



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

**POTENCIAL DE *TRICHODERMA* SPP. NO BIOCONTROLE  
DE DOENÇAS DO TOMATEIRO**

**SANDRO COELHO LINHARES MONTALVÃO**

**BRASÍLIA / DF**

**2012**

**SANDRO COELHO LINHARES MONTALVÃO**

**POTENCIAL DE *TRICHODERMA* SPP. NO BIOCONTROLE DE DOENÇAS  
DO TOMATEIRO**

Dissertação apresentada à  
Universidade de Brasília como  
requisito parcial para a obtenção  
do título de Mestre em  
Fitopatologia pelo Programa de  
Pós Graduação em Fitopatologia

**Orientador**

Prof. Dra. Sueli Corrêa Marques de Mello, Pesquisadora da  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN).

**BRASÍLIA  
DISTRITO FEDERAL – BRASIL**

**2012**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Montalvão, Sandro Coelho Linhares.

Potencial de *Trichoderma* spp. no biocontrole de doenças do tomateiro. Sandro Coelho Linhares Montalvão.

Brasília, 2012.

105 p : il.

Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1. *Sclerotinia sclerotiorum* – *Sclerotium rolfsii*.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Título.

*Dedicatória*

*“...Dedico este trabalho aos meus queridos pais,  
Ednir Coelho Linhares Montalvão e Hélio  
Santos Montalvão, pelos ensinamentos e apoio...”*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ser meu guia nessa jornada, dando-me coragem para lutar e persistência nessa caminhada. Muito obrigado Senhor pela saúde e pelas oportunidades a mim concebidas.

A Professora Dr. Suelí Corrêa Marques de Mello, minha orientadora, pelos conhecimentos passados e confiança que foram fundamentais no cumprimento desta jornada.

A secretaria do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia.

Ao CNPq e a Capes pelo auxílio financeiro.

A Dra. Joseane Padilha da Silva pelo grande apoio e ajuda nas análises dos experimentos realizados na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Aos M.sc. Irene Martins e José Eustáquio pela amizade, colaboração, companheirismo e mensagens de otimismo.

Ao Dr. João Batista Tavares pela cooperação e sugestões durante o desenvolvimento da pesquisa.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Fitopatologia do CENARGEN – Débora, Jacqueline, Laura, Luisa, Mágnio, Marcela, Suelem, Tainá, Vanessa e Wiliam pelo carinho, companheirismo, ajuda e incentivo.

Ao Curso de Pós-graduação em Fitopatologia da Universidade de Brasília pela oportunidade.

Meu muito obrigado também aos professores do Dep. de Fitopatologia: Alice, Blum, Café, Carlos Inácio, Cleber, Denise, Dianese, Helson, Juvenil, Lúcio José, Marisa, Renato, Rita, Sueli e Uesugi.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela oportunidade e espaço, onde comecei e desenvolvi meu trabalho de pesquisa.

Aos meus irmãos: Márcia Coelho Linhares Montalvão, Rita Lina de Jesus e Paulo Ricardo de Souza.

Aos amigos Wiliam Rosa, Eugênio Miranda e, em especial, ao meu mais novo irmão Marcelo Tavares de Castro que sempre estiveram presentes e dispostos a me ajudar.

Aos meus colegas de Mestrado da Tuma 2010.1: Ana Cristina, Bruno, Eugênio, Fernanda, Joelma, Kamila, Mariana, Marcelo, Marcilene e Wiliam.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da **Professora Sueli Corrêa Marques de Mello**, com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**POTENCIAL DE *TRICHODERMA* SPP. NO BIOCONTROLE DE DOENÇAS  
DO TOMATEIRO**

**SANDRO COELHO LINHARES MONTALVÃO**

DISSERTAÇÃO APROVADA em \_\_/\_\_/\_\_\_\_ por:

---

Prof. Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum  
Universidade de Brasília (UnB)  
(Membro da Banca/Examinador Interno)

---

Prof. Dr. Carlos Hidemi Uesugi  
Universidade de Brasília (UnB)  
(Membro da Banca/Examinador Interno)

---

Prof. Dra. Sueli Corrêa Marques de Mello  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN)  
(Orientadora/Presidente da Banca)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL  
BRASIL  
**2012**

## SUMÁRIO

|  | Página |
|--|--------|
| LISTA DE FIGURAS.....  | xi     |
| LISTA DE TABELAS .....   | xiii   |
| RESUMO .....   | xvi    |
| ABSTRACT .....   | xviii  |
| INTRODUÇÃO .....   | 1      |
| REVISÃO DE LITERATURA .....  | 3      |
| Tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.).....  | 3      |
| Mofa-branco – <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary .....   | 4      |
| Prodridão de Sclerótio ( <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc.).....   | 6      |
| Controle Biológico .....   | 7      |
| O gênero <i>Trichoderma</i> .....  | 9      |
| Uso do <i>Trichoderma</i> na cultura do tomate.....  | 15     |
| MATERIAL E MÉTODOS.....  | 17     |
| Isolados do patógeno e do antagonista.....   | 17     |
| Isolamento de <i>Trichoderma</i> spp. a partir de amostras do solo e preservação dos isolados obtidos..... | 18     |
| Teste de patogenicidade e reisolamento do patógeno.....  | 22     |

|   |           |
|---|-----------|
| Avaliação do antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. contra os patógenos <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i> em cultivo pareado.....             | 24        |
| Interação <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i> e <i>Trichoderma</i> spp. ao microscopia eletrônica de varredura .....                            | 25        |
| Avaliação do efeito inibidor de metabólitos voláteis produzidos por <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i> .....     | 26        |
| Avaliação do efeito inibidor de metabólitos não-voláteis produzidos por <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i> ..... | 28        |
| Efeito de <i>Trichoderma</i> spp. na germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de tomate .....  | 29        |
| Promoção de crescimento de plantas de tomate em casa de vegetação .....   | 30        |
| Avaliação dos isolados de <i>Trichoderma</i> quanto à rizocompetência em plantas de tomate em casa de vegetação .....   | 31        |
| Avaliação da supressão do tombamento em plantas de tomate por isolados de <i>Trichoderma</i> contra <i>Sclerotium rolfsii</i> em casa de vegetação .....                | 32        |
| Caracterização molecular dos isolados de <i>Trichoderma</i> .....   | 34        |
| Extração de DNA genômico .....  | 34        |
| Amplificação por PCR e sequenciamento.....  | 35        |
| Método da validação da Silhueta .....   | 36        |
| <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>   | <b>38</b> |

|   |    |
|---|----|
| Avaliação do antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i> em cultivo pareado .....                         | 38 |
| Interação <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i> e <i>Trichoderma</i> spp. sob microscopia eletrônica de varredura .....                           | 45 |
| Avaliação do efeito inibidor de metabólitos voláteis produzidos por <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i> .....     | 49 |
| Avaliação do efeito inibidor de metabólitos não-voláteis produzidos por <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i> ..... | 54 |
| Efeito de <i>Trichoderma</i> spp. na germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de tomate .....  | 68 |
| Comprimento da raiz, hipocótilo e número de plantas com lesão .....   | 74 |
| Comprimento da raiz .....   | 75 |
| Comprimento do hipocótilo.....  | 77 |
| Número de plântulas com lesões.....   | 80 |
| Promoção de crescimento em tomate.....  | 83 |
| Avaliação dos isolados de <i>Trichoderma</i> quanto a rizocompetência em plântulas de tomate em casa de vegetação.....  | 89 |
| Avaliação da supressão do tombamento de plantas de tomate por isolados de <i>Trichoderma</i> contra <i>Sclerotium rolfsii</i> em casa de vegetação .....                | 91 |
| Caracterização molecular dos isolados de <i>Trichoderma</i> .....   | 93 |

**CONCLUSÕES .....94**

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....96**

## LISTA DE FIGURAS

|  | Página |
|--|--------|
| Figura 1- Campo e estufa CNPH com plantio de tomate.....   | 19     |
| Figura 2- Isolamento de fungos do solo .....   | 20     |
| Figura 3- Testes de Patogenicidade.....  | 23     |
| Figura 4- Representação da escala de notas proposta por Bell <i>et al.</i> (1982).....   | 25     |
| Figura 5- Vista geral do ensaio metabólitos voláteis. ....   | 28     |
| Figura 6- Pareamento de culturas com <i>Trichoderma</i> e <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....  | 43     |
| Figura 7- Pareamento de colônias de <i>Trichoderma</i> sp. e <i>Sclerotium rolfsii</i> .....   | 43     |
| Figura 8- Enrolamento de hifas do isolado CEN169 em hifas do CEN217 .....  | 44     |
| Figura 9- Enrolamento de hifas do isolado CEN169 contra CEN216.....  | 44     |
| Figura 10- Imagens de MEV .....  | 47     |
| Figura 11- Imagens de MEV .....  | 48     |
| Figura 12- Ensaio metabólitos voláteis .....   | 54     |
| Figura 13- Ensaio metabólitos não-voláteis <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....   | 57     |
| Figura 14- Resultados estudos de pareado de hifas, produção de metabólitos voláteis e não-voláteis por <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ..... | 60     |
| Figura 15- Atividade de metabólitos não-voláteis produzidos por <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Sclerotium rolfsii</i> .....   | 63     |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 16- Inibição de <i>Sclerotium rolfsii</i> por isolados de <i>Trichoderma</i> em testes de pareado de culturas e produção de metabólitos voláteis e não-voláteis .....</b>   | <b>67</b> |
| <b>Figura 17- Relação entre a germinação de sementes de tomate tratadas com <i>Trichoderma</i> spp. e o tempo em dias, segundo o modelo não linear de Gompertz .....</b>  | <b>73</b> |
| <b>Figura 18- Placas gerbox em incubadora com ensaio de germinação .....</b>  | <b>74</b> |
| <b>Figura 19- Agrupamento de isolados quanto ao comprimento da raiz, hipocótilo e número de plantas com lesão induzidas através do tratamento de sementes de tomate com o antagonista, baseado no método do comprimento médio da silhueta .....</b> | <b>75</b> |
| <b>Figura 20- Sementes de tomate germinadas, apresentando tegumento colonizado por <i>Trichoderma</i> spp. ....</b>   | <b>82</b> |
| <b>Figura 21- Comparação entre plantas testemunhas e plantas tratadas com <i>Trichoderma</i> spp. ....</b>  | <b>88</b> |

## LISTA DE TABELAS

|   | Página |
|---|--------|
| Tabela 1- Isolados de <i>Trichoderma</i> obtidos de solo rizosférico de tomateiro .....   | 20     |
| Tabela 2- Isolados de <i>Trichoderma</i> selecionados da Coleção de Fungos para Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas, utilizados neste trabalho .....   | 21     |
| Tabela 3- Agrupamento de isolados de <i>Trichoderma</i> quanto a inibição do crescimento do patógeno <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , baseado no método do comprimento médio da Silhueta .....   | 38     |
| Tabela 4- Agrupamento de isolados de <i>Trichoderma</i> quanto à inibição do crescimento do patógeno <i>Sclerotium rolfii</i> , baseado no método do comprimento médio da Silhueta .....  | 40     |
| Tabela 5- Agrupamento de isolados de <i>Trichoderma</i> quanto a produção de metabólitos voláteis em termos de porcentagem de inibição do crescimento do patógeno <i>Sclerotium rolfii</i> (CEN216), baseado no método do comprimento médio da Silhueta.. ..... | 50     |
| Tabela 6- Inibição do crescimento micelial de <i>Sclerotium rolfii</i> (CEN216) por isolados de <i>Trichoderma</i> .....  | 52     |
| Tabela 7- Agrupamento de isolados de <i>Trichoderma</i> quanto à inibição do crescimento do patógeno <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (CEN217) por metabólitos não-voláteis, baseado no método do comprimento médio da Silhueta .....                            | 55     |
| Tabela 8- Porcentagem de inibição de colônias de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (CEN217) para cada um dos isolados de <i>Trichoderma</i> testados .....  | 57     |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabela 9- Agrupamento de isolados de <i>Trichoderma</i> quanto à metabólitos não-voláteis em termos de inibição do crescimento do patógeno <i>Sclerotium rolfii</i> como sugerido pelo método do comprimento médio da Silhueta .....</b> | <b>61</b> |
| <b>Tabela 10- Porcentagem de inibição de colônias de <i>Sclerotium rolfii</i> (CEN216) para cada um dos isolados de <i>Trichoderma</i> testados .....</b>   | <b>64</b> |
| <b>Tabela 11-Numero médio de sementes de tomate germinadas após tratamento com <i>Trichoderma</i> spp. ao longo do tempo (dias) de incubação.....</b>   | <b>69</b> |
| <b>Tabela 12- Agrupamento de isolados de <i>Trichoderma</i> com base no teste de germinação, baseado no método do comprimento médio da Silhueta .....</b>   | <b>70</b> |
| <b>Tabela 13- Agrupamento de isolados de <i>Trichoderma</i> quanto ao comprimento da raiz, na germinação de sementes de tomate tratadas com o antagonista, baseado no método do comprimento médio da Silhueta .....</b>                     | <b>75</b> |
| <b>Tabela 14- Agrupamento de isolados de <i>Trichoderma</i> quanto ao comprimento do hipocótilo de plântulas de tomate, oriundas de sementes tratadas com o antagonista, baseado no método do comprimento médio da Silhueta .....</b>       | <b>78</b> |
| <b>Tabela 15- Agrupamento de isolados de <i>Trichoderma</i> quanto ao número de plântulas de tomate com lesão, resultantes do tratamento de sementes com antagonista, baseado no método do comprimento médio da Silhueta .....</b>          | <b>80</b> |
| <b>Tabela 16- Agrupamento dos isolados de <i>Trichoderma</i> quanto ao comprimento de raízes de plântulas de tomate, resultantes de sementes tratadas com o antagonista, com base no método do comprimento médio da Silhueta .....</b>      | <b>83</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabela 17- Agrupamento dos isolados de <i>Trichoderma</i> quanto ao comprimento da parte aérea de plântulas de tomate, resultantes do tratamento de sementes com o antagonista, com base no método do comprimento médio da Silhueta .....</b> | <b>84</b> |
| <b>Tabela 18- Agrupamento dos isolados de <i>Trichoderma</i> quanto ao peso seco da raiz de plântulas de tomate, sob influência do tratamento das sementes com o antagonista, com base no método do comprimento médio da Silhueta .....</b>      | <b>86</b> |
| <b>Tabela 19- Número estimado de conídios de <i>Trichoderma</i> spp. por grama de raiz de tomate em ensaio de rizocompetência .....</b>  | <b>89</b> |
| <b>Tabela 20- Comparação dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. quanto a rizocompetência, número de conídios por grama de raiz aos 20 dias após inoculação em tomateiro, baseado no método do comprimento médio da Silhueta .....</b>           | <b>91</b> |
| <b>Tabela 21- Avaliação dos isolados de <i>Trichoderma</i> quanto ao controle de tombamento de plântulas de tomate (cinco plantas a cada unidade experimental), baseado no método do comprimento médio da Silhueta .....</b>                     | <b>92</b> |

## RESUMO

MONTALVÃO, Sandro Coelho Linhares. **Potencial de *Trichoderma* spp. no biocontrole de doenças do tomateiro.** 2012. Número de páginas (105 p). Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia do Prédio de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) com os seguintes objetivos: (a) isolar e selecionar isolados de *Trichoderma* antagônicos aos patógenos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* e como promotores de crescimento de plantas de tomate e (b) verificar a existência de efeitos negativos na germinação de sementes microbiolizadas com os isolados estudados. Foram utilizados 21 isolados de *Trichoderma* previamente selecionados, além de outros 13 obtidos de rizosfera de tomateiro para a microbiolização das sementes, sem pré-tratamento com fungicidas. Vários isolados apresentaram capacidade de supressão do crescimento das colônias dos patógenos estudados, nos estudos conduzidos *in vitro*, utilizando os métodos de pareamento de culturas e produção de metabólitos voláteis e não-voláteis. Promoção de crescimento de plantas foi observada com 20 isolados. Nos testes de germinação de sementes de tomate microbiolizadas com *Trichoderma* spp., em alguns casos, observou-se a presença de lesões cotiledonares das plântulas, porém sem interferência no número e vigor de plantas germinadas. Para o controle do tombamento de plântulas em casa de vegetação, três isolados foram eficientes, sendo eles CEN281, CEN1070 e CEN1080. Marcadores moleculares foram utilizados para identificação em nível específico, de 19 dos 34 isolados e os outros 15 estão em fase de sequenciamento.

**Palavras-chave:** Controle biológico, fungo antagonista, mofo-branco, podridão de sclerotium, *Lycopersicon esculentum*.

---

Orientador – Suely Corrêa Marques de Mello – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## ABSTRACT

MONTALVÃO, Sandro Coelho Linhares. **Potential of *Trichoderma* spp. on biocontrol of tomato diseases.** 2012. (105 p). Dissertation (Master in Plant Pathology – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

This work was conducted at the Laboratory of Phytopathology in Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) with the following objectives: (a) isolate and select strains of *Trichoderma* against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium rolfsii*, and; (b) evaluate the potential to induce growth promotion of tomato plants and verify the existence of negative effects on seed germination with the isolates studied. There were used twenty one strains of *Trichoderma* previously selected, and another thirteen obtained from the tomato rhizosphere to microbiolization seeds without pre-treatment with fungicides. Several isolates were capable of suppressing the growth of colonies of the pathogens *in vitro*, using the methods of the culture pairing and production of volatile and non-volatile metabolites. A promotion of plant growth was induced by twenty *Trichoderma* strains. In some cases, was observed the presence of cotyledon lesions in the seedlings, in seeds with *Trichoderma*, but without interfering with the number and vigor of germinated seeds. For the control of damping off of seedlings in the greenhouse, three strains were efficient, CEN281, CEN1070 and CEN1080. Molecular markers were used for identification nineteen species, and the identification of the other fifteen are in process.

**Keywords:** Biological control, antagonistic fungus, white mold, southern blight, *Lycopersicon esculentum*.

---

Guidance Committee: Sueli Corrêa Marques de Mello - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
(Advisor).

## INTRODUÇÃO

O tomateiro, *Lycopersicon esculentum* Mill., é uma das hortaliças mais importantes, do ponto de vista econômico e social, pelo volume de produção e geração de empregos (Makishima & Melo, 2005). No mundo, aproximadamente 4,4 milhões de hectares são cultivados com tomate, gerando uma produção de cerca de 152,9 milhões de toneladas. O Brasil ocupa o nono lugar como produtor mundial dessa olerícola, com aproximadamente 70% da produção total destinados ao mercado para consumo *in natura*; o restante é utilizado como matéria prima para industrialização (Anater, 2011). Porém, suprir o mercado com essa matéria-prima não é tarefa fácil, haja vista que plantas de tomate estão sujeitas ao ataque de vários patógenos de solo, causadores de doenças graves, como as podridões de raízes e os tombamentos de plântulas (Makishima & Melo, 2005). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary e *Sclerotium rolfsii* Sacc. são alguns dos fungos apontados como danosos a essa cultura, cujo controle é difícil e baseia-se principalmente no uso de produtos químicos que, de um modo geral, são pouco eficientes (Barbosa *et al.*, 2010; Ethur *et al.*, 2001). Em contrapartida, o uso exagerado desses produtos pode acarretar efeitos negativos como deterioração da saúde de consumidores e trabalhadores rurais, poluição ambiental e, ainda, o desenvolvimento de resistência do patógeno aos princípios ativos, o que acarreta cada vez mais aumento de doses aplicadas e, conseqüentemente, maiores riscos de efeitos indesejáveis ao homem e ao meio ambiente (Lima *et al.*, 2000; Rakh *et al.*, 2011).

Na busca de solução para esses problemas, o emprego de técnicas alternativas como o controle biológico desponta-se como importante ferramenta no controle de doenças de plantas. Graças à atenção que vem sendo dada a essa linha de pesquisa, diversos microrganismos vem sendo avaliados como agentes de biocontrole para as doenças agrícolas (Punja & Utkhede, 2003). Neste cenário, fungos do gênero *Trichoderma* Persoon têm

destacada importância pela sua diversidade e capacidade de adaptação aos diversos ambientes, além de possuírem diferentes mecanismos de ação (Kubicek & Harman, 1998).

Segundo Handelsman & Stabb (1996), a adoção do controle biológico como alternativa no controle de pragas é dificultado pela complexidade da interação entre planta, patógeno e antagonista, visto que há uma grande variação nos resultados práticos obtidos e o progresso no entendimento dessas interações ainda é lento.

Face ao expostos, é notória a necessidade de um controle eficaz de patógenos de solo e veiculados pelas sementes na cultura do tomate. Assim, esse trabalho teve como objetivo principal isolar, selecionar e avaliar fungos do gênero *Trichoderma* contra os patógenos causadores de podridão de sclerotium e mofo-branco *in vitro*, promoção do crescimento da hospedeira e interferência desses isolados na germinação das sementes, visando ao uso dos mesmos em tratamento de semente e no controle da doença.

## REVISÃO DE LITERATURA

### **Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**

O tomateiro, pertencente à Classe Dicotyledoneae, Ordem Tubiflorae, Família Solanaceae, Gênero *Lycopersicon* (= *Solanum*), espécie *Lycopersicon esculentum* Mill. *L. esculentum*, tal qual conhecemos hoje, teve sua origem da espécie andina *L. esculentum* var. *cerasiforme* (frutos tipo cereja), no Peru, sendo posteriormente domesticado no México e distribuído para as demais regiões do globo, até chegar ao Brasil (Figueira, 1982). Dentro do grupo das hortaliças, o tomate é uma das espécies mais importantes, tanto sob o ponto de vista econômico quanto social, pelo volume da produção e geração de empregos (Makishima & Melo, 2005). São aproximadamente 4,4 milhões de hectares cultivados com tomate no mundo, o que gera uma produção de cerca de 152,9 milhões de toneladas (Anater, 2011). É também uma espécie cosmopolita, pois é cultivada no mundo todo (Makishima & Melo, 2005). Entre os países maiores produtores estão a China, os Estados Unidos da América e a Índia (Fao, 2009, citado por Anater, 2011).

O Brasil é o nono maior produtor mundial de tomates e o primeiro maior produtor da América do Sul, com uma área plantada em 2010/2011 de 61,8 mil hectares e produção que atingiu 3,6 milhões de toneladas, o que significa uma produtividade média de 59,3 t/ha, superior à mundial aproximada de 40,7 t/ha (Anater, 2011). Embora cultivado em todos os estados em maior ou menor escala, os principais produtores brasileiros são Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Bahia e Rio de Janeiro. Da produção total, aproximadamente 70% são consumidos *in natura* e o restante utilizado como matéria prima para industrialização, transformada em estratos, pastas, molhos, sucos e outros derivados (Makishima & Melo, 2005). Porém, atingir altas produtividades com essa cultura não é tarefa fácil, visto que o

tomateiro está sujeito ao ataque de vários patógenos de solo, que são causadores de doenças graves como as podridões de raízes e o tombamento de plântulas (Barbosa *et al.*, 2010; Ethur *et al.*, 2001; Reyes *et al.*, 2002 e Thiruvudainambi *et al.*, 2010).

### **Mofobranco – *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary**

O mofobranco é uma doença, cujo agente causador é o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, habitante do solo, mundialmente distribuído e tido como um dos patógenos de plantas mais agressivos (Bolton *et al.*, 2006). Segundo Gorgen (2009), esta doença é conhecida por mais de 60 nomes e o mais comumente utilizado para sua designação é mofobranco. *Sclerotinia sclerotiorum* pertence ao Domínio Eukarya, Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Discomycetes, Ordem Helotiales, Família Sclerotiniaceae, Gênero *Sclerotinia* (Bolton *et al.*, 2006). Trata-se de microrganismo que apresenta estruturas de resistência, os esclerócios, responsáveis pela sua sobrevivência em condições adversas (Oliveira, 2007). A formação dessas estruturas é uma das características principais desse fungo. Segundo Nelson (1998), os escleródios permitem, em alguns casos, a persistência do fungo em campo por períodos superiores a 11 anos, conservando a sua capacidade patogênica. Os escleródios são constituídos de três camadas: uma camada externa grossa e melanizada que é bastante resistente e confere proteção às condições adversas do ambiente mesmo na ausência da hospedeira (Rocha, 2007); o córtex, camada fina e branca, intermediária; a medula, também branca, que ocupa todo o interior do escleródio. Esta é formada pelo aglomerado compacto de hifas dormentes do fungo. A germinação do escleródio pode ser de dois tipos: micelogênica, com a produção direta de hifas infectivas, as quais poderão colonizar a base do caule da hospedeira e, a mais importante, carpogênica, onde são formados apotécios produtores de ascos com ascósporos em seu interior. Os ascósporos, sob condições favoráveis, são ejetados e germinam, dando origem a doença. Estima-se que 30 milhões de ascósporos

podem ser produzidos em um único apotécio e que um escleródio pode dar origem a até seis apotécios. Fatores climáticos, como alta umidade e temperaturas amenas favorecem a produção de ascomas. Para que haja infecção, o ascósporo deve germinar primeiramente em tecidos senescentes e mortos (principalmente flores senescentes). Nessa fase, o fungo é saprófito e só posteriormente infecta a hospedeira. Mas, existe também a probabilidade dessa infecção iniciar-se antes mesmo do florescimento, a partir da germinação micelogênica e contato direto com a planta, causando injúrias em tecidos do caule da hospedeira (Davis, 1999).

O fungo é patogênico a 48 famílias, 278 gêneros e 408 espécies de plantas (Boland & Rall, 1994), dentre elas várias ervas daninhas tais como corda-de-viola (*Ipomoea nil* L. Roth), picão-preto (*Bidens pilosa* L.), caruru (*Amaranthus deflexus*), erva-quente (*Borreria alata* Aubl.), guanxuma (*Sida rhombifolia* L.), amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.), fazendeiro (*Galinsoga parviflora* Cav.) e maria-mole (*Senecio brasiliensis* Less.) (Homechin, 1982). Também nessa lista de hospedeiras encontram-se várias espécies que possuem importância econômica como é o caso da batata, alface, ervilha, soja, feijão, repolho, chicória, cenoura, tomate, etc. (Pavan *et al.*, 2005).

Na cultura do tomate, *S. sclerotiorum* causa a podridão de sclerotinia, considerada grave quando o plantio é realizado em áreas contaminadas e sob condições de temperatura amena e umidade elevada (Kimati *et al.*, 2005). Segundo Gabor & Wiebe (1997), em plantas de tomate o fungo pode infectar folhas, talos, pecíolos e ocasionalmente o fruto. Inicialmente, desenvolvem-se lesões encharcadas no caule e amolecimento da área infectada; sobre as lesões, desenvolve-se o micélio branco característico, caso as condições climáticas sejam favoráveis ao fungo, ocorrendo a podridão mole progressiva dos tecidos externos, seguida pela formação de talo oco. Grandes áreas do caule adquirem uma coloração marrom-clara,

secam e, finalmente, morrem com o progresso da doença. Corpos pretos de frutificação com formato

irregular (os escleródios) podem ser formados tanto externamente quanto internamente ao caule e auxiliam no diagnóstico da doença. Em frutos infectados, desenvolvem-se lesões acinzentadas que rapidamente evoluem para podridão aquosa e, sobre estas, um micélio cottonoso com posterior formação de escleródios.

### **Podridão de esclerócio – *Sclerotium rolfsii* Sacc.**

O fungo causador da podridão de esclerócio, segundo Kirk (2012), pertence ao Domínio Eukarya, Reino Fungi, Filo Basidiomycota, Classe Basidiomycetes, Ordem Agaricales, Família Typhulaceae e possui fase perfeita no gênero *Athelia* e fase imperfeita no gênero *Sclerotium*.

*Sclerotium rolfsii* infecta plantas cultivadas e silvestres, apresentando extensa gama de hospedeiros (cerca de 500 espécies botânicas), entre as dicotiledôneas e as monocotiledôneas. Nessa gama de hospedeiros encontram-se inúmeras espécies cultivadas além do tomate, como pimentão, cenoura, feijão e outras (Bedendo, 1995). A doença distribui-se por todas as regiões agrícolas, com predominância nas zonas tropical e subtropical, onde predominam condições de alta umidade e temperatura elevada, já que este fungo tem o seu desenvolvimento ótimo na faixa de 27-30 °C (Aycocck, 1966; Punja, 1985). Para o tomateiro, os sintomas da doença verificados no campo, segundo Gabor & Wiebe (1997), variam de tombamento de plântulas até podridões do colo, raiz e fruto. Os primeiros sintomas são caracterizados pelo aparecimento de lesão marrom-escuro abaixo ou ao nível da linha do solo e, quando o tecido do caule é invadido completamente, há o tombamento e morte rápida das plântulas. Em plantas mais velhas, a lesão chega a circundar o caule, provocando murcha, contudo sem alterações na coloração das folhas. Com o progresso da doença, verifica-se a podridão das

raízes a alguns centímetros abaixo do solo, podendo estender-se a alguns centímetros acima deste (podridão do colo). Se as condições climáticas forem favoráveis à doença, podem-se verificar os sinais do patógeno caracterizados pela formação do micélio esbranquiçado, com aspecto cotonoso, seguido da produção rápida de escleródios bronzeados, com 1 a 2 mm de diâmetro. Frutos também podem ser infectados pelo fungo causando lesões amareladas e profundas, com o conseqüente rompimento da epiderme e desenvolvimento de micélio cotonoso, juntamente com grande produção de escleródios sobre a superfície lesionada. Segundo Punja (1985), entre os métodos empregados no controle do *S. rolfsii* destacam-se as aplicações de fungicidas químicos, solarização, uso de microrganismos antagonistas, aração profunda, rotação de culturas com incorporação dos resíduos orgânicos e inorgânicos.

