



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E CIÊNCIAS AMBIENTAIS  
CURSO DE BACHARELADO EM AGRONOMIA**

**JOSÉ MANOEL FERREIRA DE LIMA CRUZ**

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Bipolaris oryzae* EM ARROZ  
VERMELHO**

**AREIA-PB  
2018**

**JOSÉ MANOEL FERREIRA DE LIMA CRUZ**

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Bipolaris oryzae* EM ARROZ  
VERMELHO**

Trabalho de Conclusão de Curso,  
apresentado à Universidade Federal da  
Paraíba, como parte das exigências para  
obtenção do título de Engenheiro  
Agrônomo.

Profa. Dra. Luciana Cordeiro do Nascimento  
Orientadora

**AREIA-PB  
2018**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

C957c Cruz, José Manoel Ferreira de Lima.

Controle Biológico de *Bipolaris oryzae* em arroz  
vermelho / José Manoel Ferreira de Lima Cruz. - Areia,  
2018.

76 f. : il.

Orientação: Luciana Cordeiro do Nascimento.

TCC (Especialização) - UFPB/CCA.

1. Biocontrole. 2. Mancha-parda. 3. *Oryza sativa* L. 4.  
*Trichoderma* spp. I. Nascimento, Luciana Cordeiro do.  
II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

JOSÉ MANOEL FERREIRA DE LIMA CRUZ

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Bipolaris oryzae* EM ARROZ  
VERMELHO**

Trabalho de Conclusão de Curso,  
apresentado à Universidade Federal da  
Paraíba, como parte das exigências para  
obtenção do título de Engenheiro  
Agrônomo.

Aprovado em 05 de Dezembro de 2018

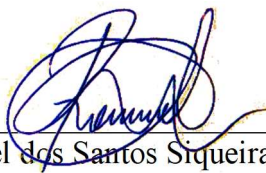
BANCA EXAMINADORA



---

Profa. Dra. Luciana Cordeiro do Nascimento  
(DFCA/CCA/UFPB)

**Orientadora**



---

Rommel dos Santos Siqueira Gomes  
Doutorando em Agronomia  
(PPGA/CCA/UFPB)

**Examinador**



---

Edecarlos Camilo da Silva  
Mestre em Agronomia  
(Membro Externo)

**Examinador**

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Iordam Silva da Cruz** e **Maria Valéria Ferreira de Lima Cruz**, que dedicaram seus esforços para realização deste sonho.

Aos meus irmãos, **Valêssa Ferreira de Lima Cruz** e **Gabriel Ferreira de Lima Cruz**, por todo apoio e companheirismo.

Ao meu amores, **Otília Ricardo de Farias** e **Luíza Antônia Farias Cruz**, por todo amor e carinho.

Aos meus queridos avós maternos e paternos, **José Alves de Lima**, **Maria do Carmo Ferreira de Lima**, **Neuza Teodora da Silva Cruz** e **Manoel Inácio da Cruz Filho** (*in memoriam*), por simplesmente existirem.

## AGRADECIMENTOS

Ao **Grande Arquiteto do Universo**, por iluminar com sua força, beleza e sabedoria, todos os meus dias, sendo autor do meu destino e essencial em minha vida.

À **Maçonaria** e a **Ordem DeMolay**, por ser homem que me tornei, a base de suas virtudes, princípios e ideologia, moldando meu caráter e minha índole.

Aos meus pais, **Iordam e Valéria**, com todo amor e gratidão, por tudo que fizeram ao longo de minha vida, me apoiando e incentivando na busca pelo conhecimento, sempre querendo meu melhor.

À pesquisadora mais linda e inteligente de todas, **Otilia Ricardo**, por ter-me proporcionado momentos incríveis, além de ser a razão do meu ingresso e de grande parte do meu conhecimento na área de fitopatologia. Pela família construída e por todo apoio, carinho, amor e força dada a mim no decorrer desta pesquisa.

À minha filha, **Luíza Antônia**, por ser a principal razão do meu viver e a primeira flor da primavera, que veio para me alegrar e dar-me um propósito de vida.

Ao meu irmão **Gabriel Ferreira**, por sempre me admirar, e a minha irmã, **Valêssa Ferreira**, por toda sua amizade e apoio na montagem e desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus queridos avós maternos e paternos, em especial à **José Alves de Lima**, pelo conhecimentos, conselhos, orientações e conversas, além de ser exemplo de honestidade, caráter e figura de grande importância em minha formação.

Aos meus amigos, **André Henriques e Oscar Neto**, por todo companheirismo, amizade, e bons momentos desfrutados.

À minha orientadora, **Prof. Dra. Luciana Cordeiro**, pela orientação, aprendizagem, carinho e dedicação nesta pesquisa, além de acolher-me sempre de braços abertos, contribuindo essencialmente para meu crescimento profissional.

Ao **Dr. Ademar Pereira**, por todos ensinamentos, apoio e por ter aberto o caminho para grandes oportunidades acadêmicas.

Ao **Prof. Dr. Guilherme Podestá**, pelos conhecimentos e ensinamentos na área de Fitopatologia, sempre me ajudando e orientando, sendo um professor de grande importância para meu crescimento profissional.

Aos Professores, **Dr. Daniel Duarte, Dr. Fábio Mielezrski e Dra. Riselane Lucena, Dr. Mailson Monteiro, Dra. Louise Costa, Dra. Edna Ursulino e Dr. Bruno Oliveira** por todo conhecimento adquirido, apoio, conversas e amizade.

Aos servidores administrativos, **Rui Barbosa (Sr. Rui), Inaldo Gomes (Naú-Aluno), Edijanio Galdino e José Thomaz (Sr. Thomaz)** por toda colaborações, conversas, aprendizados e apoio laboratorial dado nesta pesquisa.

Aos trabalhadores do Setor de Olericultura, em especial à **Vavá, Jó, Churíu e Fan**, por toda conversa, conhecimento adquirido e colaboração dada nos trabalhos desenvolvidos em campo de iniciação científica, os meus sinceros, obrigado.

Aos integrantes da equipe LAFIT, em especial à **João Victor, Felipe Marinho, Tarciana Silva e Rafael Tavares** pelos bons momentos, troca de conhecimentos e apoio nesta pesquisa.

Aos queridos amigos, **Hiago Antônio, Ingrid Duarte, Jardel Souza, Rommel Siqueira, Luiza Medeiros e Breno Oliveira** (*in memoriam*), por todo conhecimento adquirido, brincadeiras, conselhos e caráter peculiar à poucos.

Aos integrantes da **Turma 2013.2**, pelo título de ser a pior e melhor turma de todas e por todos esses cinco anos compartilhados, levarei estes momentos por toda minha vida. Em especial à **Lucilo José** (Lulu), **Laysa Gabryella** (Jatobá), **Annie Maia** (Anniemal) **Alicia Nayana** (Alicinha), **Bruno Rosendo** (Melancia), **Saulo de Tarso** (Transão), **Cristiano Bonfim** (Papi), **Thomas Ferraz** (Viado), **Raphael Jovino** (JovinoMotos/Magnata), **Gabriel Brito** (Zé das Cachorras/Leitãozinho), **José Augusto** (Bosta), **Lucas Moraes** (Marcha Lenta), **Caio César** (Cocão), **Diogo Danilo** (Superman), **Islaumax Darllony** (Sem Banho), **Lucas Gomes** (Xaropinho), **Alisson Duarte** (Candim), **Ronald Muniz** (Cansadinho), **Leandro Fernandes** (Cara de Jaca), **José Lourivaldo** (Tripé) e **Uanderson Alves**.

*“Para se ter sucesso, é necessário amar de verdade o que se faz. Caso contrário, levando em conta apenas o lado racional, você simplesmente desiste. É o que acontece com a maioria das pessoas.”*

**Steve Jobs**



## RESUMO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é considerado uma das culturas mais importantes do mundo, contribuindo de forma significativa na alimentação humana. Um dos fatores que contribuem para redução da produção dessa cultura é a ocorrência de doenças, que podem provocar prejuízos severos. Nesse contexto, destaca-se o agente causal da mancha-parda, o fungo *Bipolaris oryzae*, que pode ocasionar perdas de até 80% nas áreas de plantio. Diante do exposto, objetivou-se determinar o efeito de *Trichoderma* spp. no controle de *B. oryzae* em sementes de arroz vermelho. Os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados no experimento foram obtidos a partir de isolamento em sementes de plantas cultivadas e derivado de produto comercial. O inóculo foi obtido de sementes infectadas. Foi realizado o confronto direto de antagonista *versus* patógeno incluindo pareamento de culturas, metabólitos voláteis, esporulação e micoparasitismo, além da qualidade fisiológica. De acordo com o teste *in vitro*, os isolados de *Trichoderma* spp. foram utilizados para avaliar sua eficácia no controle de mancha parda em casa de vegetação utilizando métodos de tratamento de sementes e pulverização foliar, analisando a incidência, redução, severidade e índice de severidade da doença. Também foi realizado teste de transmissibilidade via semente-planta. Os resultados mostraram que os isolados de *Trichoderma* spp. foram eficientes em inibir o crescimento de micélio do patógeno *in vitro*, produzindo metabólitos voláteis e inibindo a esporulação. Observações microscópicas mostraram a evidências de comportamento micoparasita dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre *B. oryzae*. Foi verificado alto índice de transmissão de *B. oryzae* via semente-planta. Em relação aos testes em casa de vegetação, os isolados de *Trichoderma* spp., controlaram significativamente a incidência, redução, severidade e índice de severidade da doença. Os *Trichoderma* spp. testados no biocontrole de *B. oryzae* em sementes de arroz vermelho foram eficientes e podem ser utilizados no manejo da doença.

**Palavras-chave:** Biocontrole; Mancha-parda; *Oryza sativa* L.; *Trichoderma* spp.

## ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa* L.) is considered one of the most important crops in the world, contributing significantly to human consumption. One of the factors that contribute to reduce the production of this crop is the occurrence of diseases, which can cause severe damages. In this context, the causal agent of the brown spot, the fungus *Bipolaris oryzae*, can be highlighted, which can cause losses of up to 80% in the planting areas. In view of the above, the objective was to determine the effect of *Trichoderma* spp. in the control of *B. oryzae* in red rice seeds. The isolates of *Trichoderma* spp. used in the experiment were obtained from isolation of seeds of cultivated plants and derived from commercial product. The inoculum was obtained from infected seeds. A direct comparison of antagonist versus pathogen was performed, including cultures matching, volatile metabolites, sporulation and myoparasitism, as well as physiological quality. According to the *in vitro* test, the isolates of *Trichoderma* spp. were used to evaluate their effectiveness in the control of brown spot in greenhouse using seed treatment methods and foliar spraying, analyzing the incidence, reduction, severity and severity index of the disease. Transmissibility test was also carried out via seed-plant. The results showed that the isolates of *Trichoderma* spp. were efficient in inhibiting mycelial growth of the pathogen *in vitro*, producing volatile metabolites and inhibiting sporulation. Microscopic observations showed evidence of mycoparasite behavior of *Trichoderma* spp. about *B. oryzae*. A high transmission rate of *B. oryzae* via seed-plant was observed. In greenhouse tests, the isolates of *Trichoderma* spp., significantly controlled the incidence, reduction, severity and severity index of the disease. *Trichoderma* spp. tested on the *B. oryzae* biocontrol in red rice seeds were efficient and can be used to manage the disease.

**Keywords:** Biocontrol; Brown spot; *Oryza sativa* L.; *Trichoderma* spp.

## LISTA DE FIGURAS

		Pág.
<b>Figura 1.</b>	Teste de pareamento entre isolados de <i>Bipolaris oryzae</i> e <i>Trichoderma</i> spp.....	27
<b>Figura 2.</b>	Teste de produção de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp.....	28
<b>Figura 3.</b>	Teste de micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Bipolares oryzae</i> .....	29
<b>Figura 4.</b>	Escala diagramática (Lenz et al., 2010) adaptada da mancha-parda ( <i>Bipolaris oryzae</i> ) do arroz indicando os níveis de severidade.....	35
<b>Figura 5.</b>	Incidência de fungos em sementes de arroz vermelho ( <i>Oryza sativa</i> L.).....	37
<b>Figura 6.</b>	Ilustração dos fungos identificados na sanidade de sementes de arroz vermelho. A – <i>Bipolaris oryzae</i> , B – <i>Curvularia</i> sp., C – <i>Fusarium</i> sp., D – <i>Trichoconiella padwickii</i> , E – <i>Alternaria</i> sp., F – <i>Phoma</i> sp., G – <i>Cercospora oryzae</i> , H – <i>Magnaporthe grisea</i> , I – <i>Trichoderma</i> sp., J – <i>Aspergillus</i> sp., K – <i>Nigrospora</i> sp., L – <i>Cladosporium</i> sp., M – <i>Colletotrichum</i> sp., N – <i>Penicillium</i> sp.....	37
<b>Figura 7.</b>	Taxa de transmissão de <i>Bipolaris oryzae</i> em sementes de arroz vermelho ( <i>Oryza sativa</i> L.), inoculadas através do contato com micélio (CM) e suspensão de esporos (SE). CV (%): 14,10. CM – Contato com Micélio e SE – Suspensão de Esporos. Médias com mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.....	39
<b>Figura 8.</b>	Crescimento de <i>Bipolaris oryzae</i> em cultivo pareado com isolados de <i>Trichoderma</i> spp.. CV (%): 16,11. T0 – Testemunha; T1 – <i>Trichoderma asperellum</i> de Trichodel <sup>®</sup> ; T2 – <i>Trichoderma</i> spp. isolado de arroz; T3 – <i>Trichoderma</i> spp. isolado de algodão; T4 – <i>Trichoderma</i> spp. isolado de fava; T5 – <i>Trichoderma</i> spp. isolado de leucena. Médias com mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.....	41
<b>Figura 9.</b>	Efeito inibidor de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. sobre o índice de velocidade do crescimento micelial de <i>Bipolaris oryzae</i> . CV (%): 4,89. T0 – Testemunha; T1 – <i>Trichoderma asperellum</i> de Trichodel <sup>®</sup> ; T2 – <i>Trichoderma</i> spp. isolado de arroz; T3 – <i>Trichoderma</i> spp. isolado de algodão; T4 – <i>Trichoderma</i> spp. isolado de fava; T5 – <i>Trichoderma</i> spp. isolado de leucena. Médias com mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.....	43

- Figura 10.** Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Bipolaris oryzae* por metabólitos voláteis produzidos por isolados de *Trichoderma* spp.. CV (%): 8,78. T1 – *Trichoderma asperellum* de Trichodel®; T2 – *Trichoderma* spp. isolado de arroz; T3 – *Trichoderma* spp. isolado de algodão; T4 – *Trichoderma* spp. isolado de fava; T5 – *Trichoderma* spp. isolado de leucena. Médias com mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade..... 44
- Figura 11.** Número de esporos de *Bipolaris oryzae* sobre influência dos metabólitos voláteis produzidos por isolados de *Trichoderma* spp.. CV (%): 13,83. T0 – Testemunha; T1 – *Trichoderma asperellum* de Trichodel®; T2 – *Trichoderma* spp. isolado de arroz; T3 – *Trichoderma* spp. isolado de algodão; T4 – *Trichoderma* spp. isolado de fava; T5 – *Trichoderma* spp. isolado de leucena. Médias com mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Valores transformados por  $(Y + 1,0)^{0,5}$ ..... 45
- Figura 12.** Interações observadas ao microscópio entre hifas de *Trichoderma* spp. sobre *Bipolaris oryzae*, isolado de arroz vermelho. A – Hifa sadia de *B. oryzae*.; B – Plasmólise; C – Alteração/deformação da parede celular; D – Enrolamento/estrangulamento de hifas; E – Vacuolização; F – Crescimento paralelo de hifas..... 47
- Figura 13.** *Trichoderma* spp. colonizando plântulas de arroz vermelho (*Oryzae sativa* L.)..... 54
- Figura 14.** Incidência da Mancha Parda, causada por *Bipolaris oryzae* em plantas de arroz vermelho submetidas a tratamento com *Trichoderma* spp.. CV (%): 37,31. T0 – Testemunha; T1 – *Trichoderma asperellum* de Trichodel®; T2 – *Trichoderma* spp. isolado de arroz; T3 – *Trichoderma* spp. isolado de algodão; T4 – *Trichoderma* spp. isolado de fava; T5 – *Trichoderma* spp. isolado de leucina; T6 – Fungicida. Médias com mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Valores transformados por  $(Y + 1,0)^{0,5}$ ..... 55
- Figura 15.** Severidade da Mancha Parda, causada por *Bipolaris oryzae* em plantas de arroz vermelho submetidas a tratamento com *Trichoderma* spp.. CV (%): 10,05. T0 – Testemunha; T1 – *Trichoderma asperellum* de Trichodel®; T2 – *Trichoderma* spp. isolado de arroz; T3 – *Trichoderma* spp. isolado de algodão; T4 – *Trichoderma* spp. isolado de fava; T5 – *Trichoderma* spp. isolado de leucina; T6 – Fungicida. Médias com mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Valores transformados por  $(Y + 1,0)^{0,5}$ ..... 56

**Figura 16.** Incidência da Mancha Parda, causada por *Bipolaris oryzae* em plantas de arroz vermelho submetidas a tratamento com *Trichoderma* spp.. CV (%): 20,25. T0 – Testemunha; T1 – *Trichoderma asperellum* de Trichodel®; T2 – *Trichoderma* spp. isolado de arroz; T3 – *Trichoderma* spp. isolado de algodão; T4 – *Trichoderma* spp. isolado de fava; T5 – *Trichoderma* spp. isolado de leucina; T6 – Fungicida. Médias com mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Valores transformados por  $(Y + 1,0)^{0,5}$ ..... 57

**Figura 17.** Severidade da Mancha Parda, causada por *Bipolaris oryzae* em plantas de arroz vermelho submetidas a tratamento com *Trichoderma* spp.. CV (%): 29,58. T0 – Testemunha; T1 – *Trichoderma asperellum* de Trichodel®; T2 – *Trichoderma* spp. isolado de arroz; T3 – *Trichoderma* spp. isolado de algodão; T4 – *Trichoderma* spp. isolado de fava; T5 – *Trichoderma* spp. isolado de leucina; T6 – Fungicida. Médias com mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade..... 58

## LISTA DE TABELAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1.</b> Origem dos isolados de <i>Trichoderma</i> .....	<b>24</b>
<b>Tabela 2.</b> Escala de classificação do antagonista proposta por Bell et al. (1982). .....	<b>27</b>
<b>Tabela 3.</b> Tratamentos utilizados nas sementes de arroz vermelho.....	<b>30</b>
<b>Tabela 4.</b> Tratamentos para controle de <i>Bipolaris oryzae</i> em sementes de arroz vermelho.....	<b>34</b>
<b>Tabela 5.</b> Germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de arroz vermelho submetidas a tratamento com <i>Trichoderma</i> spp.....	<b>48</b>
<b>Tabela 6.</b> Massa verde da parte aérea (MVPA), massa seca da parte aérea (MSPA) e comprimento de parte aérea (CPA) de plântulas de arroz vermelho submetidas a tratamento com <i>Trichoderma</i> spp.....	<b>48</b>
<b>Tabela 7.</b> Massa verde da raiz (MVRA), massa seca de raiz (MSRA) e comprimento da raiz (CRA) de plântulas de arroz vermelho submetidas a tratamento com <i>Trichoderma</i> spp.....	<b>49</b>
<b>Tabela 8.</b> Emergência (E), primeira contagem de emergência (PCE) e índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de arroz vermelho submetidas a tratamento com <i>Trichoderma</i> spp.....	<b>50</b>
<b>Tabela 9.</b> Massa verde da parte aérea (MVPA), massa seca da parte aérea (MSPA) e comprimento da parte aérea (CPA) de plântulas de arroz vermelho submetidas a tratamento com <i>Trichoderma</i> spp.....	<b>51</b>
<b>Tabela 10.</b> Massa verde da raiz (MVRA), massa seca da raiz (MSRA) e comprimento da raiz (CRA) de plântulas de arroz vermelho submetidas a tratamento com <i>Trichoderma</i> spp.....	<b>52</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1 Geral.....	15
2.2 Específicos.....	15
<b>3. REFERÊNCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>16</b>
3.1. Aspectos gerais da Cultura do Arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.).....	16
3.2. Mancha parda do arroz.....	17
3.3. Controle biológico de fitopatógenos.....	19
3.3.1 <i>Trichoderma</i> spp. no controle biológico de fitopatógenos.....	20
3.3.2 Controle biológico de <i>Bipolaris oryzae</i> .....	22
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
4.1. Obtenção dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. ....	24
4.2. Sanidade de sementes de arroz vermelho.....	24
4.3. Isolamento de <i>Bipolaris oryzae</i> .....	25
4.4. Transmissão de <i>Bipolaris oryzae</i> em sementes de arroz vermelho.....	26
4.5. Controle <i>in vitro</i> de <i>Bipolaris oryzae</i> com <i>Trichoderma</i> spp. ....	26
4.5.1. Teste de pareamento de culturas.....	26
4.5.2. Ação dos metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Bipolaris oryzae</i> .....	27
4.5.3. Ação de micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Bipolaris oryzae</i> .....	29
4.6. Qualidade fisiológica de sementes tratadas com <i>Trichoderma</i> spp. ....	30
4.7. Controle <i>in vivo</i> de <i>Bipolaris oryzae</i> com <i>Trichoderma</i> spp. ....	33
4.8. Análise estatística.....	36
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
5.1. Sanidade de sementes de arroz vermelho.....	37
5.2. Transmissão de <i>Bipolaris oryzae</i> em sementes de arroz vermelho.....	39
5.3. Teste de pareamento de culturas.....	40
5.4. Ação dos metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Bipolaris oryzae</i> .....	42
5.5. Micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Bipolaris oryzae</i> .....	46
5.6. Qualidade fisiológica de sementes tratadas com <i>Trichoderma</i> spp. ....	47
5.7. Controle <i>in vivo</i> de <i>Bipolaris oryzae</i> com <i>Trichoderma</i> spp. ....	54
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>61</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é considerado uma das culturas mais importantes do mundo, sendo altamente utilizada na alimentação humana, por fornecer nutrientes essenciais buscando-se assim, um aumento contínuo na demanda global por essa cultura (KUMAR et al., 2017).

