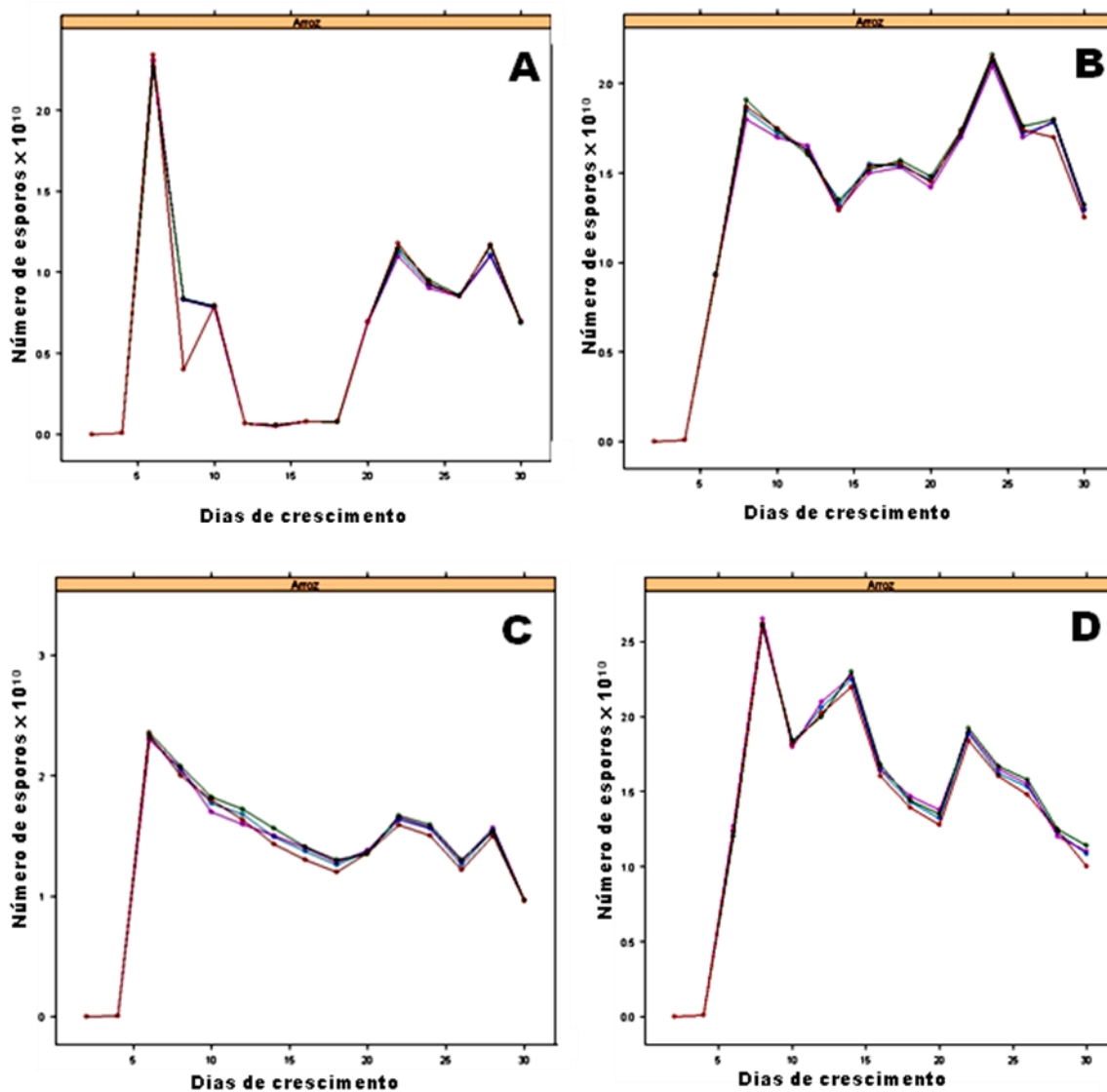


**Figura 2.** Superfície de resposta pelo modelo obtido para o número de conídios por mL para os isolados **A** – CEN162; **B** – CEN223; **C** – CEN238; **D** – CEN241 submetidos ao tratamento de milho