### **Controle Biológico**

Produtos vegetais frescos ou processados constituem uma das bases da alimentação humana. Tais alimentos são produzidos, na maioria das vezes, com a adoção de métodos de produção convencionais, orgânicos ou até mesmo sob intenso manejo em condições ambientais controladas em casas de vegetação. Apesar de todo esse cuidado, as culturas não são poupadas de ataques por fitopatógenos que afetam os mais diversos órgãos das plantas, desde raízes até os frutos (Punja & Utkhede, 2003). Para manejo das pragas e patógenos, a agricultura está estruturada basicamente no uso de agrotóxicos que, de um modo geral, são bastante eficientes. Entretanto, o uso exagerado desses produtos pode acarretar efeitos colaterais negativos como deterioração da saúde dos trabalhadores rurais e dos consumidores (Lima *et al.*, 2000), poluição ambiental e até mesmo o desenvolvimento de resistência dos patógenos aos princípios ativos (Rakh *et al.*, 2011).

Com os avanços tecnológicos e a globalização, as informações tornam-se cada vez mais dinâmicas e os conhecimentos são difundidos rapidamente em todo o mundo. Esse fato

tem levado à conscientização da sociedade para as conseqüências de certos procedimentos para a saúde e para o meio ambiente. Em meio a todas essas mudanças, os produtores rurais enfrentam o desafio de produzir mais e com maior qualidade, alimentos livres de resíduos tóxicos. Todos esses fatores, por outro lado, pressionam os governos para adoção de políticas públicas que promovam a segurança alimentar (Gullino & Kuijpers, 1994; Ragsdale & Sisler, 1994). Assim uma das formas viáveis para resolver esse impasse é a busca de insumos agrícolas não poluentes. Nesse contexto, o controle biológico (CB) tem sido apontado como um método seguro para o manejo das doenças das plantas cultivadas (Punja & Utkhede, 2003).

Segundo Baker & Cook, (1974) o Controle Biológico de doenças de plantas teve início como ciência em 1926, com estudos sobre *Streptomyces scabies*, agente causal da sarna comum da batata. Ainda, de acordo com esses autores, no ano de 1931 foi utilizado pela primeira vez o termo “controle biológico” em um artigo sobre *Gaeumannomyces graminis* agente causal da doença conhecida como mal-do-pé do trigo.

O controle biológico é resultado da interação tríplice patógeno, planta hospedeira e agente antagonista, sob a influência do ambiente (Baker & Cook, 1974). Segundo Bettiol & Ghini (1995), modificações ambientais provocadas no sítio de infecção podem resultar em limitações para as atividades do patógeno ou induzir a resistência no hospedeiro. Nessas modificações estão envolvidas práticas culturais capazes de promover condições favoráveis ao desenvolvimento do antagonista em detrimento do patógeno ou a resistência do hospedeiro.

De forma simplificada, define-se controle biológico como o uso de um microrganismo para controle de outro, podendo o agente apresentar efeito biocida, causando a morte do alvo, ou biostático, inibindo seu desenvolvimento (Zambolim, 2010). Para outros autores, essa definição pode ser vista como redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da

doença, através da ação de um ou mais organismos. Para Junqueira & Gasparotto (1991), as atividades determinantes de doença são o crescimento, a infectividade, a agressividade, a virulência e outros atributos do patógeno ou processos que determinam a infecção, o desenvolvimento dos sintomas e a reprodução do patógeno. O CB, pela análise dessas definições, visa a manter, através de certas práticas, o equilíbrio do agrossistema, de forma que o hospedeiro em presença do patógeno não seja significativamente afetado, graças à ação antagonista dos biocontroladores. Além disso, os antagonistas podem induzir tão simplesmente a resistência da planta hospedeira ao ataque de patógenos (Agrios, 2005).

Para avaliação da capacidade do antagonista suprimir o patógeno, são necessários testes *in vitro* e *in vivo*, de forma a determinar os mecanismos inerentes aos agentes de biocontrole, bem como efeitos ecológicos que interferem no controle da doença (Lumsden & Locke, 1989). Linhagens efetivas para determinados patógenos e ambientes específicos devem ser selecionadas (Howell, 2003).

Entre os antagonistas mais utilizados contra patógenos do solo, citam-se fungos do gênero *Trichoderma*, capazes de inibir o desenvolvimento de vários patógenos por mecanismos diversos, tais como competição, parasitismo direto, produção de metabólitos secundários de efeito antibiótico e enzimas líticas (Melo, 1998). Melhoria na absorção de nutrientes, indução de resistência e promoção de crescimento de plantas (Harman, 2011) são também efeitos atribuídos aos microrganismos utilizados no controle de diversas doenças de importantes culturas do mundo (Benitez *et al.*, 1998; Steyaert *et al.*, 2003).

### **O gênero *Trichoderma***

*Trichoderma*, fase imperfeita de *Hypocrea*, pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Ascomycetes, Ordem Hypocreales, Família Hypocreaceae (Kirk, 2012). O gênero *Trichoderma* foi proposto por Persoon (1974) para fungos que possuem um

conjunto de características bem definidas, porém com espécies pouco delimitadas com base na morfologia. Por isso, atribuiu-se o termo ‘agregado de espécies’ para se referir a um grupo de fungos com características morfológicas comuns dentro do gênero (Rifai, 1969; Samuels, 1996). Na determinação do gênero, são consideradas as seguintes características: crescimento rápido, atingindo de 2 a 9 cm de diâmetro após quatro dias em meio de cultura (Esposito & Silva, 1998); colônias dispersas, flocosas, ou compactadas em tufo; tamanho e formato dos conídios variados; clamidósporos, às vezes presentes; coloração de conídios variando de verde a amarelo, ou até mesmo hialinos. Os conidióforos são bem definidos (Samuels, 1996) e os conídios formados nas extremidades de fiáldes de hifas diferenciadas. Os conídios tendem a se agregar em massas e em algumas espécies, há dependência da luz para a esporulação (Gressel & Hartmann, 1968). Fatores genéticos assexuais, como a combinação parassexual, mutação e outros processos contribuem para a variação deste gênero. Rifai (1969) propôs para este grupo de fungos uma divisão, onde se reconhecia nove espécies agregadas: *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*. De acordo com essa classificação, espécies morfológicamente indistintas poderiam coexistir, como é o caso de *T. hamatum*, *T. harzianum* etc. Uma revisão sobre essas espécies agregadas foi feita por Bisset (1991) e Gams & Bisset (1998), que chegaram à subdivisão do gênero em cinco seções: *Longibrachiatum*, *Pachybasium*, *Trichoderma*, *Saturnisporum* e *Hypocreanum*. Recentemente, métodos moleculares baseados na análise do ácido desoxirribonucléico mostram-se como ferramentas muito promissoras nos estudos de filogenia de fungos e na diferenciação de espécies, *formae speciales*, raças e isolados (Kuramae & Souza, 2002). Desse modo, a análise macromolecular baseada nos ácidos nucleicos vem sendo usada na diferenciação entre e dentro dos agregados de *Trichoderma*, onde em alguns casos é possível demonstrar a diversidade genética intraespecífica (Hermosa *et al.*, 2000).

Amplamente distribuído por todo o mundo, esse gênero de fungo ocorre em quase todos os tipos de solo e ambientes naturais, especialmente naqueles contendo matéria orgânica. Muitas espécies de *Trichoderma* são também encontradas na rizosfera de plantas. O fato das espécies de *Trichoderma* desenvolverem-se em vários substratos justifica a importância biotecnológica atribuída a esse grupo de fungos (Esposito & Silva, 1998). A introdução de *Trichoderma* spp. como agente de biocontrole foi realizada por Persoon há mais de 200 anos (Lima, 2002), porém a maioria dos trabalhos voltados para essa aplicação é relativamente recente.

Os fungos do gênero *Trichoderma* são reconhecidamente bioreguladores e antagonistas naturais de vários fitopatógenos tais como: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia* spp., entre outros. Atuam como agente de CB, diminuindo ou até mesmo eliminando a necessidade do uso de fungicidas químicos (Melo, 1991; Harman, 2000).

Várias espécies desse gênero são produtoras de celulasas e outras enzimas hidrolíticas (Kubicek, 1992). Celulasas e xilanases são utilizadas em escala industrial na fabricação de rações e papel e, recentemente, vem despertando o interesse para uso em processos de produção de biocombustíveis. Já as quitinases exercem reconhecido papel no micoparasitismo, digerindo as paredes celulares dos fungos hospedeiros (Lorito *et al.*, 1998).

Muitas espécies de *Trichoderma* são princípios ativos de biofungicidas, produzidos comercialmente, como o Tricodex<sup>®</sup>, utilizado no controle de fungos causadores do apodrecimento pós-colheita da maçã; Trichodermil<sup>®</sup>, a base de *T. harzianum*, atua sobre vários patógenos de diferentes culturas, entre os quais, *R. solani* em feijão; combinada com o *T. polysporum*, constitui o composto denominado Binab-T<sup>®</sup>, que é recomendado para o controle do apodrecimento da madeira (Ricard, 1981; Melo, 1998). Outro composto, o Gliogard<sup>®</sup> tem como agente ativo *T. virens* e é utilizado na prevenção do tombamento de

plântulas causado por espécies de *Phytilium e Rhizoctonia* (Lumsden & Locke, 1989). Uma linhagem de *T. stromaticum* foi incorporada na formulação do biofungicida do Tricovab<sup>®</sup> para o controle da vassoura-de-bruxa do cacauero desde 1996.

Portanto, é notório que fungos do gênero *Trichoderma* possuem um grande potencial em diversas áreas, tais como industrial, ambiental e agrícola. Logo, estudos que visem elucidar melhor o potencial desses fungos são de fundamental importância no intuito de otimizar os seus benefícios.

Como citado anteriormente, são diversos os mecanismos de interação entre patógeno e antagonista que dão suporte ao CB. Estes são: antibiose, competição, parasitismo, hipovirulência, predação, indução de resistência e promoção de crescimento vegetal. Entretanto, um mesmo antagonista pode atuar por vários mecanismos contra determinado patógeno, o que para o controle biológico é uma característica altamente favorável (Bettiol & Ghini, 1995, Harman, 2011).

Segundo Benítez *et al.* (2004) e Amorim *et al.* (2011), antibiose é definida como a interação entre organismos na qual indivíduos de uma população secretam metabólitos voláteis ou não-voláteis capazes de inibir ou impedir o desenvolvimento dos indivíduos de uma população de outra espécie. Esses metabólitos são usualmente denominados antibióticos. Há na literatura relatos de pelo menos 100 diferentes antibióticos, com capacidade de inibição sobre diversas espécies de fungos fitopatogênicos, secretados por *Trichoderma virens*, por exemplo, produz dois antibióticos efetivos contra patógenos de solo: gliotoxina, que inibe o crescimento de *Rhizoctonia* e de *Sclerotium*, e gliovirina, capaz de inibir *Pythium* e *Phytophthora*.

Outra forma de interação antagônica é a competição, considerada pré-requisito para qualquer agente de CB, ou seja, o agente controlador deve ser capaz de crescer de maneira mais eficiente que o patógeno no local da infecção, para que o controle seja adequado

(Amorim *et al.*, 2011). Competição, segundo Bettioli & Ghini (1995), refere-se à interação entre dois ou mais organismos empenhados numa mesma ação ou substrato, disputando recursos específicos, tais como espaço, nutrientes, água e luz. Como exemplos ilustrativos desse mecanismo, citam-se espécies de *Trichoderma* capazes de mobilizar e absorver prontamente os nutrientes à sua volta e de utilizar diferentes fontes de carbono, desse modo, multiplicando-se e colonizando rapidamente a rizosfera (Harman, 2004). Além disso, várias espécies desse gênero se caracterizam por apresentarem resistência a diferentes compostos tóxicos, tanto aqueles produzidos e liberados pelas plantas em resposta ao ataque por patógenos, quanto agrotóxicos comumente utilizados na agricultura (Chet *et al.*, 1997; Benítez *et al.*, 2004; Harman, 2006). Esse mecanismo, embora importante, é extremamente difícil de ser comprovado experimentalmente (Harman, 2000).

Parasitismo designa a relação nutricional entre dois seres vivos em que um deles, o parasita, obtém todo ou parte de seu alimento às custas do outro, o hospedeiro. Quando o hospedeiro é um fitopatógeno, o parasita é designado hiperparasita. Vários são os microrganismos com essa habilidade, mas o uso como controladores biológicos só é aceito se esse antagonista for capaz de atingir as estruturas-alvos antes que o dano seja causado à planta. Na maioria das vezes, pois, tais estruturas são produzidas depois do aparecimento do sintoma e, conseqüentemente, do dano, e isso explica o porquê das raras seleções de hiperparasitas para esse fim. Por outro lado, patógenos que habitam o solo antes da presença da hospedeira são passíveis de controle com hiperparasitas (Amorim *et al.*, 2011). Segundo Benítez *et al.* (2004), o micoparasitismo como ação direta de um fungo contra outro fungo compreende um complexo processo envolvendo eventos sequenciais, incluindo reconhecimento, ataque e a subsequente penetração, seguida de morte do hospedeiro. Chet *et al.* (1998) sugerem que esse complexo processo antagônico inicia-se com o crescimento quimiotrófico de *Trichoderma* em resposta a algum estímulo liberado da hifa do hospedeiro.

Quando o contato físico entre micoparasita e hospedeiro é estabelecido, as hifas do primeiro aderem-se por meio de estruturas especializadas denominadas ‘apressórios’ e enovelam-se ao redor das hifas do hospedeiro (Chet *et al.*, 1998). Esse contato físico é o disparador para liberação, pelo hiperparasita, de enzimas hidrolíticas degradadoras dos componentes da parede celular do hospedeiro, facilitando a penetração (Chet *et al.*, 1998). O micoparasita, então, penetra no lúmen da hifa do hospedeiro, onde assimila e metaboliza o conteúdo protoplasmático, utilizando seu aparato enzimático (Amorim *et al.*, 2011). Os fungos do gênero *Trichoderma* são considerados excelentes hiperparasitas, atacando hifas e estruturas de reprodução e sobrevivência dos patógenos de plantas, assim reduzindo a capacidade infectiva e o inóculo do patógeno para infecções subsequentes (Bettiol & Ghini, 1995).

Indução de resistência é um mecanismo de controle biológico indireto, onde a planta responde à agressão dos patógenos através da ativação dos mecanismos latentes de resistência. Esse processo ocorre quando as plantas expostas a um agente indutor, biótico ou abiótico, têm seus mecanismos de defesa ativados, não apenas no sítio de indução como também em outros locais distantes, de forma mais ou menos generalizada (Romeiro, 1999). Essa ativação pode durar períodos de tempo variáveis. Com a ativação destes a planta pode produzir fitoalexinas, lignina adicional das células e compostos fenólicos (Horsfall & Cowling, 1980; Bailey, 1985; Amorim *et al.*, 2011).

A promoção de crescimento ocasionada por microrganismos do solo ocorre devido à ação de vários fatores. Pode envolver produção de hormônios vegetais, produção de vitaminas ou conversão de materiais orgânicos e inorgânicos a uma forma útil para a planta, favorecendo a absorção e a translocação de minerais. A planta bem nutrida resiste melhor a infecções (Gravel *et al.*, 2007). Vários estudos têm demonstrado a capacidade que certos isolados de *Trichoderma* possuem em promover o crescimento de plantas. Melo (1996), demonstrou que duas linhagens mutantes de *T. koningii* antagônicas a *S. sclerotiorum* eram

eficientes produtoras de celulase, além de promoverem emergência e acúmulo de massa seca em plântulas de pepino. Este grupo de fungos também atua como bioestimulante do crescimento radicular, pois promove o desenvolvimento de raízes devido à secreção de fitohormônios, o que permite uma melhor assimilação de nutrientes e água, aumentando a resistência em situações de estresse. Também a solubilização de fosfato e, por conseguinte, disponibilização de fósforo para as plantas é um importante fator de promoção do crescimento. Fósforo é um macronutriente essencial para desenvolvimento das plantas (Gravel, 2007; Harman, 2011).

### **Uso do *Trichoderma* na cultura do tomate**

Existem vários estudos relacionando o uso de fungo do gênero *Trichoderma* no controle de doenças causadas por patógenos de solo e promoção de crescimento de plantas de tomate. Como exemplo, citam-se trabalhos desenvolvidos por Ishimura *et al.* (2008), com dois isolados de *T. harzianum*, onde obteve-se o incremento de até 57% na produtividade final das plantas de tomate. Nzanza *et al.* (2011) relataram que isolados desse grupo de fungos foram testados quanto ao sinergismo com fungos micorrízicos arbusculares. Nas plantas tratadas com essa combinação fúngica foi observado um incremento no crescimento da parte aérea e das raízes e colonização da superfície radicular (rizocompetência). Nessa mesma linha de pesquisa, Morsy *et al.* (2009) testaram *T. viride* e *Bacillus subtilis* no controle de *Fusarium solani* em tomate, com resultados satisfatórios, tanto no controle do patógeno quanto na promoção de crescimento, no aumento de produtividade e na melhoria da qualidade nutricional das plantas.

Alfano *et al.* (2006) mostrou que indução de resistência é um benefício que pode ser conseguido em plantas de tomate quando inoculadas com *T. hamatum* linhagem 382. Esses autores relataram mudanças sistêmicas induzidas nas plantas como a expressão gênica e

formação de proteínas relacionadas à patogenicidade, conferindo às plantas resistência a doenças e ao estresse ambiental, além de melhoria na qualidade nutricional.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolados do patógeno e do antagonista

Os trabalhos foram conduzidos nos Laboratório de Fitopatologia do Prédio de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN). Utilizaram-se 34 isolados de *Trichoderma*, dos quais 13 isolados (CEN1068, CEN1069, CEN1070, CEN1071, CEN1072, CEN1073, CEN1074, CEN1075, CEN1076, CEN1077, CEN1078, CEN1079 e CEN1080) foram obtidos a partir de amostras de solo coletadas em área de cultivo de tomate na Embrapa Hortaliças (CNPB) localizada em Brasília (DF). Os demais isolados - quatro identificados como *T. harzianum* (CEN126, CEN141, CEN169, e CEN201), um como *T. asperellum* (CEN162), outro como *T. pseudokoningii* (CEN209) e outro como *T. longibrachiatum* (CEN280), além de 14 isolados ainda sem designação de espécie (CEN129, CEN155, CEN161, CEN170, CEN194, CEN219, CEN223, CEN273, CEN281, CEN287, CEN288, CEN289, CEN290 e CEN316) - já se encontravam cadastrados na Coleção de Fungos para Controle de Fitopatógenos e de Plantas Daninhas da Embrapa/CENARGEN. Esses últimos 21 isolados foram selecionados com base em resultados preliminares obtidos no controle do mofo-branco (*S. sclerotiorum*) e podridão do colo do feijoeiro (*S. rolfsii*) por outros membros da equipe.

Nos ensaios de biocontrole, foram utilizados os isolados CEN217 e CEN216 de *S. sclerotiorum* e de *S. rolfsii*, respectivamente, os quais também estão sendo mantidos na Coleção, através da preservação em nitrogênio líquido.

## **Isolamento de *Trichoderma* a partir de amostras de solo e preservação dos isolados obtidos**

As coletas foram realizadas em campos de tomate (Figura 1), retirando-se solo na base das plantas, à distância aproximada de 5 cm do colo e de 0-10 cm de profundidade. As amostras, acondicionadas em sacolas plásticas, foram identificadas e armazenadas à sombra, até o transporte ao laboratório, onde foram destorroadas. Alíquotas de 10 g de cada uma delas foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 mL e adicionadas de 90 mL de solução (esterilizada) de Tween 80 0,05%. Os frascos contendo as amostras foram selados com parafilme e submetidos à agitação por 40 minutos (200 rpm), à temperatura de 25 °C ( $\pm$  2 °C). Foram então obtidas as diluições seriadas conforme Dhingra & Sinclair (1985) para plaqueamento. Cerca de 100  $\mu$ L de diluição foram espalhadas sobre a superfície do meio de Martin (1 g - Fosfato de Potássio Monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>); 0,5 g - Sulfato de Magnésio Heptahidratado (MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O); 5 g - Peptona; 10 g - Dextrose; 15 g - Agar; 0,03 g - Rosa de Bengala; 0,250 g - Chloramphenicol e Água destilada para completar 1000 mL) com o auxílio de uma alça de Drigalsky previamente flambada.

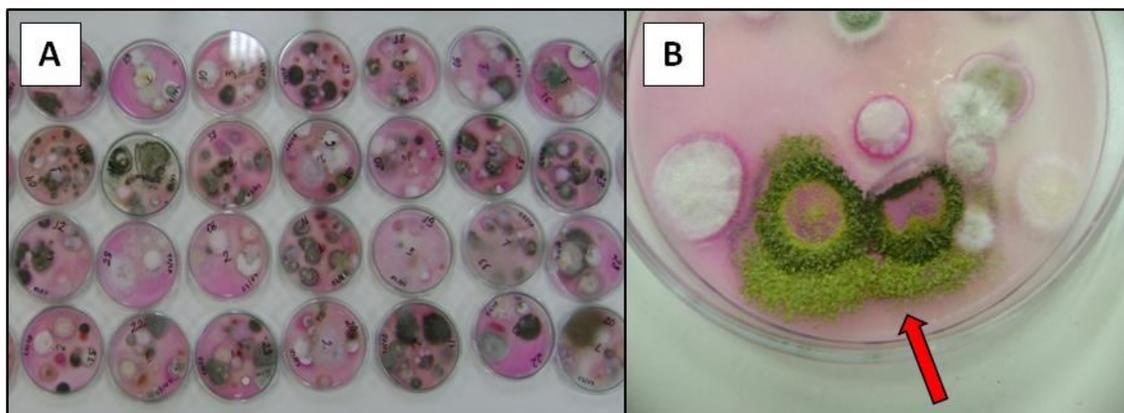
Para cada amostra de solo foram realizadas três repetições. As culturas foram mantidas em incubadora (Fanen, mod. 347) a 25 °C no escuro. Depois de dois dias de incubação, as placas foram transferidas para outra incubadora, com fotofase de 12 horas e mesma temperatura. A partir de então, as placas foram observadas diariamente e colônias típicas de *Trichoderma* (Figura 2) foram transferidas para meio Batata-Dextrose-Agar (BDA). Nesta etapa, as culturas foram mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente. Após três a sete dias de incubação, foram confeccionadas lâminas para exames das características morfológicas ao microscópio óptico e identificação do fungo em nível genérico. As colônias confirmadas como sendo de *Trichoderma* spp. foram purificadas e obtiveram-se as culturas monospóricas, as quais foram utilizadas nos trabalhos subsequentes.

Para obtenção das culturas monospóricas, retiraram-se, com o auxílio de uma haste metálica previamente flambada, pequenas alíquotas de esporos das colônias de *Trichoderma*. Essas pequenas massas de esporos foram depositadas em um tubo de ensaio contendo 10 mL de solução de Tween 80 0,05% e agitadas em vortex por aproximadamente 10 segundos. Alíquotas de 1 mL de suspensão de esporos foram depositadas em outros tubos de ensaio contendo 9 mL de solução de Tween 80 0,05% e assim sucessivamente por quatro vezes, sempre com agitação em vortex a cada diluição. Finalmente, alíquotas de 100 µL de suspensão final foram espalhadas sobre a superfície de meio Martin contido em placas de Petri. As culturas preparadas dessa forma foram incubadas por 12 horas a 25 °C ( $\pm 2$  °C), sem fotofase. As culturas puras formadas a partir de um único esporo foram transferidas individualmente para o meio BDA em tubos de ensaio e armazenadas em geladeira até o uso.

Foram obtidos das amostras coletadas, 13 isolados (Tabela 1), que somados aos 21 (Tabela 2) selecionados da coleção do CENARGEN, totalizaram 34 isolados.



**Figura 1:** **A** – Campo do CNPH com plantio de tomate e **B** – Plantio de tomate em estufa CNPH. Áreas de coleta de amostras de solo para isolamento de *Trichoderma*.



**Figura 2:** **A** – Isolamento de fungos do solo e **B** – Colônias de *Trichoderma* obtida.

**Tabela 1:** Isolados de *Trichoderma* obtidos de solo rizosférico de tomateiro.

| <b>Isolado</b><br>(nomenclatura atual) | <b>Cultura</b> | <b>Local de coleta</b> |
|--|----------------|------------------------|
| CEN1068                                | Tomate         | CNPH                   |
| CEN1069                                | Tomate         | CNPH                   |
| CEN1070                                | Tomate         | CNPH                   |
| CEN1071                                | Tomate         | CNPH                   |
| CEN1072                                | Tomate         | CNPH                   |
| CEN1073                                | Tomate         | CNPH                   |
| CEN1074                                | Tomate         | CNPH                   |
| CEN1075                                | Tomate         | CNPH                   |
| CEN1076                                | Tomate         | CNPH                   |

|         |        |      |
|---------|--------|------|
| CEN1077 | Tomate | CNPH |
| CEN1078 | Tomate | CNPH |
| CEN1079 | Tomate | CNPH |
| CEN1080 | Tomate | CNPH |

**Tabela 2:** Isolados de *Trichoderma* selecionados da coleção de Fungos para Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas, utilizados neste trabalho.

| <b>Isolado</b> | <b>Espécie</b>       | <b>Cultura</b>   | <b>Local de coleta</b> |
|----------------|----------------------|------------------|------------------------|
| CEN126         | <i>T. harzianum</i>  | Cacaueiro        | ----                   |
| CEN129         | <i>T. harzianum</i>  | Cacaueiro        | ----                   |
| CEN141         | <i>T. harzianum</i>  | Soja             | Orizona-GO             |
| CEN155         | <i>T. harzianum</i>  | Milho            | Orizona-GO             |
| CEN161         | <i>T. asperellum</i> | Arroz            | Goianira-GO            |
| CEN162         | <i>T. asperellum</i> | Arroz            | Goianira-GO            |
| CEN169         | <i>T. harzianum</i>  | Sorgo forrageiro | Rio Verde-GO           |
| CEN170         | <i>T. harzianum</i>  | Milho            | Rio Verde-GO           |
| CEN194         | <i>T. harzianum</i>  | ----             | ----                   |

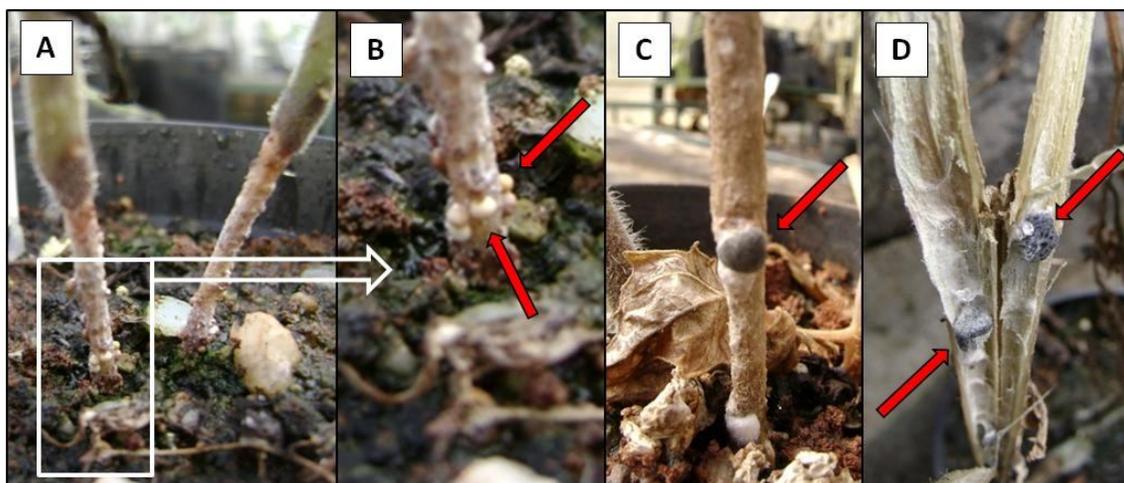
|        |                           |              |                     |
|--------|---------------------------|--------------|---------------------|
| CEN201 | <i>T. harzianum</i>       | Vochysiaceae | Goiatins/Itacar-MT |
| CEN209 | <i>T. pseudokoningii</i>  | Copafera    | Planaltina-DF       |
| CEN219 |                           | ----         | ----                |
| CEN223 | <i>T. harzianum</i>       | Algodo      | ----                |
| CEN273 |                           | Algodo      | Rio Preto-DF        |
| CEN280 | <i>T. longibrachiatum</i> | ----         | ----                |
| CEN281 | <i>T. harzianum</i>       | Algodão      | Rio Preto-DF        |
| CEN287 | <i>T. harzianum</i>       | Algodão      | Rio Preto-DF        |
| CEN288 | <i>T. harzianum</i>       | Algodão      | Rio Preto-DF        |
| CEN289 | <i>T. harzianum</i>       | Algodão      | Rio Preto-DF        |
| CEN290 | <i>T. harzianum</i>       | Algodão      | Rio Preto-DF        |
| CEN316 | <i>T. harzianum</i>       | Algodão      | Rio Preto-DF        |

### Teste de patogenicidade e reisolamento do patógeno

No intuito de testar a patogenicidade dos isolados de *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii* ao tomate, foram feitos ensaios segundo metodologia proposta por Barbosa *et al.* (2010). Os patógenos foram multiplicados em substrato sólido (arroz parboilizado), previamente umedecido com água destilada (60% v/v) e autoclavado a 120 C durante 20 minutos. Após resfriamento, os frascos Erlenmeyer contendo substrato receberam discos de micélio colonizados pelos patógenos, separadamente, e foram mantidos em incubadora por um período de 15 dias,  temperatura de 25 C e fotoperíodo de 12 horas. Arroz assim colonizado

foi incorporado ao solo autoclavado na proporção de 10 gramas/kg de solo. Após 24 horas, plântulas de tomate tipo Italiano var. “San Vito” (apresentando duas folhas compostas), produzidas em bandeja de isopor com substrato Germinar<sup>®</sup>, foram transplantadas para vasos com 500 mL de volume. As avaliações foram realizadas 14 dias após o transplante das mudas, determinando-se o número de plantas tombadas e ocorrência dos sintomas de necrose e murcha. A partir de escleródios encontrados nas plantas doentes, procedeu-se o reisolamento do patógeno. Escleródios obtidos dessas culturas (Figura 3) foram desinfetados em solução de hipoclorito 5%, colocados em placa contendo meio de cultura BDA e incubados nas condições descritas no item anterior, para produção de culturas puras do patógeno.