Atualmente, a produção mundial de arroz chega a 504,6 milhões de toneladas, tendo a China, Tailândia e Vietnã como principais países produtores, com uma produção de 145,77; 104,41 e 15,80 milhões de toneladas, respectivamente (FAO, 2018).

No Brasil, a produção em 2017/2018 foi de 12,02 milhões de toneladas, sendo distribuídos em 10,9 milhões de toneladas para arroz irrigado e 1,3 milhões de toneladas para arroz de sequeiro. Os principais Estados produtores são Rio Grande do Sul e Santa Catarina, com uma produção de 8,46 e 1,15 milhões toneladas, respectivamente. Os maiores produções de arroz sequeiro encontram-se no Centro-Oeste e no Nordeste, com 463,5 e 425,9 mil toneladas respectivamente (CONAB, 2018).

Um dos fatores que contribuem para redução da produção dessa cultura é a ocorrência de doenças associada às sementes de baixa qualidade sanitária. Nesse contexto, destaca-se o agente causal da mancha-parda, o fungo *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan), sendo o mesmo capaz de sobreviver por mais de quatro anos em sementes infectadas (KUMARI et al., 2015). O fungo *B. oryzae* é responsável por causar manchas enferrujadas em sementes de arroz altamente infectadas, que leva a redução da germinação e morte de plântulas (AMORIO; CUMAGUN, 2017). Em plantas, os sintomas típicos incluem manchas marrons escuras a avermelhada, com formato oval e distribuídas uniformemente sobre toda a superfície da folha. Com avanço da doença surgem manchas com centros cinzentos ou esbranquiçados, rodeadas por um halo amarelo-marrom (AMORIO; CUMAGUN, 2017; QUINTANA et al., 2017).

Esse patógeno é comumente encontrado tanto em sistemas de produção de arroz irrigado quanto em sequeiro e várias são medidas de controle que têm sido aplicadas a esse patógeno, como métodos culturais, químicos, controle biológico e variedades resistentes, sendo o uso de fungicidas o mais empregado (MWENDO et al., 2017). No entanto, sabe-se que o método químico quando usado de forma indiscriminada, pode causar danos drásticos ao meio ambiente e a saúde do homem e animais, além disso, esses produtos sintéticos possuem um valor elevado e necessitam de capacitação para evitar a



utilização incorreta, aumentando consideravelmente o custo de produção (KAWUBE et al., 2005).

Com isso, pesquisadores têm buscado métodos de controle de doenças que sejam eficientes, rentáveis e sustentáveis, como por exemplo, o uso do controle biológico a partir do emprego de *Trichoderma* spp. (LAZAROTTO et al., 2013), que exercem antagonismo a diversos fungos fitopatogênicos por meio de parasitismo, antibiose e/ou competição, podendo atuar individualmente ou em conjunto (BENITEZ et al., 2004). Além disso, como vantagem adicional, esses microrganismos podem contribuir para promoção de crescimento das plantas (CARVALHO et al., 2011).

Várias pesquisas têm demonstrado a eficiência de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de diversos patógenos, a exemplo de *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal do mofo branco no feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (CARVALHO et al., 2015), *Fusarium oxysporum* f. sp *cepa*, responsável pela podridão basal na cebola (*Allium cepa* L.) (ABDELRAHMAN et al., 2016), *Setophoma terrestris* causador da raiz rosada em cebolinha verde (*Allium fistulosum*) (MARCUIZZO; CARVALHO, 2018) e *Colletotrichum truncatum*, agente causal da antracnose em feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (CRUZ, et al., 2017).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Determinar a ação de *Trichoderma* spp. no controle de *Bipolaris oryzae* em sementes de arroz vermelho.

### 2.2 Específicos

Determinar o nível de controle de *B. oryzae* por meio de *Trichoderma* spp. *in vitro* e *in vivo*;

Analisar a qualidade sanitária e fisiológica de sementes de arroz vermelho tratadas com *Trichoderma* spp.;

Determinar a incidência e severidade de *B. oryzae* em plantas de arroz vermelho tratadas com *Trichoderma* spp.

Definir a taxa de transmissão de *B. oryzae* via semente-planta;

### 3. REFERÊNCIAL TEÓRICO

#### 3.1. Aspectos gerais da Cultura do Arroz (*Oryza sativa* L.)

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma gramínea da família das Poaceae, do gênero *Oryza*, que possui cerca de 20 espécies conhecidas, sendo *Oryza sativa* a mais importante (JULIANO, 1993). É uma planta anual, adaptada a solos alagados, mas desenvolve-se bem em solos não alagados, e é formada de raízes, caule, folhas e panículas (GUIMARÃES et al., 2002).

O grão de arroz é formado basicamente de endosperma e embrião, ou germe. O tegumento, que envolve a semente se encontra diretamente ligado ao pericarpo, membrana que envolve o fruto. O pericarpo é envolvido pela lema e pela pálea, que constituem a casca e são removidas durante o beneficiamento (GUIMARÃES et al., 2002).

O arroz está entre os três cereais mais produzidos e consumidos do mundo, estando atrás apenas do trigo (*Triticum* spp.) e milho (*Zea mays* L.) (PARAGINSKI et al., 2014). É considerado o alimento básico de mais da metade da população mundial, por ser uma excelente fonte de energia, devido à alta concentração de amido, também por fornecer proteínas, vitaminas e minerais, e possuir baixo teor de lipídios, sendo estes essenciais à nutrição (KUMAR et al., 2017).

No Brasil, o arroz é o principal cereal consumido, sendo utilizado na alimentação o arroz branco, arroz integral e arroz parboilizado que totaliza 25% do consumo, devido à melhor qualidade nutricional e ao comportamento de cocção desejado por grande parte dos consumidores (PARAGINSKI et al., 2014).

A produção no ano de 2018 foi de 12,02 milhões de toneladas, sendo distribuídos em 10,9 milhões de toneladas para arroz irrigado e 1,3 milhões de toneladas para arroz de sequeiro, e ocupa o terceiro lugar em área cultivada com culturas anuais, com uma área de aproximadamente 1.943,8 mil hectares, estando atrás apenas para soja (*Glycine max* L.) e milho (*Zea mays* L.) (CONAB, 2018).

O arroz é produzido, sob cultivo irrigado e em sequeiro, sendo este último também chamado de “cultivo em terras altas”, que adota o plantio logo após o início das chuvas, sendo dependente do regime pluvial e sob cultivo irrigado (ARAÚJO, 2014), ocupando

uma área de aproximadamente 1.430,8 mil hectares para arroz irrigado e 535,9 mil hectares para arroz de sequeiro (CONAB, 2018).

Existem diversas variedades de arroz cultivadas no mundo, dentre as quais estão as de coloração avermelhada do pericarpo do grão, chamados de arroz vermelho. O arroz vermelho é também conhecido como arroz da terra e é cultivado em pequenas propriedades rurais do Semiárido brasileiro, com uso de mão de obra familiar, principalmente nos estados do Rio Grande do Norte e Paraíba. É um importante componente alimentício para região Nordeste, em função de suas características diferenciadas em relação ao arroz branco, como sabor, textura e valor nutricional (PEREIRA et al, 2009).

O pigmento vermelho do pericarpo trata-se de uma proantocianina importante para a alimentação humana que é responsável pela alta digestibilidade e pela ação antioxidante, que ainda pode atuar contra alguns patógenos da cultura do arroz (SWEENEY et al., 2006). O arroz vermelho apresenta variabilidade potencial útil aos programas de melhoramento genético, constituindo assim um importante patrimônio genético, com isso, pesquisadores têm desenvolvido pesquisas que vise a coleta, conservação, cultivo e consumo desse cereal no Nordeste do Brasil (BASTOS, 2009).

### 3.2. Mancha parda do arroz

Há muitos fatores que são responsáveis pelo baixo rendimento da cultura do arroz, mas um dos principais entraves à produção são as doenças que acometem a cultura. Dentre as principais doenças destacam-se Brusone (*Pyricularia oryzae*) Mancha Parda (*Bipolaris oryzae*) Podridão do Colmo (*Sclerotium oryzae*), Podridão do Pé (*Fusarium moniliforme*) e Mancha de Grãos (*Drechslera oryzae*, *Bipolaris* spp., *Pyricularia grisea*, *Alternaria padwickii*, *Phoma* sp., *Nigrospora* spp, *Epicocum* spp., *Curvularia lunata* e *Fusarium* sp.) (HABIB et al., 2012).

A maioria dessas doenças são transmitidas através do uso de sementes de baixa qualidade sanitária, o que causa enormes perdas tanto no armazenamento quanto no campo (KUMAR et al., 2017).

O fungo *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Schoemaker (sin. *Helminthosporium oryzae* Breda de Haan, *Drechslera oryzae* (Breda de Haan) Subramanian & Jain)

(Teleomorfo: *Cochliobolus miyabeanus*) pertence ao filo Ascomycota, classe Dothideomycetes, ordem Pleosporales e família Pleosporaceae (ROSSMAN et al., 2013).

Esse patógeno possui micélio cinza a cinza esverdeado escuro; conídios retos ou raramente curvos, cilíndricos ou largos no centro e castanhos claros a dourados, a germinação frequentemente nas duas extremidades; conidióforos septados, isolados ou em pequenos grupos, reto ou flexível e septados (QUINTANA et al., 2017).

É um patógeno responsável por sérios problemas na cultura do arroz, estando o mesmo amplamente distribuído nas regiões orizícolas do mundo (KUMARI et al., 2015)

Os sintomas ocasionados pela doença vão desde manchas enferrujadas em sementes, resultando em perda do potencial germinativo e morte de plântulas, com consequente redução do estande (AMORIO; CUMAGUN, 2017), até manchas marrons escuras a avermelhada, com formato oval e distribuídas uniformemente sobre toda a superfície foliar das plantas, com redução da capacidade fotossintética associado a redução da produção (AMORIO; CUMAGUN, 2017; QUINTANA et al., 2017).

A principal forma de disseminação e introdução *B. oryzae* em novas áreas de cultivo é através da utilização de sementes de baixa qualidade sanitária, sendo o mesmo capaz de sobreviver por mais de quatro anos em sementes infectadas, sendo o seu principal meio de disseminação (KUMARI et al., 2015). Além dos danos ocasionados na germinação, as sementes infectadas podem introduzir esse patógeno em novas áreas de cultivo e servir de fonte de inóculo para epidemias na parte aérea (AMORIO; CUMAGUN, 2017; QUINTANA et al., 2017). Segundo Barnwal et al. (2013) a taxa de transmissão de *B. oryzae* entre sementes e plântulas pode atingir até 80%.

As sementes infectadas podem não germinar, transmitir a doença de sementes a plântulas e de plântulas a plantas em crescimento, ou seja, esse patógeno pode causar danos em diferentes estágios como no armazenamento, germinação, estabelecimento de plântulas, crescimento vegetativo e fase reprodutiva (HABIB et al., 2012).

Sementes infectadas como fonte de inóculo primário de *B. oryzae* foram destacadas como uma lacuna de conhecimento e uma prioridade de pesquisa para ocorrência da Mancha Parda em áreas produtoras (BARNWAL et al. 2013). Estudos sobre a qualidade sanitária de sementes mostraram a associação de *Bipolaris* spp. com sementes de arroz produzidas no Brasil, sendo que o predomínio foi de *B. oryzae*, embora outras três espécies dentro do complexo *Bipolaris* foi encontrado, geralmente em baixa incidência (MENESES et al. 2014).

A distribuição global de espécies fitopatogênicas de *Bipolaris* spp. pode ser resultado da transferência de *commodities* agrícolas incluindo plantas e sementes através de fronteiras geográficas (ZHANG et al., 2013).

### 3.3. Controle biológico de fitopatógenos

A preocupação da sociedade com o impacto dos produtos químicos ao meio ambiente, saúde de agricultores e a contaminação da cadeia alimentar com resíduos de agrotóxicos tem incentivado pesquisas pela busca de produtos diferenciados, tanto por aqueles produzidos sem o uso de agrotóxicos, como por aqueles portadores de selos que garantem que os agrotóxicos foram utilizados adequadamente (MORANDI et al., 2009). Além disso, o incremento dos custos com o controle químico, a perda de eficiência de alguns desses produtos (KAWUBE et al., 2005), por causa da resistência dos organismos-alvo advindos do uso inadequado (JASRAI, 2015), tem incentivado diversas pesquisas com a utilização de produtos alternativos, entre eles, o uso de agentes biocontroladores de doenças de plantas (LAZAROTTO et al., 2013).

O controle biológico de doenças de plantas pode ser definido de forma geral como a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença, provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem (COOK; BAKER, 1983), ou seja, de forma geral, é a utilização de um microorganismo para controlar outro microorganismo (MORANDI et al., 2009).

Os agentes com potencial para interferir nos processos vitais dos patógenos são chamados de antagonistas. Esses organismos devem estar adaptados ao mesmo nicho ecológico que os patógenos, podendo esse método ser integrado facilmente com métodos culturais e melhoramento de plantas (MORANDI et al., 2009).

Os mecanismos de ação dos antagonistas normalmente envolvidos no controle biológico são: antibiose (MARTINI et al., 2014); parasitismo, hiperparasitismo e micoparasitismo (SANTOS et al., 2012); competição (BENÍTEZ et al., 2004) e indução de resistência (ABDELRAHMAN et al., 2016).

O controle biológico está em crescimento no Brasil, mas de forma lenta, seja por falta de produtos biológicos disponíveis no mercado ou pelo perfil conservador do agricultor brasileiro, e entre os produtos disponíveis, destacam-se aqueles à base de

*Trichoderma* spp., recomendados, principalmente, para o controle de fungos habitantes do solo (BETTIOL et al., 2009).

As principais espécies que estão em produtos comercializados são *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. stromaticum* e *T. viride*, estando disponíveis nas seguintes formulações: pós-molháveis, grânulos dispersíveis, suspensões concentradas, óleos emulsionáveis, grãos colonizados e esporos secos, sendo indicado para controle de *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Botrytis* e *Crinipellis*, para as culturas de feijão, soja, algodão, fumo, morango, tomate, cebola, alho, plantas ornamentais e cacau e alguns produtos também são recomendados para o tratamento de substratos e sementes (MORANDI et al., 2009).

Apesar de não existir padronização nas metodologias, as empresas geralmente avaliam a qualidade de seus produtos por contagem de esporos (mínimo de  $1 \times 10^8$  conídios/g), germinação (mínimo de 85%) e viabilidade (mínimo de  $8,5 \times 10^7$  ufc/g). A vida de prateleira dos produtos varia de 30 a 180 dias em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) e 180 a 360 dias em geladeira ou câmara fria (4-6°C) (MORANDI et al., 2009).

Segundo Carvalho et al. (2015) os solos brasileiros são ricos em uma grande diversidade de microrganismos, com várias espécies do antagonista *Trichoderma* spp., que estão sendo alvo de inúmeras pesquisas, sendo fundamental para descoberta de isolados eficientes para uso no controle biológico de fitopatógenos em diversos agroecossistemas (MARCUIZZO; CARVALHO, 2018; REDDA et al., 2018).

### **3.3.1 *Trichoderma* spp. no controle biológico de fitopatógenos**

Espécies de *Trichoderma* prevalecem especialmente em ambientes úmidos e podem ser isoladas de todas as zonas climáticas, incluindo solos de desertos (ABDELRAHMAN et al., 2016), tendo seu desenvolvimento favorecido por temperaturas acima de 25°C (PAULA JÚNIOR et al., 2007). Esses antagonistas podem também ser utilizados isoladamente, não havendo necessidade de mistura com outros produtos ou agentes (MORANDI et al., 2009).

*Trichoderma* spp. compreende fungos de vida livre, que se reproduzem assexuadamente, presentes com mais frequência em solos de regiões de clima temperado e tropical (MACHADO et al., 2012). Esses fungos são na sua maioria isolados a partir de

solos florestais ou agrícolas em todas as latitudes e podendo ser facilmente cultivados *in vitro* (BROTMAN et al., 2010).

É considerado o mais importante microrganismo utilizado no controle biológico, por ser um antagonista eficaz contra uma ampla gama de fungos fitopatogênicos (SAITO et al., 2010). Com isso, a utilização de *Trichoderma* spp. como biofungicidas vem crescendo atualmente na agricultura (BETTIOL et al., 2009; ZEILINGER et al., 2016).

Além de atuarem no controle de patógenos nas plantas, os antagonistas têm a capacidade de controlar os patógenos das sementes, os quais sobrevivem no solo causando podridão, morte das plântulas e tombamento. Além de proteger a rizosfera das plantas contra patógenos, possui a capacidade de melhorar taxa de germinação e o vigor das sementes, auxiliando também na absorção e concentração de nutrientes através do aumento do sistema radicular, promovendo o crescimento vegetal pela produção de hormônios e conseqüentemente o aumento do rendimento das plantas (CARVALHO et al., 2011). Segundo Babu et al. (2015) esses microrganismos são consideradas alternativas naturais e ambientalmente aceitáveis às práticas agrícolas tradicionais, tanto para manejo da doença como para promoção do crescimento de várias culturas agrícola.

Cheng et al. (2011) relataram que a proteína extracelular L-aminoácido oxidase secretado por *T. harzianum* ETS 323 está envolvida no antagonismo direto contra *Botrytis cinerea*, com hifas do patógeno mostrando uma resposta a apoptose-like, incluindo a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), fragmentação de DNA e despolarização da membrana mitocondrial. Semelhante a esse trabalho, Zeilinger et al., 2016, verificou a ocorrência de mais de 22 metabolitos secundários responsáveis pelo controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepa* agente causal da podridão basal na cebola (*Allium cepa* L.).

Carvalho et al. (2011) verificaram o efeito antagônico de seis isolados de *T. harzianum* no controle de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), a utilização de isolados de *T. harzianum* mostrou-se eficiente tanto no controle *in vitro* como *in vivo* da murcha-de-fusário, causado por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (SALAZAR et al., 2011).

A eficácia de *T. harzianum* LCB47, *T. viridae* LCB48, *T. koningii* LCB49 e *T. polysporum* LCB50 em meloeiro amarelo (*Cucumis melo* L.) e a sua eficiência de controle de doenças em área de cultivo naturalmente infestada foi avaliada no Vale do São



Francisco e constatou-se que todos os isolados apresentaram redução significativa da ocorrência de tombamento e murcha de plantas de meloeiro (GAVA; MENEZES, 2012).

Milanesi et al. (2013) testaram a eficiência de *Trichoderma* spp. no biocontrole de *Fusarium* spp. e promoção de crescimento em plântulas de soja (*Glycine max* L.). Os autores contataram que diferentes isolados foram eficientes no controle de *Fusarium* spp. tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e além disso, atuaram como promotores de crescimento de plântulas de soja nas condições testadas.

Santos-Villalobos et al. (2013) verificaram o potencial de *Trichoderma* spp., isolados de manga (*Mangifera indica* L.) da cultivar "Ataulfo" México, como agentes para controlar a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.), mostra-se ser capaz de controlar a infecção e desenvolvimento da doença. Foi demonstrado que os fungos antagonistas utilizaram uma variedade de mecanismos, incluindo a indução de resistência sistêmica em plantas, antibiose, competição por nutrientes e/ou espaço e micoparasitismo.