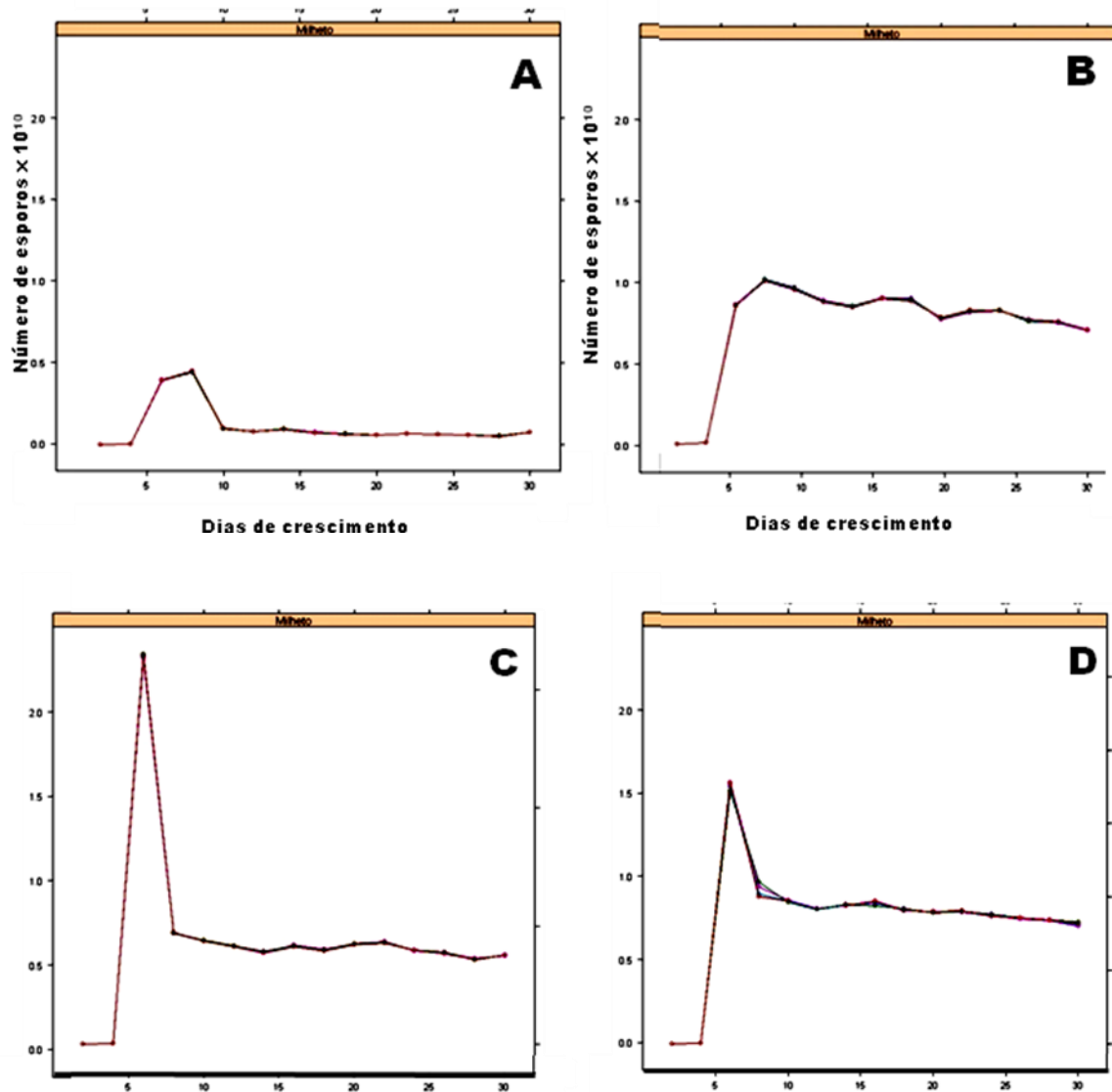
Esses resultados mostram a variabilidade dos isolados de *Trichoderma*, refletida também em termos de exigência nutricional e condições ambientais para produção de esporos. Por outro lado, disponibilidade, custo, rendimento e praticidade são requisitos importantes a serem considerados na escolha do substrato para cultivo do agente de biocontrole, especialmente quando o intuito é o desenvolvimento de biofungicida. Grãos de cereais geralmente oferecem essas vantagens, por isso são os mais utilizados (Jacson, 1997; Thangavelu et al., 2004; Fontes et al., 2007). Além disso, os grãos são prontamente biodegradáveis, facilitando as aplicações no campo e, adicionalmente, apresentam facilidade para quantificação dos propágulos produzidos. Entretanto, uma gama de substratos deve ser testada, procurando um melhor ajuste do substrato às exigências de cada isolado que se pretende desenvolver como agente de biocontrole.

**Curva de Crescimento e Produção de Esporos de *Trichoderma asperellum* (CEN162), *Trichoderma harzianum* (CEN238, CEN223 e CEN241) em Arroz parboilizado e Milheto.**

Para os dados relativos à taxa de crescimento, considerando cada combinação de isolado e substrato, procedeu-se a plotação gráfica representativa do desenvolvimento das culturas ao longo do tempo (Figuras 3 e 4).