Com a realização dos testes de patogenicidade foi possível certificar-se de que, tanto o isolado CEN216 de *S. rolfsii* quanto o CEN217 de *S. sclerotiorum* são patogênicos à cultura do tomate (Figura 3), uma vez que colonizaram os tecidos da hospedeira com consequentes lesões, necrose, tombamento e morte de plantas. Esses sintomas observados condizem com descrições encontradas na literatura (Kimati *et al.*, 2005; Punja, 1985 e Gabor & Wiebe, 1997).

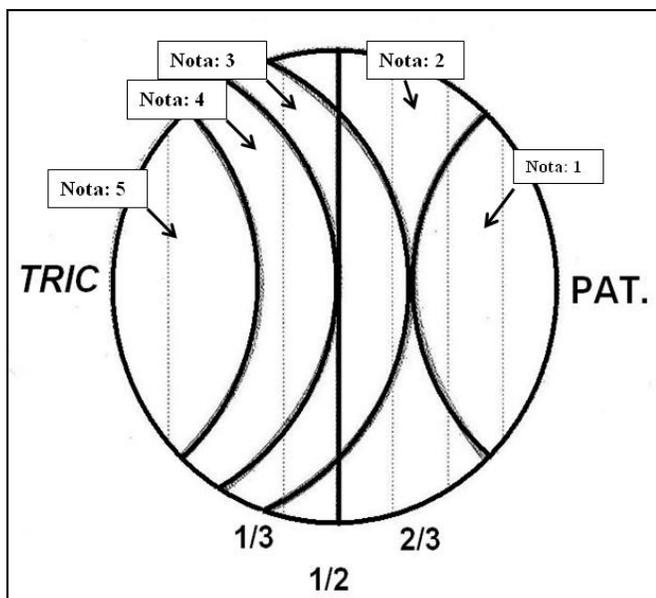


**Figura 3:** Teste de patogenicidade. **A** – Condições do colo das plantas de tomate causadas por *Sclerotium rolfsii*; **B** – Imagem aproximada da figura ‘A’ com setas apontando para escleródios em formação; **C** – Escleródio sendo formado externamente à haste da planta de tomate e **D** – Formação de escleródios no interior da haste do tomateiro (talo-oco).

## **Avaliação do antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* em cultivo pareado**

O potencial antagônico de *Trichoderma* spp. contra *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii* foi avaliado pela técnica de pareamento de culturas (Dennis & Webster, 1971). Isolados tanto dos patógenos quanto dos antagonistas foram multiplicados em meio BDA, à 25 °C e fotofase de 12 horas, durante 7 dias. Discos de ágar (5 mm de diâmetro) contendo as estruturas fúngicas retirados das culturas puras dos patógenos e dos antagonista foram depositados diametralmente opostos em placas contendo o mesmo meio e incubadas nas mesmas condições descritas. Como controle, foram preparadas placas de BDA, contendo somente o patógeno. Para cada isolado de *Trichoderma* foram realizadas três repetições. As avaliações foram realizadas aos sete dias de cultivo, atribuindo-se notas de acordo com escala estabelecida por Bell *et al.* (1982):

Nota 1-sobreposição de *Trichoderma*, que colonizou toda a superfície do meio e reduziu a colônia do patógeno; Nota 2-sobreposição de *Trichoderma*, que colonizou 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 à invasão por *Trichoderma*; Nota 5-sobreposição do patógeno que colonizou toda a superfície do meio.



**Figura 4:** Representação da escala de notas proposta por Bell *et al.* (1982).

As estruturas das zonas de confronto dos dois fungos foram analisadas com o auxílio de Microscópio Óptico (Olympus BX40), com lente de aumento de 40X. Para tanto, lâminas contendo fragmentos dessas estruturas de confronto entre os fungos foram confeccionadas e observadas quanto à presença de enrolamento, plasmólise de hifas, crescimento de hifas paralelas, bem como alterações estruturais destas hifas.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e as unidades experimentais constituíam de uma placa, foram realizadas três repetições e o experimento foi realizado duas vezes.

#### **Interação de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* e *Trichoderma* spp. ao microscópio eletrônico de varredura**

Estudos mais detalhados da interação entre isolados de *Trichoderma* e patógenos foram conduzidos pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando amostras provenientes do pareamento de culturas, com 11 isolados do antagonista. Para tanto,

discos de BDA (5 mm de diâmetro) provenientes de áreas do confronto entre as colônias de isolados de *Trichoderma* spp. e dos patógenos (*S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*) foram removidos e submetidos ao procedimento descrito por Bossola & Russel (1998), adaptado por Alves (2004), a seguir: tratamento com solução fixadora (glutaraldeído 2% e paraformaldeído 2%, em tampão cacodilato 0,05 M a pH 7,2) para fixação a 4 °C durante 24 horas, seguido de 4 lavagens com tampão cacodilato 0,05 M (pH 7,2) e pós-fixados durante 1 hora a 4 °C com tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) 1% em tampão cacodilato 0,01 M (pH 7,2).

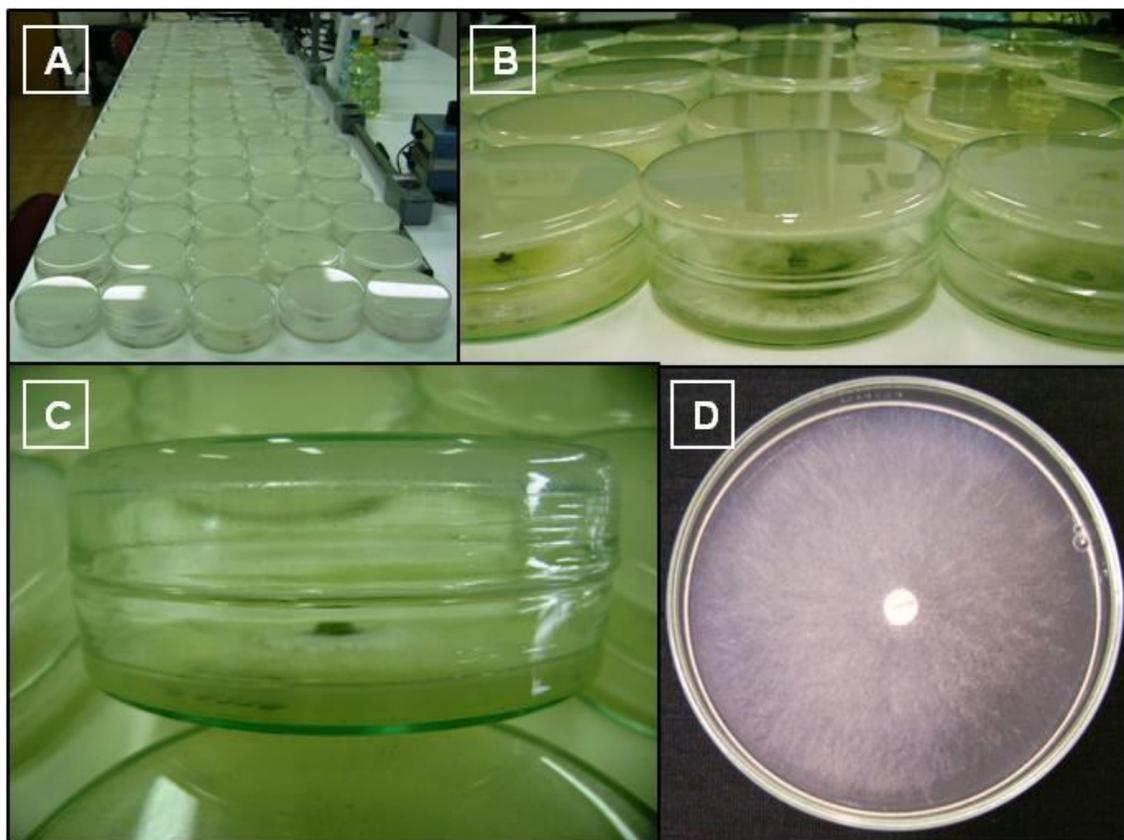
As amostras foram então lavadas três vezes com água destilada, e desidratadas em gradiente crescente de acetona (30, 50, 70, 80, 90 e duas vezes de 100%). Para secagem ao ponto crítico, utilizou-se dióxido de carbono no secador Elmitech Critical Point Drayer K850. Os suportes contendo o material foram metalizados com ouro, utilizando corrente de 25 mA, em atmosfera de ar de 1.10<sup>-2</sup> mbar durante 2'30". As imagens foram obtidas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. As visualizações foram realizadas ao microscópio eletrônico JEOL JSM-700 1 F. Foram tomadas micrografias de alterações indicativas de hiperparasitismo.

#### **Avaliação do efeito inibidor de metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii***

Para avaliação do efeito inibidor de metabólitos voláteis dos isolados de *Trichoderma* sobre *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*, realizaram-se testes com base na metodologia descrita por Dennis & Wester (1971b) com modificações. Para montagem de cada unidade amostral do experimento, duas placas de Petri contendo meio de cultura BDA receberam individualmente discos de ágar (5 mm de diâmetro) retirados de colônias do patógeno e do antagonista. As placas foram mantidas na incubadora por 7 horas nas condições anteriormente descritas. Decorrido esse período inicial de incubação, as placas foram destampadas e bases contendo o

antagonista e o patógeno foram, sobrepostamente unidas com filme de PVC, para impedir o escape de metabólitos voláteis (Figura 5). As unidades experimentais, agora formadas por duas bases de placas, obrigatoriamente com a base inferior inoculada com o antagonista, foram mantidas nas mesmas condições de incubação. Como testemunha, foram sobrepostas uma base contendo o patógeno e outra contendo apenas meio BDA. A avaliação do crescimento micelial foi realizada quando toda a superfície do meio nas parcelas testemunhas, ou seja, naquelas cujas bases inferiores continham meio BDA, apresentaram-se recobertas pelo patógeno.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e as unidades experimentais constituíam de dois fundos de placa unidos com filme plástico, foram realizadas três repetições e o experimento foi realizado duas vezes.



**Figura 5:** **A** – Vista geral do ensaio de produção de metabólitos voláteis; **B** – Colônias de *Trichoderma* spp. nas placas inferiores de cada unidade experimental; **C** – Detalhe da execução do experimento e **D** – Placa superior inteiramente colonizada pelo patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, ao final do experimento.

#### **Avaliação do efeito inibidor de metabólitos não-voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii***

Testes com isolados do antagonista foram também realizados para avaliação da inibição do crescimento do patógeno por metabólitos não-voláteis, com base na metodologia descrita por Agrawal *et al.* (1977), com modificações. Isolados de *Trichoderma* foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido à base de batata-dextrose. Utilizaram-se 5 discos de ágar (5 mm de diâmetro) por frasco, retirados de culturas de *Trichoderma* desenvolvidas em BDA, com cinco dias de idade. A incubação foi realizada em agitador orbital (Lab-line incubator-shaker modelo NT 711), a 150 rpm, à

temperatura de 25 °C ( $\pm$  2 °C), na ausência de luz. Após sete dias, a parte líquida foi coletada por filtração em papel de filtro e levada a ambiente estéril onde foi novamente filtrada com o auxílio de membranas de celulose (0,45  $\mu$ m). O “metabólito” assim esterilizado foi incorporado ao meio BDA autoclavado, à razão de de 25% (v/v). Para cada isolado de *Trichoderma*, foram preparadas três placas com o filtrado de colônias, totalizando 105 placas para cada isolado de patógeno. As placas de Petri com o meio receberam ao centro, um disco de cultura do patógeno e foram a seguir incubadas a 25 °C ( $\pm$  2 °C). A testemunha consistiu de placas contendo meio BDA sem filtrado de colônias de *Trichoderma*, inoculadas com discos dos patógenos. As medições do crescimento radial foram tomadas quando toda a superfície do meio nas placas testemunhas se apresentou completamente recoberta por micélio do patógeno.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e as unidades experimentais constituídas de uma placa; foram realizadas três repetições e o experimento foi realizado duas vezes.

### **Efeito de *Trichoderma* spp. na germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de tomate**

Sementes de tomate tipo italiano var. “San Vito” foram tratadas com *Trichoderma* via suspensão de conídios com os isolados do antagonista previamente selecionados.

O tratamento consistiu na imersão das sementes por 24 horas (as testemunhas foram submersas em água) em suspensão de esporos de *Trichoderma*. Os esporos para o preparo das suspensões foram obtidos de culturas do fungo desenvolvidas em meio BDA, a 25 °C ( $\pm$  2 °C), sob luz constante por sete dias. A concentração de esporos foi ajustada para  $6 \times 10^8$  conídios mL<sup>-1</sup>. As sementes, após o tratamento, foram semeadas em caixa tipo gerbox sobre duas folhas de papel de filtro umedecidos com água destilada estéril. Distribuíram-se 25 sementes de tomate por gerbox. Diariamente o papel de filtro foi umedecido com água

destilada e esterilizada. Após 72 horas, foi determinado o número de sementes germinadas e não germinadas e, após 10 dias, o número de sementes com germinação normal, germinação anormal e número de sementes mortas, medindo-se também o comprimento da radícula e do hipocótilo. Foram consideradas como germinação anormal todas as plântulas que apresentaram o hipocótilo apodrecido, danificado, ausência de hipocótilo ou ausência da raiz primária (Nakagawa, 1999).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e as unidades experimentais constituídas de uma placa tipo gerbox com 25 sementes; foram realizadas três repetições.

### **Promoção de crescimento de plantas de tomate em casa de vegetação**

Este experimento foi conduzido com vasos plásticos de 500 mL de capacidade, os quais foram preenchidos com solo autoclavado e irrigados com 25 mL de suspensão  $6 \times 10^7$  conídios mL<sup>-1</sup> de *Trichoderma*. Oito sementes de tomate tipo italiano var. “San Vito” foram semeadas em cada vaso, após a aplicação do antagonista. Utilizaram-se 22 isolados de *Trichoderma* selecionados nos testes realizados em laboratório. Quatorze dias após a emergência das plântulas, foram obtidas as medidas de comprimento de raiz, parte aérea e peso seco de raiz de nove plantas por tratamento. Para obtenção do peso seco das raízes, essas foram encaminhadas para o laboratório onde efetuou-se secagem em estufa a uma temperatura de 60 °C por um período de três dias, após secagem, essas foram pesadas em balança de precisão e seus valores de peso seco anotados. As medidas de comprimento foram efetuadas para cada planta separadamente, escolhidas aleatoriamente, sendo três plantas de um mesmo vaso. Para efeito comparativo foi adicionado ao experimento mais um tratamento, o controle negativo, constituído por sementes não tratadas, semeadas em solo autoclavado.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e as unidades experimentais constituídas de um vaso com oito plantas; foram realizadas três repetições e o experimento foi realizado duas vezes.

### **Avaliação dos isolados de *Trichoderma* quanto à rizocompetência em plantas de tomate em casa de vegetação**

Os isolados de *Trichoderma* que apresentaram melhor potencial antagônico nos experimentos de promoção de crescimento de plantas foram avaliados quanto à rizocompetência. Sementes de tomate tipo italiano var. “San Vito” foram esterilizadas superficialmente com solução de hipoclorito de sódio (5%), lavadas duas vezes com água destilada esterilizada e, então, submersas em suspensão de conídios ( $5 \times 10^8$  conídios mL<sup>-1</sup>) por um período de 24 horas para adesão desses à superfície das sementes. Para compor as testemunhas, sementes de tomate foram ao mesmo tempo tratadas de forma idêntica as descrições anteriores, diferindo apenas na etapa de microbiolização, visto que, essas foram submersas apenas em água destilada esterilizada sem a presença de conídios de *Trichoderma*. Em casa de vegetação, onde a temperatura se manteve entre 15 e 39 °C e a umidade entre 70 e 80%, com fotofase de 12 horas, 10 sementes foram plantadas em vaso contendo 500g de solo esterilizado.. Após duas semanas de crescimento nessas condições, as plantas foram colhidas. As raízes foram removidas do solo, sacudidas para a eliminação do solo frouxamente aderido e cortadas em fragmentos usando bisturi estéril. Os fragmentos de raízes com o solo fortemente aderido foram secos ao ar e pesados. Para amostragem da microflora da rizosfera, 1g de raiz foi levado para ambiente estéril e mantido em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução estéril de Tween 80 0,05%, sob agitação em aparelho ultrassônico por dois minutos. Após agitação, a suspensão foi submetida a diluições seriadas segundo a metodologia de Dhingra & Sinclair (1985) modificada até a obtenção de suspensões com diluições de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$

<sup>3</sup> e  $10^{-4}$ . Alíquotas de 100µL dessas suspensões diluídas foram espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalski, previamente flambada, em meio Martin (seletivo para *Trichoderma*). Para cada isolado foram preparadas nove placas (três para cada diluição), as quais foram vedadas com filme plástico e mantidas na incubadora, em ausência de luz, a temperatura de incubação foi de 25 °C ( $\pm 2$  °C), durante três dias. Passado esse período, as placas foram transferidas para outra incubadora com fotofase de 12 horas e as demais condições idênticas às anteriores. Para amostragem do rizoplano, os segmentos de raízes foram lavados com água corrente de torneira. Os segmentos de raízes foram secos ao ar e, posteriormente, realizaram-se as diluições seriadas e plaqueamentos como no tratamento anterior. Para ambos os tratamentos foram utilizadas duas repetições.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e as unidades experimentais, constituídas de uma placa; foram realizadas três repetições e o experimento foi realizado duas vezes.

#### **Avaliação da supressão do tombamento de plantas de tomate por isolados de *Trichoderma* contra *Sclerotium rolfsii* em casa de vegetação**

Para realização deste experimento, os isolados de *Trichoderma* previamente selecionados segundo os testes já realizados para esta finalidade, foram inoculados em placas de Petri contendo meio BDA. As colônias foram incubadas à temperatura de 25 °C ( $\pm 2$  °C) em presença de luz, durante sete dias, para produção de esporos. Para extração dos esporos, foram adicionados às placas de Petri 20 mL de solução de Tween 80 0,05%. A suspensão obtida foi utilizada para contagem de esporos com o auxílio de uma câmara de Neubauer, sob microscópio ótico. A suspensão foi ajustada para  $6 \times 10^7$  conídios mL<sup>-1</sup> de *Trichoderma*. Já a multiplicação dos isolados dos patógenos foi realizada segundo metodologia adaptada de Serra e Silva (2005), onde 300 g de arroz parboilizado foram acondicionados em sacolas

plásticas autoclaváveis, umedecidos com água destilada a 60% do peso (180 mL), para cada sacola. O substrato assim preparado foi autoclavado a 120 °C por um período de 20 min e, após resfriamento, foi inoculado com cinco discos (0,5 mm de diâmetro) de BDA contendo micélio do patógeno. Utilizaram-se colônias de *S. rolfsii* com sete dias de incubação a 25 °C ( $\pm 2$  °C) e fotofase de 12 horas. As sacolas plásticas contendo o substrato inoculado foram também mantidas à temperatura de 25 °C ( $\pm 2$  °C) e fotofase de 12 horas, durante 15 dias. A cada dois dias as embalagens foram movidas suavemente para homogeneização dos micélios dos fungos sobre o substrato de arroz.

Concomitante à produção dos antagonistas e patógenos, foram preparadas sementes-pré-germinadas de tomate tipo italiano var. “San Vito” para utilização no experimento. Para tanto, as sementes foram microbiolizadas com os isolados de *Trichoderma* e acondicionadas em caixas gerbox para germinação por um período de 3 dias em incubadora com fotofase de 12 horas e temperatura de 25 °C ( $\pm 2$  °C). As testemunhas foram também pré-germinadas nas mesmas condições anteriores, mas, sem a microbiolização com isolados de *Trichoderma*.

Produzidos antagonista, patógeno e hospedeiro, o ensaio foi montado segundo metodologia de Barbosa *et al.* (2010), com modificações, em casa de vegetação (temperatura de 14-35 °C, umidade próxima a 80% e fotoperíodo de 12 horas), em copos descartáveis de 400 mL preenchidos com solo autoclavado. Cada copo recebeu 20 mL de suspensão de conídios ( $6 \times 10^7$  conídios mL<sup>-1</sup>) e, após 48 horas, 4 g de arroz colonizado pelo patógeno. Preparado o sistema (solo-antagonista-patógeno) este ficou em repouso por mais um período de três dias, quando por fim foram distribuídas cinco sementes germinadas de tomate por copo. Para validação do experimento dois tipos de testemunha foram juntamente instalados, a Testemunha apenas com o patógeno e sem *Trichoderma* e outra a Testemunha absoluta sem patógeno e sem *Trichoderma*. Após 11 e 17 dias de cultivo, avaliou-se o crescimento das

plantas de tomate, taxa de mortalidade e presença de lesões. Para cada isolado de *Trichoderma* foram utilizadas três repetições.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e as unidades experimentais, constituídas um vaso com cinco plantas de tomate; foram realizadas três repetições e o experimento foi realizado duas vezes.

### **Caracterização molecular dos isolados de *Trichoderma***

#### **Extração de DNA genômico**

A identificação de isolados de *Trichoderma*, usando marcador molecular, foi realizada com DNA genômico total dos isolados. Extraído o DNA, procedeu-se a amplificação e seqüenciamento das regiões ITS1, 5,8S e ITS2 do rDNA e análise das seqüências em banco de dados. Para a extração do DNA genômico total, os isolados monospóricos foram crescidos em 50 mL de BD líquido (caldo de 200 g de batata e 20 g de dextrose em 1 L de água) por 3 dias a 25 °C ( $\pm 2$  °C). A suspensão fúngica foi filtrada e o micélio foi macerado em nitrogênio líquido usando pistilo e almofariz de porcelana. Após a maceração, o DNA genômico foi extraído pelo método fenol-clorofórmio (Reader & Broda, 1985), onde foram homogeneizados 50 mg de micélio macerado em 500  $\mu$ l de tampão de extração Tris HCl (Invitrogen) 200 mM, EDTA (Vetec) 25 mM e SDS 0,5% pH 7,0). Em seguida foram adicionadas 350  $\mu$ L de fenol (Sigma-Aldrich). Posteriormente, adicionou-se 150  $\mu$ L de clorofórmio (Vetec), misturando-se o conteúdo do tubo por inversão, até alcançar uma textura leitosa, iniciando-se nesta fase a degradação do material protéico. Esta mistura foi centrifugada (eppendorf) a 14.546,7 g por 30 minutos em centrífuga refrigerada à temperatura de 4 °C. Após a centrifugação, colheu-se no máximo 750  $\mu$ L da fase aquosa superior, transferiu-se o líquido para um tubo com volume de 1,5 mL, acrescentou-se 10  $\mu$ L de RNase (Invitrogen) (1U/  $\mu$ L), incubando-se à 37 °C por 30

minutos. Para a eliminação das proteínas residuais, acrescentou-se igual volume de clorofórmio, misturando-se o conteúdo suavemente por inversão seguido de centrifugação por 10 minutos a 14.546,7 g. Em seguida, transferiu-se a fase aquosa superior para novos tubos, seguido da adição de isopropanol (Vetec) gelado na proporção de 54% do volume da solução para a precipitação do DNA. Efetuou-se nova centrifugação por 15 segundos a 2.151,9 g e descartou-se o sobrenadante. Para a remoção das impurezas do DNA, o precipitado foi lavado com 200µL de etanol (Vetec) 70% a 4 °C, centrifugado por 1 minuto e novamente o sobrenadante foi descartado. A secagem do precipitado de DNA foi realizada em *speedvacuum* (Eppendorf Concentrator 5301) por 10 a 15 minutos e em seguida ressuspensionado em 50 µL de tampão TE (10 µM Tris-HCl, pH 8,0 e 1 µM EDTA). O DNA purificado foi submetido à electroforese em gel de agarose (Invitrogen) 1% (5 V/cm), corado em solução de brometo de etídio e fotodocumentado em luz UV. A quantificação do DNA genômico total foi realizada por meio de comparação com marcador 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

### **Amplificação por PCR e sequenciamento**

Para a caracterização taxonômica dos isolados de *Trichoderma* spp., utilizaram-se os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5'TTC CGT AGG TGA ACC TGC GG 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (White *et al.*, 1990). A reação totalizou 25µL contendo 4 µl com a concentração de 5 ng/µl de DNA, 2,5 de tampão 10x na concentração final de 1x, 0,5 µl de DNTP 10 mM (0,2 nM de cada), 0,75µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, oligonucleotídeos iniciadores 10mM ITS1 e ITS4 (0,5mM cada), 0,125 µl de Taq DNA polimerase (0,5 U/ µl) e água ultrapura para completar o volume final da reação. As reações foram realizadas em termociclador MJ Research, INC. PTC – 100MT, sob as seguintes condições térmicas: 94 °C por 4 min, 39 ciclos de 94 °C por 1 min, 56 °C por 1 min, 72 °C por 1 min e 72 °C por 8 min. Ao final da reação, o produto foi mantido a 4 °C. Um controle negativo sem DNA foi incluído

nas amplificações do PCR. Os fragmentos amplificados e o controle foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,0 %, em tampão TBE 0,5x contendo brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado através do sistema Canon.

Todos os produtos obtidos pela PCR foram purificados e sequenciados pela empresa Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). Os iniciadores utilizados para a reação de sequenciamento foram os mesmos descritos anteriormente para as reações da PCR.

As seqüências obtidas foram comparadas com a sua fita complementar gerando-se uma fita seqüência de consenso processada pelo programa DNA sequence assembly BASER software 2,93 (<http://www.dnabaser.com/index.html>) e submetidas à análise comparativa no banco de dados por meio do *basic local alignment search tool* (BLAST) no NCBI, (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), o qual utiliza o método heurístico para encontrar o melhor *score* de alinhamentos locais entre a seqüência submetida e o banco de dados. As seqüências foram submetidas também ao TrichoBLAST, site de submissão internacional em taxonomia de *Trichoderma* e *Hypocrea* (ISTH, <http://www.isth.info/>). ISTH é um banco de dados publicamente disponível que permite o diagnóstico de seqüências nucleotídicas com ferramentas de busca de similaridade, que cobre a maioria das espécies geneticamente caracterizadas das espécies dos gêneros *Trichoderma* e *Hypocrea*.

### **Método da validação da Silhueta**

O uso da Técnica de Validação da Silhueta (Rousseeuw, 1987) partiu do princípio pelo qual se calcula o comprimento da silhueta para cada amostra, a largura média da silhueta para cada cluster, a média global da silhueta e média para o conjunto de dados total. Com esta aproximação, cada cluster pode ser representado pela chamada silhueta, baseado na

comparação do seu estreitamento e separação. O comprimento médio da silhueta foi aplicado para validação de cluster e também para decidir o número ideal de clusters.

A construção da silhueta  $S(i)$  é dada como:

$$S(i) = \frac{(b(i) - a(i))}{\max\{a(i), b(i)\}},$$

em que  $a(i)$  é dissimilaridade média do objeto  $i$  em relação a todos os outros objetos do mesmo cluster;  $b(i)$  é dissimilaridade média mínima do objeto  $i$  em relação a todos os outros cluster (no cluster mais próximo).

Ela é seguida da formula  $-1 \leq S(i) \leq 1$ . Se o valor da silhueta é próximo de 1, significa que amostra está bem clusterizada e foi designado a um cluster apropriado. Se o valor da silhueta é próximo de zero, significa que a amostra poderia ser designada em outro cluster mais próximo, e a amostra encontra-se igualmente distante de ambos os clusters. Se o valor da silhueta é -1, significa que a amostra foi erroneamente classificada. O comprimento médio da silhueta para todos os objetos é simplesmente a média de  $S(i)$ .

Para realização das análises estatísticas dos ensaios aqui apresentados foi utilizado o Programa Estatístico “R”.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Avaliação do antagonismo de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* em cultivo pareado

#### a) Testes com *Sclerotinia sclerotiorum*

Foram formados sete grupos de isolados, conforme mostra a Tabela 3. O comprimento médio da silhueta foi de 0.94, indicando uma boa separação dos grupos de isolados.