A redução da incidência e severidade de mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum* também foi observada por Carvalho et al., (2015) na cultura do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em plantas tratadas com isolados de *Trichoderma* sp., provando os mesmo ser agentes biocontroladores eficazes no manejo dessa doença em condições de campo, com valores em torno de 80% na redução da severidade.

Esses trabalhos demonstram a eficiência de espécies de *Trichoderma* desde o tratamento de sementes, plantas, como também o uso dos mesmos para controle de patógenos causadores de doenças na pós-colheita.

Os efeitos benéficos de *Trichoderma* spp. diferem em relação ao genótipo da planta, isolado fúngico e concentrações aplicadas (ISLAM et al., 2014), com isso, são necessárias pesquisas que amplie o banco de dados de plantas hospedeiras a esse antagonista, bem como isolados eficientes aplicados no controle de patógenos agressivos para que se possa entender os mecanismos envolvidos no controle da doença.

### **3.3.2 Controle biológico de *Bipolaris oryzae***

Apesar de já se ter comprovado a eficiência do efeito antagonista de *Trichoderma* spp. para diversos fungos fitopatogênicos, poucos são os trabalhos avaliando seu efeito sobre o fungo

Várias medidas de controle têm sido aplicadas a *B. oryzae*, como métodos culturais, químicos, controle biológico e variedades resistentes, sendo o uso de fungicidas o mais empregado para tratamento de sementes e plantas (MWENDO et al., 2017).

No tratamento de sementes o uso de fungicidas possibilita a redução do inóculo inicial de patógenos, controla a infecção primária, aumenta o vigor e o estande de plântulas. Porém, as opções de fungicidas registrados para *B. oryzae* são poucas, além disso, esses produtos se mostram ineficientes quando a pressão de inóculo é elevada no campo (MARTINI et al., 2014).

No entanto, são escassos estudos que observem o potencial de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *B. oryzae*. na cultura do arroz vermelho, sendo necessária a realização de pesquisas que poderão informar a eficiência desses antagonistas em testes de laboratório e em condições de casa de vegetação.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia (LAFIT) e os experimentos em casa de vegetação foram conduzidos no Laboratório de Análise de Sementes (LAS), ambos pertencentes ao Departamento de Fitotecnia e Ciências Ambientais (DFCA), do Centro de Ciências Agrárias (CCA), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), localizado no município de Areia, Paraíba.

##### 4.1. Obtenção dos isolados de *Trichoderma* spp.

Os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados no experimento foram obtidos a partir de isolamento direto em sementes e derivado de produto comercial (Tabela 1). Os mesmos foram identificados com auxílio de microscópio óptico através de suas características morfológicas, utilizando literatura especializada (SEIFERT et al., 2011).

**Tabela 1.** Origem dos isolados de *Trichoderma*.

Isolados	Origem
<i>Trichoderma asperellum</i>	Trichodel <sup>®</sup>
<i>Trichoderma</i> spp.	Sementes de Arroz ( <i>Oryzae sativa</i> L.)
<i>Trichoderma</i> spp.	Sementes de Algodão ( <i>Gossypium hirsutum</i> L.)
<i>Trichoderma</i> spp.	Sementes de Fava ( <i>Phaseolus lunatus</i> L.)
<i>Trichoderma</i> spp.	Sementes de Leucena ( <i>Leucaena leucocephala</i> Lam.)

##### 4.2. Sanidade de sementes de arroz vermelho

As sementes de arroz vermelho utilizadas nesse trabalho foram cedidas pela Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba (EMEPA-PB). As sementes foram beneficiadas manualmente através de observação visual descartando as mal formadas e atacadas por pragas (sementes parcial ou totalmente destruídas, com perfurações que atingiam o embrião).

O método utilizado para a análise e identificação de fungos nas sementes foi à incubação em substrato de papel filtro “*blotter test*” (BRASIL, 2009). Foram utilizadas 400 sementes de arroz vermelho, as quais foram previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% durante três minutos. Posteriormente, as sementes foram

distribuídas individualmente em condições assépticas, em placas de Petri sobre uma dupla camada de papel filtro esterilizados e umedecidos com água destilada esterilizada (ADE). As placas contendo as sementes foram mantidas por um período de sete dias a temperatura de  $25 \pm 2$  °C.

Transcorrido este período, procedeu-se com a identificação dos fungos pela morfologia com o auxílio de microscópio óptico e estereoscópico e literatura especializada (SEIFERT et al., 2011). Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes infectadas para cada fungo identificado.

### 4.3. Isolamento de *Bipolaris oryzae*

O isolado de *B. oryzae* foi obtido a partir de sementes de arroz infectadas, utilizando *blotter test*, descrito no item 4.2.

Após identificação do patógeno, a partir das estruturas reprodutivas, o mesmo foi transferido para o meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), incubado a temperatura de  $25 \pm 2$  °C, para obtenção da colônia fúngica do patógeno.

Após obtenção da cultura do patógeno o mesmo foi repicado em meio de cultura CA (20 g de cenoura, 20g de ágar por litro) e AvA (30g de aveia em Floco Quaker® e 20g de ágar por litro), por serem usados na indução de esporulação em várias espécies de fungos (GOODING; LUCAS, 1959; TUIITE, 1969). Posteriormente, foi realizada a purificação do isolado através da técnica da cultura monospórica, originada a partir de um único esporo, garantindo a identidade geneticamente pura do isolado.

Na individualização dos conídios para a obtenção da cultura monospórica foi obtida uma suspensão concentrada do inóculo, por meio da colônia fúngica crescida em meio de CA (cenoura-ágar) e AvA (aveia-ágar). Foram colocados 10 mL de água destilada esterilizada (ADE) dentro de tubo de ensaio, onde foi homogeneizado para liberação dos esporos. Realizou-se esse procedimento em quatro diluições. Posteriormente, retirou-se com uma pipeta graduada 1 mL da suspensão menos concentrada de esporos e transferiu para placas de Petri, contendo meio de cultura AA (ágar-água). Após 6 horas de incubação a uma temperatura de  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 h, com auxílio de microscópio óptico foram selecionados esporos que se encontravam isolados e viáveis, ou seja, apresentando formação e crescimento do tubo germinativo, os

quais, em seguida foram transferidos, com uma alça estéril, para placas de Petri contendo meio BDA.

#### **4.4. Transmissão de *Bipolaris oryzae* em sementes de arroz vermelho**

No teste de transmissão, foram utilizadas 100 sementes, as quais foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 1% por três minutos e posteriormente realizadas três lavagens sucessivas em água destilada esterilizada (ADE) e colocadas sobre papel filtro esterilizado para retirar o excesso de umidade (BRASIL, 2009).

A inoculação com *B. oryzae* foi realizada de duas formas: 1 – Contato direto das sementes sob a colônia fúngica pura de *B. oryzae* por 24 horas em meio (CM); 2 – Imersão por 5 min das sementes em suspensão de conídios ( $10^5$  conídios/mL) do patógeno (SE).

A suspensão de esporos foi realizada a partir da contagem de conídios, adicionado 10 mL de ADE em colônia pura de *B. oryzae* e feito a raspagem com uma escova de cerdas macia para liberação dos conídios. A suspensão foi filtrada em dupla gaze e retirada uma alíquota de 1 mL e transferida para a câmara de Neubauer, na qual foi feita a contagem de conídios mL<sup>-1</sup> e ajustada a concentração para  $10^5$  conídios/mL.

Após 24 horas sobre a colônia fúngica e imersão na suspensão de conídios de *B. oryzae*, as sementes foram semeadas em recipientes (500 mL), contendo substrato comercial (Basaplant<sup>®</sup>) e vermiculita esterilizados, na proporção de 2:1 (substrato/vermiculita - v/v), previamente autoclavado por duas vezes (1,0 kgf/cm<sup>2</sup> à 120 °C por 60 min, com intervalos de 24 h entre autoclavagens).

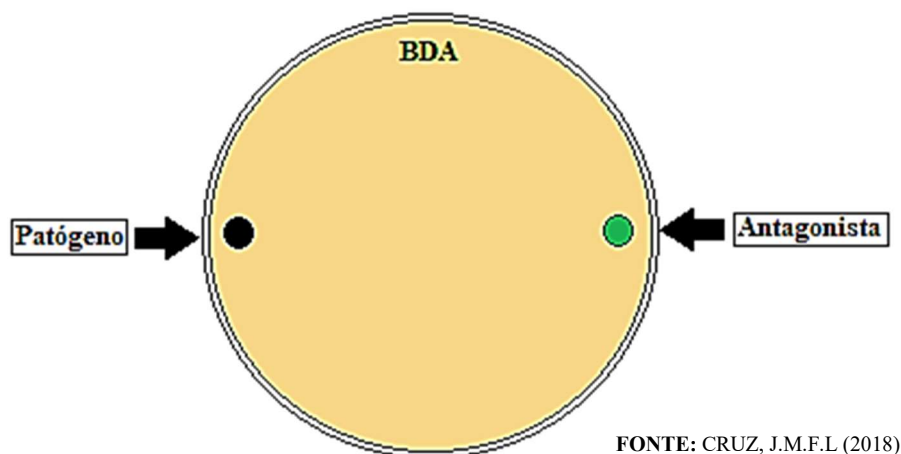
O teste de transmissão permaneceu em casa de vegetação durante 30 dias. Na avaliação do período de emergência e avaliação final, as sementes não germinadas e as plantas com sintomas foliares foram contabilizadas, sendo posteriormente, colocadas em câmara úmida para o reisolamento do patógeno e confirmação do agente causal.

#### **4.5. Controle *in vitro* de *Bipolaris oryzae* com *Trichoderma* spp.**

##### **4.5.1. Teste de pareamento de culturas**

O teste do pareamento de culturas foi realizado através da metodologia de cultura pareada (DENNIS; WEBSTER, 1971). O patógeno foi repicado dois dias antes de cada

isolado do antagonista, opostamente em cada placa Petri, contendo meio de cultura BDA (Figura 1). As placas foram incubadas a  $25 \pm 2$  °C, com fotoperíodo de 12h.



**Figura 1.** Teste de pareamento entre isolados de *Bipolaris oryzae* e *Trichoderma* spp..

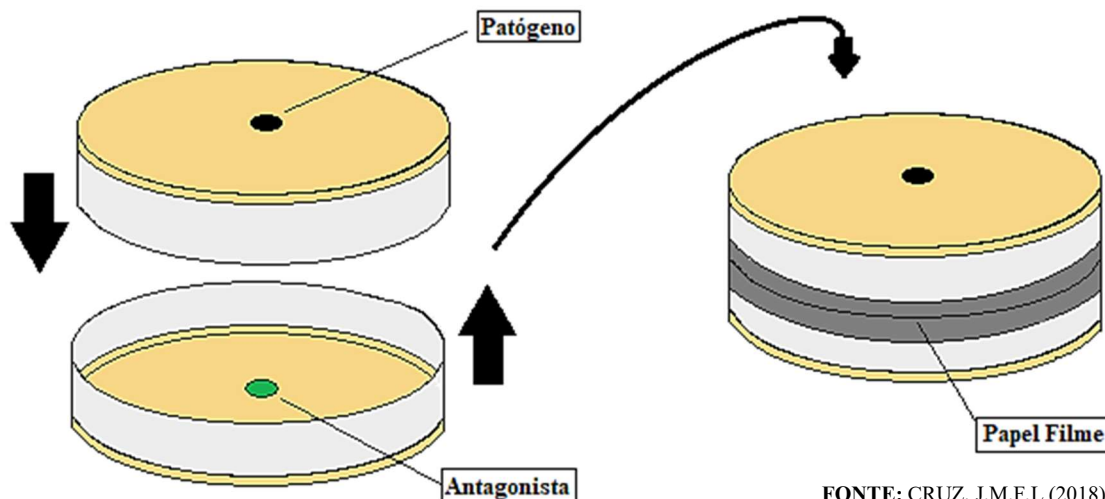
Sete dias após a repicagem dos isolados de *Trichoderma* spp., foi realizada a classificação do antagonista de acordo com a escala descrita por Bell et al. (1982), conforme a Tabela 2.

**Tabela 2.** Escala de classificação do antagonista proposta por Bell et al. (1982).

Classe	Ação do <i>Trichoderma</i> spp.
1	<i>Trichoderma</i> spp. cresce sobre o patógeno e ocupa toda a superfície do meio;
2	<i>Trichoderma</i> spp. cresce sobre pelo menos 2/3 da superfície do meio;
3	<i>Trichoderma</i> spp. ocupa aproximadamente metade da superfície do meio;
4	<i>Trichoderma</i> spp. cresce sobre 1/3 da superfície do meio;
5	<i>Trichoderma</i> spp. não cresce e o patógeno ocupa toda a superfície da placa.

#### 4.5.2. Ação dos metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. sobre *Bipolaris oryzae*

Um disco da colônia do patógeno e um de cada isolado do antagonista foi adicionado individualmente no centro de placas de Petri contendo meio BDA, em cada base com o patógeno e o antagonista ajustados e fechados com papel filme. As placas foram incubadas a  $25 \pm 2$  °C, com fotoperíodo de 12 h, de forma que as bases superiores são aquelas com patógeno (Figura 2).



FONTE: CRUZ, J.M.F.L (2018)

**Figura 2.** Teste de produção de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp..

Durante cinco dias foi realizado diariamente, a medição do diâmetro das colônias de *B. oryzae* com paquímetro digital, em dois eixos ortogonais, descartando-se o disco replicado da colônia pura, sendo posteriormente calculada a média. Esses dados foram utilizados no cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), sendo os dados expressos em  $\text{cm.dia}^{-1}$ , a partir de fórmula apresentada por Oliveira (1991):

$$\text{IVCM} = \sum \frac{(D - D_a)}{N}$$

Onde: IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial;

D= diâmetro médio atual da colônia;

D<sub>a</sub>= diâmetro médio da colônia do dia anterior;

N= número de dias após a inoculação.

Com os dados de crescimento micelial também foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do patógeno, de acordo com a formula apresentadas abaixo:

$$\text{PIC} = \frac{(D_c - D_t)}{D_c} \times 100$$

Onde: D<sub>c</sub>= diâmetro da colônia no tratamento controle;

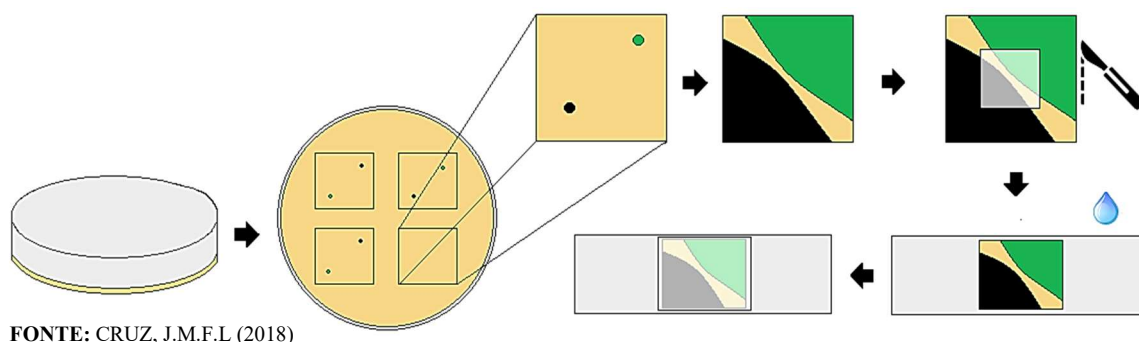
Dt= diâmetro da colônia em determinada dose.

Ao final do experimento, foi realizada a contagem de conídios formados ao quinto dia de incubação. Para tal, em cada base de placa de Petri contendo o patógeno, foi adicionado 10 mL de ADE e feito a raspagem com uma escova de cerdas macia para liberação dos conídios. A suspensão foi filtrada em dupla gaze e retirada uma alíquota de 1 mL e transferida para a câmara de Neubauer, na qual foi feita a contagem de conídios mL<sup>-1</sup>.

#### 4.5.3. Ação de micoparasitismo de *Trichoderma* spp. sobre *Bipolaris oryzae*

Para avaliar o micoparasitismo de *Trichoderma* spp. sobre *B. oryzae*, foram delimitados quatro quadrantes na parte inferior das placas de Petri contendo meio de cultura BDA (5,0 mm) com dimensões da lamínula a ser utilizada. Em seguida, um pequeno fragmento contendo colônia de *B. oryzae* foi adicionado em uma das extremidades dos quadrantes e na outra extremidade foi adicionado fragmento contendo isolado do antagonista, com distância aproximada de 1 cm.

As placas foram incubadas a  $28 \pm 2$  °C por 24 horas até ocorrer o contato entre as hifas do patógeno e antagonista. Após o contato entre as hifas, o meio foi cortado na camada limítrofe e colocado em uma lâmina, posteriormente foi corado com corante de “Shear”, sendo em seguida sobreposta por uma lamínula e realizada a observação em microscópio Olympus BX53, com fotografias registradas através da câmera Olympus DP73 com auxílio do programa cellSens Dimension em aumento de 20, 40 e 100x (Figura 3).



FONTE: CRUZ, J.M.F.L (2018)

**Figura 3.** Teste de micoparasitismo de *Trichoderma* spp. sobre *Bipolaris oryzae*.



#### 4.6. Qualidade fisiológica de sementes tratadas com *Trichoderma* spp.

Para avaliar a influência dos agentes biocontroladores sobre a qualidade fisiológica, sementes de arroz vermelho sem inoculação de *B. oryzae* foram submetidas aos tratamentos descritos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Tratamentos utilizados nas sementes de arroz vermelho.

<b>Tratamentos</b>
T0 – Sementes desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% por 3 min
T1 – Sementes inoculadas com <i>Trichoderma asperellum</i> isolado de Trichodel <sup>®</sup>
T2 – Sementes inoculadas com <i>Trichoderma</i> spp. isolado de sementes de arroz
T3 – Sementes inoculadas com <i>Trichoderma</i> spp. isolado de sementes de algodão
T4 – Sementes inoculadas com <i>Trichoderma</i> spp. isolado de sementes de fava
T5 – Sementes inoculadas com <i>Trichoderma</i> spp. isolado de sementes de leucena
T6 – Captan (CM)
T6 – Tiabendazol (SE)

Para realização do tratamento com os agentes biocontroladores foram utilizadas duas formas de inoculação: 1 – Contato direto das sementes sob a colônia fúngica de *Trichoderma* spp. por 24 horas (CM); 2 – Imersão por 5 minutos das sementes na suspensão de conídios ( $10^8$  conídios/mL) do *Trichoderma* spp. (SE).

A suspensão de esporos foi realizada a partir da contagem de conídios, adicionado 10 mL de ADE em colônia pura de *Trichoderma* spp. e feito a raspagem com uma escova de cerdas macia para liberação dos conídios. A suspensão foi filtrada em dupla gaze e retirada uma alíquota de 1 mL e transferida para a câmara de Neubauer, na qual foi feita a contagem de conídios mL<sup>-1</sup> e ajustada a concentração para  $10^8$  conídios/mL.

Após aplicação dos tratamentos as sementes foram submetidas aos testes de germinação e emergência.

##### 4.6.1. Teste de Germinação

O testes de germinação foi realizado conforme prescrições das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), onde foram utilizadas 100 sementes, distribuídas

em quatro repetições de 25 sementes, e colocadas em substrato de papel “germitest”, umedecido com 2,5 vezes o peso do papel seco e distribuídos em câmara de germinação do tipo *Biochemical Oxygen Demand* (B.O.D.), regulada a  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de doze horas. Após o semeio, os rolos foram acondicionados em sacos plásticos transparentes, com a finalidade de evitar a perda de água por evaporação. As contagens de sementes germinadas foram realizadas diariamente do 5° ao 14° dia, contabilizando-se as plântulas normais (raiz e hipocótilo).

A primeira contagem de germinação foi conduzida conjuntamente com o teste de germinação, computando-se as sementes germinadas no 5° dia após a semeadura (BRASIL, 2009).

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi conduzido em conjunto com o teste de germinação, efetuando-se contagens diárias das sementes germinadas. O índice foi determinado de acordo com a fórmula proposta por Maguire (1962):

$$IVG = \frac{G_1 + G_2 + \dots + G_n}{N_1 + N_2 + \dots + N_n}$$

Onde: IVG = índice de velocidade de germinação;

$G_1, G_2$  e  $G_n$  = número de sementes germinadas no primeiro, segundo e último dia;

$N_1, N_2$  e  $N_n$  = número de dias decorridos da semeadura à primeira, segunda e última contagem.