**Figura 3.** Crescimento dos isolados **A** – CEN162; **B** – CEN223; **C** – CEN238; **D** – CEN241 em arroz parboilizado.



**Figura 4.** Crescimento dos isolados **A** – CEN162; **B** – CEN223; **C** – CEN238; **D** – CEN241 em milho.

Embora, de forma geral, o comportamento dos isolados e com respeito aos substratos tenha variado consideravelmente, o período de maior desenvolvimento das culturas ocorreu entre cinco e oito dias, como observado com os isolados CEN223 e 241, em arroz parboilizado.

No substrato arroz parboilizado, o isolado CEN162 apresentou três pontos de crescimento, porém apenas do 6<sup>o</sup> ao 8<sup>o</sup> dia apresentou o valor predito máximo; CEN223 com dois pontos de esporulação no 8<sup>o</sup> e no 21<sup>o</sup>, sendo o segundo com taxa superior; CEN238 com valor máximo no 8<sup>o</sup> dia

decrecendo gradativamente até o 30º e CEN241 apresentou três pontos de crescimento, porém apenas 8º dia apresentou o valor predito máximo.

No milho, os isolados CEN162 um único ponto de esporulação entre o 5º e o 7º dia seguido de forte queda; CEN223 valor máximo no 6º dia mantendo mesma taxa até o 30º dia; CEN238 mesmo padrão do CEN162 porém com maior taxa de esporulação e CEN241 produziu um valor predito máximo no 6º dia com um queda e mantendo-se na mesma taxa de esporulação até o 30º dia.

## CONCLUSÕES

1. Substrato, seu teor de umidade e tempo de embebição são fatores importantes na produção de esporos dos isolados dos *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma harzianum* estudados.
2. Arroz parboilizado apresenta maior produção de esporo para *T. asperellum* e milho para *T. harzianum*.
3. A melhor condição para obter o maior número de esporos e com 80% de umidade e embebição superior a 16 horas.
4. Cada isolado apresenta diferentes picos de esporulação ao longo do tempo de cultivo.
5. Ambos os isolados, nas condições em que os experimentos foram conduzidos, podem oferecer mais de uma extração em um único cultivo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ADEKUNLE AT, CARDWELL KF, FLORINI DA, IKOTUN T. 2001. Seed treatment with *Trichoderma* species for control of damping-off of cowpea caused by *Macrophomina phaseolina*. **Biocontrol Sci. Technol.** 11:449–457.
- BENÍTEZ T, RINCÓN AM, LIMÓN MC, CODÓN AC. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, 7:249-260.
- COOK RJ, BAKER KF. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. **The American Phytopathological Society**. Minnesota. U.S.A. p.533.
- DENNIS C, WEBSTER J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotic. **Transactions British Mycological Society**. 57:25-39.
- JACK A, LEWIS JA, PAPAIVIZAS GC. 1991. Biocontrol of plant diseases: the approach for tomorrow. **Crop Protection** 10:95-105.
- JACKSON MA. 1997. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 19:180-187.
- LUMSDEN RD, LEWIS JA. 1989. Selection, production, formulation and commercial use of plant disease biocontrol fungi for improving plant growth. *In*: WHIPPS JM, LUMSDEN RD. (Eds.), **Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth**. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 171– 190.
- PAPAIVIZAS GC. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol. **Annual Review Phytopathological**, 23:23-54.

REIS EM, FORCELINI CA, REIS AC. 2001. **Manual de Fungicidas: Guia para o controle químico de doenças de plantas.** 4ª ed, Editora Insular, Florianópolis, SC, 16-17.

SCHIPPER B, LUGTENBERG B, WEISBEEK PJ. 1987. Plant growth control by fluorescent pseudomonas. **Innovative Approaches to Plant Disease Control.** Editora I Chet Wiley e Sons, New York, NY. 19-39.

SIVAN A, CHET I. 1992. *Environmental Microbiology: Microbial control of plant diseases.* Editora Wiley-Liss, New York, NY. 335-354.

THANGAVELU R, PALANISWAMI A, VELAZHAHAN R. 2004. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing fusarium wilt of banana. **Agriculture, Ecosystems and Environment,** 103:259–263.

TIGANO MS, MELLO SCM. 2006. Fungos agentes de controle biológico. *In:* OLIVEIRA FILHO EC, MONNERAT RG. (Eds). **Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas.** Planaltina (DF), Embrapa Cerrados. p.157-174.