**Tabela 3:** Agrupamento de isolados de *Trichoderma* quanto à inibição do crescimento do patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, baseado no método do comprimento médio da Silhueta.

| Isolado | Espécie              | Grupo | Nota segundo a escala de Bell <i>et al.</i> | Validação da Silhueta |
|---------|----------------------|-------|---|-----------------------|
| CEN219  |                      | 7     | 1,00 ± 0,00                                 | 0,00                  |
| CEN141  | <i>T. harzianum</i>  | 6     | 1,33 ± 0,49                                 | 1,00                  |
| CEN223  | <i>T. harzianum</i>  | 6     | 1,33 ± 0,49                                 | 1,00                  |
| CEN281  | <i>T. harzianum</i>  | 6     | 1,33 ± 0,49                                 | 1,00                  |
| CEN287  | <i>T. harzianum</i>  | 6     | 1,33 ± 0,49                                 | 1,00                  |
| CEN1068 |                      | 1     | 1,67 ± 0,49                                 | 1,00                  |
| CEN155  | <i>T. harzianum</i>  | 1     | 1,67 ± 0,49                                 | 1,00                  |
| CEN161  | <i>T. asperellum</i> | 1     | 1,67 ± 0,49                                 | 1,00                  |
| CEN170  | <i>T. harzianum</i>  | 1     | 1,67 ± 0,49                                 | 1,00                  |
| CEN273  |                      | 1     | 1,67 ± 0,49                                 | 1,00                  |
| CEN1069 |                      | 2     | 2,00 ± 0,45                                 | 1,00                  |

|            |                           |   |             |      |
|------------|---------------------------|---|-------------|------|
| CEN1071    |                           | 2 | 2,00 ± 0,45 | 1,00 |
| CEN1074    |                           | 2 | 2,00 ± 0,45 | 1,00 |
| CEN126     | <i>T. harzianum</i>       | 2 | 2,00 ± 0,45 | 1,00 |
| CEN194     | <i>T. harzianum</i>       | 2 | 2,00 ± 0,45 | 1,00 |
| CEN280     | <i>T. longibrachiatum</i> | 2 | 2,00 ± 0,45 | 1,00 |
| CEN289     | <i>T. harzianum</i>       | 2 | 2,00 ± 0,45 | 1,00 |
| CEN1070    |                           | 3 | 2,33 ± 0,59 | 1,00 |
| CEN1073    |                           | 3 | 2,33 ± 0,59 | 1,00 |
| CEN1075    |                           | 3 | 2,33 ± 0,59 | 1,00 |
| CEN129     | <i>T. harzianum</i>       | 3 | 2,33 ± 0,59 | 1,00 |
| CEN162     | <i>T. asperellum</i>      | 3 | 2,33 ± 0,59 | 1,00 |
| CEN201     | <i>T. harzianum</i>       | 3 | 2,33 ± 0,59 | 1,00 |
| CEN1077    |                           | 5 | 2,67 ± 0,49 | 1,00 |
| CEN1078    |                           | 5 | 2,67 ± 0,49 | 1,00 |
| CEN169     | <i>T. harzianum</i>       | 5 | 2,67 ± 0,49 | 1,00 |
| CEN209     | <i>T. pseudokoningii</i>  | 5 | 2,67 ± 0,49 | 1,00 |
| CEN290     | <i>T. harzianum</i>       | 5 | 2,67 ± 0,49 | 1,00 |
| CEN316     | <i>T. harzianum</i>       | 5 | 2,67 ± 0,49 | 1,00 |
| CEN1072    |                           | 4 | 3,00 ± 0,00 | 1,00 |
| CEN1076    |                           | 4 | 3,00 ± 0,00 | 1,00 |
| CEN1079    |                           | 4 | 3,00 ± 0,00 | 1,00 |
| CEN1080    |                           | 4 | 3,00 ± 0,00 | 1,00 |
| CEN288     | <i>T. harzianum</i>       | 4 | 3,00 ± 0,00 | 1,00 |
| Testemunha |                           | 8 | 5,00 ± 0,00 | 0,00 |

A Tabela 3 apresenta as médias seguidas do desvio padrão em ordem decrescente de inibição do crescimento do patógeno, segundo os grupos sugeridos pelo método do comprimento médio da silhueta. O melhor resultado de inibição ficou para o grupo 7 onde está alocado o isolado CEN219 (Figura 6 A e B), seguido dos isolados do grupo 6, que compreende: CEN141, CEN123, CEN281 e CEN287. O grupo 1 foi o terceiro melhor inibidor e acomoda os isolados: CEN1068, CEN155, CEN161, CEN170 e CEN273. Já o grupo 2 constituiu-se dos isolados CEN1069, CEN1071, CEN1074, CEN126, CEN194, CEN280 e CEN289 e foi seguido pelo grupo 3 (CEN1070, CEN1073, CEN1075, CEN129, CEN162 e CEN201); na sequência, aparecem o grupo 5 (CEN1077, CEN1078, CEN169, CEN209 e CEN316) e o grupo 4 (CEN1072, CEN1076, CEN1079, CEN1080 e CEN288), sendo que este apresentou os resultados menos satisfatórios, embora diferindo da testemunha que formou o grupo 8.

**b) Testes com *Sclerotium rolfsii***

Também nesse caso foram formados sete grupos de isolados conforme ilustra a Tabela 4. O comprimento médio da silhueta foi de 0.91, o que indica uma boa separação dos grupos de isolados.

**Tabela 4:** Agrupamento de isolados de *Trichoderma* quanto à inibição do crescimento do patógeno *Sclerotium rolfsii*, baseado no método do comprimento médio da Silhueta.

| Isolado | Espécie             | Grupo | Nota segundo a escala de Bell <i>et al.</i> | Validação da Silhueta |
|---------|---------------------|-------|---|-----------------------|
| CEN1069 |                     | 2     | 1,00 ± 0,00                                 | 1,00                  |
| CEN1071 |                     | 2     | 1,00 ± 0,00                                 | 1,00                  |
| CEN129  | <i>T. harzianum</i> | 2     | 1,00 ± 0,00                                 | 1,00                  |

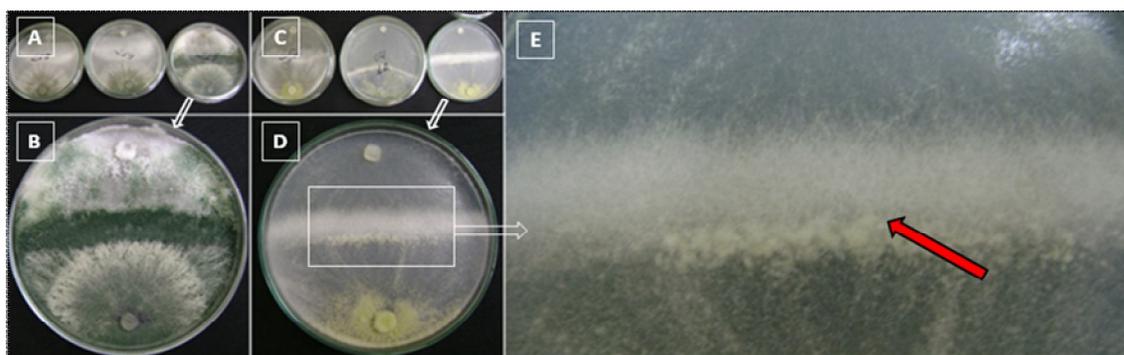
|         |                      |   |             |      |
|---------|----------------------|---|-------------|------|
| CEN169  | <i>T. harzianum</i>  | 2 | 1,00 ± 0,00 | 1,00 |
| CEN170  | <i>T. harzianum</i>  | 2 | 1,00 ± 0,00 | 1,00 |
| CEN194  | <i>T. harzianum</i>  | 2 | 1,00 ± 0,00 | 1,00 |
| CEN273  |                      | 2 | 1,00 ± 0,00 | 1,00 |
| CEN281  | <i>T. harzianum</i>  | 2 | 1,00 ± 0,00 | 1,00 |
| CEN287  | <i>T. harzianum</i>  | 2 | 1,00 ± 0,00 | 1,00 |
| CEN289  | <i>T. harzianum</i>  | 2 | 1,00 ± 0,00 | 1,00 |
| CEN1068 |                      | 1 | 1,33 ± 0,49 | 1,00 |
| CEN1077 |                      | 1 | 1,33 ± 0,49 | 1,00 |
| CEN126  | <i>T. harzianum</i>  | 1 | 1,33 ± 0,49 | 1,00 |
| CEN141  | <i>T. harzianum</i>  | 1 | 1,33 ± 0,49 | 1,00 |
| CEN316  | <i>T. harzianum</i>  | 1 | 1,33 ± 0,49 | 1,00 |
| CEN1070 |                      | 3 | 1,67 ± 0,48 | 1,00 |
| CEN1074 |                      | 3 | 1,67 ± 0,48 | 1,00 |
| CEN1073 |                      | 3 | 1,67 ± 0,48 | 1,00 |
| CEN1076 |                      | 3 | 1,67 ± 0,48 | 1,00 |
| CEN1078 |                      | 3 | 1,67 ± 0,48 | 1,00 |
| CEN155  | <i>T. harzianum</i>  | 3 | 1,67 ± 0,48 | 1,00 |
| CEN161  | <i>T. asperellum</i> | 3 | 1,67 ± 0,48 | 1,00 |
| CEN162  | <i>T. asperellum</i> | 3 | 1,67 ± 0,48 | 1,00 |
| CEN1075 |                      | 5 | 2,00 ± 0,00 | 1,00 |
| CEN1079 |                      | 5 | 2,00 ± 0,00 | 1,00 |
| CEN1080 |                      | 5 | 2,00 ± 0,00 | 1,00 |
| CEN201  | <i>T. harzianum</i>  | 5 | 2,00 ± 0,00 | 1,00 |

|            |                           |   |             |      |
|------------|---------------------------|---|-------------|------|
| CEN209     | <i>T. pseudokoningii</i>  | 5 | 2,00 ± 0,00 | 1,00 |
| CEN219     |                           | 5 | 2,00 ± 0,00 | 1,00 |
| CEN280     | <i>T. longibrachiatum</i> | 5 | 2,00 ± 0,00 | 1,00 |
| CEN288     | <i>T. harzianum</i>       | 6 | 2,33 ± 0,58 | 0,00 |
| CEN1072    |                           | 4 | 2,67 ± 0,52 | 1,00 |
| CEN223     | <i>T. harzianum</i>       | 4 | 2,67 ± 0,52 | 1,00 |
| CEN290     | <i>T. harzianum</i>       | 7 | 3,00 ± 1,00 | 0,00 |
| Testemunha |                           | 8 | 5,00 ± 0,00 | 0,00 |

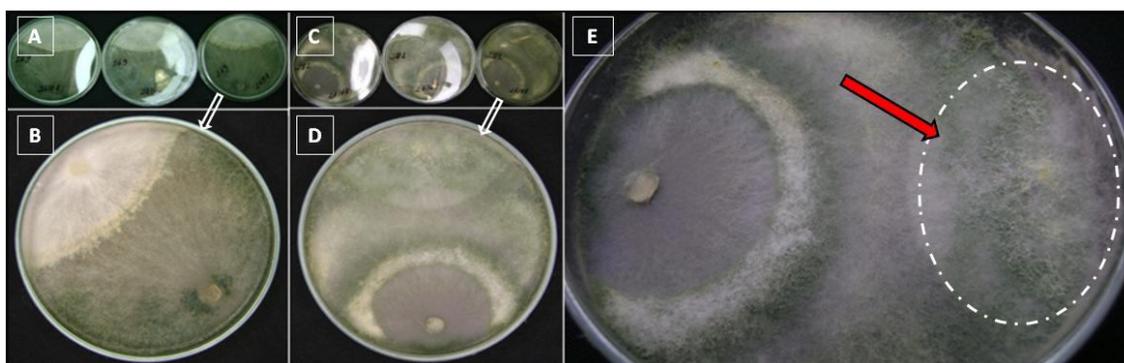
Segundo o método da silhueta, os isolados testados foram divididos em grupos quanto a sua eficiência de inibição do crescimento micelial do patógeno, onde, o melhor resultado foi alcançado pelo grupo 2 composto pelos isolados: CEN1069, CEN1071, CEN129, CEN169, CEN170, CEN194, CEN273, CEN281, CEN287 e CEN289, o segundo melhor resultado foi obtido pelo grupo 1 que compreende os isolados: CEN1068, CEN1077, CEN126, CEN141 e CEN316, em terceiro o grupo 3 onde estão alocados os isolados: CEN1070, CEN1074, CEN1073, CEN1076, CEN1078, CEN155, CEN161 e CEN162, seguidos do grupo 5 (CEN1075, CEN1079, CEN1080, CEN201, CEN209, CEN219 e CEN280), grupo 6 (CEN288), grupo 4 (CEN1072 e CEN223), grupo 7 (CEN290) e por fim o grupo 8 formado apenas pela testemunha.

Nos confrontos realizados entre os 34 isolados de *Trichoderma* e os isolados CEN217 (*S. sclerotiorum*) e CEN216 (*S. rolfsii*), foram observadas interações antagônicas, com competição por interferência e o hiperparasitismo, o que segundo Papavizas (1985) evidencia a interação entre os microrganismos. Em decorrência da competição, houve entrelaçamento e deformação de hifas (Figuras 7 e 8). Também foi observado que os isolados de *Trichoderma* penetraram e colonizaram propágulos do isolados CEN217 e CEN216 (Figuras 10 e 11).

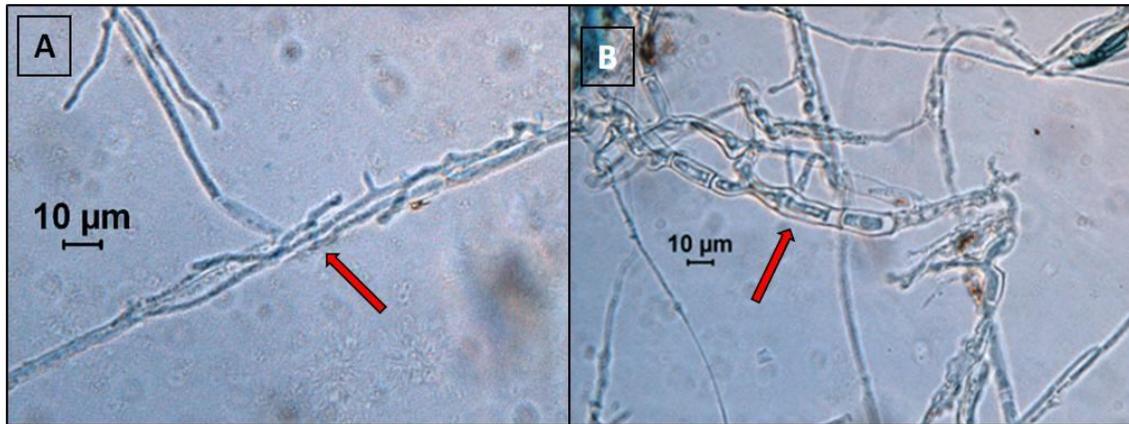
Nos testes *in vitro* realizados entre os isolados de *Trichoderma* e os isolados de *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*, observaram-se que após sete dias do confronto os raios médios das colônias dos patógenos confrontadas diferiram estatisticamente do raio médio da testemunha (cultura pura dos patógenos), e em todos os confrontos houve inibição do crescimento micelial dos patógenos como pode ser observado na Tabela 4, em que todos os grupos de isolados diferiram estatisticamente das testemunhas (grupo 8).



**Figura 6:** Pareamento de culturas com *Trichoderma* e *Sclerotinia sclerotiorum* (CEN217). **A** e **B** – Confronto direto entre os isolados CEN217 (*S. sclerotiorum*) e CEN219 de *Trichoderma*; **C** e **D** – Confronto entre os isolados CEN217 (*S. sclerotiorum*) e CEN1070 de *Trichoderma* e **E** – Imagem aproximada com seta destacando zona de confronto entre o patógeno e antagonista, Figura D.



**Figura 7:** Pareamento de colônias de *Trichoderma* sp. e *Sclerotium rolfsii*. **A** e **B** – Confronto direto entre os isolados CEN216 (*S. rolfsii*) e CEN169 de *T. harzianum*; **C** e **D** – Confronto entre os isolados CEN216 e CEN281 de *Trichoderma harzianum* e **E** – Imagem aproximada da figura D com seta destacando colonização e esporulação de *T. harzianum* sobre área onde deveria ter desenvolvido a colônia de *S. rolfsii*.



**Figura 8:** **A** – Seta indicando enrolamento de hifas do isolado CEN169 (*Trichoderma harzianum*) em hifas do CEN217 (*S. sclerotiorum*); **B** – Seta indicando deformação de Hifas do patógeno.



**Figura 9:** **A** – Seta indicando o enrolamento de hifas do isolados CEN169 (*Trichoderma harzianum*) contra CEN216 (*Sclerotium rolfsii*); **B** – Seta indicando deformação de hifas do patógeno.

Essas alterações evidenciam o parasitismo de *Trichoderma* sobre os patógenos estudados, conforme sugere Papavizas (1985). Entretanto, outros mecanismos de ação podem estar concomitantemente envolvidos nessas ações antagonicas de *Trichoderma*, como competição, que é considerado um dos mais eficientes e pode limitar para os patógenos:

nutrientes, água ou os sítios onde esses fatores nutricionais são mais abundantes (Perello *et al.*, 2003).

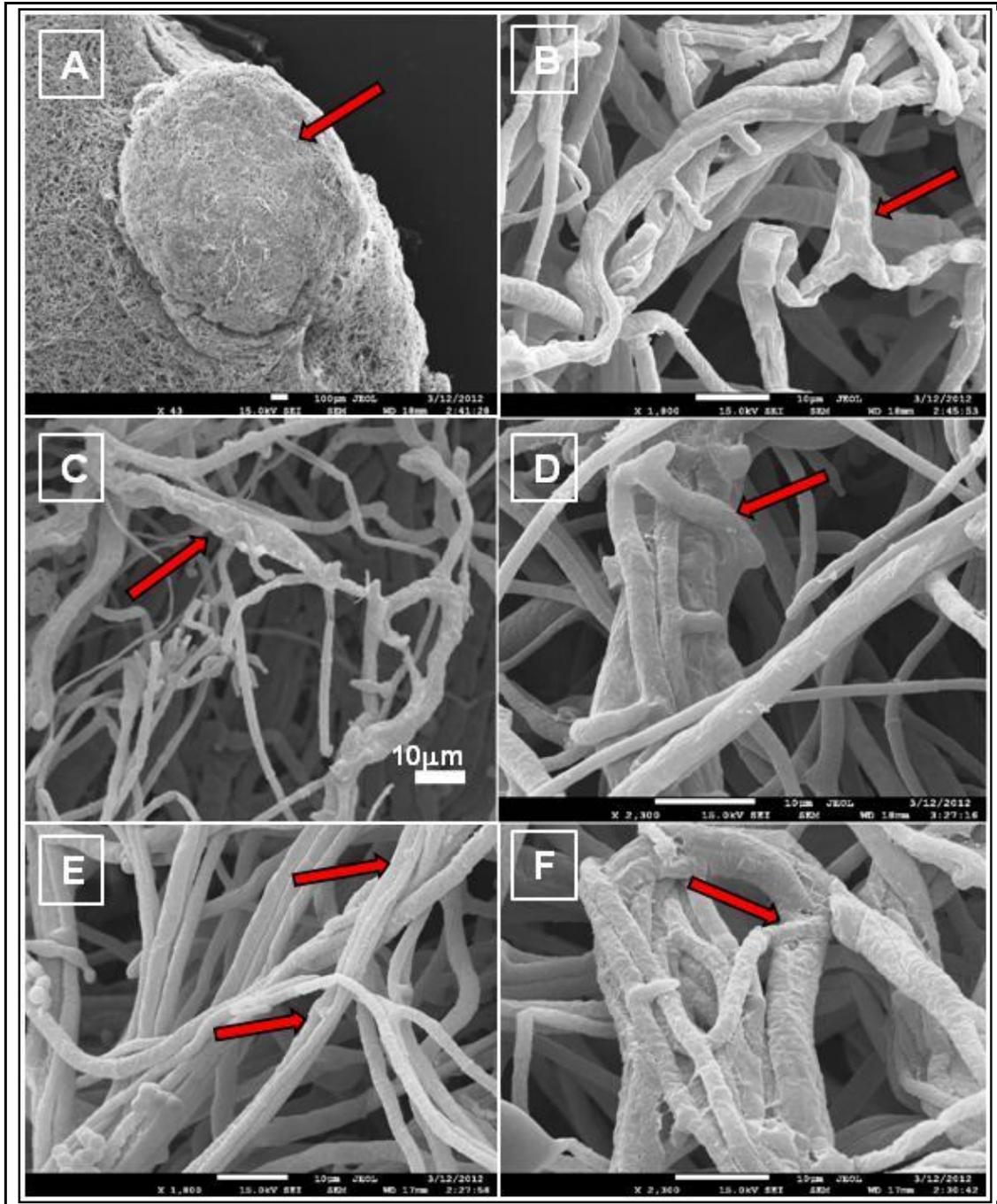
Em trabalhos realizados por Melo e Faull (2000), observou-se que *Trichoderma* inibiu de 79 a 82% do crescimento de *Rizoctonia solani*, na cultura de arroz. Outro resultado semelhante foi obtido por Bonfim (2007), onde todos os isolados de *Trichoderma* testados apresentaram rápido crescimento micelial, diferindo estatisticamente da testemunha ao inibir o desenvolvimento de *Rhizopus stolonifer* de maracujazeiro. Carvalho Filho *et al.* (2008), demonstraram o potencial dos isolados de *Trichoderma*, para controle de *Cylindrocladium*. Da mesma forma, foi observado neste trabalho que dos 34 isolados avaliados, a maioria promoveu o enrolamento, crescimento paralelo e/ou estrangulamento das hifas dos patógenos (Figuras 10 e 11), indicando o potencial dos isolados de *Trichoderma* estudados no controle do patógeno através desses mecanismos de ação.

O enovelamento descrito acima, assim como estrangulamento de hifas do patógeno podem promover a destruição da parede celular, provavelmente para obter nutrientes a partir das células mortas (Melo, 1998). Enzimas produzidas por *Trichoderma* spp. como quitinases e celulases, provocam a lise ou degradam a parede celular do patógeno (Elad *et al.*, 1982). Essas enzimas hidrolizam a parede celular de outros fungos, sendo induzidas por diferentes polímeros componentes da parede dos fungos alvo (Howell, 2005).

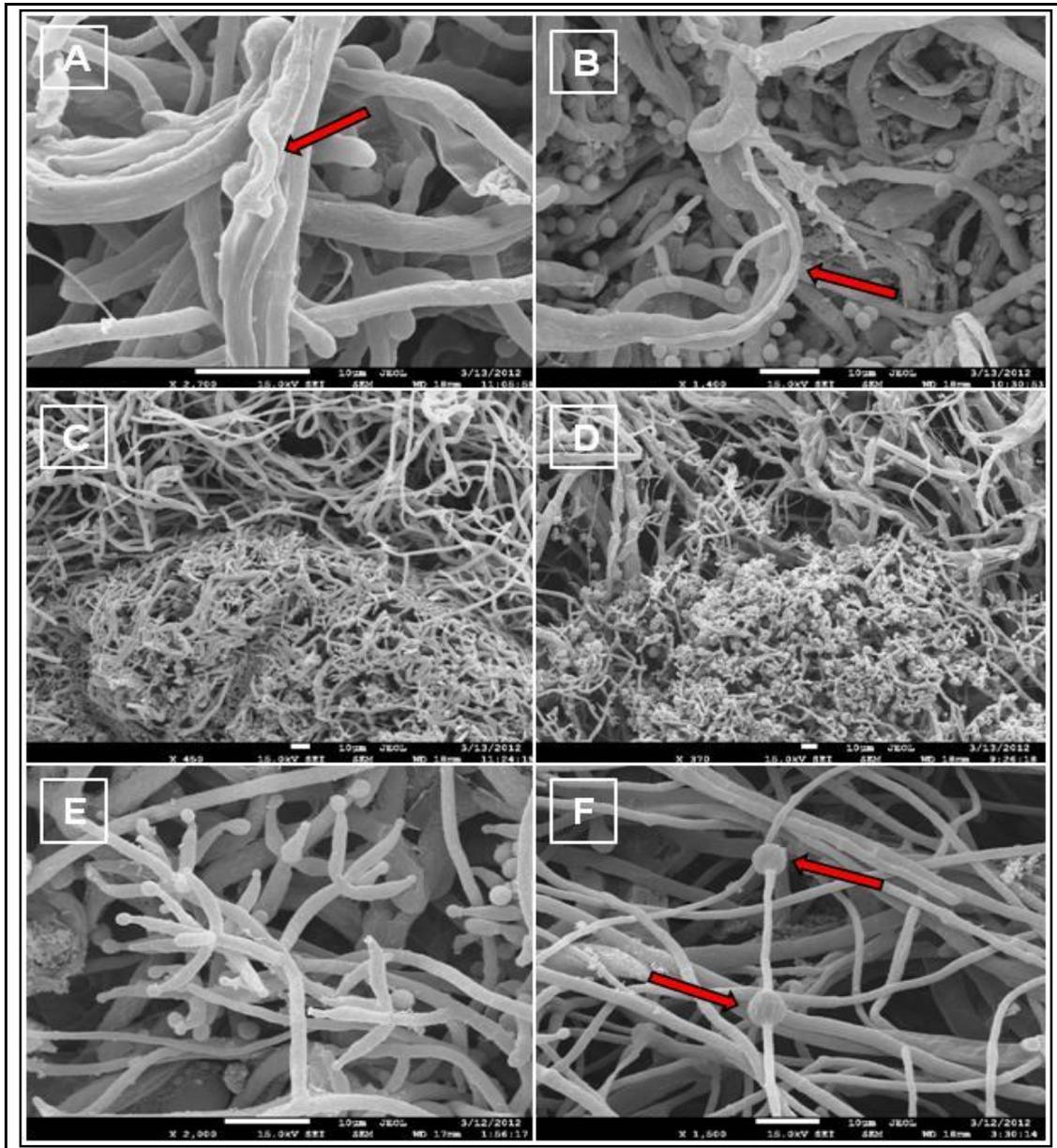
### **Interação *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* e *Trichoderma* spp. sob microscopia eletrônica de varredura**

Devido à impossibilidade de realizar as observações ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) com todos os confrontos realizados, foram escolhidos 11, envolvendo ambos os patógenos *S. sclerotiorum* (CEN217) e de *S. rolfsii* (CEN216), com nove isolados de *Trichoderma*. Os confrontos analisados foram: CEN217 x CEN129; CEN217 x CEN155;

CEN217 x CEN201; CEN217 x CEN1075; CEN216 x CEN129; CEN216 x CEN155; CEN216 x CEN281; CEN216 x CEN287; CEN216 x CEN289; CEN216 x CEN1071 e CEN216 x CEN1073, todos apresentando competição entre os microrganismos. Ao MEV foi visualizado o pareamento de hifas dos patógenos e antagonistas, enrolamento das hifas de *Trichoderma* spp. sobre as duas espécies de patógeno, hidrólise e deformação das hifas dos patógenos e penetração de hifas de *Trichoderma* spp. em hifas dos patógenos (Figuras 10 e 11). Isto comprova o hiperparasitismo de *Trichoderma* spp. sobre *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*.



**Figura 10:** Imagens de MEV. **A** – Seta apontando escleródio de *Sclerotinia sclerotiorum* (CEN217); **B** – Seta indicando hifa deformada do mesmo patógeno; **C** – Seta indicando hifa de *Sclerotium rolfsii* (CEN216) sendo parasitada pelo isolado de *Trichoderma* CEN1073; **D** – Seta indicando o enrolamento de hifa do isolado CEN287 (*Trichoderma harzianum*) em *S. rolfsii*; **E** – Setas indicando hifas com apressórios do isolado CEN129 (*T. harzianum*) sobre CEN216 e **F** – Seta indicando a penetração de hifa do isolado CEN129 em hifa de *S. rolfsii*.



**Figura 11:** Imagens de MEV. **A** – Seta indicando hifa do isolado de *Trichoderma harzianum* (CEN155) parasitando *Sclerotinia sclerotiorum* (CEN216); **B** – Seta indicando hifa do isolado CEN1075 (*Trichoderma* sp.) paralela a hifa do mesmo patógeno; **C** – vista da região de confronto entre *T. harzianum* (emaranhado de hifas mais compactadas na base da imagem) *S. sclerotiorum* (emaranhado mais frouxo de hifas na área superior da imagem); **D** – Vista da região de confronto entre CEN281 (*T. harzianum*) na base da imagem e CEN216 (*S. rolfsii*) na área superior da imagem; **E** – Estruturas reprodutivas do *T. harzianum* (CEN201), com suas células conidiogênicas fialídicas ampuliformes e conídios unicelulares lisos; **F** – Setas indicando clamidósporos intercalares de *T. harzianum* (CEN287).

## **Avaliação do efeito inibidor de metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii***

### **a) Testes com *Sclerotinia sclerotiorum***

Dos 34 isolados de *Trichoderma* testados quanto à produção de metabólitos voláteis, nenhum teve qualquer influência sobre o crescimento de *S. sclerotiorum* (Figura 5), indicando que não houve a produção ou os metabólitos voláteis produzidos pelos isolados do antagonista em estudo não tiveram influência deletéria significativa no crescimento micelial do isolado CEN217 (*S. sclerotiorum*). Esse fato não significa que metabólitos não possam ser liberados no decorrer do desenvolvimento das colônias do fungo antagonista em quantidades que possam ser efetivos a outros isolados do patógeno. O isolado 316, por exemplo, inibiu o crescimento de outro isolado de *S. sclerotiorum* (CEN969) pela produção de metabólitos voláteis, em trabalho conduzido por outros membros da equipe. É importante lembrar que esse mecanismo de inibição (metabólitos voláteis) é apenas um dos mecanismos de ação exercido por fungos do gênero *Trichoderma* (Bettiol & Ghini, 1995, Harman, 2011).

### **b) Testes com *Sclerotium rolfsii***

Os resultados obtidos nos ensaios de produção de metabólitos voláteis ativos contra *S. rolfsii* possibilitaram a formação de três grupos de isolados de *Trichoderma*, conforme ilustra a Tabela 5. O comprimento médio da silhueta foi de 0.59, o que indica uma razoável separação dos grupos de isolados.