O comprimento e massa seca e massa verde das plântulas foram realizados após o teste de germinação. Com o auxílio de uma régua graduada em milímetros, foram avaliados o comprimento de parte aérea e raiz das plântulas normais, sendo os resultados expressos em centímetros por plântula ( $\text{cm.plântula}^{-1}$ ).

Para determinação da massa verde, a parte aérea e o sistema radicular das plântulas foram pesadas em balança analítica com precisão de 0,001g sendo os resultados expressos em  $\text{g.plântula}^{-1}$ . Posteriormente, foi determinado a massa seca da parte aérea e o sistema radicular sendo colocadas em sacos de papel Kraft e levados para estufa com circulação forçada de ar à temperatura de  $65 \pm 2$  °C, até a obtenção de peso constante, por 48 horas. Decorrido esse período foram pesados em balança analítica com precisão de 0,001g e os resultados expressos em  $\text{g.plântula}^{-1}$ .

#### 4.6.2. Teste de Emergência

O teste de emergência também foi realizado conforme prescrições das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), em ambiente protegido, com quatro repetições de 25 sementes, sendo semeadas em bandejas plásticas com dimensões de 49x33x7,0 cm de comprimento, largura e profundidade, respectivamente, contendo areia lavada, previamente autoclavado por duas vezes (1,0 kgf/cm<sup>2</sup> à 120 °C por 60 min, com intervalo de 24 h entre autoclavagens), cuja manutenção da umidade foi por meio de duas regas diárias.

Para as contagens do teste de emergência o critério utilizado foi emissão dos cotilédones acima do substrato do 5° ao 14° dia, sendo os resultados em porcentagem.

A primeira contagem de emergência também foi conduzida conjuntamente com o teste de emergência, computando-se as plântulas emergidas no 5° dia após a semeadura (BRASIL, 2009).

O índice de velocidade de emergência foi conduzido em conjunto com o teste de emergência, onde foi anotado diariamente o número de plântulas germinadas. O índice foi determinado de acordo com a fórmula proposta por Maguire (1962):

$$IVE = \frac{E_1 + E_2 + \dots + E_n}{N_1 + N_2 + \dots + N_n}$$

Onde: IVE = índice de velocidade de germinação;

$G_1, G_2$  e  $G_n$  = número de plântulas emergidas no primeiro, segundo e último dia;

$N_1, N_2$  e  $N_n$  = número de dias decorridos da semeadura à primeira, segunda e última contagem.

O comprimento e massa seca e massa verde das plântulas foram realizados após o teste de emergência. Com o auxílio de uma régua graduada em milímetros, foram avaliados o comprimento de parte aérea e raiz das plântulas normais, sendo os resultados expressos em centímetros por plântula (cm.plântula<sup>-1</sup>).

Para determinação da massa verde, a parte aérea e o sistema radicular das plântulas foram pesadas em balança analítica com precisão de 0,001g sendo os resultados expressos em g.plântula<sup>-1</sup>. Posteriormente, foi determinado a massa seca da parte aérea e o sistema radicular sendo colocadas em sacos de papel Kraft e levados para estufa com circulação

forçada de ar à temperatura de  $65 \pm 2$  °C, até a obtenção de peso constante, por 48 horas. Decorrido esse período foram pesados em balança analítica com precisão de 0,001g e os resultados expressos em g.plântula<sup>-1</sup>.

#### **4.7. Controle *in vivo* de *Bipolaris oryzae* com *Trichoderma* spp.**

Para avaliar o potencial do uso de *Trichoderma* spp. em casa de vegetação, foram realizados dois experimentos, sendo um utilizando o antagonista no tratamento de sementes, através do contato direto da semente com o micélio (Experimento 1) e outro no tratamento foliar de plantas de arroz vermelho, através da suspensão de esporos (Experimento 2).

### **EXPERIMENTO 1**

As sementes de arroz vermelho foram previamente desinfestadas em hipoclorito de sódio a 1% por três minutos e submetidas aos tratamentos descritos na Tabela 3 do item 4.6, com inoculação de *B. oryzae*. Para realização do tratamento com os agentes biocontroladores foram utilizado o contato direto das sementes sob a colônia fúngica de *Trichoderma* spp., sendo incubados em condições controladas de  $25 \pm 2$  °C e mantidas por 24 horas.

Após tratadas, as sementes foram transferidas para colônia fúngica do patógeno em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, sendo inoculadas com *B. oryzae*, também através do contato direto das sementes e foram incubados nas mesmas condições controladas e mantidas por mais 24 horas. Na testemunha, as sementes foram acondicionadas em contato com o substrato livre de *Trichoderma* spp. e inoculadas com patógeno.

Após tratadas com tratamentos biológicos e inoculadas com patógeno as sementes foram semeadas em sacos de polietileno com capacidade de 1,5 L contendo substrato comercial Basaplant® e vermiculita esterilizados, na proporção de 2:1 (substrato/vermiculita - v/v).

Após 30 dias das sementes inoculadas, as plantas foram analisadas por meio de inspeção visual, avaliando-se a incidência, severidade, índice de severidade e redução da doença.

## EXPERIMENTO 2

As sementes de arroz vermelho previamente desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 3 minutos e lavadas em ADE por 1 minuto. Para realização do tratamento com os agentes biocontroladores foram utilizado a imersão por 5 min das sementes em suspensão de conídios ( $10^8$  conídios/mL) dos *Trichoderma* spp., posteriormente as sementes foram semeadas em sacos de polietileno com capacidade de 1,5 L contendo substrato comercial Basaplant<sup>®</sup> e vermiculita esterilizados, na proporção de 2:1 (substrato/vermiculita - v/v).

A suspensão de esporos foi realizada a partir da contagem de conídios, adicionado 10 mL de ADE em colônia pura de *Trichoderma* spp e feito a raspagem com uma escova de cerdas macia para liberação dos conídios. A suspensão foi filtrada em dupla gaze e retirada uma alíquota de 1 mL e transferida para a câmara de Neubauer, na qual foi feita a contagem de conídios mL<sup>-1</sup> e ajustada a concentração para  $10^8$  conídios/mL.

Aos 15 dias após semeadura as plantas foram submetidas aos tratamento descritos na Tabela 4.

**Tabela 4.** Tratamentos para controle de *Bipolaris oryzae* em sementes de arroz vermelho.

<b>Tratamentos</b>
T0 – Pulverização com água
T1 – Pulverização com a suspensão de conídios ( $10^8$ conídios/mL) de <i>Trichoderma asperellum</i> isolado de Trichodel <sup>®</sup> + Tween 20 (0,05%)
T2 – Pulverização com a suspensão de conídios ( $10^8$ conídios/mL) de <i>Trichoderma</i> spp. isolado de sementes de arroz + Tween 20 (0,05%)
T3 – Pulverização com a suspensão de conídios ( $10^8$ conídios/mL) de <i>Trichoderma</i> spp. isolado de sementes de algodão + Tween 20 (0,05%)
T4 – Pulverização com a suspensão de conídios de ( $10^8$ conídios/mL) <i>Trichoderma</i> spp. isolado de sementes de fava + Tween 20 (0,05%)
T5 – Pulverização com a suspensão de conídios de ( $10^8$ conídios/mL) <i>Trichoderma</i> spp. isolado de sementes de leucena + Tween 20 (0,05%)
T6 – Pulverização com Tiabendazol (0,2g/200ml)

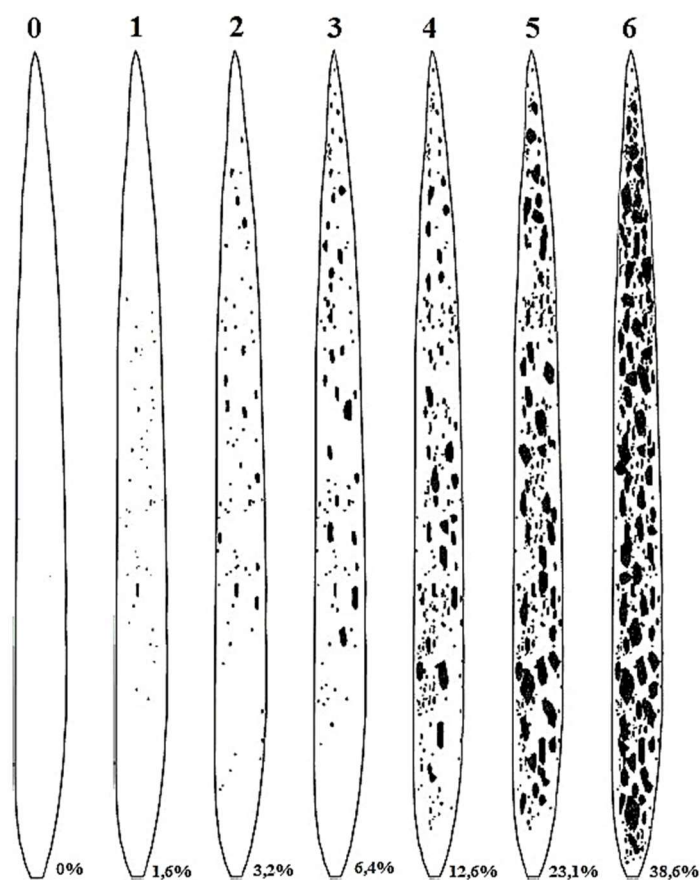
Após tratadas com tratamentos biológicos, as plantas foram acondicionadas em câmara úmida por um período de 24 horas. Transcorrido esse período, as plantas foram inoculadas com *B. oryzae* e mantidas em câmara úmida por 48 horas após pulverização.

Após 15 dias da inoculação do patógeno, as plantas foram analisadas por meio de inspeção visual, avaliando-se a incidência da doença, severidade da doença, índice de severidade da doença e a redução da doença.

A incidência da doença foi calculada com base em fórmula proposta por Teng e James (2001):

$$\text{Incidência da Doença(\%)} = \frac{\text{Número total de plantas infectadas por vaso}}{\text{Número total de plantas por vaso}} \times 100$$

A severidade foi avaliada com base em escala diagramática proposta por Lenz et al. (2010), sendo adaptada para melhor obtenção e representação dos dados, utilizando uma escala de nota variando de 0-6 (Figura 4).



**Figura 4.** Escala diagramática (Lenz et al., 2010) adaptada da mancha-parda (*Bipolaris oryzae*) do arroz indicando os níveis de severidade.

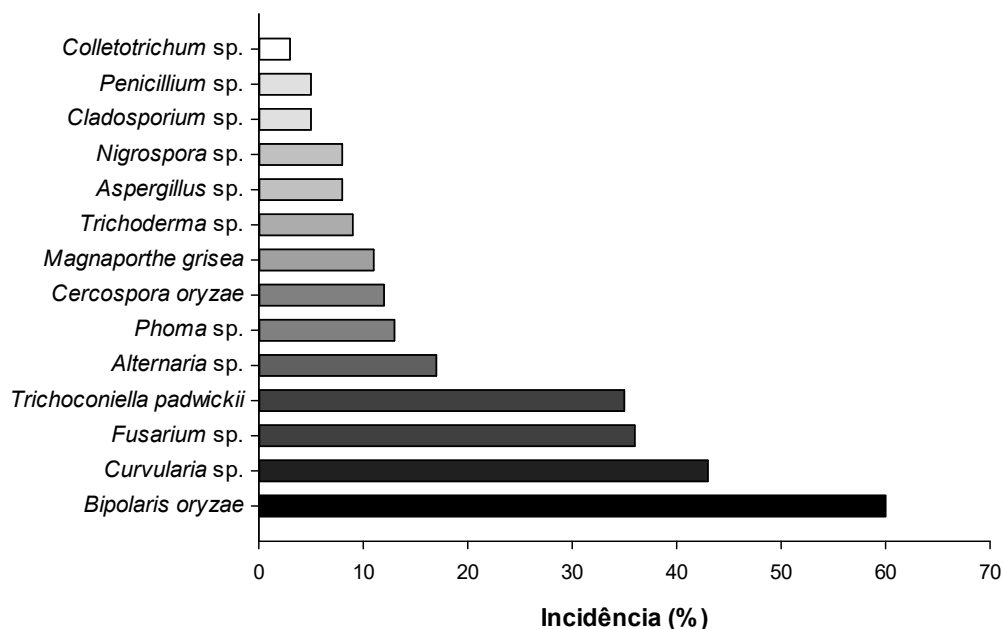
#### **4.8. Análise estatística**

O delineamento experimental utilizado nos experimentos de laboratório e casa de vegetação foi o inteiramente casualizado (DIC), em quatro repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando *software* estatístico Sisvar, versão 5.6 (Ferreira, 2014).

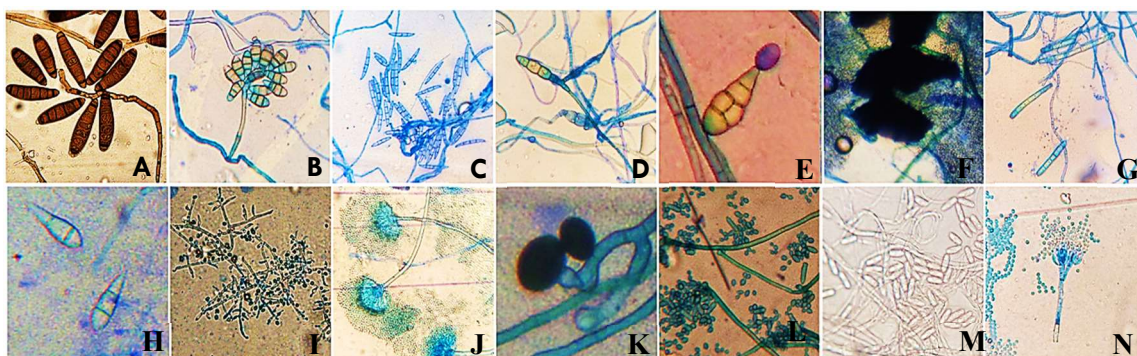
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Sanidade de sementes de arroz vermelho

Os fungos identificados e sua respectiva incidência nas sementes de arroz vermelho foram: *Bipolaris oryzae* (60,0%), *Curvularia* sp. (43,0%), *Fusarium* sp. (36,0%), *Trichoconiella padwickii* (35%), *Alternaria* sp. (17,0%), *Phoma* sp. (13,0%), *Cercospora oryzae* (12,0%), *Magnaporthe grisea* (11,0%), *Trichoderma* sp. (9,0%), *Aspergillus* sp. (8,0%), *Nigrospora* sp. (8,0%), *Cladosporium* sp. (5,0%), *Penicillium* sp. (5,0%), *Colletotrichum* sp. (3,0) (Figura 5 e 6).



**Figura 5.** Incidência de fungos em sementes de arroz vermelho (*Oryza sativa* L.).



**Figura 6.** Ilustração dos fungos identificados na sanidade de sementes de arroz vermelho. A – *Bipolaris oryzae*, B – *Curvularia* sp., C – *Fusarium* sp., D – *Trichoconiella padwickii*, E – *Alternaria* sp., F – *Phoma* sp., G – *Cercospora oryzae*, H – *Magnaporthe grisea*, I – *Trichoderma*



sp., J – *Aspergillus* sp., K – *Nigrospora* sp., L – *Cladosporium* sp., M – *Colletotrichum* sp., N – *Penicillium* sp..

Silva et al. (2014) observaram que o fungo *Curvularia lunata* mostrou-se patogênico para variedade de arroz Bonança, apresentando incidência elevadas com valores de 70%. Roma (2010) trabalhando com arroz irrigado encontrou os fungos *B. oryzae*, *C. lunata*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium solani*, *Microdochium oryzae*, *Nigrospora oryzae*, *Pyricularia grisea*, *Trichoconiella padwickii* e *Cladosporium cladosporioides* associados as sementes.

Scheidt (2017), encontrou sementes de arroz infectadas por uma ampla gama de patógenos, sendo os fungos *Microdochium oryzae*, *B. oryzae*, *Alternaria padwickii* e *Curvularia* sp. encontrados com maior incidência e prevalência.

Avaliando a qualidade sanitária de diferentes lotes de sementes de arroz provenientes de seis regiões orizícolas do Rio Grande do Sul, Farias et al. (2007a), observaram a ocorrência de *Alternaria* sp., *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp., *Nigrospora* sp. e *Phoma* sp., responsáveis por manchas nos grãos. Esses mesmos autores verificaram na cultivar BRS 406 uma incidência de 57% de *Bipolaris* sp., corroborando com os dados obtidos. De forma geral, esses microrganismos causam muitos danos quando associados a sementes, que vão desde mancha nos grãos até redução do potencial germinativo e vigor, além dos problemas ocasionados em condições de campo.

De acordo com Kandhari (2010), as plântulas de arroz infectadas por *Fusarium fujikuroi* ficam finas, com coloração verde amarelado claro, alongado anormalmente e algumas morrem antes de produzir grãos. Alguns outros sintomas são a descoloração nos nós inferiores e a produção de raízes adventícias em um ou mais nós acima do nível da água.

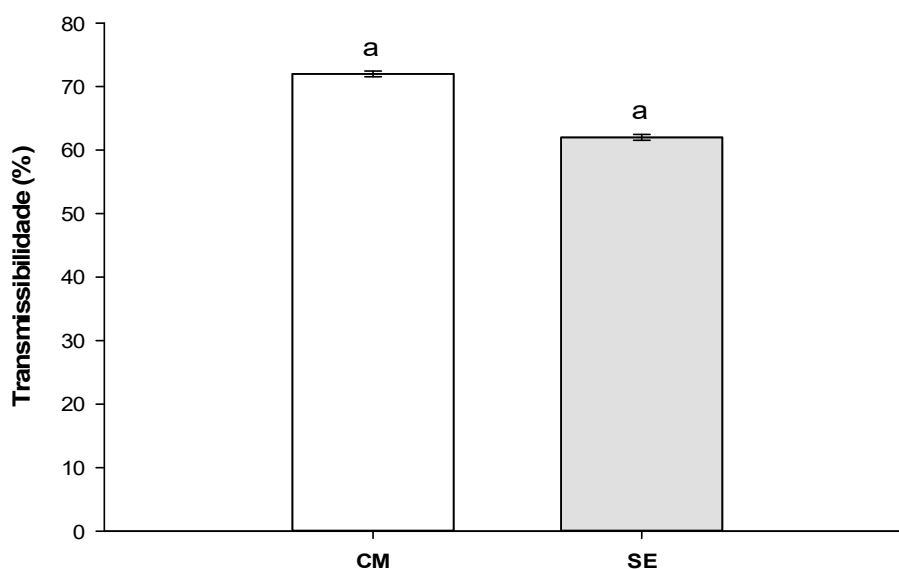
Para Farias et al. (2007b), a presença de *Alternaria padwickii*, associado às sementes de arroz, poderá ocasionar baixa germinação das sementes, diminuição da área foliar sadia, conseqüentemente ocasionando problemas de baixa produção, além de contribuir de forma significativa para mancha dos grãos.

Malavolta et al. (2007) avaliando a qualidade sanitária de sementes de arroz oriundas de diferentes sistemas de cultivo, verificaram uma variação, sendo observada uma com alta incidência dos fungos *P. grisea*, *B. oryzae* e *Microdochium oryzae* no cultivo inundado, enquanto que sob irrigação por aspersão predominaram *Pyricularia*

*grisea*, *Phoma sorghina* e *Drechslera* spp., sendo estes fungos responsáveis por causar depreciação do grão e danos expressivos em campo.

## 5.2. Transmissão de *Bipolaris oryzae* em sementes de arroz vermelho

A taxa de transmissão máxima de *B. oryzae* em semente-planta de arroz vermelho foi de 72,0% e 68,0%, com a inoculação através do contato direto das sementes sob a colônia fúngica do patógeno e imersão das sementes em suspensão de esporos do patógeno, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si. Com os resultados obtidos, confirma-se a transmissão desse microrganismo via sementes (Figura 7).



**Figura 7.** Taxa de transmissão de *Bipolaris oryzae* em sementes de arroz vermelho (*Oryza sativa* L.), inoculadas através do contato com micélio (CM) e suspensão de esporos (SE). CV (%): 14,10. CM – Contato com Micélio e SE – Suspensão de Esporos. Médias com mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

O resultado obtido mostra-se superior aos encontrados por Malavolta, et al. (2002), que obteve níveis de transmissão semente-plântula de 25%. Segundo Barnwal et al. (2013) a transmissão via sementes pode chegar a índices de até 80%.

Esses dois métodos de inoculação (imersão na suspensão de esporos e contato com a colônia fúngica desenvolvida) são comumente utilizados para inoculação de patógenos em sementes, pois garante que todas estejam com as estruturas fúngicas aderidas ao

tegumento, para que assim possa avaliar a taxa máxima de transmissão de determinado patógeno (MACHADO et al., 2001).