**Tabela 5:** Agrupamento de isolados de *Trichoderma* quanto à produção de metabólitos voláteis, em termos de porcentagem de inibição do crescimento do patógeno *Sclerotium rolfsii* (CEN216), baseado no método do comprimento médio da Silhueta.

| <b>Isolado</b> | <b>Espécie</b>           | <b>Grupo</b> | <b>Diâmetro da colônia do patógeno em cm</b> | <b>Validação da Silhueta</b> |
|----------------|--------------------------|--------------|--|------------------------------|
| CEN126         | <i>T. harzianum</i>      | 3            | 4,25 ± 0,65                                  | 0,75                         |
| CEN155         | <i>T. harzianum</i>      | 3            | 4,25 ± 0,65                                  | 0,75                         |
| CEN170         | <i>T. harzianum</i>      | 3            | 4,25 ± 0,65                                  | 0,75                         |
| CEN169         | <i>T. harzianum</i>      | 3            | 4,25 ± 0,65                                  | 0,75                         |
| CEN129         | <i>T. harzianum</i>      | 3            | 4,25 ± 0,65                                  | 0,75                         |
| CEN290         | <i>T. harzianum</i>      | 3            | 4,25 ± 0,65                                  | 0,75                         |
| CEN219         |                          | 3            | 4,25 ± 0,65                                  | 0,75                         |
| CEN1075        |                          | 3            | 4,25 ± 0,65                                  | 0,75                         |
| CEN273         |                          | 3            | 4,25 ± 0,65                                  | 0,75                         |
| CEN141         | <i>T. harzianum</i>      | 1            | 5,25 ± 0,76                                  | 0,52                         |
| CEN201         | <i>T. harzianum</i>      | 1            | 5,25 ± 0,76                                  | 0,52                         |
| CEN161         | <i>T. asperellum</i>     | 1            | 5,25 ± 0,76                                  | 0,52                         |
| CEN1074        |                          | 1            | 5,25 ± 0,76                                  | 0,52                         |
| CEN289         | <i>T. harzianum</i>      | 1            | 5,25 ± 0,76                                  | 0,52                         |
| CEN1069        |                          | 1            | 5,25 ± 0,76                                  | 0,52                         |
| CEN288         | <i>T. harzianum</i>      | 1            | 5,25 ± 0,76                                  | 0,52                         |
| CEN209         | <i>T. pseudokoningii</i> | 1            | 5,25 ± 0,76                                  | 0,52                         |
| CEN281         | <i>T. harzianum</i>      | 1            | 5,25 ± 0,76                                  | 0,52                         |
| CEN194         | <i>T. harzianum</i>      | 1            | 5,25 ± 0,76                                  | 0,52                         |

|            |                           |   |             |      |
|------------|---------------------------|---|-------------|------|
| CEN1068    |                           | 1 | 5,25 ± 0,76 | 0,52 |
| CEN1073    |                           | 1 | 5,25 ± 0,76 | 0,52 |
| CEN1079    |                           | 1 | 5,25 ± 0,76 | 0,52 |
| CEN162     | <i>T. asperellum</i>      | 1 | 5,25 ± 0,76 | 0,52 |
| CEN1072    |                           | 2 | 6,29 ± 0,72 | 0,61 |
| CEN1076    |                           | 2 | 6,29 ± 0,72 | 0,61 |
| CEN316     | <i>T. harzianum</i>       | 2 | 6,29 ± 0,72 | 0,61 |
| CEN223     | <i>T. harzianum</i>       | 2 | 6,29 ± 0,72 | 0,61 |
| CEN1078    |                           | 2 | 6,29 ± 0,72 | 0,61 |
| CEN1080    |                           | 2 | 6,29 ± 0,72 | 0,61 |
| CEN1071    |                           | 2 | 6,29 ± 0,72 | 0,61 |
| CEN287     | <i>T. harzianum</i>       | 2 | 6,29 ± 0,72 | 0,61 |
| CEN1077    |                           | 2 | 6,29 ± 0,72 | 0,61 |
| CEN1070    |                           | 2 | 6,29 ± 0,72 | 0,61 |
| CEN280     | <i>T. longibrachiatum</i> | 2 | 6,29 ± 0,72 | 0,61 |
| Testemunha |                           | 4 | 9,00 ± 0,00 | 0,00 |

Em conformidade com a Tabela 5, para este experimento os melhores resultados foram alcançados com os isolados do grupo 3 que compreende nove isolados: CEN126, CEN155, CEN170, CEN169, CEN129, CEN290, CEN219, CEN1075 e CEN273, seguidos do grupo 1 com 14 isolados: CEN141, CEN201, CEN161, CEN1074, CEN289, CEN1069, CEN288, CEN209, CEN281, CEN194, CEN1068, CEN1073, CEN1079 e CEN162 e do grupo 2 formado por 11 isolados: CEN1072, CEN1076, CEN316, CEN223, CEN1078, CEN1080, CEN1071, CEN287, CEN1077, CEN1070 e CEN280; por fim, o grupo 4 foi constituído pela testemunha.

Todos os grupos de isolados de *Trichoderma* utilizados nesse ensaio diferiram significativamente da testemunha quanto à redução do crescimento micelial de *S. rolfsii* pela produção de compostos voláteis. Colônias do fitopatógeno atingiram crescimento inferior ao da testemunha, que alcançou 9.0 cm de diâmetro (Tabela 5), significando que os isolados do antagonista em estudo produzem compostos tóxicos voláteis capazes de inibir o crescimento micelial do isolado CEN216 e essa pode ser uma das vias de controle desse patógeno pelos isolados do antagonista. A percentagem de inibição do crescimento micelial de *S. rolfsii* pelos 34 isolados de *Trichoderma* estão apresentados na Tabela 6.

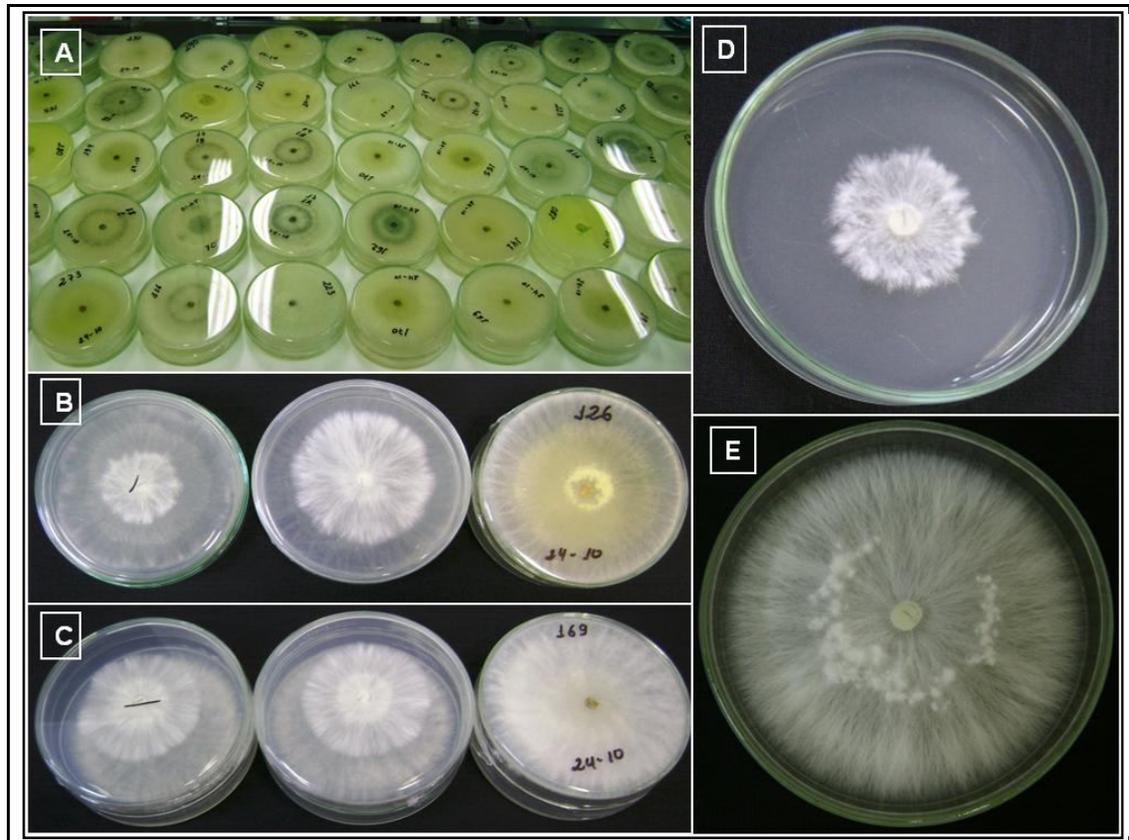
**Tabela 6:** Inibição do crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii* (CEN216) por isolados de *Trichoderma*.

| <b>Isolados</b> | <b>Inibição (%)</b> | <b>Isolados</b> | <b>Inibição (%)</b> | <b>Isolados</b> | <b>Inibição (%)</b> |
|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| <b>CEN126</b>   | 53,70               | <b>CEN223</b>   | 26,85               | <b>CEN1071</b>  | 23,89               |
| <b>CEN129</b>   | 51,85               | <b>CEN273</b>   | 49,26               | <b>CEN1072</b>  | 29,44               |
| <b>CEN141</b>   | 41,67               | <b>CEN280</b>   | 34,81               | <b>CEN1073</b>  | 37,59               |
| <b>CEN155</b>   | 53,70               | <b>CEN281</b>   | 44,63               | <b>CEN1074</b>  | 40,37               |
| <b>CEN161</b>   | 42,59               | <b>CEN287</b>   | 32,78               | <b>CEN1075</b>  | 50,56               |
| <b>CEN162</b>   | 47,22               | <b>CEN288</b>   | 43,89               | <b>CEN1076</b>  | 29,07               |
| <b>CEN169</b>   | 54,44               | <b>CEN289</b>   | 40,19               | <b>CEN1077</b>  | 33,15               |
| <b>CEN170</b>   | 52,96               | <b>CEN290</b>   | 51,48               | <b>CEN1078</b>  | 25,07               |
| <b>CEN194</b>   | 38,33               | <b>CEN316</b>   | 30,19               | <b>CEN1079</b>  | 36,11               |
| <b>CEN201</b>   | 41,67               | <b>CEN1068</b>  | 45,19               | <b>CEN1080</b>  | 32,59               |
| <b>CEN209</b>   | 44,44               | <b>CEN1069</b>  | 39,63               | <b>Test.</b>    | 0,00                |
| <b>CEN219</b>   | 56,67               | <b>CEN1070</b>  | 33,33               |                 |                     |

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com dados obtidos por diferentes autores, indicando que fungos do gênero *Trichoderma* possuem a capacidade de produzir metabólitos voláteis com efeito inibitório sobre o crescimento micelial de vários fungos em meio de cultura (Dennis & Webster, 1971b). Entre os metabólitos produzidos por esse grupo de fungo, há gases, como: etileno e cianeto de hidrogênio (Campbell, 1989), acetaldeído, acetona, etanol e dióxido de carbono (Tamimi & Hutchinson, 1975), que interferem negativamente no crescimento microbiano. Esses gases têm atividade em concentrações baixas, mas não são considerados antibióticos. O CO<sub>2</sub>, segundo Manganot & Diem (1979), é um dos gases produzidos por antagonistas mais estudados e apresenta efeitos bastante variáveis em fungos, desde estimulantes a inibitórias.

Acredita-se que o potencial de metabólitos voláteis seja devido à maior facilidade de sua difusão no ambiente solo, por meio de poros ou filmes d'água, conseguindo de maneira eficiente atingir patógenos deste ambiente (Lobo Júnior & Abreu, 2000).

Os estudos realizados neste trabalho motivam a realização de trabalhos futuros para confirmação da eficiência dos isolados de *Trichoderma* contra o patógeno *S. Rolfsii*, por meio de ensaios *in vivo*.



**Figura 12:** A– Ensaio de metabólitos voláteis com *Sclerotium rolfsii* (CEN216); B e C– Inibição no crescimento de colônias do patógeno pelos isolados CEN126 e CEN169 de *Trichoderma*; D – Colônia de *Sclerotium rolfsii* (sete dias), com redução no crescimento pelos metabólitos voláteis produzidos pelo isolado CEN126 do antagonista (*T. harzianum*) e E – Testemunha.

**Avaliação do efeito inibidor de metabólitos não-voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii***

a) **Teste com *Sclerotinia sclerotiorum***

Foram formados, com base no método da silhueta, dois grupos de isolados, conforme ilustra a Tabela 7. O comprimento médio da silhueta foi de 0.87, o que indica uma boa separação dos grupos de isolados.

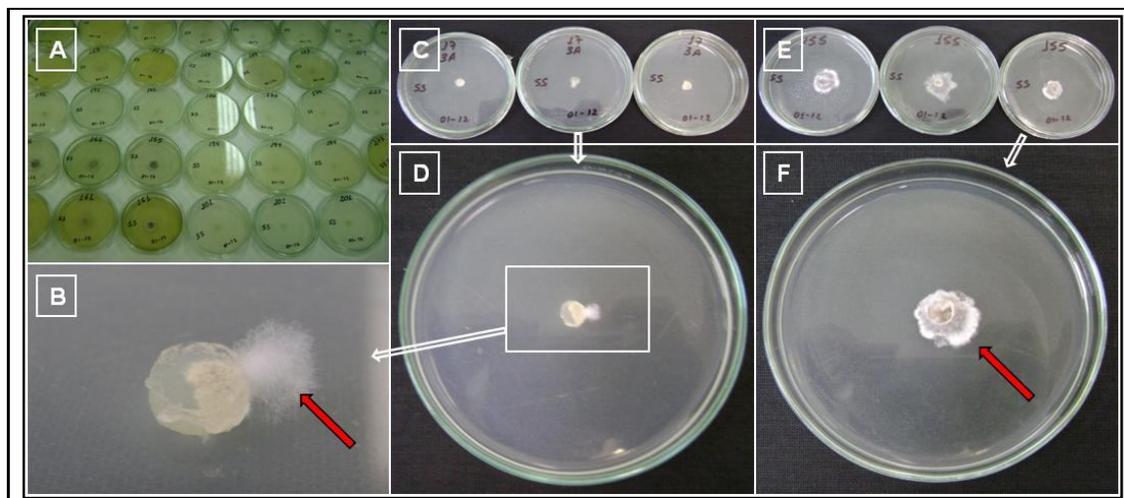
**Tabela 7:** Agrupamento de isolados de *Trichoderma* quanto à inibição do crescimento do patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (CEN217) por metabólitos não-voláteis, baseado no método do comprimento médio da Silhueta.

| <b>Isolado</b> | <b>Espécie</b>            | <b>Grupo</b> | <b>Diâmetro da colônia do patógeno em cm</b> | <b>Validação da Silhueta</b> |
|----------------|---------------------------|--------------|--|------------------------------|
| CEN1071        |                           | 2            | 0,82 ± 0,90                                  | 0,87                         |
| CEN1076        |                           | 2            | 0,82 ± 0,90                                  | 0,87                         |
| CEN1077        |                           | 2            | 0,82 ± 0,90                                  | 0,87                         |
| CEN1079        |                           | 2            | 0,82 ± 0,90                                  | 0,87                         |
| CEN162         | <i>T. asperellum</i>      | 2            | 0,82 ± 0,90                                  | 0,87                         |
| CEN201         | <i>T. harzianum</i>       | 2            | 0,82 ± 0,90                                  | 0,87                         |
| CEN1080        |                           | 2            | 0,82 ± 0,90                                  | 0,87                         |
| CEN1073        |                           | 2            | 0,82 ± 0,90                                  | 0,87                         |
| CEN1072        |                           | 2            | 0,82 ± 0,90                                  | 0,87                         |
| CEN1075        |                           | 2            | 0,82 ± 0,90                                  | 0,87                         |
| CEN1078        |                           | 2            | 0,82 ± 0,90                                  | 0,87                         |
| CEN1074        |                           | 2            | 0,82 ± 0,90                                  | 0,87                         |
| CEN155         | <i>T. harzianum</i>       | 2            | 0,82 ± 0,90                                  | 0,87                         |
| CEN1070        |                           | 2            | 0,82 ± 0,90                                  | 0,87                         |
| CEN219         |                           | 2            | 0,82 ± 0,90                                  | 0,87                         |
| CEN129         | <i>T. harzianum</i>       | 2            | 0,82 ± 0,90                                  | 0,87                         |
| CEN280         | <i>T. longibrachiatum</i> | 2            | 0,82 ± 0,90                                  | 0,87                         |
| CEN289         | <i>T. harzianum</i>       | 2            | 0,82 ± 0,90                                  | 0,87                         |

|            |                          |   |             |      |
|------------|--------------------------|---|-------------|------|
| CEN273     |                          | 2 | 0,82 ± 0,90 | 0,87 |
| CEN281     | <i>T. harzianum</i>      | 2 | 0,82 ± 0,90 | 0,87 |
| CEN287     | <i>T. harzianum</i>      | 2 | 0,82 ± 0,90 | 0,87 |
| CEN209     | <i>T. pseudokoningii</i> | 2 | 0,82 ± 0,90 | 0,87 |
| CEN169     | <i>T. harzianum</i>      | 1 | 8,23 ± 1,19 | 0,87 |
| CEN1068    |                          | 1 | 8,23 ± 1,19 | 0,87 |
| CEN1069    |                          | 1 | 8,23 ± 1,19 | 0,87 |
| CEN288     | <i>T. harzianum</i>      | 1 | 8,23 ± 1,19 | 0,87 |
| CEN141     | <i>T. harzianum</i>      | 1 | 8,23 ± 1,19 | 0,87 |
| CEN170     | <i>T. harzianum</i>      | 1 | 8,23 ± 1,19 | 0,87 |
| CEN194     | <i>T. harzianum</i>      | 1 | 8,23 ± 1,19 | 0,87 |
| CEN316     | <i>T. harzianum</i>      | 1 | 8,23 ± 1,19 | 0,87 |
| Testemunha |                          | 1 | 8,23 ± 1,19 | 0,87 |
| CEN290     | <i>T. harzianum</i>      | 1 | 8,23 ± 1,19 | 0,87 |
| CEN223     | <i>T. harzianum</i>      | 1 | 8,23 ± 1,19 | 0,87 |
| CEN161     | <i>T. asperellum</i>     | 1 | 8,23 ± 1,19 | 0,87 |
| CEN126     | <i>T. harzianum</i>      | 1 | 8,23 ± 1,19 | 0,87 |

Os melhores resultados foram alcançados com isolados do grupo 2, quais sejam: CEN1071, CEN1076, CEN1077, CEN1079, CEN162, CEN201, CEN1080, CEN1073, CEN1072, CEN1075, CEN1078, CEN1074, CEN155, CEN1070, CEN219, CEN129, CEN280, CEN289, CEN273, CEN281, CEN287 e CEN209. Já os resultados obtidos com os demais isolados (CEN169, CEN1068, CEN1069, CEN288, CEN141, CEN170, CEN194, CEN316, CEN290, CEN223, CEN161 e CEN126) igualaram-se à testemunha e foram

alocados no grupo 2, ou seja, estes últimos isolados não produziram metabólitos solúveis com propriedades inibitórias contra o patógeno *S. sclerotiorum*.



**Figura 13:** **A** - Ensaio de metabólitos não-voláteis *Sclerotinia sclerotiorum* (CEN217); **B** – Crescimento deficiente de micélio do patógeno, em presença de filtrado de cultura do isolado CEN1075 (*Trichoderma* sp.); **C e D** – Da mesma forma, inibição do crescimento do patógeno devido a ação dos metabólitos solúveis produzidos pelo mesmo isolado de *Trichoderma*; **E e F** - Ação de metabólitos solúveis do isolado CEN155 (*T. harzianum*) sobre o patógeno, com crescimento escasso e setorização da colônia (seta vermelha).

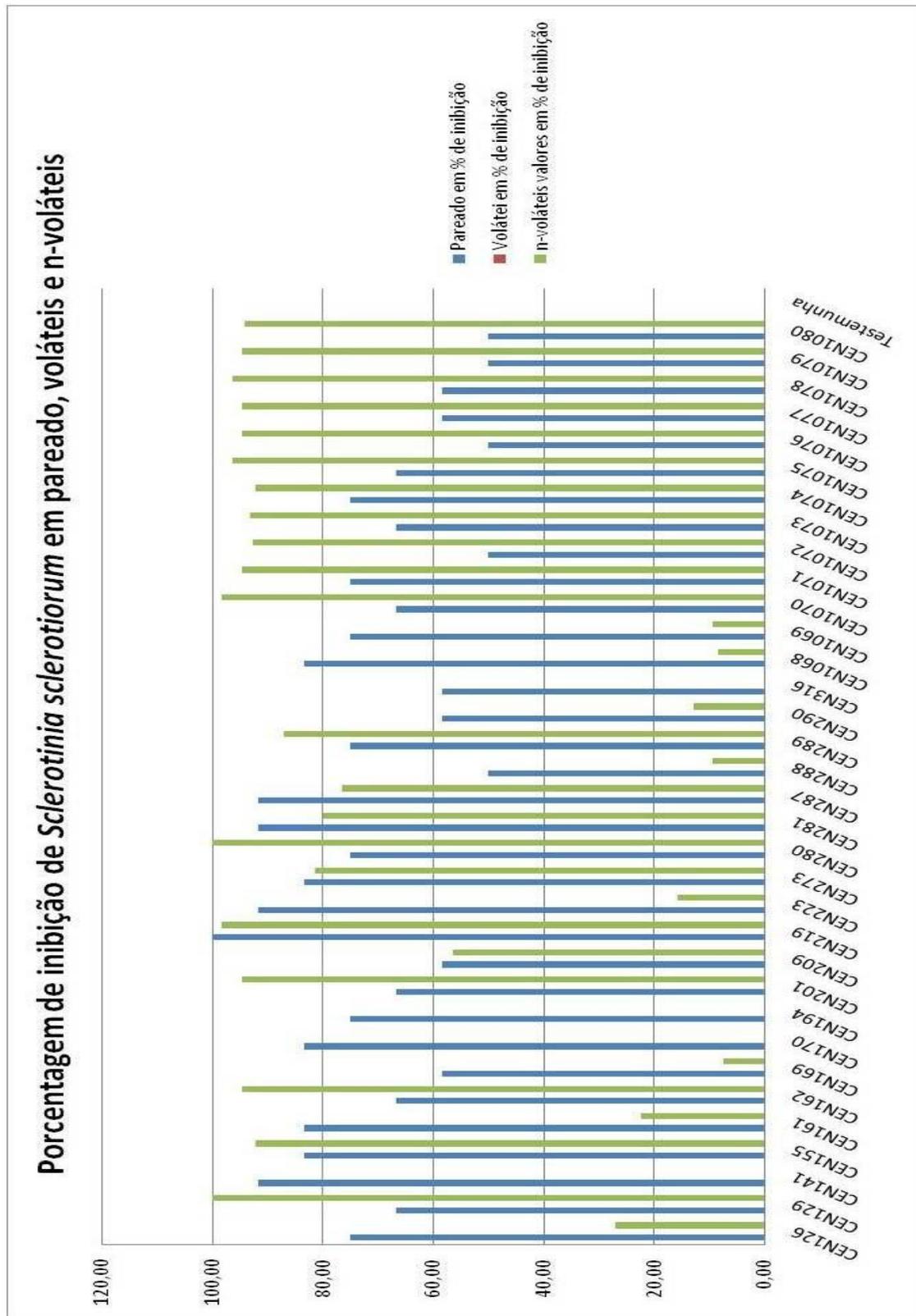
**Tabela 8:** Porcentagem de inibição de colônias de *Sclerotinia sclerotiorum* (CEN217) para cada um dos isolados de *Trichoderma* testados.

| Isolados | Pareado em % de inibição | Voláteis em % de inibição | não-voláteis valores em % de inibição |
|----------|--------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| CEN126   | 75,00                    | 0,00                      | 26,85                                 |
| CEN129   | 66,67                    | 0,00                      | 100,00                                |
| CEN141   | 91,67                    | 0,00                      | 0,00                                  |
| CEN155   | 83,33                    | 0,00                      | 92,04                                 |

|        |        |      |        |
|--------|--------|------|--------|
| CEN161 | 83,33  | 0,00 | 22,22  |
| CEN162 | 66,67  | 0,00 | 94,44  |
| CEN169 | 58,33  | 0,00 | 7,41   |
| CEN170 | 83,33  | 0,00 | 0,00   |
| CEN194 | 75,00  | 0,00 | 0,00   |
| CEN201 | 66,67  | 0,00 | 94,44  |
| CEN209 | 58,33  | 0,00 | 56,30  |
| CEN219 | 100,00 | 0,00 | 98,15  |
| CEN223 | 91,67  | 0,00 | 15,74  |
| CEN273 | 83,33  | 0,00 | 81,30  |
| CEN280 | 75,00  | 0,00 | 100,00 |
| CEN281 | 91,67  | 0,00 | 79,81  |
| CEN287 | 91,67  | 0,00 | 76,48  |
| CEN288 | 50,00  | 0,00 | 9,26   |
| CEN289 | 75,00  | 0,00 | 87,04  |
| CEN290 | 58,33  | 0,00 | 12,78  |
| CEN316 | 58,33  | 0,00 | 0,00   |
| 03-3A  | 83,33  | 0,00 | 8,33   |
| 03-3B  | 75,00  | 0,00 | 9,26   |
| 04-1A  | 66,67  | 0,00 | 98,15  |
| 04-1B  | 75,00  | 0,00 | 94,44  |
| 17-1A  | 50,00  | 0,00 | 92,59  |
| 17-1B  | 66,67  | 0,00 | 93,15  |
| 17-02  | 75,00  | 0,00 | 92,04  |
| 17-3A  | 66,67  | 0,00 | 96,30  |

|            |       |      |       |
|------------|-------|------|-------|
| 17-3B      | 50,00 | 0,00 | 94,44 |
| 22-02      | 58,33 | 0,00 | 94,44 |
| 24-02      | 58,33 | 0,00 | 96,30 |
| 24-03      | 50,00 | 0,00 | 94,44 |
| 38-01      | 50,00 | 0,00 | 94,07 |
| Testemunha | 0,00  | 0,00 | 0,00  |

---



**Figura 14:** Resultados dos estudos de pareado de hifas, produção de metabólitos voláteis e não-voláteis por *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (CEN217).

b) **Teste com *Sclerotium rolfsii***

Também com base no método da silhueta, dois grupos de isolados foram formados, conforme ilustra a Tabela 9. O comprimento médio da silhueta foi de 0,8, o que indica uma boa separação dos grupos de isolados.

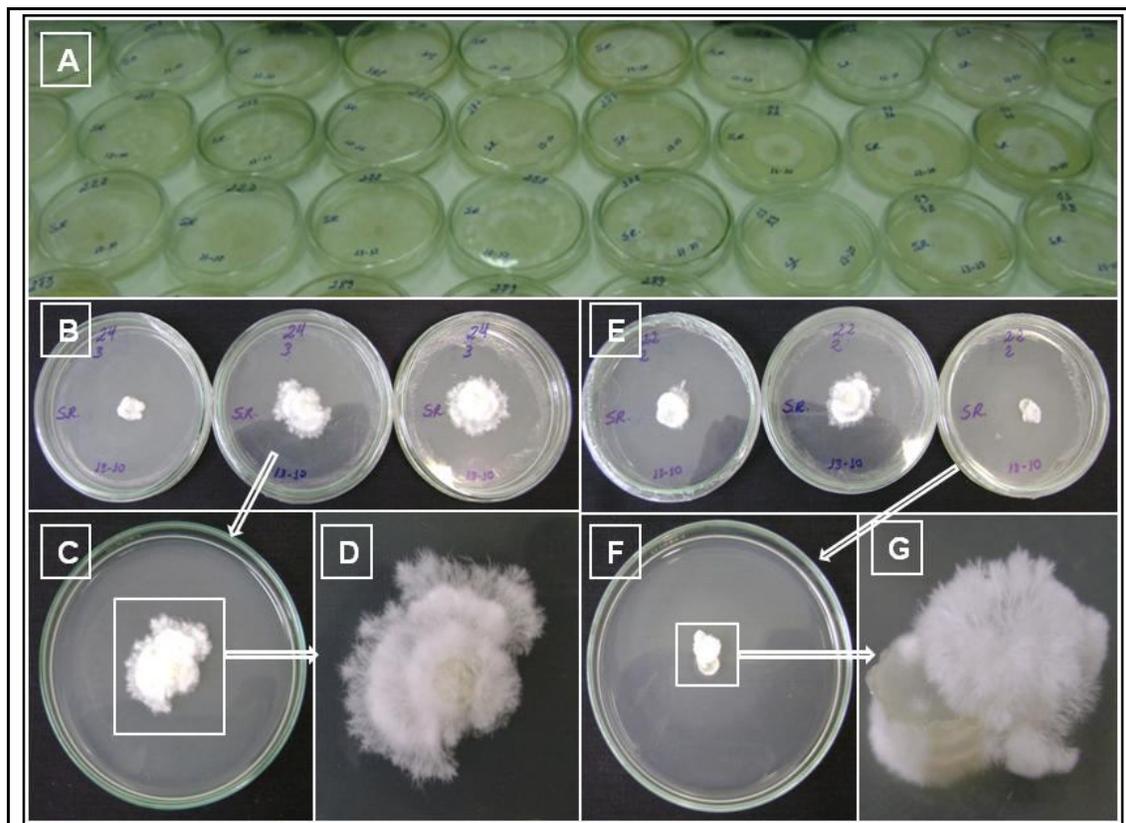
**Tabela 9:** Agrupamento de isolados de *Trichoderma* quanto à metabólitos não-voláteis em termos de inibição do crescimento do patógeno *Sclerotium rolfsii*, como sugerido pelo método do comprimento médio da Silhueta.

| <b>Isolado</b> | <b>Espécie</b>      | <b>Grupo</b> | <b>Diâmetro da colônia do patógeno em cm</b> | <b>Validação da Silhueta</b> |
|----------------|---------------------|--------------|--|------------------------------|
| CEN1070        |                     | 2            | 1,95 ± 1,14                                  | 0,85                         |
| CEN1077        |                     | 2            | 1,95 ± 1,14                                  | 0,85                         |
| CEN1072        |                     | 2            | 1,95 ± 1,14                                  | 0,85                         |
| CEN1074        |                     | 2            | 1,95 ± 1,14                                  | 0,85                         |
| CEN1073        |                     | 2            | 1,95 ± 1,14                                  | 0,85                         |
| CEN1079        |                     | 2            | 1,95 ± 1,14                                  | 0,85                         |
| CEN1080        |                     | 2            | 1,95 ± 1,14                                  | 0,85                         |
| CEN1076        |                     | 2            | 1,95 ± 1,14                                  | 0,85                         |
| CEN1078        |                     | 2            | 1,95 ± 1,14                                  | 0,85                         |
| CEN1071        |                     | 2            | 1,95 ± 1,14                                  | 0,85                         |
| CEN129         | <i>T. harzianum</i> | 2            | 1,95 ± 1,14                                  | 0,85                         |
| CEN126         | <i>T. harzianum</i> | 1            | 7,90 ± 1,21                                  | 0,77                         |
| CEN141         | <i>T. harzianum</i> | 1            | 7,90 ± 1,21                                  | 0,77                         |
| CEN170         | <i>T. harzianum</i> | 1            | 7,90 ± 1,21                                  | 0,77                         |

|            |                           |   |             |      |
|------------|---------------------------|---|-------------|------|
| CEN281     | <i>T. harzianum</i>       | 1 | 7,90 ± 1,21 | 0,77 |
| CEN288     | <i>T. harzianum</i>       | 1 | 7,90 ± 1,21 | 0,77 |
| CEN316     | <i>T. harzianum</i>       | 1 | 7,90 ± 1,21 | 0,77 |
| CEN209     | <i>T. pseudokoningii</i>  | 1 | 7,90 ± 1,21 | 0,77 |
| CEN287     | <i>T. harzianum</i>       | 1 | 7,90 ± 1,21 | 0,77 |
| CEN223     | <i>T. harzianum</i>       | 1 | 7,90 ± 1,21 | 0,77 |
| CEN1068    |                           | 1 | 7,90 ± 1,21 | 0,77 |
| CEN1069    |                           | 1 | 7,90 ± 1,21 | 0,77 |
| CEN169     | <i>T. harzianum</i>       | 1 | 7,90 ± 1,21 | 0,77 |
| Testemunha |                           | 1 | 7,90 ± 1,21 | 0,77 |
| CEN194     | <i>T. harzianum</i>       | 1 | 7,90 ± 1,21 | 0,77 |
| CEN273     |                           | 1 | 7,90 ± 1,21 | 0,77 |
| CEN290     | <i>T. harzianum</i>       | 1 | 7,90 ± 1,21 | 0,77 |
| CEN155     | <i>T. harzianum</i>       | 1 | 7,90 ± 1,21 | 0,77 |
| CEN219     |                           | 1 | 7,90 ± 1,21 | 0,77 |
| CEN162     | <i>T. asperellum</i>      | 1 | 7,90 ± 1,21 | 0,77 |
| CEN161     | <i>T. asperellum</i>      | 1 | 7,90 ± 1,21 | 0,77 |
| CEN1075    |                           | 1 | 7,90 ± 1,21 | 0,77 |
| CEN201     | <i>T. harzianum</i>       | 1 | 7,90 ± 1,21 | 0,77 |
| CEN289     | <i>T. harzianum</i>       | 1 | 7,90 ± 1,21 | 0,77 |
| CEN280     | <i>T. longibrachiatum</i> | 1 | 7,90 ± 1,21 | 0,77 |

Compondo o grupo 2 com os melhores resultados, aparecem os isolados: CEN1070, CEN1077, CEN1072, CEN1074, CEN1073, CEN1079, CEN1080, CEN1076, CEN1078, CEN1071 e CEN129. Os isolados do grupo 1, que compreendem CEN126, CEN141,

CEN170, CEN281, CEN288, CEN316, CEN209, CEN287, CEN223, CEN1068, CEN1069, CEN169, Testemunha, CEN194, CEN273, CEN290, CEN155, CEN219, CEN162, CEN161, CEN1075, CEN201, CEN289 e CEN280, não apresentaram produção de metabólitos solúveis com ação inibitória do crescimento micelial do patógeno.



**Figura 15:** Atividade de metabólitos não-voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. contra *Sclerotium rolfii*. **A** – Imagem do ensaio; **B** e **C** – Colônias de *S. rolfii* apresentando redução do crescimento sob ação de metabólitos do isolado CEN1079 de *Trichoderma*; **D** – Imagem aproximada de colônia com crescimento irregular e setorização C; **E** e **F** – Crescimento irregular e setorização de colônias do patógeno sob ação de metabólitos solúveis produzidos pelo isolado CEN1077 (*Trichoderma* sp.) e **G** – Imagem aproximada de colônia do patógeno sob efeito de metabólitos produzidos por *Trichoderma*.

De acordo com os resultados obtidos, há inibição do crescimento micelial dos patógenos devido a produção de compostos tóxicos por isolados de *Trichoderma*. Tais

metabólitos acarretaram crescimento reduzido das colônias, que se apresentaram menos densas e com deformações. Alguns desses compostos já foram identificados como nos trabalhos de Weidling (1934), onde antibióticos como giotoxina e viridina foram identificados; na seqüência, Dennis & Webster (1971) demonstraram a capacidade de alguns isolados de *Trichodema* produzirem compostos voláteis e não voláteis com efeito inibitório no desenvolvimento de vários fungos.

Outros trabalhos nessa linha de pesquisa com resultados semelhantes foram conduzidos por Smith *et al.* (1990) e Chambers & Scott (1995). A eficiência de metabólitos tóxicos produzidos por espécies de *Trichoderma* foi também evidenciada em trabalhos como de Reis *et al.* (1995) e Aparecido *et al.* (1999) onde foi demonstrado existir difusão desses metabólitos sobre hifas de muitos outros patógenos. Os isolados de *Trichoderma* testados neste ensaio foram bastante promissores no controle de *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*. Dentre os efeitos causados pelos antibióticos, merecem destaque a redução ou paralisação do crescimento e esporulação, redução da germinação de esporos, deformação de hifas e endólise (Campbell, 1989).

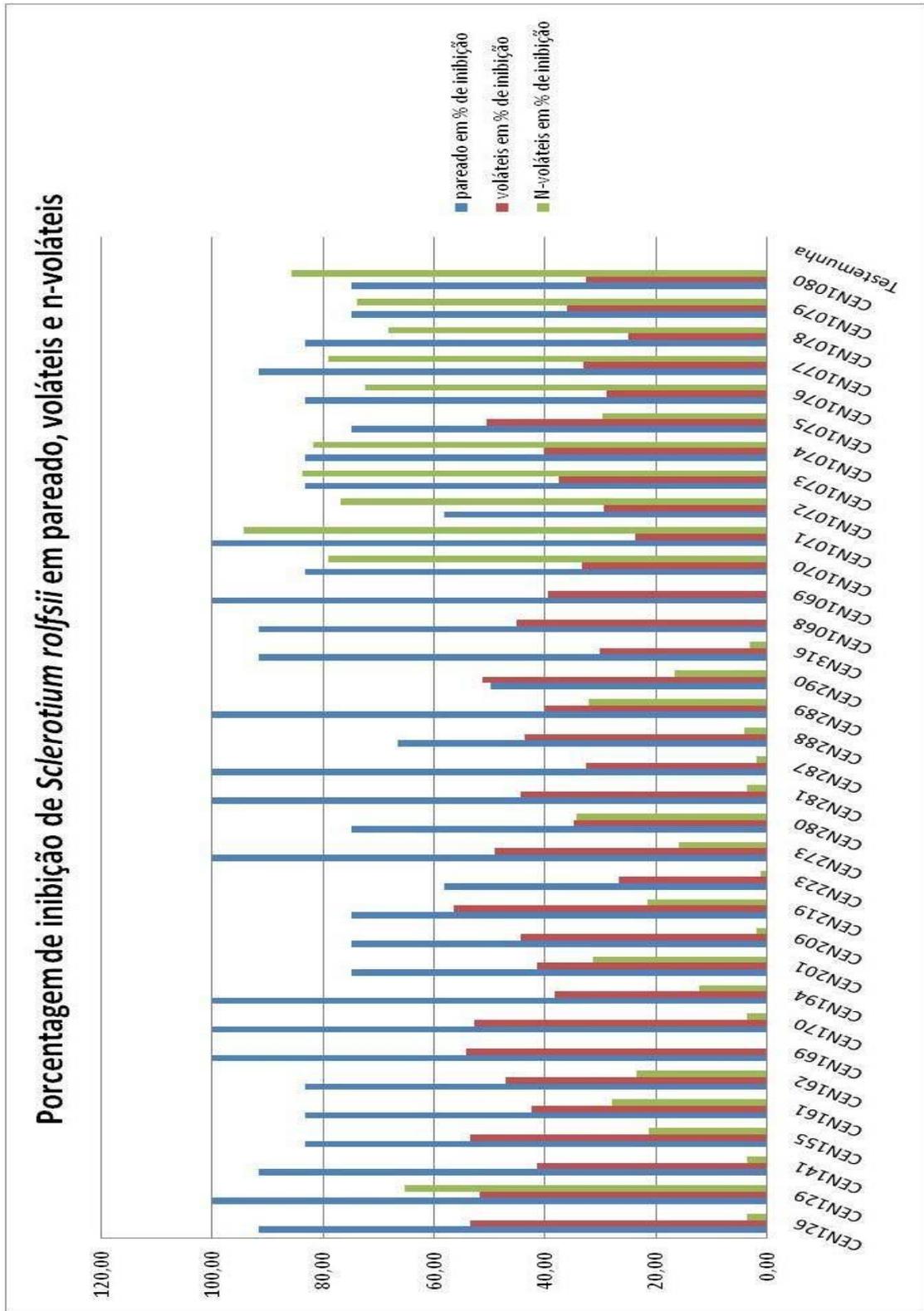
**Tabela 10:** Porcentagem de inibição de colônias de *Sclerotium rolfsii* (CEN216) para cada um dos isolados de *Trichoderma* testados.

| <b>Isolados</b> | <b>pareado em % de inibição</b> | <b>voláteis em % de inibição</b> | <b>N-voláteis em % de inibição</b> |
|-----------------|---------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| CEN126          | 91,67                           | 53,70                            | 3,70                               |
| CEN129          | 100,00                          | 51,85                            | 65,37                              |
| CEN141          | 91,67                           | 41,67                            | 3,70                               |
| CEN155          | 83,33                           | 53,70                            | 21,30                              |
| CEN161          | 83,33                           | 42,59                            | 28,15                              |

|        |        |       |       |
|--------|--------|-------|-------|
| CEN162 | 83,33  | 47,22 | 23,52 |
| CEN169 | 100,00 | 54,44 | 0,00  |
| CEN170 | 100,00 | 52,96 | 3,70  |
| CEN194 | 100,00 | 38,33 | 12,41 |
| CEN201 | 75,00  | 41,67 | 31,48 |
| CEN209 | 75,00  | 44,44 | 1,85  |
| CEN219 | 75,00  | 56,67 | 21,67 |
| CEN223 | 58,33  | 26,85 | 1,11  |
| CEN273 | 100,00 | 49,26 | 15,93 |
| CEN280 | 75,00  | 34,81 | 34,44 |
| CEN281 | 100,00 | 44,63 | 3,70  |
| CEN287 | 100,00 | 32,78 | 1,85  |
| CEN288 | 66,67  | 43,89 | 4,07  |
| CEN289 | 100,00 | 40,19 | 32,22 |
| CEN290 | 50,00  | 51,48 | 16,67 |
| CEN316 | 91,67  | 30,19 | 3,15  |
| 03-3A  | 91,67  | 45,19 | 0,00  |
| 03-3B  | 100,00 | 39,63 | 0,00  |
| 04-1A  | 83,33  | 33,33 | 79,26 |
| 04-1B  | 100,00 | 23,89 | 94,44 |
| 17-1A  | 58,33  | 29,44 | 77,04 |
| 17-1B  | 83,33  | 37,59 | 83,89 |
| 17-02  | 83,33  | 40,37 | 81,85 |
| 17-3A  | 75,00  | 50,56 | 29,81 |
| 17-3B  | 83,33  | 29,07 | 72,59 |

|            |       |       |       |
|------------|-------|-------|-------|
| 22-02      | 91,67 | 33,15 | 79,07 |
| 24-02      | 83,33 | 25,07 | 68,33 |
| 24-03      | 75,00 | 36,11 | 74,07 |
| 38-01      | 75,00 | 32,59 | 85,74 |
| Testemunha | 0,00  | 0,00  | 0,00  |

---



**Figura 16:** Inibição de *Sclerotium rolfsii* por isolados de *Trichoderma* em testes de pareado de culturas e produção de metabólitos voláteis e não-voláteis.

Como foi mencionado anteriormente, ensaios em casa de vegetação com grande número de isolados do antagonista demandam muito tempo e trabalho. Assim, os ensaios *in vitro* até aqui realizados possibilitaram uma pré-seleção de isolados para outras etapas do trabalho. Dessa forma, os isolados CEN223, CEN194, CEN169 CEN209, CEN290, CEN316 e CEN288 não foram considerados para os ensaios de casa de vegetação.

Entretanto, os isolados CEN141, CEN170, CEN1068, CEN1069, CEN161 e CEN173, devido à ineficiência de esporulação quando cultivados em substrato artificial, também desfavorecem a avaliação *in vivo*. Esporulação abundante é uma característica importante quando a meta é o desenvolvimento de biofungicidas à base de *Trichoderma*, já que os esporos constituem princípio ativo desses produtos.

Por fim, o isolado CEN280 identificado como pertencente à espécie *T. longibrachiatum*, tem sido relatado como patógeno oportunista em humanos, causando infecções no trato respiratório de pessoas com sistema imunológico debilitado (Loeppky *et al.*, 1983; Munoz *et al.*, 1997; Richter *et al.*, 1999). Portanto, não deve ser recomendado para uso em programas de controle biológico.

### **Efeito de *Trichoderma* spp. na germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de tomate**

A Tabela 11 apresenta a média e seu desvio padrão para o teste de germinação ao longo dos dias observados para cada isolado.

**Tabela 11:** Número médio de sementes de tomate germinadas após tratamento com *Trichoderma* spp. ao longo do tempo (dias) de incubação.

| Isolados | Tempo (dias) |              |              |              |
|----------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|          | 2            | 4            | 6            | 8            |
| CEN1070  | 16.00 ± 2.00 | 23.00 ± 1.00 | 23.33 ± 0.58 | 23.33 ± 0.58 |
| CEN1071  | 17.67 ± 3.06 | 22.00 ± 1.00 | 23.33 ± 1.53 | 23.67 ± 1.53 |
| CEN126   | 15.67 ± 2.89 | 24.33 ± 0.58 | 23.67 ± 0.58 | 23.67 ± 0.58 |
| CEN129   | 14.00 ± 2.65 | 22.67 ± 0.58 | 23.00 ± 0.00 | 23.00 ± 0.00 |
| CEN155   | 18.00 ± 3.61 | 23.33 ± 0.58 | 23.33 ± 0.58 | 23.33 ± 0.58 |
| CEN161   | 18.00 ± 1.73 | 24.00 ± 1.00 | 24.33 ± 1.15 | 24.67 ± 0.58 |
| CEN162   | 14.33 ± 4.93 | 21.33 ± 2.08 | 22.00 ± 2.65 | 22.00 ± 2.65 |
| CEN1072  | 15.67 ± 1.15 | 23.67 ± 1.53 | 23.67 ± 1.53 | 23.67 ± 1.53 |
| CEN1073  | 16.00 ± 1.00 | 23.00 ± 1.00 | 23.67 ± 1.53 | 23.67 ± 1.53 |
| CEN1074  | 15.67 ± 3.06 | 23.67 ± 0.58 | 24.00 ± 1.00 | 24.00 ± 1.00 |
| CEN1075  | 17.33 ± 3.79 | 23.67 ± 1.15 | 24.33 ± 1.15 | 24.33 ± 1.15 |
| CEN1076  | 13.67 ± 2.08 | 23.67 ± 1.53 | 23.67 ± 1.53 | 23.67 ± 1.53 |
| CEN201   | 15.33 ± 1.53 | 22.67 ± 0.58 | 22.67 ± 0.58 | 23.00 ± 0.00 |
| CEN219   | 16.33 ± 0.58 | 23.33 ± 0.58 | 23.33 ± 0.58 | 24.00 ± 1.00 |

|         |              |              |              |              |
|---------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| CEN1077 | 13.67 ± 3.51 | 23.33 ± 0.58 | 23.67 ± 1.15 | 23.67 ± 1.15 |
| CEN1078 | 16.67 ± 2.89 | 22.67 ± 1.15 | 23.33 ± 1.53 | 23.33 ± 1.53 |
| CEN1079 | 14.67 ± 3.21 | 23.67 ± 0.58 | 23.67 ± 0.58 | 23.67 ± 0.58 |
| CEN273  | 13.67 ± 1.15 | 23.00 ± 1.73 | 23.00 ± 1.73 | 23.33 ± 1.53 |
| CEN281  | 18.33 ± 3.79 | 23.67 ± 1.53 | 24.33 ± 0.58 | 24.67 ± 0.58 |
| CEN287  | 15.67 ± 2.31 | 23.33 ± 0.58 | 23.67 ± 1.15 | 24.00 ± 1.00 |
| CEN289  | 16.67 ± 2.31 | 22.33 ± 1.15 | 23.00 ± 0.00 | 23.00 ± 0.00 |
| CEN1080 | 14.33 ± 1.53 | 23.00 ± 1.00 | 23.33 ± 0.58 | 23.33 ± 0.58 |
| Test.   | 16.00 ± 2.00 | 23.33 ± 2.08 | 23.33 ± 1.53 | 23.67 ± 1.53 |

**Tabela 12:** Agrupamento de isolados de *Trichoderma* com base no teste de germinação, baseado no método do comprimento médio da Silhueta.

| Isolado | Espécie              | Grupo | Número de plantas germinadas | Validação da Silhueta |
|---------|----------------------|-------|------------------------------|-----------------------|
| CEN161  | <i>T. asperellum</i> | 3     | 22,6 ± 3,20                  | 0,75                  |
| CEN281  | <i>T. harzianum</i>  | 3     | 22,6 ± 3,20                  | 0,75                  |
| CEN1075 |                      | 3     | 22,6 ± 3,20                  | 0,75                  |
| CEN1071 |                      | 1     | 21,7 ± 3,48                  | 0,66                  |
| CEN1072 |                      | 1     | 21,7 ± 3,48                  | 0,85                  |
| CEN287  | <i>T. harzianum</i>  | 1     | 21,7 ± 3,48                  | 0,85                  |
| CEN219  |                      | 1     | 21,7 ± 3,48                  | 0,85                  |

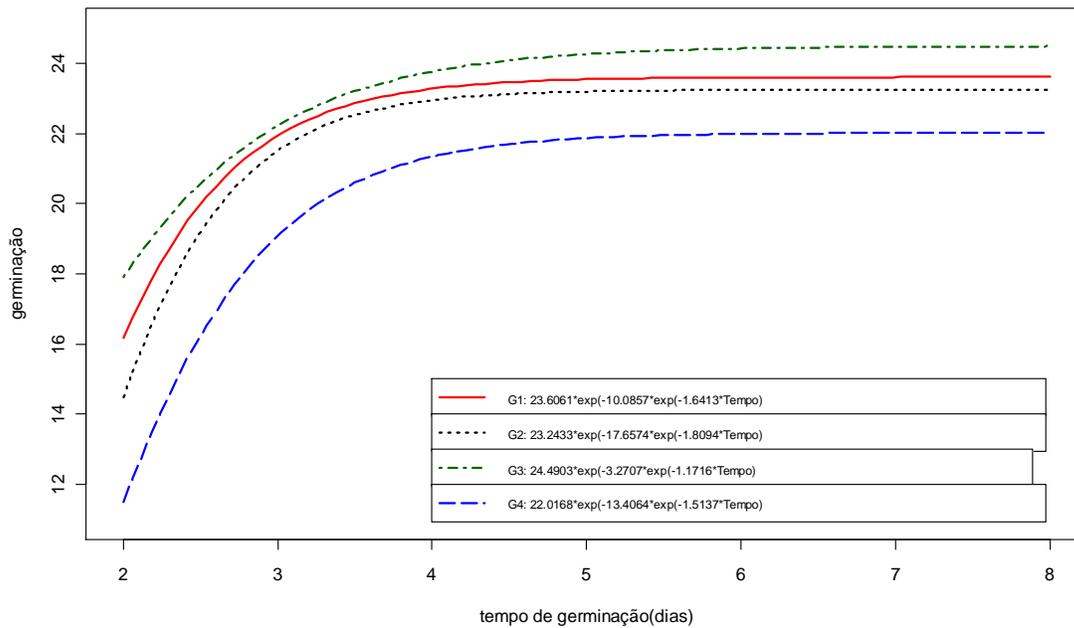
|            |                      |   |             |      |
|------------|----------------------|---|-------------|------|
| CEN1073    |                      | 1 | 21,7 ± 3,48 | 0,85 |
| Testemunha |                      | 1 | 21,7 ± 3,48 | 0,85 |
| CEN126     | <i>T. harzianum</i>  | 1 | 21,7 ± 3,48 | 0,85 |
| CEN1074    |                      | 1 | 21,7 ± 3,48 | 0,85 |
| CEN1078    |                      | 1 | 21,7 ± 3,48 | 0,85 |
| CEN155     | <i>T. harzianum</i>  | 1 | 21,7 ± 3,48 | 0,85 |
| CEN1070    |                      | 1 | 21,7 ± 3,48 | 0,85 |
| CEN1079    |                      | 1 | 21,7 ± 3,48 | 0,85 |
| CEN201     | <i>T. harzianum</i>  | 2 | 21,0 ± 4,00 | 0,56 |
| CEN1080    |                      | 2 | 21,0 ± 4,00 | 0,56 |
| CEN273     |                      | 2 | 21,0 ± 4,00 | 0,56 |
| CEN1077    |                      | 2 | 21,0 ± 4,00 | 0,56 |
| CEN129     | <i>T. harzianum</i>  | 2 | 21,0 ± 4,00 | 0,56 |
| CEN1076    |                      | 2 | 21,0 ± 4,00 | 0,56 |
| CEN289     | <i>T. harzianum</i>  | 2 | 21,0 ± 4,00 | 0,56 |
| CEN162     | <i>T. asperellum</i> | 4 | 19,9 ± 4,38 | 0,00 |

Face ao número limitado de repetições (3), não foi possível determinar a influência do período de incubação das sementes na germinação para cada isolado, separadamente. Para

resolver esse impasse, os dados experimentais foram divididos em grupos heterogêneos entre si, de acordo com o método do comprimento médio da silhueta, conforme mostra a Tabela 12.

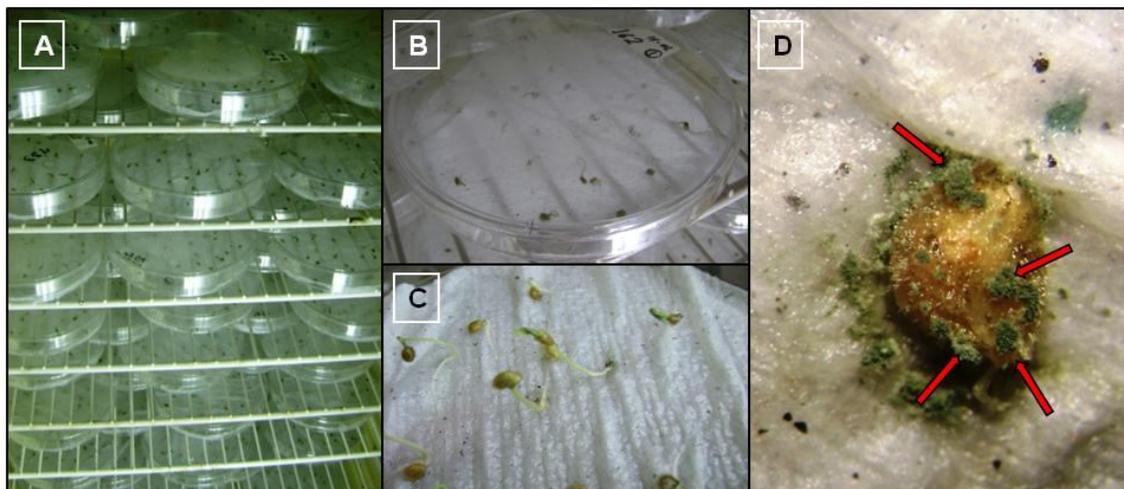
De acordo com a Tabela 12, os isolados de *Trichoderma* estudados foram divididos em quatro grupos com base no método estatístico utilizado, e o agrupamento que se mostrou com melhor taxa de germinação de sementes foi o grupo 3, constituídos pelos isolados: CEN161, CEN281 e CEN1075. A seguir, apresenta-se o grupo 1, com os isolados: CEN1071, CEN1072, CEN287, CEN219, CEN1073, Testemunha, CEN126, CEN1074, CEN1078, CEN155, CEN1070 e CEN1079, na sequência tem-se o grupo 2 acomodando os isolados: CEN201, CEN1080, CEN273, CEN1077, CEN129, CEN1076 e CEN289, e por fim o grupo 4 que apresentou os menores índices de germinação e é composto por apenas um isolado (CEN162). Nota ainda que os grupos 2 e 4 (que juntos englobam 8 isolados) apresentaram valores de taxa de germinação inferiores aos valores da testemunha mostrando que os isolados de *Trichoderma* dos outros dois grupos não interferem negativamente no número de sementes de tomate germinadas.

Para cada um dos grupos indicados acima, estudou-se a interferência do tempo na germinação, isto é, com base na taxa máxima de germinação de cada grupo, qual o tempo médio que esses grupos gastariam para que se chegasse ao máximo de germinação. Com isso, analisando-se a Figura 17, é possível inferir que o grupo 3 foi o que alcançou maior número de sementes germinadas, em contrapartida, apresentou o maior tempo de germinação; o grupo 1 apresentou tanto o segundo maior número de sementes germinadas com o segundo melhor tempo de germinação; o grupo 2, apesar de ter ficado em terceiro lugar em número de sementes germinadas, apresentou-se com o melhor tempo de germinação; em último lugar na escala de sementes germinadas, tem-se o grupo 4, também com o terceiro melhor tempo de germinação.



**Figura 17:** Relação entre a germinação de sementes de tomate tratadas com *Trichoderma* spp. e o tempo em dias, segundo o modelo não linear de Gompertz.

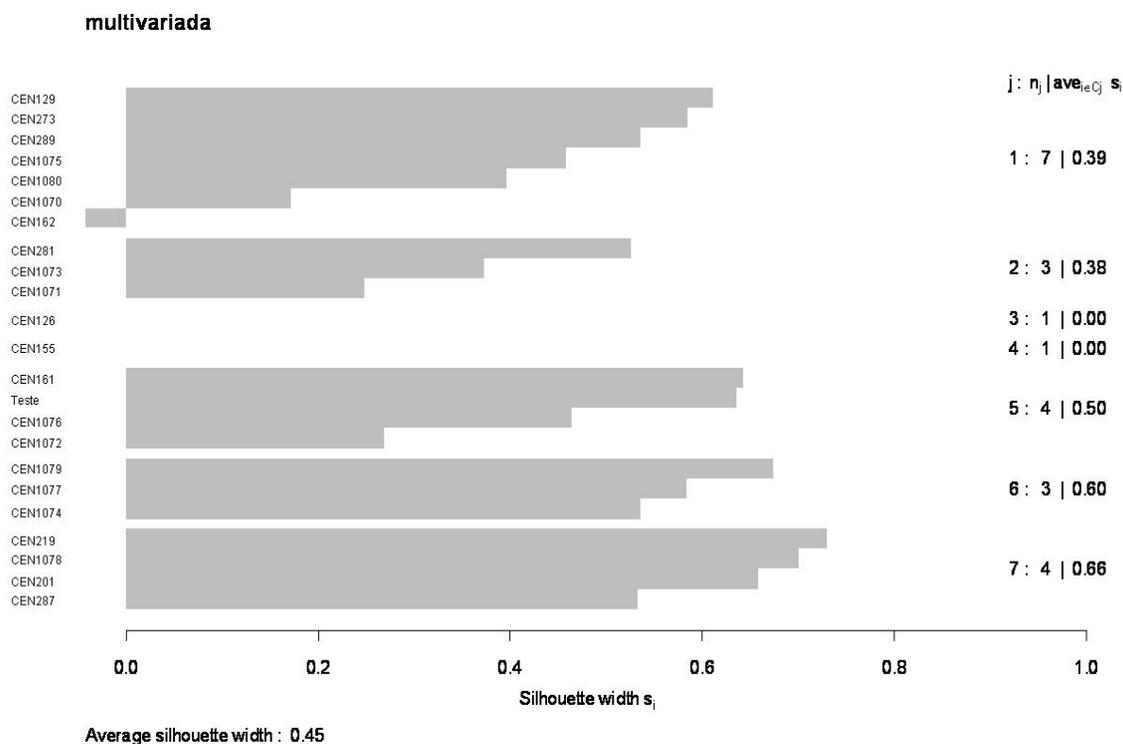
Um dos problemas ao tratar sementes com agentes de biocontrole é que estes podem eventualmente afetar a germinação (Lucon, 2009). Neste trabalho, a porcentagem de germinação normal foi maior do que a germinação anormal e sementes mortas, portanto, os isolados avaliados não apresentaram danos às sementes quando comparados a testemunha, podendo ser viabilizado o uso de alguns destes para o tratamento de sementes de tomate.



**Figura 18:** A – Placas gerbox em incubadora com ensaio de germinação de sementes de tomate tratadas com *Trichoderma* spp.; B- Unidade experimental do ensaio; C- Sementes em início de germinação sobre papel filtro e D- Semente de tomate com superfície colonizada em virtude do tratamento das sementes com *Trichoderma* spp.

### **Comprimento da raiz, hipocótilo e número de plantas com lesão**

Ao tentar separar grupos considerando as medidas do comprimento da raiz, hipocótilo e número de plantas com lesão analisadas conjuntamente, o método do comprimento médio da silhueta mostrou não haver distinção ótima de grupos heterogêneos entre si, pois o mesmo apresentou-se com valor da silhueta igual a 0.45, que é um valor abaixo do mínimo (0.5) para que se tenha segurança na utilização desse método (Figura 19). Assim, a melhor maneira para resolver esse impasse foi analisar separadamente cada uma dessas três medidas, isto é, fazer a avaliação de cada uma das variáveis em questão separadamente.