Estudos realizados por Sousa et al. (2009), considerando diferentes métodos de inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), cultivar Delta Opal, constataram que os métodos de inoculação na suspensão de conídios e contato direto com micélio destacaram-se como os mais eficazes para causar infecção nas sementes, não havendo diferença significativa entre eles. Farias (2016) também não observou diferença estatística entre esses dois métodos de inoculação em avaliação da taxa de transmissão de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodão, cultivar BRS 286 e Topázio.

No entanto, em alguns trabalhos, consideram o método de imersão de sementes o mais eficaz na inoculação de patógeno, como o realizado por Pedroso et al. (2010), onde constataram que a imersão das sementes salsa (*Petroselinum crispum*) em suspensão de conídios foi o mais adequado para inoculação de *Alternaria alternata* e *Alternaria dauci*.

Segundo Sousa et al. (2009) o método de contato direto apresenta como desvantagem, para algumas sementes, a dificuldade de caracterização entre infecção e contaminação, pois as sementes por ficar por um período mais longo em contato com a colônia fúngica, o que pode iniciar o processo germinativo em um período relativamente curto, com isso não obtendo níveis satisfatórios de infecção.

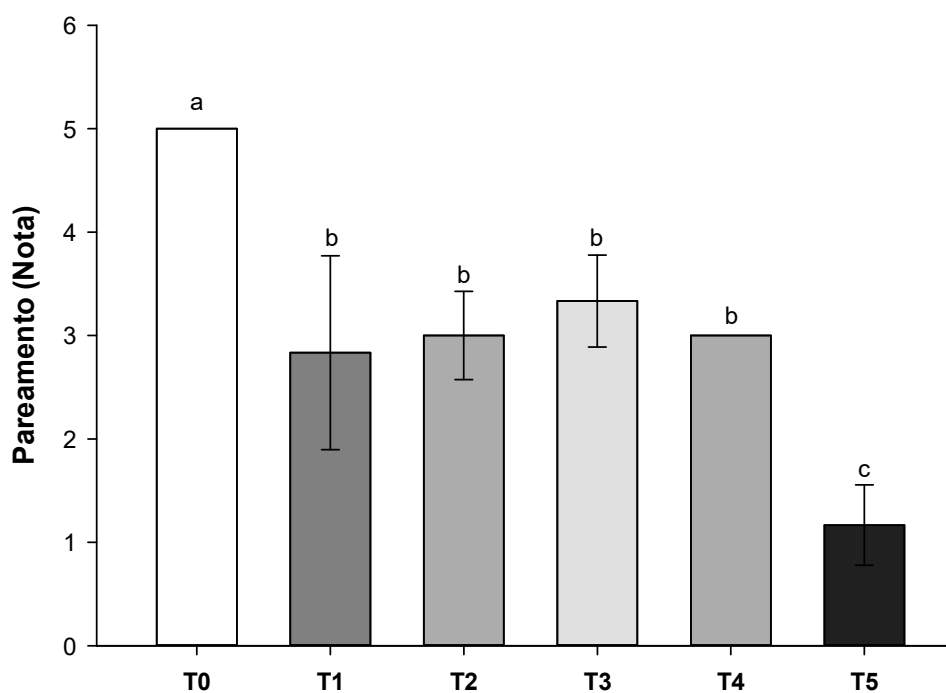
Em outras pesquisas, alguns autores relacionam que a agressividade do patógeno pode estar relacionada com período de contato das sementes com o mesmo, como foi verificado por Botelho et al. (2013), onde avaliando a inoculação de dois isolados de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão comum, observaram que após 36 horas das sementes em contato com micélio, não reduziu o estande final de plantas, no entanto, quando o período de contato com o mesmo isolado foi de 72 horas, houve redução no estande de 71,4%.

### **5.3. Teste de pareamento de culturas**

Todos os isolados de *Trichoderma* sp. apresentaram rápido crescimento micelial e intensa esporulação, e com apenas cinco dias de incubação foi possível observar a inibição no desenvolvimento de *Bipolaris oryzae*.

Detectou-se ação antagonista dos isolados de *Trichoderma* sobre o crescimento micelial de *B. oryzae* no teste de confronto direto e todos os isolados exerceram ação inibitória sobre o crescimento de *B. oryzae*, sendo agrupados entre a classe 1 e 3, diferindo estatisticamente da testemunha (Figura 7).

Dentre os 5 isolados de *Trichoderma* spp. testados, o tratamento T5 diferiu estatisticamente dos demais isolados, se mostrando mais eficiente, estando agrupado na classe 1, ou seja, o mesmo cresceu sobre o patógeno e ocupou toda a superfície do meio, sendo capaz de colonizar eficientemente o meio de cultura e produzir esporos em abundância sobre as colônias de *B. oryzae*, impedindo o crescimento do patógeno, devido sua ação micoparasita (Figuras 8).



**Figura 8.** Crescimento de *Bipolaris oryzae* em cultivo pareado com isolados de *Trichoderma* spp.. CV (%): 16,11. T0 – Testemunha; T1 – *Trichoderma asperellum* de Trichodel®; T2 – *Trichoderma* spp. isolado de arroz; T3 – *Trichoderma* spp. isolado de algodão; T4 – *Trichoderma* spp. isolado de fava; T5 – *Trichoderma* spp. isolado de leucena. Médias com mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Resultado semelhantes foram obtidos por Broetto et al. (2014) trabalhando com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. no biocontrole de *Machophomina phaseolina*,

constataram que em apenas cinco dias de incubação, os antagonistas já inibiam o desenvolvimento desse fungo.

Carvalho et al. (2015) também observou uma intensa esporulação de isolados de *Trichoderma* spp. utilizados no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e segundo esses autores, essa alta capacidade de produção de esporos é forma de avaliar o potencial desse antagonista, sendo esta uma ferramenta promissora no uso do controle biológico.

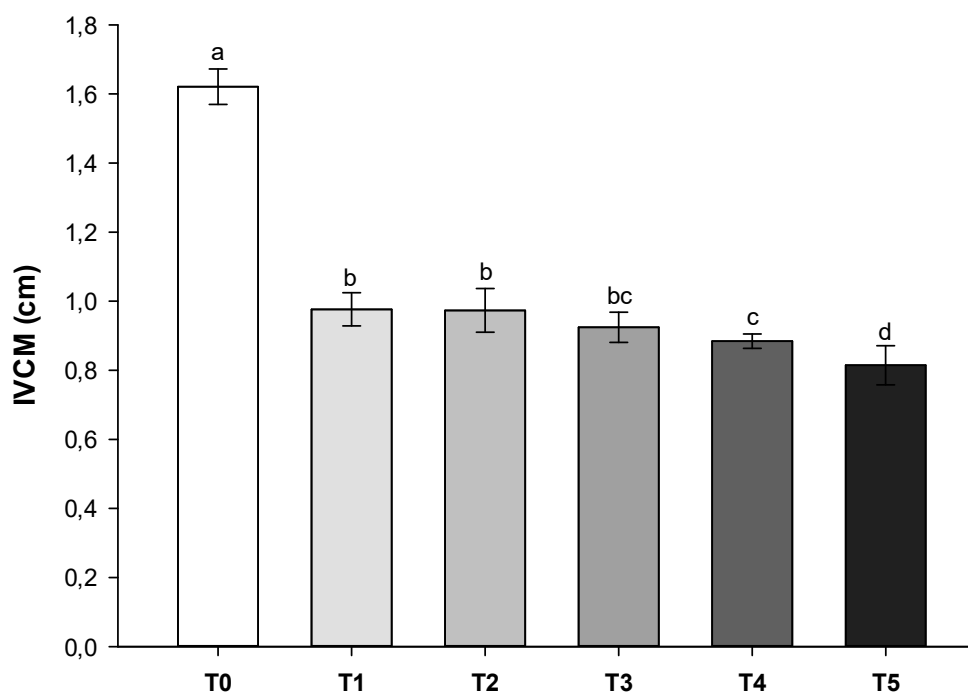
A capacidade de biocontrole depende de vários fatores e o método de cultivo pareado é uma das maneiras de realizar seleção de isolados com potencial de aplicação, onde por essa técnica pode-se considerar isolados muito eficientes aqueles que apresentarem notas entre 1,0 e 1,5, e eficientes aqueles que apresentarem notas entre 2,0 e 2,5 (ETHUR, 2006).

Isso foi demonstrado por Lima et al. (2016) ao avaliar atividade antagonista de isolados de *Trichoderma* em fungos filamentosos (*Alternaria* sp., *Aspergillus niger*, *Bipolaris* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium solani*), sendo verificado efeito antagonístico nos fungos testados. Para *Bipolaris* sp., o autores verificaram que esse fungo teve seu crescimento fortemente inibido, apresentando na classificação do pareamento notas 1 e 3, com valores de 100% a 66,6% de inibição do crescimento micelial.

Semelhantemente, Machado; Silva (2013) também constataram potencial antagonístico de *Trichoderma* spp. e produtos à base desse antagonista na redução do crescimento micelial de *Bipolaris* sp., *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp. e *Phoma* sp. oriundos de sementes *Gochnatia polymorpha* no teste de confronto direto, com notas variando de 1 a 2,5.

#### **5.4. Ação dos metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. sobre *Bipolaris oryzae***

Pelo teste de antibiose foi possível observar a produção de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp., verificando diferença significativa para o índice de velocidade do crescimento micelial de *B. oryzae* quando comparados com a testemunha. Dentre os tratamentos, semelhante ao que ocorreu no teste de confronto direto, o isolado T5 de *Trichoderma* spp. se mostrou mais eficiente, diferindo dos valores obtidos para os demais isolados de *Trichoderma* spp. (Figura 9).

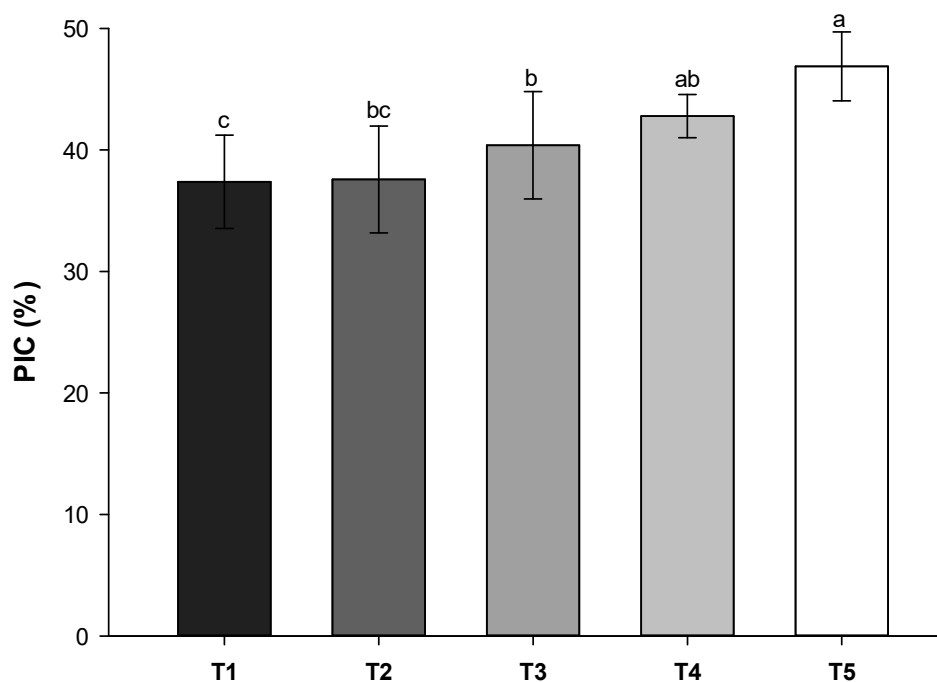


**Figura 9.** Efeito inibidor de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. sobre o índice de velocidade do crescimento micelial de *Bipolaris oryzae*. CV (%): 4,89. T0 – Testemunha; T1 – *Trichoderma asperellum* de Trichodel®; T2 – *Trichoderma* spp. isolado de arroz; T3 – *Trichoderma* spp. isolado de algodão; T4 – *Trichoderma* spp. isolado de fava; T5 – *Trichoderma* spp. isolado de leucena. Médias com mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Existe uma grande variedade de compostos produzidos por espécies de *Trichoderma*, incluindo enzimas líticas e hormônios, além de muitos metabólitos secundários com importantes funções biológicas, sendo na grande maioria responsáveis por estresses bióticos e abióticos (ABDELRAHMAN et al., 2016).

Nas pesquisas realizadas, dentre os vários mecanismos de ação de *Trichoderma* spp., a antibiose tem sido considerada uma das principais desses microrganismos (REINO et al., 2008). Substâncias foram observados por Abdelrahman et al. (2016), onde verificaram o acúmulo de mais de 25 metabolitos em plantas tratadas com dois isolados de *Trichoderma* sp., sendo a maioria representado por fenilpropanoides, estando esse composto envolvidos em mecanismo do tipo antibiose.

As médias dos dados de inibição de crescimento micelial de *B. oryzae*, demonstraram que compostos ou substâncias gasosas foram liberadas e mostraram efeitos inibitórios que situaram-se entre 38% e 47%. Dos isolados utilizados, o T5 e T4 foram os mais eficazes, comparando com os demais, onde os mesmos apresentaram inibição de 47% e 43%, respectivamente (Figura 10).



**Figura 10.** Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Bipolaris oryzae* por metabólitos voláteis produzidos por isolados de *Trichoderma* spp.. CV (%): 8,78. T1 – *Trichoderma asperellum* de Trichodel®; T2 – *Trichoderma* spp. isolado de arroz; T3 – *Trichoderma* spp. isolado de algodão; T4 – *Trichoderma* spp. isolado de fava; T5 – *Trichoderma* spp. isolado de leucena. Médias com mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

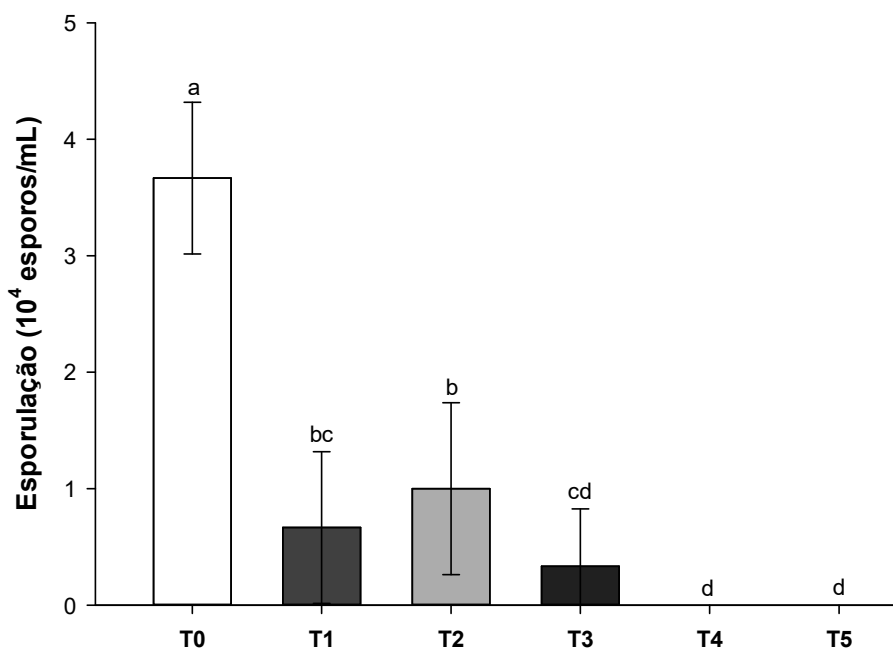
A capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. na produção de metabólitos voláteis já foi demonstrado em muitas pesquisas, como na realizada por Martini et al. (2014), onde constataram a influência desses metabólitos no crescimento micelial de *B. oryzae* e *Fusarium* spp. veiculados a sementes de arroz irrigado. A produção de metabólitos voláteis por *Trichoderma* também foi verificada por Guimarães et al. (2016) na redução do crescimento de *Cladosporium herbarum* obtido de sementes infectadas de

feijoeiro. Rodrigues et al. (2018) também observaram que isolados de *Trichoderma* spp. reduziram completamente o crescimento micelial de *Ceratocystis cacaofunesta*.

Isaias et al. (2014) em avaliação da suscetibilidade de *S. rolfsii* e *V. dahliae* aos metabólitos voláteis liberados pelos isolados de *Trichoderma* testados, verificaram uma variação no percentual de inibição do crescimento micelial desses patógenos, dependendo do metabólito avaliado, onde *V. dahliae* foi mais suscetível a ação dos metabólitos produzidos, com inibição acima de 70%, em comparação a *S. rolfsii*, que apresentou inibição em torno de 55%.

Entender a ação dos mecanismos antagônicos de isolados de *Trichoderma* spp. sobre fitopatógenos é importante para a seleção de agentes de biocontrole eficientes, sendo importante ressaltar, que esse potencial deve também ser avaliado em condições de campo, pois o nível de controle biológico de um patógeno pode variar em função do agente de biocontrole utilizado e sua capacidade de adaptação às condições do ambiente (ISAIAS et al., 2014).

Foi observado, que os tratamentos com o isolado T3, T4 e T5 inibiram significativamente a esporulação das colônias do isolados de *B. oryzae*, sendo constatada diferença desses tratamentos com os demais. Também foi verificado que todos os tratamentos de *Trichoderma* spp apresentaram inibição significativa na esporulação quando comparadas com a testemunha (Figura 11).



**Figura 11.** Número de esporos de *Bipolaris oryzae* sobre influência dos



metabólitos voláteis produzidos por isolados de *Trichoderma* spp.. CV (%): 13,83. T0 – Testemunha; T1 – *Trichoderma asperellum* de Trichodel®; T2 – *Trichoderma* spp. isolado de arroz; T3 – *Trichoderma* spp. isolado de algodão; T4 – *Trichoderma* spp. isolado de fava; T5 – *Trichoderma* spp. isolado de leucena. Médias com mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Valores transformados por  $(Y + 1,0)^{0,5}$ .

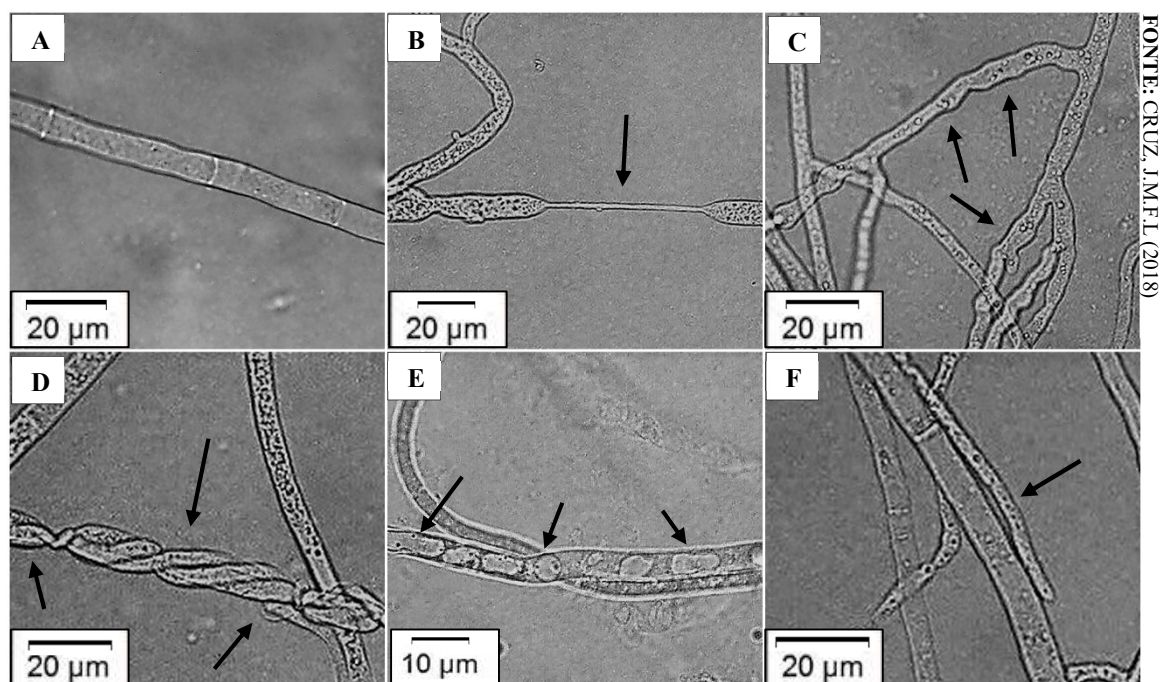
Além de reduzir o crescimento micelial do patógeno, os metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma* spp., podem impedir a esporulação ou germinação de esporos (SOLINO et al., 2017). Bomfim et al. (2010) também afirmaram que entre os efeitos provocados pelos antibióticos, observa-se a redução e/ ou paralisação do crescimento micelial, da esporulação e germinação de esporos, além de distorção de hifas e endólise.

No entanto, a baixa eficiência de *Trichoderma* sp. ao inibir o crescimento micelial e esporulação por meio de metabólitos voláteis não indica, necessariamente, a baixa eficiência do mesmo no controle da doença. A capacidade de biocontrole desses antagonistas não se restringe somente ao mecanismo de antibiose.

Na literatura, os mecanismos de ação como parasitismo, hiperparasitismo e micoparasitismo (SANTOS et al., 2012), competição (BENÍTEZ et al., 2004) e indução de resistência (ABDELRAHMAN et al., 2016) já foram descritos como fatores chave no controle de diversas doenças. Dessa forma esses antagonistas podem agir contra patógenos usando um ou mais mecanismos (DEMIRCI et al., 2011) e a atuação de vários mecanismos ao mesmo tempo faz com que o antagonista garanta sua eficiência no controle do patógeno tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

### **5.5. Micoparasitismo de *Trichoderma* spp. sobre *Bipolaris oryzae***

Foi observada ação micoparasitária de *Trichoderma* spp. sobre *B. oryzae* em todos os tratamentos aplicados, através de mecanismos tais como: vacuolização, enrolamento/estrangulamento de hifas, alteração/deformação da parede celular, crescimento paralelo de hifas (patógeno/hospedeiro) e plasmólise (Figura 12).



**Figura 12.** Interações observadas ao microscópio entre hifas de *Trichoderma* spp. sobre *Bipolaris oryzae*, isolado de arroz vermelho. A – Hifa sadia de *B. oryzae*.; B – Plasmólise; C – Alteração/deformação da parede celular; D – Enrolamento/estrangulamento de hifas; E – Vacuolização; F – Crescimento paralelo de hifas

Carvalho Filho et al. (2008) verificaram efeito positivo no crescimento paralelo, enrolamento e plasmólise de hifas na interação antagônica micoparasitária de *Trichoderma* spp. sobre *Cylindrocladium scoparium*. Montalvão (2012) obteve efeito significativo no micoparasismo de *Trichoderma harzianum* contra *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum* em tomateiro (*Solanum lycopersicum*), observando o enrolamento e deformação de hifas, bem como a penetração do patógeno.

### 5.6. Qualidade fisiológica de sementes tratadas com *Trichoderma* spp.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 5, verificou-se que, com exceção do isolado T4, não houve efeito significativo dos demais isolados sobre as variáveis analisadas quando comparadas com a testemunha, tanto para o contato com micélio, quanto para imersão na suspensão de esporos.

Quando comparou-se os resultados obtidos pelos dois métodos de inoculação, não constatou-se diferença estatística para germinação, primeira contagem e índice de velocidade de germinação (Tabela 5).

**Tabela 5.** Germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG) e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de arroz vermelho submetidas a tratamento com *Trichoderma* spp..

Tratamentos	GERMINAÇÃO					
	G (%)		PCG (%)		IVG	
	CM	SE	CM	SE	CM	SE
T0	100 aA	100 aA	99 aA	99 aA	4,99 aA	4,99 aA
T1	97 aA	98 aA	94 abA	93 abA	4,79 aA	4,84 aA
T2	99 aA	97 aA	99 aA	96 abA	4,95 aA	4,84 aA
T3	89 bA	89 bA	89 bA	86 bA	4,45 bA	4,42 bA
T4	99 aA	100 aA	98 abA	99 aA	4,93 aA	4,99 aA
T5	100 aA	100 aA	99 aA	100 aA	4,98 aA	5,00 aA
T6	98 aA	97 aA	97 abA	95 abA	4,88 aA	4,82 aA
CV (%)	2,53	2,73	4,22	4,84	2,84	2,86

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. TLeu – *Trichoderma* spp. isolado de leucena; TFav – *Trichoderma* spp. isolado de fava; TPro – *Trichoderma asperellum* de Trichodel®; TAlg – *Trichoderma* spp. isolado de algodão; TArr – *Trichoderma* spp. isolado de arroz; CM – Contato com Micélio e SE – Suspensão de Esporos (10<sup>8</sup> conídios/mL).

Na Tabela 6 observa-se que nas sementes inoculadas com T5 (0,032g) por meio do contato com micélio (CM) obteve resultados inferiores de massa verde de parte aérea quando comparados com os tratamento a base de *Trichoderma* spp.. Para o método de suspensão de esporos (SE), todos os tratamentos foram superiores, exceto o T2 (0,044g) que apresentou menor MVPA, não diferindo do tratamento controle (0,042g).

**Tabela 6.** Massa verde da parte aérea (MVPA), massa seca da parte aérea (MSPA) e comprimento de parte aérea (CPA) de plântulas de arroz vermelho submetidas a tratamento com *Trichoderma* spp..

Tratamentos	GERMINAÇÃO					
	MVPA (g)		MSPA (g)		CPA (cm)	
	CM	SE	CM	SE	CM	SE
T0	0,042 abcA	0,042 bA	0,0075 aA	0,0075 aA	12,85 aA	12,85 aA
T1	0,045 aA	0,046 abA	0,0054 bcA	0,0058 bcA	7,80 bA	6,97 cA
T2	0,043 abA	0,044 bA	0,0055 bcA	0,0055 cA	7,32 bA	7,87 cA
T3	0,046 aA	0,047 abA	0,0048 cA	0,0050 cA	7,62 bA	8,02 cA
T4	0,035 abcB	0,049 abA	0,0080 aA	0,0078 aA	12,15 aA	12,70 aA
T5	0,032 bcB	0,058 aA	0,0079 aA	0,0084 aA	11,70 aB	12,90 aA
T6	0,031 cB	0,050 abA	0,0069 abA	0,0072 abA	10,80 aA	11,35 bA
CV (%)	12,14	10,73	9,71	9,91	9,16	5,54

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. TLeu – *Trichoderma* spp. isolado de leucena;

TFav – *Trichoderma* spp. isolado de fava; TPro – *Trichoderma asperellum* de Trichodel®; TAlg – *Trichoderma* spp. isolado de algodão; TArr – *Trichoderma* spp. isolado de arroz; CM – Contato com Micélio e SE – Suspensão de Esporos ( $10^8$  conídios/mL).

Com relação a massa seca da parte aérea e comprimento de plântulas os tratamentos T5 e T4 apresentaram plantas mais vigorosas, com os valores de 0,0080g e 0,0079g para MSPA e 12,15 cm e 11,70 cm para CPA quando utilizou o método de contato com micélio do patógeno (CM) e 0,0078g e 0,0084g para MSPA e 12,70 cm e 12,90 cm para CPA pelo método de inoculação com suspensão de esporos (SE), respectivamente, não diferindo estatisticamente da testemunha e do fungicida para a MSPA e CPA no método CM. Para o método SE, apenas a testemunha foi semelhante aos tratamentos T5 e T4, proporcionando maiores resultados de comprimento da parte aérea em relação aos demais tratamentos (Tabela 6).

Em relação a comparação entre os métodos de inoculação, não foi verificada diferença para a MSPA. Os resultados de T5, T4 e fungicida para MVPA se mostrou superior no método de inoculação através da imersão das sementes na suspensão de esporos (SE). O T5 mostrou-se mais eficiente no CPA para o mesmo método de inoculação (Tabela 6).

A inoculação das sementes com os isolados T3 (0,021g) pelo método de contato com micélio (CM), resultou no menor valor de massa verde da raiz, não diferindo dos tratamentos T4 e T5. As sementes inoculadas com isolados T4 (0,047g) e T5 (0,054g) pelo método de suspensão de esporos (SE), proporcionaram maiores valores de MVRA, não diferindo do tratamento químico (Tabela 7).

**Tabela 7.** Massa verde da raiz (MVRA), massa seca de raiz (MSRA) e comprimento da raiz (CRA) de plântulas de arroz vermelho submetidas a tratamento com *Trichoderma* spp..

Tratamentos	GERMINAÇÃO					
	MVRA (g)		MSRA (g)		CRA (cm)	
	CM	SE	CM	SE	CM	SE
T0	0,024 abA	0,024 dA	0,0053 abA	0,0053 bA	13,80 abA	13,80 aA
T1	0,024 abA	0,028 cdA	0,0038 cdA	0,0038 cA	5,92 deA	6,25 bA
T2	0,025 abA	0,032 bcdA	0,0032 deA	0,0037 cA	6,52 deA	7,22 bA
T3	0,021 bB	0,036 bcdA	0,0026 eA	0,0028 cA	5,22 eA	6,62 bA
T4	0,036 aB	0,047 abA	0,0046 bcA	0,0050 bA	10,50 bcB	12,85 aA
T5	0,036 aB	0,054 aA	0,0058 aA	0,0064 aA	14,02 aA	13,57 aA
T6	0,029 abB	0,040 abcA	0,0055 abA	0,0054 bA	9,20 cdB	12,30 aA
CV (%)	24,13	17,80	11,12	8,96	15,46	6,82

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. TLeu – *Trichoderma* spp. isolado de leucena;

TFav – *Trichoderma* spp. isolado de fava; TPro – *Trichoderma asperellum* de Trichodel®; TAlg – *Trichoderma* spp. isolado de algodão; TArr – *Trichoderma* spp. isolado de arroz; CM – Contato com Micélio e SE – Suspensão de Esporos ( $10^8$  conídios/mL).

Para a massa seca da raiz o T5 obteve melhores resultados, entre os tratamentos com *Trichoderma* spp., para ambos métodos de inoculação, sendo 0,0508g para CM e 0,0064g para SE, no entanto o método SE, foi superior significativamente quando comparado com os demais tratamentos (Tabela 7).

Para comprimento de raiz, o melhor tratamento, quando comparado com a testemunha, para método de inoculação CM foi o T5 (14,02cm). Para o método SE os melhores tratamentos foram o T4 (12,85cm) e T5 (13,57cm) os quais não diferiram testemunha e do fungicida (Tabela 7).

Na comparação entre os métodos de inoculação, foi constatada diferença estatística para os tratamento T3, T4, T5 e fungicida na MVRA, onde o método SE obteve as melhores médias. Para o CRA, houve diferença significativa para o tratamento T5, sendo o método SE superior quando comparado com o método CM. Não houve diferença estatística para MSRA (Tabela 7).

Os tratamentos das sementes com os *Trichoderma* spp., com exceção do T1, influenciaram positivamente na emergência, obtendo melhores resultados em relação a testemunha no método CM e iguais significativamente no método SE (Tabela 8).

**Tabela 8.** Emergência (E), primeira contagem de emergência (PCE) e índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de arroz vermelho submetidas a tratamento com *Trichoderma* spp..

Tratamentos	EMERGÊNCIA					
	E (%)		PCE (%)		IVE	
	CM	SE	CM	SE	CM	SE
T0	90 bA	90 abA	1 bA	1 bA	3,22 cA	3,22 cA
T1	90 bA	86 bA	40 aA	13 abB	3,98 abA	3,37 bcB
T2	93 abA	92 abA	39 aA	25 aA	3,97 abA	3,79 abA
T3	92 abA	94 abA	37 aA	28 aA	3,99 abA	3,75 abcA
T4	96 abA	95 abA	8 bB	30 aA	3,58 bcA	3,74 abcA
T5	99 aA	99 aA	31 aA	36 aA	4,11 aA	4,14 aA
T6	96 abA	89 abB	7 abB	32 aA	3,64 abcA	3,55 bcA
CV (%)	4,11	5,62	19,46	22,74	5,46	6,52

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. TLeu – *Trichoderma* spp. isolado de leucena; TFav – *Trichoderma* spp. isolado de fava; TPro – *Trichoderma asperellum* de Trichodel®; TAlg – *Trichoderma* spp. isolado de algodão; TArr – *Trichoderma* spp. isolado de arroz; CM – Contato com Micélio e SE – Suspensão de Esporos ( $10^8$  conídios/mL). PCE – Valores transformados por  $(Y + 1,0)^{0,5}$ .

Para primeira contagem de emergência, no método de inoculação CM, com exceção do T4, houve diferença estatística para todos os outros tratamentos quando comparado com a testemunha. Já para o método SE, todos os tratamentos diferiram da testemunha (Tabela 8).

Com relação ao índice de velocidade de emergência, no método CM, os tratamentos resultaram em maiores índices, sendo superior a testemunha, com exceção do T5. Todos os tratamentos no método SE, foram superiores a testemunha, com exceção do T1 e do fungicida (Tabela 8).

Comparando os métodos de inoculação, o T5 na PCE pelo método CM, apresentou média inferior quando comparado com o método SE. O T1, para o método SE, nas variáveis de PCE e IVE obteve médias inferiores em relação ao método CM, diferindo estatisticamente, sendo observado resultado semelhante na emergência para o tratamento fungicida (Tabela 8).

Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos no método de inoculação CM para massa verde da parte aérea. No método de inoculação SE, observou-se que os tratamentos com os isolados de T3 (0,0424g), T4 (0,0469g) e T5 (0,0437g) foram os que apresentaram maiores valores não diferindo da testemunha (Tabela 9).

**Tabela 9.** Massa verde da parte aérea (MVPA), massa seca da parte aérea (MSPA) e comprimento da parte aérea (CPA) de plântulas de arroz vermelho submetidas a tratamento com *Trichoderma* spp..

Tratamentos	EMERGÊNCIA					
	MVPA (g)		MSPA (g)		CPA (cm)	
	CM	SE	CM	SE	CM	SE
T0	0,0522 aA	0,0522 aA	0,0113 bA	0,0113 cA	9,80 aA	9,80 aA
T1	0,0552 aA	0,0395 bB	0,0130 abA	0,0120 cA	9,90 aA	7,25 bB
T2	0,0595 aA	0,0410 bB	0,0135 aA	0,0127 bcA	9,97 aA	7,75 bB
T3	0,0612 aA	0,0424 abB	0,0137 aA	0,0126 bcB	10,20 aA	7,80 bB
T4	0,0590 aA	0,0469 abB	0,0127 abA	0,0138 abA	10,00 aA	8,47 abB
T5	0,0612 aA	0,0437 abB	0,0140 aA	0,0146 aA	10,02 aA	8,17 abB
T6	0,0532 aA	0,0410 bB	0,0125 abA	0,0126 bcA	10,00 aA	8,00 bB
CV (%)	6,89	10,05	5,89	5,14	3,56	9,09

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. TLeu – *Trichoderma* spp. isolado de leucena; TFav – *Trichoderma* spp. isolado de fava; TPro – *Trichoderma asperellum* de Trichodel®; TAlg – *Trichoderma* spp. isolado de algodão; TArr – *Trichoderma* spp. isolado de arroz; CM – Contato com Micélio e SE – Suspensão de Esporos (10<sup>8</sup> conídios/mL).

Todos os tratamentos de *Trichoderma* spp. promoveram uma maior massa seca de parte aérea no método de inoculação CM, não diferindo do fungicida e diferindo do tratamento controle. Para o método de inoculação SE, os maiores valores de MSPA foram obtidos pelo tratamento T4 (0,0138g) e T5 (0,0146g) (Tabela 9).

Para comprimento de plântulas também não houve diferença entre os tratamentos no método de inoculação CM. No método de inoculação SE observou-se um efeito positivo sobre o desenvolvimento de plântulas tratadas com T4 e T5, não diferindo estatisticamente da testemunha (Tabela 9).

Em comparação com os métodos testados, com exceção da testemunha nas variáveis, MVPA e CPA, o método de inoculação CM proporcionou melhor desenvolvimento e vigor das plântulas tratadas. Já para a MSPA o método de inoculação não diferiu estatisticamente, com exceção do T3, que obteve melhor resultado na inoculação com CM (Tabela 9).

Com base nos resultados apresentados na Tabela 10, verificou-se que não houve efeito significativo do tratamento das sementes com os isolados de *Trichoderma* spp. sobre a massa verde da raiz, massa seca da raiz para ambos os métodos de inoculação e para o comprimento da raiz (CRA) no método SE. Já no método CM, em relação ao CRA, houve efeito positivo dos demais tratamentos quando comparada a testemunha, com exceção do T1.

**Tabela 10.** Massa verde da raiz (MVRA), massa seca da raiz (MSRA) e comprimento da raiz (CRA) de plântulas de arroz vermelho submetidas a tratamento com *Trichoderma* spp..

Tratamentos	EMERGÊNCIA					
	MVRA (g)		MSRA (g)		CRA (cm)	
	CM	SE	CM	SE	CM	SE
T0	0,060 aA	0,060 aA	0,013 aA	0,013 aA	6,05 bA	6,05 aA
T1	0,061 aA	0,065 aA	0,013 aA	0,012 aA	7,20 abA	6,02 aB
T2	0,061 aA	0,069 aA	0,013 aA	0,013 aA	7,62 aA	5,85 aB
T3	0,065 aA	0,067 aA	0,013 aA	0,011 aB	7,75 aA	6,30 aB
T4	0,073 aA	0,065 aA	0,012 aB	0,014 aA	7,95 aA	6,82 aB
T5	0,076 aA	0,065 aA	0,014 aA	0,014 aA	7,75 aA	6,75 aB
T6	0,065 aA	0,075 aA	0,012 aA	0,012 aA	7,30 aA	6,30 aB
CV (%)	12,75	21,21	7,53	9,45	6,92	9,98

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. TLeu – *Trichoderma* spp. isolado de leucena; TFav – *Trichoderma* spp. isolado de fava; TPro – *Trichoderma asperellum* de Trichodel®; TAlg – *Trichoderma* spp. isolado de algodão; TArr – *Trichoderma* spp. isolado de arroz; CM – Contato com Micélio e SE – Suspensão de Esporos ( $10^8$  conídios/mL).

Na comparação entre os métodos de inoculação, com exceção da testemunha, observou-se diferença significativa, onde o CM proporcionou maior CRA. Já para a variável MSRA, o tratamento T1 obteve melhor resultado no método de inoculação de SE e o T5 no método de CM. Não houve diferença estatística para a MVRA entre os métodos testados (Tabela 10).

Semelhante aos resultados obtidos nesse trabalho, Doni et al. (2014) demonstraram que plantas de arroz inoculadas com *Trichoderma* spp. apresentaram aumento significativo da taxa de germinação, índice de velocidade de germinação, emergência, comprimento de plântulas, massa da parte aérea e da raiz.

Abdelrahman et al. (2016) ao avaliarem a influência de dois isolados de *T. longibrachiatum* inoculados em sementes de cebola (*Allium cepa*), verificaram que os mesmos promoveram melhoria do crescimento e desenvolvimento, com aumento significativo da porcentagem de germinação, emergência, peso e altura de plântulas em comparação ao tratamento controle, sendo esses resultados semelhantes aos encontrados nesse trabalho. Chagas et al. (2017) também ressaltaram o potencial de isolados de *Trichoderma asperellum* na promoção de crescimento inicial de plantas soja (*Glycine max*), feijão caupi (*Vigna unguiculata*), milho (*Zea mays*) e arroz (*Oryza sativa*), corroborando com os resultados observados nesse trabalho.

A capacidade de *Trichoderma* spp. em proporcionar o crescimento mais vigoroso de plantas está ligado a sua capacidade de produção de auxinas que estimula o alongamento celular e a iniciação da raiz e giberelina que está envolvida na divisão celular que influencia na germinação da semente (DONI et al., 2014). Além disso, Cai et al. (2013) relataram que o metabólito secundário, harzianolide produzido por *Trichoderma* spp. pode influenciar no desenvolvimento do estágio inicial da planta através do aumento do comprimento da raiz.

Diversos fungos promotores de crescimento são usados na agricultura (BUBA et al., 2015), sendo *Trichoderma* o mais comum, por possuir diversas espécies capazes de estimular o crescimento das plantas, aumentando a absorção de água e minerais, notadamente fosfato e suprimir doenças de plantas (YADAV et al., 2015).

Segundo Carvalho et al. (2014) a colonização da superfície da sementes e hipocótilo pelo antagonista é a principal característica para seleção de potenciais agentes de biocontrole, pois promove a proteção de possíveis sítios de infecção do patógeno.



No teste de germinação detectou-se a colonização do *Trichoderma* spp. nas raízes primárias e secundárias. O desenvolvimento do antagonista no sistema radicular é característica de fundamental importância para agentes de controle biológico, pois promove a proteção de possíveis sítios de infecção (Figura 13).