**Figura 19:** Agrupamento de isolados de *Trichoderma* quanto ao comprimento da raiz, hipocótilo e número de plantas com lesão induzidas através do tratamento de sementes de tomate com o antagonista, baseado no método do comprimento médio da silhueta.

### Comprimento da raiz

Com base no método de comprimento da silhueta, oito grupos de isolados foram formados, conforme ilustra a Tabela 13. O comprimento médio da silhueta foi de 0.68, respeitando-se o mínimo para uma boa separação dos grupos de isolados.

**Tabela 13:** Agrupamento de isolados de *Trichoderma* quanto ao comprimento da raiz, na germinação de sementes de tomate tratadas com o antagonista, baseado no método do comprimento médio da Silhueta.

| Isolado | Espécie             | Grupo | Comprimento em centímetros | Validação da Silhueta |
|---------|---------------------|-------|----------------------------|-----------------------|
| CEN129  | <i>T. harzianum</i> | 3     | 8,96 ± 1,39                | 0,34                  |

|            |                      |   |             |      |
|------------|----------------------|---|-------------|------|
| CEN1075    |                      | 3 | 8,96 ± 1,39 | 0,34 |
| CEN289     | <i>T. harzianum</i>  | 3 | 8,96 ± 1,39 | 0,34 |
| CEN1071    |                      | 2 | 8,48 ± 0,74 | 0,78 |
| CEN223     | <i>T. harzianum</i>  | 2 | 8,48 ± 0,74 | 0,78 |
| CEN1072    |                      | 2 | 8,48 ± 0,74 | 0,78 |
| CEN281     | <i>T. harzianum</i>  | 1 | 8,28 ± 0,97 | 0,63 |
| CEN1080    |                      | 1 | 8,28 ± 0,97 | 0,63 |
| CEN126     | <i>T. harzianum</i>  | 1 | 8,28 ± 0,97 | 0,63 |
| CEN1070    |                      | 1 | 8,28 ± 0,97 | 0,63 |
| CEN1073    |                      | 6 | 7,86 ± 1,08 | 0,75 |
| CEN162     | <i>T. asperellum</i> | 6 | 7,86 ± 1,08 | 0,75 |
| CEN287     | <i>T. harzianum</i>  | 5 | 7,56 ± 0,56 | 0,56 |
| CEN161     | <i>T. asperellum</i> | 5 | 7,56 ± 0,56 | 0,56 |
| Testemunha |                      | 5 | 7,56 ± 0,56 | 0,56 |
| CEN1074    |                      | 7 | 7,20 ± 0,63 | 0,68 |
| CEN201     | <i>T. harzianum</i>  | 7 | 7,20 ± 0,63 | 0,68 |
| CEN1076    |                      | 7 | 7,20 ± 0,63 | 0,68 |
| CEN219     |                      | 8 | 6,84 ± 0,88 | 0,87 |
| CEN1079    |                      | 8 | 6,84 ± 0,88 | 0,87 |
| CEN1078    |                      | 8 | 6,84 ± 0,88 | 0,87 |
| CEN155     | <i>T. harzianum</i>  | 4 | 6,51 ± 0,55 | 0,92 |
| CEN1077    |                      | 4 | 6,51 ± 0,55 | 0,92 |

De acordo com a Tabela 13, o grupo que apresentou maior crescimento de raiz foi o grupo 3, constituído pelos isolados: CEN129, CEN1075 e CEN289; em seguida, apresentam-se em ordem decrescente de comprimento médio de raízes: grupo 2 (CEN1071, CEN273 e CEN1072), grupo 1 (CEN281, CEN1080, CEN126 e CEN1070), grupo 6 (CEN1073 e CEN162), grupo 5 (CEN287, CEN161 e Testemunha), grupo 7 (CEN1074, CEN201 e CEN1076), grupo 8 (CEN219, CEN1079 e CEN1078); por fim, como menor comprimento de raiz o grupo 4 (CEN155 e CEN1077).

Ao avaliar o comprimento de radícula, observou-se que sementes tratadas com os isolados dos grupos 3, 2, 1, 6 e 5 foram melhores ou não diferiram estatisticamente dos tratamentos testemunhas (Tabela 13), apresentando satisfatório desenvolvimento radicular. Resultados diferentes foram obtidos em trabalho realizado por Ethur (2006), ao avaliar o desenvolvimento de plântulas de pepineiro. De acordo com esse autor, isolados de *Trichoderma* inibiram a germinação e o desenvolvimento não apenas da radícula, mas também do hipocótilo.

Neste trabalho, o desenvolvimento radicular das plântulas mostrou-se superior ao desenvolvimento do hipocótilo, em todos os tratamentos, evidenciando maior indução no crescimento radicular. Esse fato pode ser justificado pelo possível efeito de isolados de *Trichoderma* através da produção de reguladores de crescimento como os jasmonatos, os quais podem atuar na germinação de sementes e ou no desenvolvimento das raízes (Baker & Cook, 1974).

### **Comprimento do hipocótilo**

Com base no método de comprimento da silhueta, os isolados de *Trichoderma* estudados foram divididos em cinco grupos, conforme ilustrado na Tabela 14. O comprimento médio da silhueta foi de 0.73, o que indica uma boa separação dos grupos de isolados.

**Tabela 14:** Agrupamento de isolados de *Trichoderma* quanto ao comprimento do hipocótilo de plântulas de tomate, oriundas de sementes tratadas com o antagonista, baseado no método do comprimento médio da Silhueta.

| <b>Isolado</b> | <b>Espécie</b>       | <b>Grupo</b> | <b>Comprimento em centímetros</b> | <b>Validação da Silhueta</b> |
|----------------|----------------------|--------------|-----------------------------------|------------------------------|
| CEN1071        |                      | 1            | 4,21 ± 0,31                       | 0,74                         |
| CEN1070        |                      | 1            | 4,21 ± 0,31                       | 0,74                         |
| CEN289         | <i>T. harzianum</i>  | 5            | 3,74 ± 0,22                       | 0,58                         |
| CEN1075        |                      | 5            | 3,74 ± 0,22                       | 0,58                         |
| CEN1088        |                      | 5            | 3,74 ± 0,22                       | 0,58                         |
| CEN1074        |                      | 5            | 3,74 ± 0,22                       | 0,58                         |
| CEN1080        |                      | 5            | 3,74 ± 0,22                       | 0,58                         |
| CEN1077        |                      | 5            | 3,74 ± 0,22                       | 0,58                         |
| CEN155         | <i>T. harzianum</i>  | 4            | 3,56 ± 0,19                       | 0,79                         |
| Testemunha     |                      | 4            | 3,56 ± 0,19                       | 0,79                         |
| CEN287         | <i>T. harzianum</i>  | 4            | 3,56 ± 0,19                       | 0,79                         |
| CEN281         | <i>T. harzianum</i>  | 4            | 3,56 ± 0,19                       | 0,79                         |
| CEN1079        |                      | 4            | 3,56 ± 0,19                       | 0,79                         |
| CEN219         |                      | 4            | 3,56 ± 0,19                       | 0,79                         |
| CEN273         |                      | 3            | 3,40 ± 0,27                       | 0,75                         |
| CEN1073        |                      | 3            | 3,40 ± 0,27                       | 0,75                         |
| CEN161         | <i>T. asperellum</i> | 3            | 3,40 ± 0,27                       | 0,75                         |
| CEN1072        |                      | 3            | 3,40 ± 0,27                       | 0,75                         |
| CEN1076        |                      | 3            | 3,40 ± 0,27                       | 0,75                         |
| CEN201         | <i>T. harzianum</i>  | 3            | 3,40 ± 0,27                       | 0,75                         |

|        |                      |   |             |      |
|--------|----------------------|---|-------------|------|
| CEN129 | <i>T. harzianum</i>  | 3 | 3,40 ± 0,27 | 0,75 |
| CEN162 | <i>T. asperellum</i> | 2 | 3,22 ± 0,46 | 0,96 |
| CEN126 | <i>T. harzianum</i>  | 2 | 3,22 ± 0,46 | 0,96 |

A Tabela 14 apresenta o agrupamento dos isolados de *Trichoderma*. No grupo 1, encontram-se os isolados CEN1071 e CEN1070, os quais proporcionaram maior comprimento de hipocótilo, seguido do grupo 5 (CEN289, CEN1075, CEN1078, CEN1074, CEN1080 e CEN1077), grupo 4 (CEN155, Testemunha, CEN287, CEN281, CEN1079 e CEN219), grupo 3 (CEN273, CEN1073, CEN161, CEN1072, CEN1076, CEN201 e CEN129) e, por fim, o grupo 2 (CEN162 e CEN126) cujas plântulas apresentaram menores comprimentos de hipocótilo.

O tratamento com o isolados pertencentes aos grupos 1, 5 e 4 apresentaram maiores médias de comprimento do hipocótilo, diferindo significativamente de todos os outros tratamentos (Tabela 14).

Pode-se relacionar a promoção no crescimento das plântulas à produção de hormônios, disponibilidade de nutrientes do solo ou matéria orgânica e aumento na captação ou translocação de minerais (Kleifeld & Chet, 1992). Porém nos resultados apresentados acima, o aumento do hipocótilo provavelmente está mais relacionado à produção de fitohormônios, os quais podem causar alterações na rota do metabolismo e crescimento de plântulas, já que o ensaio foi realizado sobre papel de filtro em caixa tipo gerbox, sem a presença de nutrientes externos que pudessem favorecer as plantas. Em trabalhos semelhantes realizados com pepineiros, os autores Yedidia *et al.*, (1999) e Ethur (2006) constataram que o estímulo do crescimento realizado por isolado de *T. harzianum* em meio hidropônico estava na interação formada entre fungo e planta.

## Número de plântulas com lesões

Pelo método de análise de comprimento da silhueta, os isolados foram separados em nove grupos distintos conforme ilustra a Tabela 15. O comprimento médio da silhueta foi de 0.7 indicando uma boa separação dos grupos de isolados.

**Tabela 15:** Agrupamento de isolados de *Trichoderma* quanto ao número de plântulas de tomate com lesão, resultantes do tratamento de sementes com o antagonista, baseado no método do comprimento médio da Silhueta.

| Isolado    | Espécie              | Grupo | Número de plantas com lesão | Validação da Silhueta |
|------------|----------------------|-------|-----------------------------|-----------------------|
| CEN126     | <i>T. harzianum</i>  | 3     | 1,67 ± 1,15                 | 0,00                  |
| CEN155     | <i>T. harzianum</i>  | 5     | 2,33 ± 0,58                 | 0,00                  |
| CEN161     | <i>T. asperellum</i> | 6     | 3,67 ± 2,58                 | 1,00                  |
| CEN1076    |                      | 6     | 3,67 ± 2,58                 | 1,00                  |
| CEN1072    |                      | 8     | 4,00 ± 1,79                 | 1,00                  |
| Testemunha |                      | 8     | 4,00 ± 1,79                 | 1,00                  |
| CEN1070    |                      | 1     | 4,83 ± 0,75                 | 0,25                  |
| CEN289     | <i>T. harzianum</i>  | 1     | 4,83 ± 0,75                 | 0,25                  |
| CEN129     | <i>T. harzianum</i>  | 4     | 5,33 ± 1,44                 | 1,00                  |
| CEN1074    |                      | 4     | 5,33 ± 1,44                 | 1,00                  |
| CEN1079    |                      | 4     | 5,33 ± 1,44                 | 1,00                  |
| CEN273     |                      | 4     | 5,33 ± 1,44                 | 1,00                  |
| CEN162     | <i>T. asperellum</i> | 7     | 5,75 ± 2,86                 | 0,63                  |
| CEN1075    |                      | 7     | 5,75 ± 2,86                 | 0,63                  |
| CEN1080    |                      | 7     | 5,75 ± 2,86                 | 0,63                  |

|         |                     |   |             |      |
|---------|---------------------|---|-------------|------|
| CEN1077 |                     | 7 | 5,75 ± 2,86 | 0,63 |
| CEN281  | <i>T. harzianum</i> | 9 | 6,83 ± 2,23 | 0,65 |
| CEN1073 |                     | 9 | 6,83 ± 2,23 | 0,65 |
| CEN201  | <i>T. harzianum</i> | 2 | 8,00 ± 1,51 | 0,76 |
| CEN219  |                     | 2 | 8,00 ± 1,51 | 0,76 |
| CEN1078 |                     | 2 | 8,00 ± 1,51 | 0,76 |
| CEN287  | <i>T. harzianum</i> | 2 | 8,00 ± 1,51 | 0,76 |
| CEN1071 |                     | 2 | 8,00 ± 1,51 | 0,76 |

O agrupamento de isolados que se apresentou com menor índice de plantas com lesões foi o grupo 3, representado pelo isolado CEN126, e na seqüência, em número crescente de plantas lesionadas, o grupo 5 (CEN155), o grupo 6 (CEN161 e CEN1076), o grupo 8 (CEN1072 e Testemunha), o grupo 1 (CEN1070 e CEN289), o grupo 4 (CEN129, CEN1074, CEN1079 e CEN273), o grupo 7 (CEN162, CEN1075, CEN1080 e CEN1077), o grupo 9 (CEN281 e CEN1073) e, por último, com os maiores números de plantas lesionadas o grupo 2 (CEN201, CEN219, CEN1078, CEN287 e CEN1071). Incontestavelmente todos os grupos de isolados apresentaram plantas com lesões, o que condiz com o trabalho realizado por Ethur (2006), onde este autor observa plantas de tomate com lesões ao serem tratadas com isolados de *Trichoderma*.



**Figura 20:** **A** e **C** – Sementes de tomate germinadas, apresentando tegumento colonizado por *Trichoderma* spp.; **B** – Plântula de tomate da imagem ‘A’ onde foi retirado o tegumento da semente, exibindo cotilédones lesionados e **D** – Plântula de tomate da imagem ‘C’ com um pequeno fragmento de colônia de *Trichoderma* spp. na base do cotilédone e tegumento ao lado, colonizado por *Trichoderma* spp.

Ethur (2006), ao estudar a germinação de sementes de tomate, obteve resultados muito semelhantes aos obtidos neste trabalho. *Trichoderma* spp. pode causar apodrecimento de sementes de tomate, se as mesmas estiverem em contato com o agente de biocontrole sob condições de umidade elevada, propiciando o rápido desenvolvimento sobre o envoltório das sementes (Figura 20). Chamberlain & Gray (1974) postularam que certas espécies de *Trichoderma* sejam capazes de reduzir a germinação das sementes, produzindo plantas jovens raquíticas e necroses em hipocótilo e raízes.

## Promoção do Crescimento em Tomate

Pelo método de análise de comprimento de silhueta, os isolados de *Trichoderma* foram reunidos em dois agrupamentos distintos conforme ilustra a Tabela 16. O comprimento médio da silhueta foi de 0.59 indicando uma boa separação dos grupos de isolados.

**Tabela 16:** Agrupamento dos isolados de *Trichoderma* quanto ao comprimento de raízes de plântulas de tomate, resultantes de sementes tratadas com o antagonista, com base no método do comprimento médio da Silhueta.

| Isolado | Espécie              | Grupo | Comprimento em centímetros | Validação da Silhueta |
|---------|----------------------|-------|----------------------------|-----------------------|
| CEN1074 |                      | 1     | 34,8 ± 5,62                | 0,59                  |
| CEN1071 |                      | 1     | 34,8 ± 5,62                | 0,59                  |
| CEN161  | <i>T. asperellum</i> | 1     | 34,8 ± 5,62                | 0,59                  |
| CEN1070 |                      | 1     | 34,8 ± 5,62                | 0,59                  |
| CEN1078 |                      | 1     | 34,8 ± 5,62                | 0,59                  |
| CEN281  | <i>T. harzianum</i>  | 1     | 34,8 ± 5,62                | 0,59                  |
| CEN1075 |                      | 1     | 34,8 ± 5,62                | 0,59                  |
| CEN289  | <i>T. harzianum</i>  | 1     | 34,8 ± 5,62                | 0,59                  |
| CEN1077 |                      | 1     | 34,8 ± 5,62                | 0,59                  |
| CEN129  | <i>T. harzianum</i>  | 1     | 34,8 ± 5,62                | 0,59                  |
| CEN1072 |                      | 2     | 28,5 ± 3,48                | 0,59                  |
| CEN287  | <i>T. harzianum</i>  | 2     | 28,5 ± 3,48                | 0,59                  |
| CEN201  | <i>T. harzianum</i>  | 2     | 28,5 ± 3,48                | 0,59                  |
| CEN219  |                      | 2     | 28,5 ± 3,48                | 0,59                  |
| CEN162  | <i>T. asperellum</i> | 2     | 28,5 ± 3,48                | 0,59                  |

|            |                     |   |             |      |
|------------|---------------------|---|-------------|------|
| CEN155     | <i>T. harzianum</i> | 2 | 28,5 ± 3,48 | 0,59 |
| CEN1080    |                     | 2 | 28,5 ± 3,48 | 0,59 |
| Testemunha |                     | 2 | 28,5 ± 3,48 | 0,59 |
| CEN1079    |                     | 2 | 28,5 ± 3,48 | 0,59 |
| CEN126     | <i>T. harzianum</i> | 2 | 28,5 ± 3,48 | 0,59 |
| CEN1076    |                     | 2 | 28,5 ± 3,48 | 0,59 |
| CEN1073    |                     | 2 | 28,5 ± 3,48 | 0,59 |

Maiores valores médios de comprimento de raiz foi apresentado pelo grupo 1 (CEN1074, CEN1071, CEN161, CEN1070, CEN1078, CEN281, CEN1075, CEN289, CEN1077 e CEN129). Os isolados do grupo 2 (CEN1072, CEN287, CEN201, CEN219, CEN 162, CEN155, CEN1080, Testemunha, CEN1079, CEN 126, CEN1076 e CEN1073) não induziram incremento de raiz, porém, não houve resultados estatisticamente inferiores aos verificados com a testemunha, podendo-se inferir que os isolados aqui testados não prejudicaram o desenvolvimento das raízes tratadas.

**Tabela 17:** Agrupamento de isolados de *Trichoderma* quanto ao comprimento da parte aérea de plântulas de tomate, resultantes do tratamento de sementes com o antagonista, com base no método do comprimento médio da Silhueta.

| <b>Isolado</b> | <b>Espécie</b>      | <b>Grupo</b> | <b>Comprimento em centímetros</b> | <b>Validação da Silhueta</b> |
|----------------|---------------------|--------------|-----------------------------------|------------------------------|
| CEN1072        |                     | 4            | 4,90 ± 1,33                       | 0,83                         |
| CEN155         | <i>T. harzianum</i> | 4            | 4,90 ± 1,33                       | 0,83                         |
| CEN281         | <i>T. harzianum</i> | 4            | 4,90 ± 1,33                       | 0,83                         |
| CEN1080        |                     | 4            | 4,90 ± 1,33                       | 0,83                         |

|            |                      |   |             |      |
|------------|----------------------|---|-------------|------|
| CEN219     |                      | 2 | 4,20 ± 0,56 | 0,56 |
| CEN126     | <i>T. harzianum</i>  | 2 | 4,20 ± 0,56 | 0,56 |
| CEN1076    |                      | 2 | 4,20 ± 0,56 | 0,56 |
| CEN201     | <i>T. harzianum</i>  | 2 | 4,20 ± 0,56 | 0,56 |
| CEN1079    |                      | 2 | 4,20 ± 0,56 | 0,56 |
| CEN1070    |                      | 1 | 3,94 ± 0,44 | 0,60 |
| CEN1073    |                      | 1 | 3,94 ± 0,44 | 0,60 |
| CEN1078    |                      | 1 | 3,94 ± 0,44 | 0,60 |
| CEN1071    |                      | 1 | 3,94 ± 0,44 | 0,60 |
| CEN129     | <i>T. harzianum</i>  | 3 | 3,81 ± 0,40 | 0,81 |
| CEN1077    |                      | 3 | 3,81 ± 0,40 | 0,81 |
| Testemunha |                      | 3 | 3,81 ± 0,40 | 0,81 |
| CEN1074    |                      | 6 | 3,67 ± 0,24 | 0,87 |
| CEN287     | <i>T. harzianum</i>  | 6 | 3,67 ± 0,24 | 0,87 |
| CEN289     | <i>T. harzianum</i>  | 6 | 3,67 ± 0,24 | 0,87 |
| CEN162     | <i>T. asperellum</i> | 6 | 3,67 ± 0,24 | 0,87 |
| CEN161     | <i>T. asperellum</i> | 5 | 3,23 ± 0,46 | 1,00 |
| CEN1075    |                      | 5 | 3,23 ± 0,46 | 1,00 |

De acordo com a Tabela 17, os isolados foram divididos em seis grupos distintos, onde os melhores resultados foram alcançados com os isolados do grupo 4 (CEN1072, CEN155, CEN281 e CEN1080), seguido do grupo 2 (CEN219, CEN126, CEN1076, CEN201 e CEN1079), grupo 1 (CEN1070, CEN1073, CEN1078 e CEN1071), grupo 3 (CEN129, CEN1077 e Testemunha), grupo 6 (CEN1074, CEN287, CEN289 e CEN162) e por fim, o grupo 5 (CEN161 e CEN1075). Verificou-se menor crescimento de hipocótilo com os

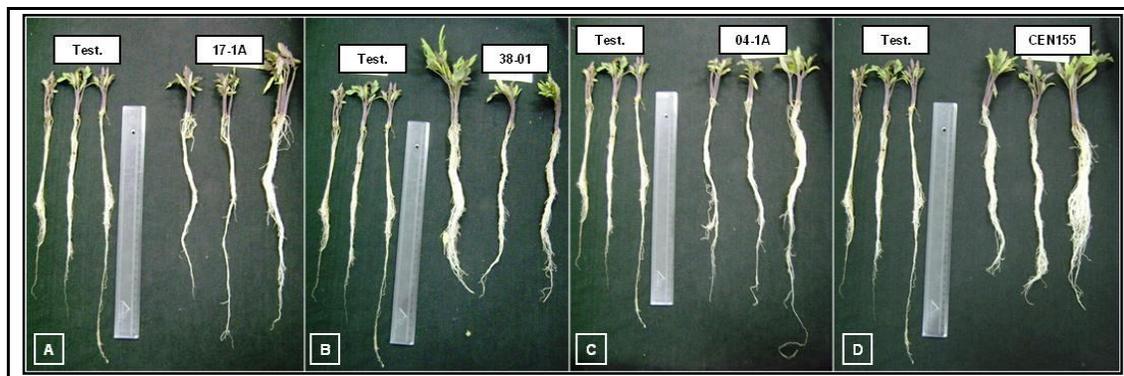
isolados dos grupos 6 e 5, quando comparados ao grupo 3. Entretanto essa diferença no crescimento de hipocótilo para avaliação dos isolados deve ser cuidadosa, visto que alguns dos isolados que apresentaram menor rendimento na promoção de crescimento da parte aérea proporcionaram bons resultados de crescimento de raiz, como no caso dos isolados CEN161, CEN289, CEN1074 e CEN1075, alocados no primeiro grupo do ensaio anterior (Tabela 16).

**Tabela 18:** Agrupamento dos isolados de *Trichoderma* quanto ao peso seco da raiz de plântulas de tomate, sob influência do tratamento das sementes com o antagonista, com base no método do comprimento médio da Silhueta.

| <b>Isolado</b> | <b>Espécie</b>      | <b>Grupo</b> | <b>Peso seco de raiz<br/>em gramas</b> | <b>Validação da<br/>Silhueta</b> |
|----------------|---------------------|--------------|--|----------------------------------|
| CEN155         | <i>T. harzianum</i> | 3            | 0,07 ± 0,03                            | 0,96                             |
| CEN1080        |                     | 3            | 0,07 ± 0,03                            | 0,96                             |
| CEN1072        |                     | 1            | 0,05 ± 0,02                            | 0,65                             |
| CEN1070        |                     | 1            | 0,05 ± 0,02                            | 0,65                             |
| CEN281         | <i>T. harzianum</i> | 1            | 0,05 ± 0,02                            | 0,83                             |
| CEN1076        |                     | 1            | 0,05 ± 0,02                            | 0,83                             |
| CEN1077        |                     | 1            | 0,05 ± 0,02                            | 0,83                             |
| CEN219         |                     | 1            | 0,05 ± 0,02                            | 0,83                             |
| CEN201         | <i>T. harzianum</i> | 1            | 0,05 ± 0,02                            | 0,83                             |
| CEN287         | <i>T. harzianum</i> | 2            | 0,03 ± 0,01                            | 0,64                             |
| CEN1078        |                     | 2            | 0,03 ± 0,01                            | 0,64                             |
| CEN126         | <i>T. harzianum</i> | 2            | 0,03 ± 0,01                            | 0,64                             |
| CEN1074        |                     | 2            | 0,03 ± 0,01                            | 0,64                             |

|            |                      |   |             |      |
|------------|----------------------|---|-------------|------|
| CEN162     | <i>T. asperellum</i> | 2 | 0,03 ± 0,01 | 0,64 |
| CEN1071    |                      | 2 | 0,03 ± 0,01 | 0,64 |
| Testemunha |                      | 2 | 0,03 ± 0,01 | 0,64 |
| CEN289     | <i>T. harzianum</i>  | 2 | 0,03 ± 0,01 | 0,64 |
| CEN129     | <i>T. harzianum</i>  | 2 | 0,03 ± 0,01 | 0,64 |
| CEN1078    |                      | 2 | 0,03 ± 0,01 | 0,64 |
| CEN1075    |                      | 2 | 0,03 ± 0,01 | 0,64 |
| CEN1073    |                      | 2 | 0,03 ± 0,01 | 0,64 |
| CEN161     | <i>T. asperellum</i> | 2 | 0,03 ± 0,01 | 0,64 |

Com base no método de análise de comprimento da silhueta, entende-se que os melhores resultados para esse ensaio foram alcançados com isolados de *Trichoderma* dos grupos 3 (CEN155 e CEN1080) e 1 (CEN1072, CEN1070, CEN281, CEN1076, CEN1077, CEN219 e CEN201). Já os isolados CEN287, CEN1078, CEN126, CEN1074, CEN 162, CEN1071, CEN289, CEN129, CEN1079, CEN1075, CEN1073, CEN161, CEN155, CEN1080 se agruparam (grupo 2) com a testemunha. Nenhum dos isolados testados prejudicou o desenvolvimento de plântulas, ao serem comparados com a testemunha.



**Figura 21:** **A** – Comparação entre plantas testemunhas e plantas tratadas com o isolado CEN1072 (*Trichoderma* sp.); **B** – Comparação entre testemunha e plantas tratadas com o isolado CEN1080; **C** – Comparação entre testemunha e plantas tratadas com o isolado CEN1070 (*Trichoderma* sp.) e **D** – Comparação entre Testemunha e plantas tratadas com o isolado CEN155 (*T. harzianum*).

Os resultados obtidos corroboram a maioria dos trabalhos com esse grupo de fungos, utilizando diversas espécies agrícolas, nos quais foram demonstrados incrementos na promoção do crescimento das plantas tratadas (Yedidia *et al.*, 2000; Harman *et al.*, 2011; Hoyos-Carvajal *et al.*, 2009). Esse incremento pode ser avaliado em termos de aumento da biomassa, resistência ao estresse, produtividade e aumento da absorção e solubilização de nutrientes (Shoresh *et al.*, 2010), pois são vários os mecanismos envolvidos no estímulo do crescimento das plantas por *Trichoderma* spp. (Harman, 2011b). Esse grupo de fungos também pode produzir metabólitos com atividades análogas a fitohormônios, como ácido indol acético (Cutler *et al.*, 1989).

Estudos realizados com plantas de milho conduzidos por Resende *et al.* (2004) indicaram maior acúmulo de matéria seca das raízes. Por outro lado, em trabalhos realizados por Carvalho Filho *et al.* (2008) com *Trichoderma* em eucalipto, não foi verificado o incremento na promoção do crescimento. Esses resultados sugerem que a promoção de crescimento de plantas depende fortemente da interação isolado e espécie vegetal.

### **Avaliação dos isolados de *Trichoderma* quanto à rizocompetência em plântulas de tomate em casa de vegetação**

Todos os 14 isolados de *Trichoderma* utilizados no ensaio foram capazes de colonizar a rizosfera, sendo que seis colonizaram o rizoplano (Tabela 19). Oito isolados não foram recuperados nos plaqueamentos realizados à diluição de  $10^{-4}$ , não significando, entretanto, que estes não sejam capazes de colonizar o rizoplano das plantas. Isso significa mais um fator positivo para a utilização destes como potenciais agentes de controle biológico, haja vista o grande potencial demonstrado nos ensaios anteriores. Em trabalho realizado por Tsahouridou & Thanassouloupoulos (2002), resultados semelhantes da capacidade dos isolados de *Trichoderma* em colonizar raízes de tomate foram encontrados, o que corrobora com os resultados aqui descritos. A colonização do sistema radicular das plantas pode significar proteção adicional do sistema radicular, impedindo a colonização por fitopatógenos. O agente de biocontrole forma uma barreira envolvendo a raiz da planta tratada, além de promover o aumento de atividade das enzimas degradadoras de parede de fungos nas raízes (Amorim *et al.*, 2011). A interação de fungos do gênero *Trichoderma* com as raízes das plantas é semelhante à observada com as micorrizas, ou seja, o *Trichoderma* ao penetrar e colonizar os tecidos da raiz não desencadeia os mecanismos de defesa específico nas plantas e estas, por sua vez, não o reconhecem como patógeno (Yedidia; Benhamou & Chet, 1999).