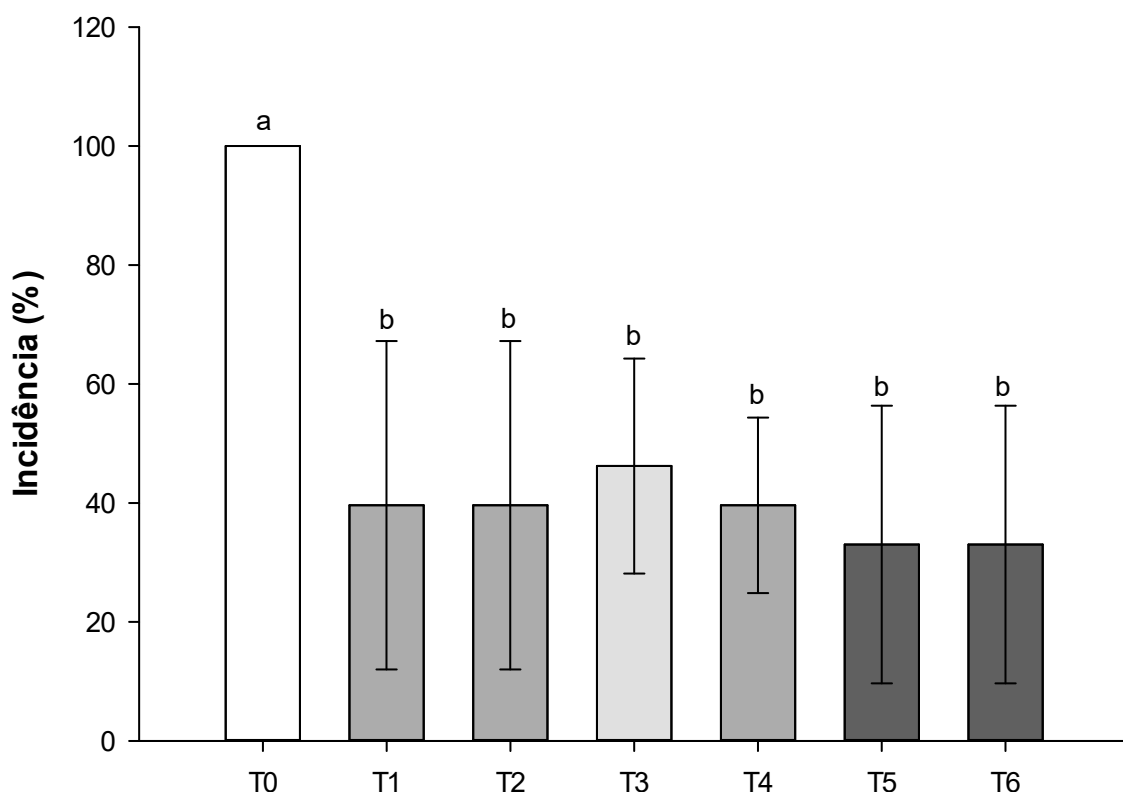


**Figura 13.** *Trichoderma* spp. colonizando plântulas de arroz vermelho (*Oryzae sativa* L.)

### 5.7. Controle *in vivo* de *Bipolaris oryzae* com *Trichoderma* spp.

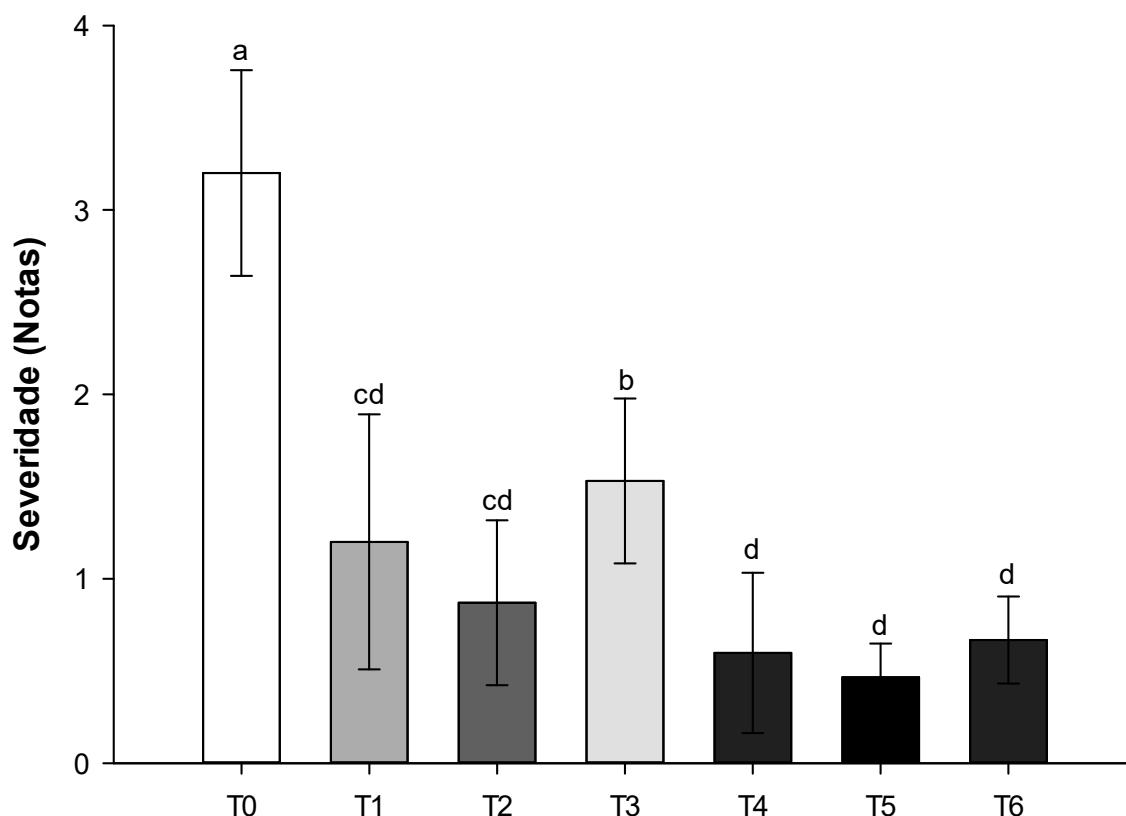
#### EXPERIMENTO 1

Para incidência da doença, verificou-se redução significativa em todas as plantas tratadas com os isolados de *Trichoderma* spp., onde observou-se que na testemunha (plantas não tratadas) todas as plantas (100%) apresentaram sintomas de mancha-parda e nos tratamentos os valores variaram de 33% a 46%. Não foram verificadas diferenças significativas entre os isolados de *Trichoderma* spp. e o fungicida (Figura 14).



**Figura 14.** Incidência da Mancha Parda, causada por *Bipolaris oryzae* em plantas de arroz vermelho submetidas a tratamento com *Trichoderma* spp.. CV (%): 37,31. T0 – Testemunha; T1 – *Trichoderma asperellum* de Trichodel®; T2 – *Trichoderma* spp. isolado de arroz; T3 – *Trichoderma* spp. isolado de algodão; T4 – *Trichoderma* spp. isolado de fava; T5 – *Trichoderma* spp. isolado de leucina; T6 – Fungicida. Médias com mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Valores transformados por  $(Y + 1,0)^{0,5}$ .

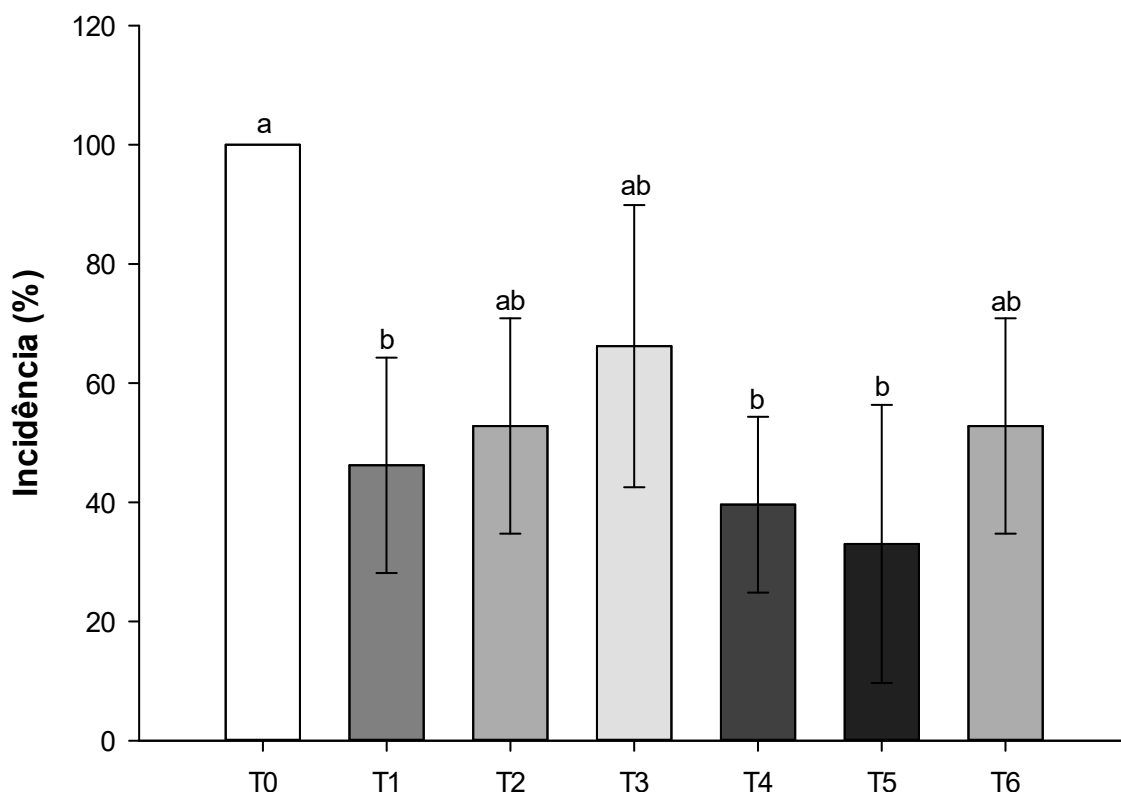
Para severidade, os tratamentos a base de *Trichoderma* spp se mostraram efetivos, com exceção do T3, que não diferiram estatisticamente do tratamento fungicida. Quando comparados com a testemunha, todos os tratamentos apresentaram notas inferiores a 2 (3,2% da área foliar lesionada), diferindo do tratamento controle (Figura 15).



**Figura 15.** Severidade da Mancha Parda, causada por *Bipolaris oryzae* em plantas de arroz vermelho submetidas a tratamento com *Trichoderma* spp.. CV (%): 10,05. T0 – Testemunha; T1 – *Trichoderma asperellum* de Trichodel®; T2 – *Trichoderma* spp. isolado de arroz; T3 – *Trichoderma* spp. isolado de algodão; T4 – *Trichoderma* spp. isolado de fava; T5 – *Trichoderma* spp. isolado de leucina; T6 – Fungicida. Médias com mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Valores transformados por  $(Y + 1,0)^{0,5}$ .

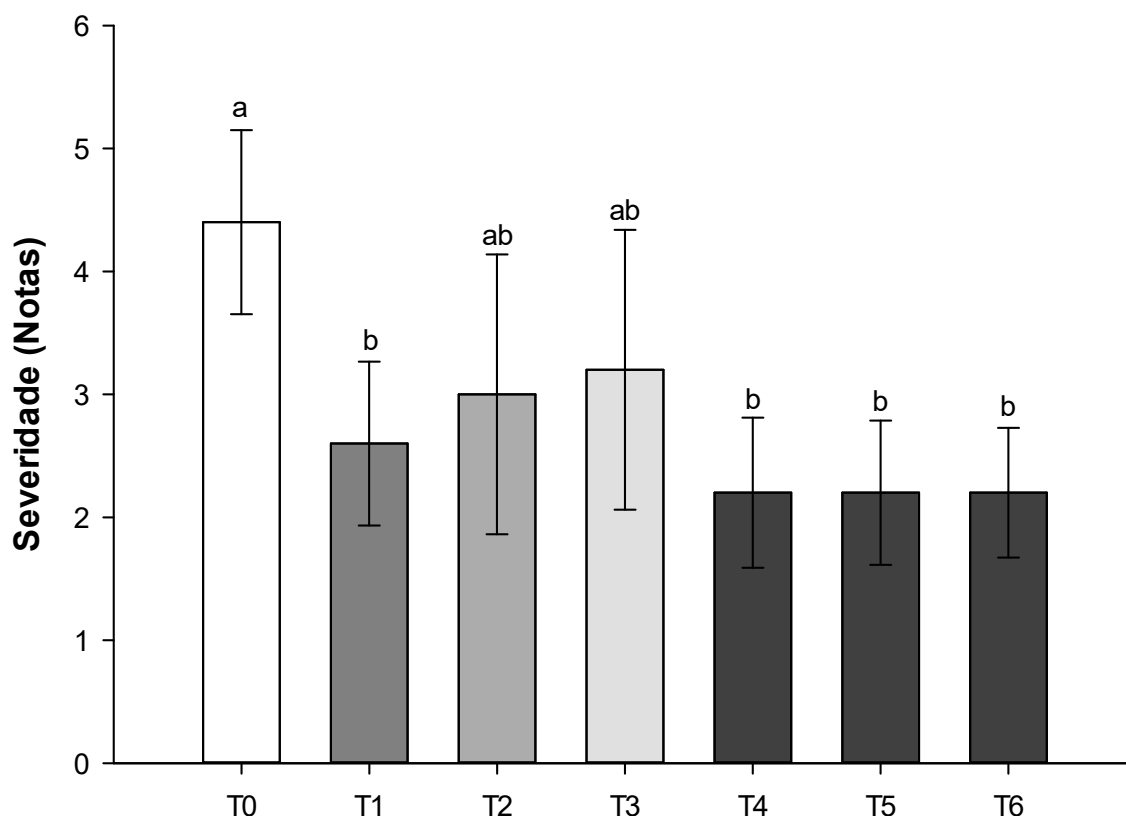
## EXPERIMENTO 2

Verificou-se que, de forma geral, a aplicação dos isolados de *Trichoderma* spp. resultou em redução significativa da incidência de mancha parda do arroz vermelho quando comparada com a testemunha. Ao final do experimento (30 dias) os tratamentos apresentaram redução da incidência, variando de 33,0% a 66,2%, não havendo diferença significativa entre os tratamentos e o fungicida (Figura 16).



**Figura 16.** Incidência da Mancha Parda, causada por *Bipolaris oryzae* em plantas de arroz vermelho submetidas a tratamento com *Trichoderma* spp.. CV (%): 20,25. T0 – Testemunha; T1 – *Trichoderma asperellum* de Trichodel®; T2 – *Trichoderma* spp. isolado de arroz; T3 – *Trichoderma* spp. isolado de algodão; T4 – *Trichoderma* spp. isolado de fava; T5 – *Trichoderma* spp. isolado de leucina; T6 – Fungicida. Médias com mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Valores transformados por  $(Y + 1,0)^{0,5}$ .

A severidade foi significativamente menor com as aplicações prévias de *Trichoderma* spp. se comparado com a severidade das mudas inoculadas somente com *B. oryzae* (T0). No geral, os tratamentos reduziram as lesões ocasionadas por *B. oryzae* em plantas de arroz vermelho, com nota entre 2 (3,2% de lesões na folha) e 3 (6,4% de lesões na folha), sendo observado que esses tratamentos na diferiram estatisticamente do tratamento fungicida (Figura 17).



**Figura 17.** Severidade da Mancha Parda, causada por *Bipolaris oryzae* em plantas de arroz vermelho submetidas a tratamento com *Trichoderma* spp.. CV (%): 29,58. T0 – Testemunha; T1 – *Trichoderma asperellum* de Trichodel®; T2 – *Trichoderma* spp. isolado de arroz; T3 – *Trichoderma* spp. isolado de algodão; T4 – *Trichoderma* spp. isolado de fava; T5 – *Trichoderma* spp. isolado de leucina; T6 – Fungicida. Médias com mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Khalili et al. (2012), avaliando três isolados de nativos de *Trichoderma harzianum*, *T. virens* e *T. atroviride*, no controle da mancha parda em arroz (*Oryza sativa*) obteve controle variando de 32,2 a 48,9 % após pulverização foliar de isolados de *Trichoderma* em cultivares de Tarom.

Abdel-Fattah et al. (2007), obtiveram notas de severidades entre 2,5 e 4, com o tratamento foliar em arroz com *Trichoderma harzianum*, verificando um índice máximo de severidade da doença de 53,5%, para a mesma suspensão de esporos aplicada neste trabalho. Também observaram, uma incidência de 12% de *B. oryzae* para as plantas tratadas.

Uma significativa redução no sintoma de podridão basal causada por *Fusarium oxysporum* f. sp *cepa* foi observada em plantas de cebola (*Allium cepa* L.) tratadas com dois isolados de *T. longibrachiatum* (ABDELRAHMAN et al., 2016). Semelhantemente, Souza et al. (2014) observaram redução da severidade de requeima da batata ao tratar as plantas com suspensão de esporos de *T. harzianum* e *T. longibrachiatum*. Para os autores, essa eficiência, provavelmente, está associada a suas características intrínsecas como mecanismos que sobrepõem a defesa dos patógenos, competir com microrganismo do solo e resistir aos fatores abióticos, que sugere que esses isolados possui um bom potencial no controle de *P. infestans* em condições de campo.

Segundo Shores et al. (2010) a influência de espécies de *Trichoderma* no crescimento das plantas e tolerância a fatores abióticos e bióticos também se deve a alteração no proteoma e metaboloma da planta com a colonização de raízes.

Gava; Menezes (2012) verificaram que, de forma geral, a aplicação de isolados de *Trichoderma* resultou em redução significativa da incidência de doenças do melão (*Cucumis melo*) em área de cultivo naturalmente infestada no Vale do São Francisco. Ao final do experimento (73 dias) os tratamentos com os isolados LCB49 e LCB50 apresentaram a maior eficácia de controle, com 48,1 e 51,6%, respectivamente, sendo esses resultados próximo aos encontrados nesse trabalho.

*Trichoderma* spp. demonstraram ser agentes eficientes no biocontrole do mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, no feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), com redução da doença em torno de 80% em trabalho realizado por Carvalho et al. (2015). Além disso, esses autores também observaram a redução no número de apotécio, que são estruturas de frutificação desse patógeno.

A proteção de plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) por *Trichoderma harzianum*, *T. strigosum* e *T. theobromicola* contra a antracnose, causada por *Colletotrichum lindemuthianum* foram observadas por Pedro et al. (2012) sendo verificado valores de 77,6% a 97,54% de redução. Além da redução da severidade, esses autores também observaram a eficiência desses isolados na promoção de crescimento de plantas de feijão tratadas. Bae et al. (2011) também constataram que isolados de *T. theobromicola* foi capaz de atrasar o desenvolvimento de sintomas de doença causados por *P. capsici* em pimentão (*Capsicum annuum*).

## 6. CONCLUSÕES

1. Todos os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram ação micoparasitárias.
2. *Trichoderma* spp. se mostraram eficientes no controle *in vitro* e *in vivo*.
3. *Trichoderma* spp. não interferiu na qualidade fisiológica das sementes.
4. *Bipolaris oryzae* apresentou alta incidência em sementes.
5. A incidência e severidade da doença foram reduzidas com aplicação dos tratamentos à base de *Trichoderma* spp.
6. O fungo *Bipolaris* apresentou alto índice de transmissão semente-planta.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABDEL-FATTAH, G. M.; SHABANA, Y. M.; ISMAIL, A. E.; RASHAD, Y. M. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent against *Bipolaris oryzae*. **Mycopathologia**, v.164, n.2, p. 81-89, 2007.

ABDELRAHMAN, M.; ABDEL-MOTAAL, F.; EL-SAYED, M.; JOGALIAH, S.; SHIGYO, M.; ITO, S. I.; TRAN, L. S. P. Dissection of *Trichoderma longibrachiatum*-induced defense in onion (*Allium cepa* L.) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepa* by target metabolite profiling. **Plant Science**, v.246, p.128-138, 2016.

AMORIO, D. J. H.; CUMAGUN, C. J. R. Pathogenicity and cytological examination of adapted and non-adapted *Bipolaris* species on resistant and susceptible cultivars of rice and corn. **Mycosphere**, v. 8, n. 3, p. 377-391, 2017.

BABU, A. N.; JOGALIAH, S.; ITO, S. I.; NAGARAJ, A. K.; TRAN, L. S. P. Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenol oxidase. **Plant Science**, v. 231, p. 62-73, 2015.

BAE, H.; ROBERTS, D. P.; LIM, H. S.; STREM, M. D.; PARK, S. C.; RYU, C. M.; MELNICK, R. L.; BAILEY, B. A. Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.24, n.3, p. 336-351, 2011.

BARNWAL, M. K.; KOTASTHANE, A.; MAGCULIA, N.; MUKHERJEE, P. K.; SAVARY, S.; SHARMA, A. K.; SINGH, H. B.; SINGH, U. S.; SPARKS, A. H.; VARIAR, M.; ZAIDI, N. A review on crop losses, epidemiology and disease management of rice Brown spot to identify research priorities and knowledge gaps. **European Journal of Plant Pathology**, v. 136, n. 3, p. 443–457, 2013.



BASTOS, S. M. C. **Propriedades termodinâmicas de adsorção de água de dois genótipos de arroz-vermelho**. Anápolis, 2009. 88f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2009.

BELL, D.K.; WELLS. H.D.; MARKHAM, C.R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, n. 4, p.379-382, 1982.

BENITEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v.7, n.4, p.249-260, 2004.

BOMFIM, M. P.; JOSÉ, A. R. S.; REBOUÇAS, T. N. H.; ALMEIDA, S. S.; SOUZA, I. V. B.; DIAS, N. O. Avaliação antagônica in vitro e in vivo de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.36, n.1, p. 61-67, 2010.

BOTELHO, L. D. S.; ZANCAN, W. L. A.; MACHADO, J. D. C.; BARROCAS, E. N. Performance of common bean seeds infected by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Seed Science**, v.35, n.2, p.153-160, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p.

BROETTO, L.; COLTRO-RONCATO, S.; MEINERZ, C. C.; DILDEY, O.D.F.; PAZDIORA, P.C.; GONÇALVES, E. D. V.; MORAES, A. J.; HENKEMEIER, N. P.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R. Crescimento micelial e produção de microescleródios de *Macrophomina phaseolina* confrontado com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. **Revisão Anual de Patologia de Plantas** v.13, n.4, p.310-317, 2014.

BROTMAN, Y.; GUPTA, K.J.; VITERBO, A. *Trichoderma*. **Current Biology**, v. 20, p. 390-391, 2010.

CARVALHO FILHO, M. R.; MENÊZES, J. E.; MELLO, S. C. M.; SANTOS, R. P. Avaliação de isolados de *Trichoderma* no controle da mancha foliar de eucalipto in vitro e quanto a esporulação em dois substratos sólidos. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 2008.

CARVALHO, D. D. C.; GERALDINE, A. M.; LOBO JUNIOR, M.; MELLO, S. C. M. Biological control of white mold by *Trichoderma harzianum* in common bean under field conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 12, p. 1220-1224, 2015.

CARVALHO, D. D. C.; LOBO JUNIOR, M.; MARTINS, I.; INGLIS, P. W.; MELLO, S. C. M. Biological control of *Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. **Tropical Plant Pathology**, v.39, n. 5, p.384-391, 2014.

CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M.; SILVA, M. C. Controle de *Fusarium oxysporum f.sp. phaseoli* in vitro e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 1, p. 028-034, 2011.

CHAGAS, L. F. B.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; SOARES, L. P.; FIDELIS, R. R.. *Trichoderma* na promoção do crescimento vegetal. **Revista de Agricultura Neotropical**, v.4, n.3, p.97-102, 2017.

CHENG, C.H.; YANG, C.A.; LIU, S.Y.; LO, C.T.; HUANG, H.C.; LIAO, F.C.; PENG, K.C. Cloning of a novel l-amino acid oxidase from *Trichoderma harzianum* ETS 323 and bioactivity analysis of overexpressed l-amino acid oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 9142–9149, 2011.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safras de grãos** – v.1, n1. Disponível em <http://conab.gov.br> Acesso em: 29 de agosto de 2018.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. 2.ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1983. 539p.

CRUZ, J. M. F. L.; FARIAS, O. R.; OLIVEIRA, M. D. M.; GOMES, R. S. S. G.; NASCIMENTO, L. C. Controle de *Colletotrichum truncatum* agente causal da antracnose do feijão-fava por *Trichoderma* spp.. In: II Congresso Internacional da Diversidade do Semiárido, 2017, Campina Grande. **Anais II CONIDIS**. Campina Grande: Realize Eventos & Editora, v. 1. p. 1-9, 2017.

DEMIRCI, E.; DANE, E.; EKEN, C. In vitro antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia on potato tubers against *Rhizoctonia solani*. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v.35, n.4, p. 457-462, 2011.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. **Transactions British Mycological Society**, v. 57, n. 1, p. 363-369, 1971.

DONI, F.; ANIZAN, I.; CHE RADZIAH, C. M. Z.; SALMAN, A. H.; RODZIHAN, M. H.; YUSOFF, W. M. W. Enhancement of rice seed germination and vigour by *Trichoderma* spp. **Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology**, v.7, n.21, p. 4547-4552, 2014

ETHUR, L. Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro**. 2006. 154 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2018. **Yearbook of statistics: summary tables**. FAO. (Disponível em <http://www.fao.org>). Acesso em: 29 de agosto de 2018.

FARIAS, C. R. J.; AFONFO, A. P. S.; BRANDÃO, M. F.; PIEROBOM, C. R, Incidência de fungos associados a sementes de arroz em seis regiões produtoras do Rio Grande do Sul. **Current Agricultural Science and Technology**, v.13, n.4, p. 487-490, 2007a.

FARIAS, C. R. J.; AFONFO, A. P. S.; BRANDÃO, M. F.; PIEROBOM, C. R. Ocorrência de *Alternaria padwickii* (Ganguly) em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) (Poaceae) produzidas em quatro regiões orizícolas do Rio Grande do Sul e seu efeito sobre plântulas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 4, n., p. 245-249, 2007b.

FARIAS, O. R. **Qualidade de sementes de algodoeiro (*Gossypium* spp.) submetidas ao controle biológico**. 2016. 80 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2016.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

GAVA, C. A. T.; MENEZES, M. E. L. Eficiência de isolados de *Trichoderma* spp no controle de patógenos de solo em meloeiro amarelo. **Revista Ciência Agronômica**, v.43, n.4, 2012.

GOODING, G. V.; LUCAS, G. B. Factors influencing sporangial formation and zoospore activity in phytophthora-parasitica var nicotianae. **Phytopathology**, v. 49, n. 5, p. 277-281, 1959.

GUIMARÃES, C. M.; FAGERIA, N. K.; BARBOSA FILHO, M. P. Como a planta de arroz se desenvolve. **Informações Agronômicas**, n. 99, 2002.

GUIMARÃES, G. R. FERREIRA, D. S.; GALVÃO, C. S.; MELLO, S. C. M.; CARVALHO, D. D. C. Ação de metabólitos voláteis e não voláteis de *Trichoderma harzianum* sobre o crescimento de *Cladosporium herbarum*. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v.21, n.1, p. 7-11, 2016.

HABIB, A.; JAVED, N.; SAHI, S. T.; WAHEED, M. Detection of seed borne mycoflora of different coarse and fine rice varieties and their management through seed treatments. **Pakistan Journal of Phytopathology**, v.24, n.2, p.133-136, 2012.

ISAIAS, C. O.; MARTINS, I.; SILVA, J. B. T.; SILVA, J. P.; MELLO, S. C. M. Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, v.40, n.1, p.34-41, 2014.

ISLAM, S.; AKANDA, A. M.; SULTANA, F.; HOSSAIN, M. M. Chilli rhizosphere fungus *Aspergillus* spp. PPA1 promotes vegetative growth of cucumber (*Cucumis sativus*) plants upon root colonisation. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.47, n.10, p.1231-1238, 2014.

JULIANO, B. O. **Rice in human nutrition**. Rome. FAO, 1993. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/t0567e/T0567E00.htm>. Acesso em: 22 novembro. 2018.

KANDHARI, J. Importantes doenças fúngicas do arroz na Índia e sua gestão. Em: **Taxonomia e Ecologia dos Fungos Indianos**, MUKERJI, K. G.; MUKERJI, C (Eds.). IK International Pvt. Ltd., Nova Deli, Índia, ISBN: 13-9789380026923, pp: 223-249. 2010.

KAWUBE, G.; KANOBE, C.; EDEMA, R.; TUSIIME, G.; MUDINGOTTO, P. J.; ADIPALA, E. Efficacy of manual seed sorting methods in reduction of transmission of rice and cowpea seed-borne diseases. **African Crop Science Conference Proceeding**, v.7, p.1363- 1367, 2005.

KHALILI, E.; SADRAVI, M.; NAEIMI, S.; KHOSRAVI, V. Biological control of rice brown spot with native isolates of three *Trichoderma* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, n.1, p. 297-305, 2012.

KUMAR, H.; AHMAD, S.; ZACHARIA, S.; KUMAR, S.; ALI, A. Impact of different fungicides combination against brown leaf spot (*Drechslera oryzae*) of rice under the *invitro* and *in vivo*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.6, n.1, p. 341-344, 2017.

KUMARI, S.; KUMAR, A.; RANI, S. Morphological characterization of *Bipolaris oryzae* causing brown spot of paddy in bihar. **International Education & Research Journal**, v. 1, n. 5, p. 84-87, 2015.

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; BELTRAME, R.; SANTOS, Á. F.; MÜLLER, J.; ARAÚJO, M. M. Tratamento biológico e químico em sementes de *Cedreia fissilis* para controle de *Rhizoctonia* sp. **Cerne**, v. 19, n. 1, p. 169-175, 2013.

LENZ, G.; BALARDIN, R. S.; CORTE, G. D.; MARQUES, L. N.; DEBONA, D. Escala diagramática para avaliação de severidade de mancha-parda em arroz. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, p. 752-758, 2010.

LIMA, M. L. P.; VAZ, M. C. A.; SILVA, A. S.; SOUZA, K. A.; TUÑÓN, G. I. L. *In vitro* confrontation of *Trichoderma* spp. isolates with phytopathogenic and non-phytopathogenic fungi. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 3, n. 2, p. 1–8, 2016.

MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C. F. e ANTONIOLLI, Z. I. Trichoderma no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v.35, n.1, p. 274-288, 2012.

MACHADO, D. F.; SILVA, A. C. F. *Trichoderma* no controlo in vitro de fungos presentes em diásporos de *Gochmatia polymorpha*. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v.36, n.2, p. 182-191, 2013.

MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; VIEIRA, M. G. G. C.; ALVES, M. C. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos utilizando monitol. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n. 95, p. 101, 2001.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation of seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.1, p.176-177, 1962.

MALAVOLTA, V. M. A.; PARISI, J. J. D.; TAKADA, H. M. Efeito de diferentes níveis de incidência de *Bipolaris oryzae* em sementes de arroz sobre aspectos fisiológicos da

semente, transmissão do patógeno as plântulas e produção. **Summa Phytopathologica**, v. 28, n. 4, p. 336-340, 2002.

MALAVOLTA, V. M. A.; SOLIGO, J. A.; DIAS, D. D.; BASTOS, C.R. Incidência de fungos e quantificação de danos em sementes de genótipos de arroz. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.33, n.3, p. 280-286, 2007.

MARCUZZO, L.L.; CARVALHO, J. Avaliação de formulados biológicos no crescimento e manejo da raiz rosada em cebolinha-verde. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 1, p. 88-89, 2018.

MARTINI, L. B.; ETHUR, L. Z.; DORNELES, K. R. Influência de metabólitos decendários de *Trichoderma* spp. no desenvolvimento de fungos veiculados pelas sementes e na germinação de sementes de Arroz. **Ciência e Natura**, v. 36 n. 2, p. 86–91, 2014.

MENESES, P. R.; FARIAS, C. R. J.; CANIELA, A. R. A.; SCHWANCK, A. A.; DEIBLER, A. N.; FUNCK, G. D.; DEL PONTE, E. M. Regional and varietal differences in prevalence and incidence levels of Bipolaris species in Brazilian rice seedlots. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n.5, p. 349–356, 2014.

MILANESI, P. M.; BLUME, E.; ANTONIOLI, Z. I.; MUNIZ, M. F. B.; SANTOS, R. F.; FINGER, G.; DURIGON, M. R. Biocontrole de *Fusarium* spp. com *Trichoderma* spp. e promoção de crescimento em plântulas de soja. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 347-356, 2013.

MONTALVÃO, S. C. L. **Potencial de *Trichoderma* spp. no biocontrole de doenças do tomateiro**. Brasília, 2012. 124f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

MORANDI, M. A. B.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BETTIOL, W.; TEIXEIRA, H. Controle biológico de fungos fitopatogênicos. **Informe Agropecuário**, v.30, n.251, p.73-82, 2009.

MWENDO, M.M.; OCHWO-SSEMAKULA, M.; LAMO, J.; GIBSON, P.; EDEMA, R. Reaction of upland rice genotypes to the brown spot disease pathogen *Bipolaris oryzae*. **African Journal of Rural Development**, v. 2, n. 1, p.127-133, 2017.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tombamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.)**. 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

PARAGINSKI, R. T.; ZIEGLER, V.; TALHAMENTO, A.; ELIAS, M. C.; OLIVEIRA, M. Propriedades tecnológicas e de cocção em grãos de arroz condicionados em diferentes temperaturas antes da parboilização. **Brasilian Journal of Food Technology**, v.17, n.2 p. 146–153, 2014.

PAULA JÚNIOR, T. J.; TEIXEIRA, H.; FADI, N. M. A. M.; VENZON, M.; JESUS JÚNIOR, W. C., MORANDI, M. A. B.; PALLINI, A. Interações entre fitófagos e patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.15, p.353-402, 2007.

PEDRO, E. A. S.; HARAKAVA, R.; CLEUSA MARIA MANTOVANELLO LUCON, C. M. M.; GUZZO, S. D. Promoção do crescimento do feijoeiro e controle da antracnose por *Trichoderma* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.11, p.1589-1595, nov. 2012.

PEDROSO, D. C.; MENEZES, V. O.; MUNIZ, M. F. B.; PIVETA, G.; TUNES, L. M.; MULLER, J.; MENEZES, N. L. Métodos de inoculação de *Alternaria alternata* E *A. dauci* em sementes de salsa e sua influência na qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.3, p. 079-085, 2010.

PEREIRA, J. A.; BASSINELLO, P. Z.; CUTRIM, V. A.; RIBEIRO, V. Q. Comparação entre características agronômicas, culinárias e nutricionais em variedades de arroz branco e vermelho. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 1, p. 243-248, 2009.



QUINTANA, L.; GUTIÉRREZ, S.; ARRIOLA, M.; MORINIGO, K.; ORTIZ, A. Rice brown spot *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker in Paraguay. **Tropical Plant Research**, v.4, n.3, p.419–420, 2017.

REDDA, E.T.; MA, J.; MEI, J.; LI, M.; WU, B.; JIANG, X. Biological Control of Soilborne Pathogens (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum*) of Cucumber (*Cucumis sativus*) by *Trichoderma* sp. **Journal of Life Sciences**, v. 12, p. 1-12, 2018.

REINO, J. L.; GUERRERO, R. F.; HERNÁNDEZ-GALÁN R.; COLLADO, I. G. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 89–123, 2008.

RODRIGUES, G. S.; MAGALHÃES, D. M. A.; COSTA, A. M.; LUZ, E. D. M. N. Antagonismo de *Trichoderma* spp. ao agente etiológico da Murcha de *Ceratocystis* em cacauero. **Summa Phytopathologica**, v.44, n.1, p.72-78, 2018.

ROMA, R. C. C. **Diversidade de fungos associados a manchas em sementes de arroz irrigado com aplicação de silicato de cálcio e cinza de casca de arroz**. Minas Gerais, 2010. 48f. Dissertação (Mestrado em Etiologia; Epidemiologia; Controle), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

ROSSMAN, A. Y.; MANAMGODA, D. S.; HYDE, K. D. Proposal to conserve the name *Bipolaris* against *Cochliobolus* (Ascomycota: Pleosporales: Pleosporaceae). **Taxon**, v.62, n.6, p. 1331–1332, 2013.

SAITO, L. R.; SALES, L. L. S. R., MARTINCKOSKI, L.; ROYER, R.; RAMOS, M. S.; REFFATTI, T. Aspects of the effects of the fungus *Trichoderma* spp. in biocontrol of pathogens of agricultural crops. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v.2, n. 3, p.203-216, 2010.

SALAZAR, L.; SANABRIA, N.; APONTE, G.; ALCANO, M.; HERRERA, R.; COLMENARES, D.; ESPINOZA, M.; ALEMÁN, L.; MAGAÑA, S. Efectividad de

aislamientos de *Trichoderma* spp., en el control de la fusariosis del tomate en condiciones *in vitro* e *in vivo*. **Bioagro**, v.23, n.3, p. 185-190, 2011.

SANTOS, C. C.; OLIVEIRA, F. A.; SANTOS, M. S.; TALAMINI, V.; FERREIRA, J. M. S.; SANTOS, F. J. Influência de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa*. **Scientia Plena**, v.8, n.4, p.1-5, 2012.

SANTOS-VILLALOBOS S. L.; GUZMÁN-ORTIZ, D. A. G.; GÓMEZ-LIM, M. A.; DÉLANO-FRIER, J. P.; DE-FOLTER, S.; SÁNCHEZ-GARCÍA, P.; PEÑA-CABRIALES, J. J. Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). **Biological Control**, v.64, n.1, p. 37-44, 2013.

SCHEIDT, B. T. **Determinação do momento de infecção de *Fusarium graminearum* em panículas e quantificação de fungos infectando sementes de arroz irrigado produzidas no alto Vale do Itajaí –SC**. Lages, 2017. 58f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2017.

SEIFERT, K.; MORGAN-JONES, G.; GAMS, W.; KENDRICK, B. 2011. **The genera of Hyphomycetes**. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, 2011, p. 866.

SHORESH, M., HARMAN, G. E., MASTOURI, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Annual review of phytopathology**, v.48, p. 21-43, 2010.

SILVA, M. S. B. S.; RODRIGUES, A. A. C.; OLIVEIRA, L. J. M. G.; SILVA, E. K. C.; PEREIRA, T. S. Sanidade de sementes de arroz, biocontrole, caracterização e transmissão de *Curvularia lunata* em semente-plântula de arroz. **Revista Ceres**, Viçosa, v.61, n.4, p. 511-517, 2014.

SOLINO, A. J. S.; OLIVEIRA, J. B. S.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; ALENCAR, M. S. R.; RIBEIRO, L. M. Potencial antagonista e controle *in vitro* de *Alternaria solani* por fungos sapróbios. **Summa Phytopathologica**, v.43, n.3, p.199-204, 2017.

SOUSA, M. V.; MACHADO, J. C.; PFENNING, L. H.; KAWASAKI, V. H.; ARAÚJO, D. V.; SILVA, A. A.; MARTINI NETO, A. Métodos de inoculação e efeito de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro. **Tropical plant Pathology**, v. 33, n. 1, p. 041-049, 2009.

SOUZA, J. R.; REBOUÇAS, T. N. H.; LUZ, J. M. Q.; AMARAL, C. L. F.; FIGUEIREDO, R. M.; SANTANA, C. M. P. Potencialidade de fungicidas biológicos no controle de requeima do tomateiro. **Horticultura Brasileira**, v.32, n.1, 2014.

SWEENEY, M. T.; THOMSON, M. J.; PFEIL, B. E.; McCOUCH, S. Caught red handed: *Rc* encodes a basic helix-loop-helix protein conditioning red pericarp in rice. **The Plant Cell**, v.18, p.283-294, 2006.

TUITE, J. **Plant Pathological Methods**. Fungi and Bacteria. Minneapolis, Burgess Publishing Company, 1969. 239p.

TENG, P. S.; W. C. JAMES. Disease and Yield Loss Assessment. In: **Plant Pathologist's Pocketbook**, Waller, J.M., J.M. Lenne and S.J. Waller (Eds.). CABI Pub. Co. Inc., Boston, Massachusetts, p. 25-38, 2001.

YADAV, M. K.; ARAVINDAN, S. S. K.; GHRITLAHRE, T.; ADAK AND BERLINER J. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Popular Kheti**, v.3, n.2, 2015.

ZEILINGER, S.; GRUBER, S.; BANSAL, R.; MUKHERJEE, P. K. Secondary metabolism in *Trichoderma* e chemistry meets genomics. **Fungal Biology Reviews**, 2016.

ZHANG, N.; ROSSMAN, A. Y.; SEIFERT, K.; BENNETT, J. W.; CAI, G.; CAI, L.; HILLMAN, B.; HYDE, K. D.; LUO, J.; MANAMGODA, D.; MEYER, W.; MOLNAR, T.; SCHOCH, C.; TADYCH, M.; WHITE, J. F.. Impacts of the International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants (Melbourne Code) on the scientific names of

plant pathogenic fungi. **Online. APSnet Feature. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, p. 1-19, 2013.**