**Tabela 19:** Número estimado de conídios de *Trichoderma* spp. por grama de raiz de tomate em ensaio de rizocompetência.

| <b>Isolado</b> | <b>Rizosfera</b>  | <b>Rizoplano</b> |
|----------------|-------------------|------------------|
| <b>CEN126</b>  | $3,7 \times 10^4$ | Não detectado    |
| <b>CEN129</b>  | $4,3 \times 10^5$ | Não detectado    |

|                   |                       |                     |
|-------------------|-----------------------|---------------------|
| <b>CEN281</b>     | 9,7 x 10 <sup>4</sup> | Não detectado       |
| <b>CEN287</b>     | 1,3 x 10 <sup>5</sup> | Não detectado       |
| <b>CEN1070</b>    | 2,1 x 10 <sup>5</sup> | Não detectado       |
| <b>CEN1071</b>    | 1,3 x 10 <sup>5</sup> | 6 x 10 <sup>3</sup> |
| <b>CEN1072</b>    | 1,7 x 10 <sup>5</sup> | 3 x 10 <sup>3</sup> |
| <b>CEN1073</b>    | 2,6 x 10 <sup>5</sup> | 1 x 10 <sup>4</sup> |
| <b>CEN1074</b>    | 4,4 x 10 <sup>5</sup> | Não detectado       |
| <b>CEN1076</b>    | 4,5 x 10 <sup>5</sup> | 3 x 10 <sup>3</sup> |
| <b>CEN1077</b>    | 2,0 x 10 <sup>5</sup> | Não detectado       |
| <b>CEN1078</b>    | 2,4 x 10 <sup>5</sup> | Não detectado       |
| <b>CEN1079</b>    | 1,9 x 10 <sup>5</sup> | 7 x 10 <sup>3</sup> |
| <b>CEN1080</b>    | 2,8 x 10 <sup>5</sup> | 3 x 10 <sup>3</sup> |
| <b>Testemunha</b> | Não detectado         | Não detectado       |

De acordo com a Tabela 20, dois isolados (CEN126 e CEN281) não diferiram significativamente da testemunha com base no teste de Tukey a 5%. Dos 14 isolados testados nesse ensaio, merecem destaque os isolados CEN129 e CEN1076 que compõem o grupo 2, com maior número de conídios por grama de raiz, apontando assim uma alta capacidade destes em colonizar a rizosfera do tomateiro.

**Tabela 20:** Comparação dos isolados de *Trichoderma* quanto à rizocompetência, número de conídios por grama de raiz, aos 20 dias após inoculação em tomateiro, baseado no método do comprimento médio da Silhueta.

| Isolado | Espécie             | Grupo | Número de conídios x 10 <sup>4</sup> / grama de raiz | Validação da Silhueta |
|---------|---------------------|-------|--|-----------------------|
| CEN1076 |                     | 2     | 44,00 ± 3,85   | 0,92                  |
| CEN129  | <i>T. harzianum</i> | 2     | 44,00 ± 3,85   | 0,92                  |
| CEN1072 |                     | 1     | 18,53 ± 8,08   | 0,64                  |
| CEN1079 |                     | 1     | 18,53 ± 8,08   | 0,64                  |
| CEN1071 |                     | 1     | 18,53 ± 8,08   | 0,64                  |
| CEN287  | <i>T. harzianum</i> | 1     | 18,53 ± 8,08   | 0,64                  |
| CEN1077 |                     | 1     | 18,53 ± 8,08   | 0,64                  |
| CEN1070 |                     | 1     | 18,53 ± 8,08   | 0,64                  |
| CEN281  | <i>T. harzianum</i> | 1     | 18,53 ± 8,08   | 0,64                  |
| CEN1074 |                     | 1     | 18,53 ± 8,08   | 0,64                  |
| CEN1078 |                     | 1     | 18,53 ± 8,08   | 0,64                  |
| CEN126  | <i>T. harzianum</i> | 1     | 18,53 ± 8,08   | 0,64                  |
| CEN1073 |                     | 1     | 18,53 ± 8,08   | 0,64                  |
| CEN1080 |                     | 1     | 18,53 ± 8,08   | 0,64                  |

**Avaliação da supressão do tombamento de plantas de tomate por isolados de *Trichoderma* contra *Sclerotium rolfsii* em casa de vegetação**

Isolados de *Trichoderma* mostraram-se bastante promissores ao serem avaliados para controle do tombamento de plântulas de tomate, em casa de vegetação. Destacaram-se os isolados CEN1070, CEN1080 e CEN281, dentre os demais, segundo o método do

comprimento médio da Silhueta (Tabela 21). Esses três isolados apresentaram também bons resultados nos testes de produção de metabólitos não voláteis, promoção de crescimento de raiz e hipocótilo, conforme verificado anteriormente. O isolado CEN1080, adicionalmente, foi capaz de colonizar a rizosfera das plantas, como verificado no experimento de rizocompetência. Esses dados obtidos corroboram outros existentes na literatura. Como exemplo destes, citam-se Reyes *et al.* (2002) que conseguiram resultados satisfatórios no biocontrole de *S. rolfsii*, também em tomateiro, assim como Tsahouridou & Thanassouloupoulos (2002), no controle do tombamento em plântulas e Lohmann *et al.* e Mello *et al.* (2007), com soja, em casa de vegetação.

**Tabela 21:** Avaliação dos isolados de *Trichoderma* quando ao controle do tombamento de plântulas de tomate (cinco plantas a cada unidade experimental), baseado no método do comprimento médio da Silhueta.

| <b>Isolado</b> | <b>Espécie</b>      | <b>Grupo</b> | <b>Número de plantas não tombadas</b> | <b>Validação da Silhueta</b> |
|----------------|---------------------|--------------|---------------------------------------|------------------------------|
| CEN1070        |                     | 1            | 5,00 ± 0,00                           | 1,00                         |
| CEN126         | <i>T. harzianum</i> | 1            | 5,00 ± 0,00                           | 1,00                         |
| CEN281         | <i>T. harzianum</i> | 1            | 5,00 ± 0,00                           | 1,00                         |
| CEN1080        |                     | 1            | 5,00 ± 0,00                           | 1,00                         |
| Test. Abs.     |                     | 1            | 5,00 ± 0,00                           | 1,00                         |
| CEN1071        |                     | 2            | 4,67 ± 0,48                           | 1,00                         |
| CEN1072        |                     | 2            | 4,67 ± 0,48                           | 1,00                         |
| CEN1073        |                     | 2            | 4,67 ± 0,48                           | 1,00                         |
| CEN1074        |                     | 2            | 4,67 ± 0,48                           | 1,00                         |

|         |                     |   |             |      |
|---------|---------------------|---|-------------|------|
| CEN1078 |                     | 2 | 4,67 ± 0,48 | 1,00 |
| CEN1079 |                     | 2 | 4,67 ± 0,48 | 1,00 |
| CEN287  | <i>T. harzianum</i> | 2 | 4,67 ± 0,48 | 1,00 |
| CEN1076 |                     | 4 | 4,33 ± 0,52 | 1,00 |
| CEN1077 |                     | 4 | 4,33 ± 0,52 | 1,00 |
| Test.   |                     | 3 | 3,50 ± 0,55 | 0,58 |
| CEN129  | <i>T. harzianum</i> | 3 | 3,50 ± 0,55 | 0,58 |

### **Caracterização molecular dos isolados de *Trichoderma***

Um único produto de aproximadamente 560 a 600 pares de base foi obtido a partir das ampliações pela técnica de PCR com os iniciadores ITS1 e ITS4 para os 19 isolados de *Trichoderma*. Após o sequenciamento e posterior edição com auxílio de programa específico (DNA BASER) dos eletrofenogramas gerados no sequenciamento, 15 isolados foram identificados como *T. harzianum* (CEN126, CEN129, CEN141, CEN155, CEN169, CEN170, CEN194, CEN201, CEN223, CEN281, CEN287, CEN288, CEN289, CEN290 e CEN316), dois como *T. asperellum* (CEN161 e CEN162), um como *T. pseudokoningii* (CEN209) e um como *T. longibrachiatum* (CEN280).

## CONCLUSÃO

- ✓ Treze novos isolados de *Trichoderma* foram obtidos em áreas cultivadas com tomate na Embrapa Hortaliças (CNPq) e foram incorporados à Coleção de Fungos Para Controle de Fitopatógenos e de Plantas Daninhas da Embrapa/CENARGEN, ampliando seu acervo genético.
- ✓ Segundo os testes *in vitro*, os isolados CEN281 e CEN287 apresentam potencial como agentes de biocontrole a doenças causadas por *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*.
- ✓ Os isolados de *Trichoderma* testados não possuem ação inibitória do crescimento de *S. sclerotiorum* pela produção de metabólitos voláteis.
- ✓ Todos os isolados de *Trichoderma* são capazes de inibir o crescimento de *S. rolfsii* pela produção de metabólitos voláteis, com destaque para os isolados: CEN126, CEN155, CEN170, CEN169, CEN129, CEN290, CEN219, CEN1075 e CEN273.
- ✓ Os isolados CEN1070, CEN1077, CEN1072, CEN1074, CEN1073, CEN1079, CEN1080, CEN1076, CEN1078, CEN1071 e CEN129 possuem destacada ação inibitória *in vitro* contra *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*, pela produção de metabólitos não voláteis.
- ✓ Os isolados de *Trichoderma* testados não interferem negativamente na germinação de sementes de tomate.
- ✓ Isolados de *Trichoderma* podem causar lesões em plântulas de tomate durante o processo de germinação, se em condições de umidade elevadas.
- ✓ Os isolados de *Trichoderma* não afetam o desenvolvimento radicular de plântulas de tomate.
- ✓ Todos os isolados de *Trichoderma* selecionados para o ensaio de rizocompetência são capazes de colonizar a rizosfera de plantas de tomate em casa de vegetação e seis destes colonizam também o rizoplano.

- ✓ Os isolados CEN281, CEN1070 e CEN1080 devem ser utilizados em estudos de campo, por haverem apresentado os melhores resultados no controle do tombamento de plântulas de tomate, causado por *S. rolfsii*, em casa de vegetação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal, S. C.; Khare, M. N.; Agrawal, P.S. Biological control of *Sclerotium rolfsii* causing collar rot of lentil. *Indian Phytopathology*, v.30, p.176-179, 1977.
- Agrios, G. N. *Plant pathology*. 5<sup>th</sup> edition. New York: Academic Press, 922 p., 2005.
- Alfano, G.; Lewis Ivey, M. L.; Cakir, C.; Bos, J. I. B.; Miller, S. A.; Madden, L. V.; Kamoun, S.; Hoitink, H. A. J. Systemic Modulation of Gene Expression in Tomato by *Trichoderma hamatum* 382. *The American Phytopathological Society*. v. 97, n. 4, p. 429-437, 2007.
- Alves, E. Curso introdutório à microscopia eletrônica de varredura. UFLA/FAEPE, Lavras, 43 p., 2004.
- Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamin Filho, A. *Manual de Fitopatologia*. Piracicaba: Agronômica Ceres. v. 1, 4. Ed, p. 383-387, 2011.
- Anater, E. U. Tomate. *Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina*, 2010-2011.
- Aparecido, C. C.; Egydio, A. P. M.; Figueiredo, M. B. Eficiência do método de Castellani (água destilada) para a preservação de fungos fitopatogênicos. In: *Reunião Científica em Ciências Agrárias do Lageado, Botucatu, SP. Resumos...*. Botucatu: FCA-UNESP, p. 42, 1999.
- Aycock, R. Stem rot and other diseases caused by *Sclerotium rolfsii*. North Caroline: Agricultural Experiment Station Tech. Bull, p.174, 1966.
- Bailey, J.A. *Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions*. Springer-Verlag, Berlin, German. 1985.
- Baker, K. F. & Cook, R. J. *Biological control of plant pathogens*. San Francisco: W.F. Freeman, 433 p., 1974.
- Barbosa, R. N. T.; Halfeld-Vieira, B. A.; Nechet, K. L.; Souza, G. R. Método para inoculação de *Sclerotium rolfsii* em tomateiro. *Revista Agro@mbiente On-line*, v.4, n.1, p.x-y jan-jun, 2010.
- Bedendo, I. P. Damping off. In: Filho, A.B. *et al.* *Manual de Fitopatologia*. -São Paulo: Agronômica Ceres, ed. 3, p. 820-828, 1995.

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

Benitez, T.; Limón, C.; Delgado-Jarana, J.; Rey, M. Glucanolytic and other enzymes and their genes. *In: Trichoderma and Gliocladium – enzymes, biological control and commercial applications* (Harman, G.E.; Kubicek, C.P., eds). London, Taylor & Francis, vol 2, p. 101-27, 1998.

Benítez, T.; Rincón, A.M.; Limón, M.C. e Codón, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, v.7, p. 249-260. 2004.

Bettiol. W.; Ghini, R. Controle Biológico. In: Bergamin Filho, A.;Dimati, H.; Amorim, L. *Manual de Fitopatologia: principios e conceitos*. Ceres. 3 ed. São Paulo. Cap. 36, p. 717-727, 1995.

Bisset, J. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*, v. 69, p. 2357-2372, 1991.

Blum, L. E. B. Controle biológico de fitopatógenos. In: Blum, L. E. B.; Cares, J. E.; Uesugi, C. H. *Fitopatologia: o estudo das doenças de plantas*. 1. ed. Brasília: Otimismo, p. 196-205, 2006.

Boland, G. J.; Hall. R. Index of plants of hostes *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal Plant Pathology*, Ottawa, Vol. 16, n. 1, p. 93-108, 1994.

Bolton, M. D.; Thomma, B. P. H. J.; Nelson, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology*, Cancaster. n.7, v. 11, p. 1-16, 2006.

Bomfim, M. P. Antagonismo in vitro e in vivo de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em Maracujazeiro amarelo. 76 f. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Vitória da Conquista - BA, 2007.

Carvalho, A. C. Bioprospecção de isolados de *Trichoderma stromaticum* para controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauero. 69 f. (Dissertação de Mestrado). Ilhéus-BA, Universidade Estadual de Santa Cruz, 2006.

Carvalho Filho, M. R.; Menêzes, J. E.; Melo, S. C. M; Santos, R. P. Avaliação de isolados de *Trichoderma* no controle da mancha foliar do Eucalipto *in vitro* e quanto a esporulação em dois substratos sólidos. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*. Brasília,DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.

Campbell, R. *Biological control of microbial plant pathogens*. Sidney: C.U.P, 218 p., 1989.

- Chamberlain, D. W.; Gray, L. E. Germination, seed treatment and microorganisms in soybean seed produced in Illinois. *Plant Disease Reporter*, Washington, 1974.
- Chambers, S. M.; Scott, E. S. *In vitro* antagonism of *Phytophthora cinnamomi* and *P. citricola* by isolates of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens*. *Journal of Phytopathology*. v. 143; p. 471-477, 1995.
- Chet, I.; Benhamou, N.; Haran, S. Mycoparasitism and lytic enzymes. In: *Trichoderma* and *Gliocladium* – enzymes, biological control and commercial applications (Harman, G.E.; Kubicek, C.P., eds). London, Taylor & Francis, v. 2, p. 153-72, 1998.
- Cutler, H. G.; Himmelsbach, D. S.; Arrendale, R. E.; Cole, P. D.; Cox, R. D. Koninginin A: a novel plant growth regulator from *Trichoderma koningii*. *Agric. Biol. Chem*, v. 53, n. 10, p. 2604-2611, 1989.
- Davis, J. M. L.; Gladders, P.; Young, C.; Dyer, C.; Hiron, L.; Locke, T.; Lockley, D.; Ottway, C.; Smith, J.; Thorpe, G.; Watling, M. Petal culturing to forecast *Sclerotinia* stem rot in winter oilseed rape; 1993-1998. *Aspects of Applied Biology*, New Jersey, v. 56, n. 2, p. 129-134. 1999.
- Dennis, C. & Webster J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. *Transactions British Mycological Society*. v.57, p.363-369, 1971a.
- Dennis, C. & Webster J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotic. *Transactions British Mycological Society*. v.57, p.25-39, 1971b.
- Dhingra, O. D. & Sinclair, J.B. *Basic Plant Pathology Methods*. CRC Press, Florida. 1985.
- Dhingra, O. D. & Sinclair. J. B. *Basic Plant Pathology Methods*. Florida: CRC, p. 434, 1995.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. Ithaca, v. 12, p.13-18, 1990.
- Morsy, E. M.; Abdel-Kawi, K. A.; Khalil, M. N. A. Efficiency of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* as Biocontrol Agents against *Fusarium solani* on Tomato Plants. *Egypt. J. Phytopathol.*, v. 37, n. 1, p. 47-57, 2009.
- Elad, Y.; Chet, I.; Henis, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.*, v.28, 1982.
- Esposito, E. & Silva, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Critic Rev Microbiol*, v. 24, p. 89-98, 1998.

Ethur, L. Z.; Cembranel, C. Z.; Silva, A. C. F. Seleção de *Trichoderma* spp. visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. Ciência Rural, Santa Maria, v. 31 n.5, 2001.

Ethur, L. Z.; Blume, E.; Marlove, M.; Silva, A. C. F.; Stefanelo, R. D. Rocha, E. k. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. Fitopatologia Brasileira, v. 30, n.2, p. 127-133, 2005.

Ethur, L. Z.; Marlove, M.; Silva, A. C. F. Sanidade de sementes e emergência de plântulas de nabo forrageiro, aveia preta e centeio submetidas a tratamentos com bioprotetor e fungicida. Revista Ciência e Natura, UFSM, v. 28, n. 2, p. 17-27, 2006.

Filgueira, F. A. Manual de Olericultura: Cultura e Comercialização de Hortaliças. São Paulo, v. 2, 584 p., 1982.

Gabor, B. & Wiebe, W. Tomato Diseases: A Practical Guide for Seedsmen, Growers and Agricultural Advisors. Seminis Vegetable Seeds Inc. p. 27-30, 1997.

Gams, W. & Bisset, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Harman, G. & Kubicek, C.P. *Trichoderma and Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics*, Taylor & Francis, Londres, p. 3-34, 1998.

Gorgen, C. A. Manejo do mofo branco da soja com palhada de *Brachiaria ruziziensis* e *Trichoderma harzianum* '1306'. 78 f. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Goiás – UFG. Mestrado em Agronomia (Produção Vegetal), 2009.

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

Gressel, J. B & Hartmann, K. M. Morphogenesis of *Trichoderma*: Action spectrum of photoinduced sporulation. Planta, v. 79, p. 271-74, 1968.

Gullino M. L. & Kuijpers L. A. M. Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. Annual Review of Phytopathology, v. 32, p. 559-579, 1994.

Handelsman, J. & Stabb, E. V. Biocontrol do soilborne plant pathogens. The Plant Cell, v.8, p. 1855-1869, 1996.

Harman, G. E. Myths and dogmas of biocontrol – changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease, v. 84, p. 377-392, 2000.

- Harman, G. E. *Trichoderma* – not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica*, v. 39, p. 103-108, 2004.
- Harman, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96, p. 190–194. 2006.
- Harman, G. E. Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytologist*, v. 189, p. 647–649, 2011.
- Hermosa, M. R. Grondona, I., Iturriaga, E. A., Dí'az-Mi'nguez, J. M., Castro, C., Monte, E.; Garcia-Acha, I. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied Environmental Microbiology*, v. 66, p. 1890-1898. 2000.
- Homechin, M. Tentativa de estabelecimento do fungo *Trichoderma* sp., para verificação do seu potencial antagonístico, sobre o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*: resultado de pesquisa. Londrina: Embrapa Soja, 217 p., 1982.
- Horsfall, J. G. & Cowling, E. B. *Plant Disease: An Advanced Treatise. How Diseases Develop in Populations*. Academic Press, New York, v. 2, 1980.
- Howell, C. R. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts, *Plant Disease*, v. 87, n. 1, 2003.
- Howell, C. R. Understanding the Mechanisms Employed by *Trichoderma virens* to Effect Biological Control of Cotton Diseases. *The Nature and Application of Biocontrol Microbes II: Trichoderma* spp. p. 227-232. 2005.
- Hoyos-Carvajal, L.; Orduz, S.; Bissett, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological Control*, v. 51, p. 409–416, 2009.
- Ishimura, I.; Tivelli, S. W.; Alves, H. S. Avaliação do tomateiro em sistema orgânico de produção para as condições de São Roque, SP. *Hortic. bras.*, v. 26, n. 2, p. S5519-S5523, 2008.
- Junqueira, N. T. V; Gasparotto, L. Controle biológico de fungos estomáticos causadores de doenças foliares em seringueira. *In* Controle biológico de doenças de plantas (Bettiol, W., ed.) Jaguariúna, CNPDA/Embrapa, p. 307-331, 1991.
- Kimati, H., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A., Rezende, J.A.M. *Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas*. Ed. Ceres. São Paulo, v. 2, 2005.
- Kirk, P. *Index Fungorum*. CABI Bioscience, CBS and Landcare Research, available online, ed. 2012. Disponível em [www.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org), Acesso em: 17/02/2012.

Kleifeld, O. & Chet, I. *Trichoderma harzianum* – interaction with plants and effect on growth response. *Plant and Soil*, v. 144, p. 267-272, 1992.

Kubicek, C.P. The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*, structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. *Adv Biochem Engineer Biotechnol*, v. 45, p. 1-27, 1992.

Kubicek, C. P. & Harman, G. E. *Trichoderma* and *Gliocladium*: basic biology, taxonomy and genetics. USA, v. 1, p. 278, 1998.

Kuramae, E. E. & Souza, N. L. Variabilidade genética entre *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* através de RAPD e sequências de regiões ITS e rDNA. *Acta Scientiarum*, v. 24, n. 5, p. 1481-1485, 2002.

Lima, L. H. C.; Marco, J. L. de; Felix, C. R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por microorganismos. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. (Ed.). *Controle biológico*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, cap. 8. p. 263-284, 2000.

Lima, A. L. Caracterização morfológica, molecular e bioquímica de *Trichoderma* spp. isolados de solo de cerrado. 74 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2002.

Lobo Junior, M. & Abreu, M. S. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 24, n. 2, abr./jun., 2000.

Loeppky, C. B., Sprouse, R. F., Everett, E. D. *Trichoderma viride* peritonitis. *South. Med J.*, v.76, p. 798-799, 1983.

Lorito, M. Chitinolytic enzymes and their genes. In: *Trichoderma* and *Gliocladium* – enzymes, biological control and commercial applications (Harman, G.E.; Kubicek, C.P., eds). London, Taylor & Francis, v. 2, p. 73- 99, 1998.

Lucon, C. M. M. Promoção de crescimento de plantas com uso de *Trichoderma* spp. Disponível em: [http://www.infobibos.com/Artigos/2009\\_1/trichoderma/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2009_1/trichoderma/index.htm) Acesso em: 14/11/2011.

Lumsden, R. D. & Locke, J. C. Biological control of damping-off caused by *Phytophthora ultimum* and *Rhizoctonia solani* in soilless mix. *Phytopathology*, v. 79, p. 361-66, 1989.

Makishima, N. & Melo, W. F. O rei das hortaliças. Como cultivar – Especial, Embrapa Hortaliças, p. 28-32, 2005.

Mangenot, F. & Diem, H. G. Fundamentals of biological control. In: Krupa, S. V. & Dommergues, Y. R. (Eds.). Ecology of root pathogens, Amstenolam: Elsevier, p. 207-215, 1979.

Mello, S. C. M.; Ávila, Z. R.; Braúna, L. M.; Pádua, R. R.; Gomes, D. Cepas de *Trichoderma* spp. para El control biológico de *Sclerotium rolfsii* SACC. Fitosanidad, v. 11, n. 1, 2007.

Melo, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. Revis. Anu. Patol. Plantas, v. 4, n. 1, p. 261-295, 1996.

Melo, I. S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol, W. (Org.). Controle biológico de doenças de plantas, Embrapa - CNPDA, p. 135-156, 1991.

Melo, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: Melo, I. S. & Azevedo, J. L. (Ed.) Controle biológico. Jaguariúna: Embrapa, 1998.

Melo, I. S. & Faull, J. L. Tombamento de plântulas e controle biológico de *Rhizoctonia solani* e *Pythium* spp. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. (Eds.) Controle biológico. Jaguariúna: Embrapa, v. 2, p. 237-262, 2000.

Munoz, F. M., Demmler, G. J., Travis, W. R., Ogden, A. K., Rossmann, S. N., Rinaldi, M. G. *Trichoderma longibrachiatum* infection in a pediatric patient with aplastic anemia. J. Clin. Microbiol., v. 35, n. 2, p. 499-503, 1997.

Nakagawa, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: Krzyzanowski, F. C.; Vieira, R. D.; França Neto, J. B. Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina : Abrates, 1999.

Nelson, B. Biology of *Sclerotinia*. In: Proceedings of the sclerotinia workshop. 1998.

Nzanza, B.; Marais, D.; Soundy, P. Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seedling growth and development as influenced by *Trichoderma harzianum* and arbuscular mycorrhizal fungi. African Journal of Microbiology Research, v. 5(4), p. 425-431, 2011.

Oliveira, J. R. de. Podridões de sementes, tombamentos, podridões de raízes e colo. Wiki – Main. São Paulo. Disponível em : <http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r783101411.html>. Acessado em 15/11/2011.

Papavizas, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrole. Annual Review Phytopathology, Palo Alto, US, v. 23, 1985.

Pavan, M. A.; Krause-Sakate, R. Kurozawa, C.; Doenças das solanáceas. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A.; Rezende, J. A. M. Manual de

fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 589-596, 2005.

Punja, Z. K. The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. Annual Review of Phytopathology, v.23, p. 97-127, 1985.

Punja, Z. K.; Utkhede, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. Trends in Biotechnology, v. 21, p. 400-407, 2003.

Ragsdale, N. N.; Sisler, H. D. Social and political implications of managing plant diseases with decreased availability of fungicides in the United States. Annual Review of Phytopathology, v. 32, p. 545-557, 1994.

Rakh R. R.; Raut, L. S.; Dalvi, S. M.; Manwar, A. V. Biological control of *Sclerotium rolfsii*, causing stem rot of groundnut by *Pseudomonas cf. monteilii* 9. Recent Research in Science and Technology, v. 3, n. 3, p. 26-34, 2011.

Reader U. & Broda P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Lett.Appl.Microbiol, v. 1, p. 17–20, 1985.

Reis, A.; Oliveira, S. M. A.; Menezes, M. Potencial de isolados de *Trichoderma* para biocontrole da murcha de *Fusarium* do feijoeiro. Summa Phytopathologica, v. 21, n. 1, p. 16-20. 1995.

Resende, M. L.; Oliveira, J. A.; Guimarães, R. M.; Von Pinho, R. G.; Vieira, A. R. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. Ciência e Agrotecnologia, v. 28, p. 793-798, 2004.

Reyes, R. A.; Martinez, B. B.; Rivero, G. G.; Montejo, G. J. Actividad *in vivo* de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotium rolfsii* en plantulas de tomate. Manejo Integrado de Plagas y Agroecolog.a (Costa Rica) n. 66, p. 45 - 48 , 2002.

Ricard, J. L. Commercialization of *Trichoderma* based mycofungicide, some problems and - solutions. Biocontrol News Inform, v. 2, p. 95-98, 1981.

Richter, S.; Cormican, M. G.; Pfaller, M. A.; Lee, C. K.; Gingrich, R.; Rinaldi, M. G.; Sutton, D. A. Fatal disseminated *Trichoderma longibrachiatum* infection in an adult bone marrow transplant patient: species identification and review of the literature. J. Clin. Microbiol, v. 37, n. 4, p. 1154-1160, 1999.

Rocha, R. P. Manejo da podridão de sclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*) e míldio (*Bremia lactucae*) na cultura da alface. Dissertação 76 f. (Mestrado em Agronomia, área de concentração em Agricultura) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, 2007.

Romeiro, R. S. Indução de resistência em plantas a patógenos. Viçosa: Ed. UFV, 45 p. (Caderno Didático nº 56), 1999.

Rousseuw, P. J. Silhouettes: a graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *Journal of Computational and Applied Mathematics*. 20, p. 53-65, 1987.

Samuels, G.J. *Trichoderma*, a review of biology and sistematics of the genus. *Mycol Res*, v. 100, p. 923-35, 1996.

Serra, I. M. R. S.; Silva, G. S. Caracterização biológica e fisiológica de isolados de *Sclerotium rolfsii* obtidos de pimentão no Estado do Maranhão. *Fitopatologia Brasileira*, v. 30, p. 61-66, 2005.

Shoresh, M.; Mastouri, F.; Harman, G. E. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*, v. 48, p. 21–43, 2010.

Smith, V. L.; Wilcox, W. F.; Harman, G. E. Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. *Phytopathology*, v. 80, p. 880-885, 1990.

Steyaert, J. M.; Ridgway, H. J.; Elad, Y.; Stewart, A. Genetic basis of mycoparasitism: a mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. *New. Zeal. J. Crop Hortic. Sci.*, v. 31, p. 281-291, 2003.

Tamimi, K. M.& Hutchinson, S. A. Differences between the biological effects of culture gases from several species of *Trichoderma*. *Transactions of the British. Mycological Society*, London, v. 64, 1975.

Thiruvudainambi, S.; Chandrasekar, G.; Baradhan, G. Potential antagonism of *Trichoderma* sp. against *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Plant Archives* v. 10, n. 2, p. 617-620, 2010.

Tsahouridou, P. C.; Thanassoulopoulos, C. C. Proliferation of *Trichoderma konigii* in the tomato rhizosphere and the suppression of danping-off by *Sclerotium rolfsii* *Soil Biology and Biochemistry*, v. 34, p. 767-776. 2002.

Weidling, R. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology*, St Paul v. 24, p. 1153-1179, 1934.

White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J.; White, T. J. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, Inc., New York, p. 315–322, 1990.

Yedidia, I.; Benhamou, N.; Chet, I. Induction of defenses responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology, v. 65, p. 1061-1070, 1999.

Yedidia, I.; Behamou, N.; Kapulnik, Y.; Chet, I. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *T. harzianum* strain T-203. Plant Physiol. Biochem, v. 38, p. 863-873, 2000.

Zambolim, L. - Proteção de plantas: Manejo Integrado de Doenças de Plantas. Viçosa, 88 p., 2010.