

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA NO TRÓPICO ÚMIDO

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Rhizoctonia solani*, AGENTE CAUSAL DO
TOMBAMENTO DO TOMATEIRO, COM *Trichoderma* spp.

REJANE SOUZA DE AQUINO SALES

Manaus - Amazonas

Agosto, 2011

REJANE SOUZA DE AQUINO SALES

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Rhizoctonia solani*, AGENTE CAUSAL DO
TOMBAMENTO DO TOMATEIRO, COM *Trichoderma* spp.**

ORIENTADOR: DR. ROGÉRIO EIJI HANADA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como parte dos requisitos, para obtenção do título de Mestre em Agricultura no Trópico Úmido.

Manaus, Amazonas

Agosto, 2011

A Banca Julgadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

TÍTULO: CONTROLE BIOLÓGICO DE *Rhizoctonia solani*, AGENTE
CAUSAL DO TOMBAMENTO DO TOMATEIRO, COM *Trichoderma* spp.

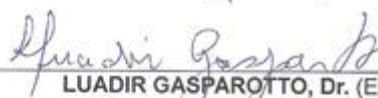
AUTORA:
REJANE SOUZA DE AQUINO SALES

BANCA EXAMINADORA

BANCA JULGADORA:



DANILO FERNANDES DA SILVA FILHO, Dr. (INPA)
(Presidente)



LUADIR GASPAROTTO, Dr. (EMBRAPA)
(membro)



MARIA GERALDA DE SOUZA, Dra. (EMBRAPA)
(membro)

Manaus, 23 de agosto de 2011

S163

Sales, Rejane Souza de Aquino

Controle biológico de *Rhizoctonia solani*, agente causal do tombamento do tomateiro, com *Trichoderma* spp./Rejane Souza de Aquino Sales. --- Manaus: [s.n.], 2011.

38 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2011

Orientador: Rogério Eiji Hanada

Área de concentração: Uso e Manejo dos Recursos Naturais

1. Antagonista. 2. Tombamento. 3. Incidência.
4. Produção massal de esporos – Doenças e pragas. I. Título.

CDD 19. ed. 632.96

Sinopse:

Estudou-se o controle biológico de *Rhizoctonia solani* utilizando *Trichoderma* spp. em condições de casa-de-vegetação, Manaus-AM. A incidência de mudas de tomateiros tombadas foi avaliada.

Palavras-chave: Identificação, antagonista, esporulação, fitopatógeno

Dedico

*A meu esposo e filhos
Aos meus pais e irmãos.*

AGRADEÇO

À Deus, por este trabalho e que resplandeça à sua Luz sobre todos os nomes mencionados.

Aos meus chefes, professor Dr. Jaydione Luiz Marcon e Professora Dra. Rosany Piccolotto Carvalho do Laboratório de Fisiologia da UFAM, pela minha liberação para realização dos experimentos.

Ao professor/pesquisador do INPA, Dr. Rogério Eiji Hanada, do Laboratório de Preservação de Madeira - CPPF/INPA, por seu auxílio neste trabalho.

À pesquisadora do INPA Dra. Rosalee Albuquerque Coelho Netto, pelas análises realizadas no Laboratório de Fitopatologia.

Aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Fisiologia da UFAM.

RESUMO

Diversas culturas, incluindo hortaliças como o tomateiro, estão sujeitas a várias doenças que podem limitar sua produção. Em particular, os fungos habitantes de solo são responsáveis por perdas importantes em todos os tipos de cultivos agrícolas. Espécies do gênero *Trichoderma* possuem propriedades antagônicas com capacidade de controlar um grande número de doenças de plantas, como o tombamento das mudas, causada pelo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial dos isolados de *Trichoderma* spp. no controle do tombamento de tomateiro em condições de casa-de-vegetação. Os isolados de *Trichoderma* spp. foram fornecidos pela Coleção de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do INPA. Enquanto que, *R. solani* foi obtido a partir do caule, necrosado, do tomateiro com sintomas característicos do tombamento, coletado no campo da Estação Experimental de Hortaliças Alejo van der Pahlen município de Manaus, AM. Para seleção dos antagonistas, com potencial de controle de *R. solani*, foram realizados dois experimentos: o primeiro no mês de dezembro de 2010 utilizando 40 isolados de *Trichoderma* spp., e o segundo no mês de janeiro de 2011, com os cinco mais eficientes do primeiro experimento. Ambos experimentos foram realizados em casa-de-vegetação. Após a preparação da suspensão dos antagonistas e do inóculo do patógeno promoveu-se a infestação artificial do solo. Nessa infestação foi selecionada a quantidade de 24g de grãos de arroz colonizado com *R. solani*/100 g de solo quantidade ajustada para causar tombamento no tomateiro. Em uma bandeja de plástico misturou-se 24g de *R. solani* cultivado em arroz/100 g de solo e aplicou-se 1,0 mL da suspensão de 10^8 conídios mL^{-1} /100 g de solo. Após o revolvimento das misturas, estas foram transferidas para copos de plásticos de 500 mL. O material foi incubado por 15 dias, para o estabelecimento inicial dos fungos. Posteriormente, procedeu-se o plantio do tomateiro com sementes da cultivar Kada. Os resultados mostraram que 12 isolados tiveram efeito semelhante a testemunha sem patógeno, reduzindo significativamente a incidência de tombamento em plântulas de tomateiros. Entre os 12 antagonistas foram selecionados cinco isolados de *Trichoderma* (1.611, 2.121, 1.439-B, 2.130 e 1.599) estes mostraram que a percentagem de plântulas sobreviventes não apresentou diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade comparada com o tratamento controle sem o patógeno. Já o isolado 1.599 resultou em 100% de plântulas sobreviventes de forma similar a testemunha sem o patógeno. Para a avaliação do ensaio *in vitro* do mecanismo de ação antagônico foi empregado o método de cultivo pareado em disco de BDA com cinco isolados antagonistas 1.611, 2.121, 1.439-B, 2.130 e 1.599 contra o isolado patogênico 2.329. Os resultados mostraram que os cinco isolados apresentaram excelente ação em teste de pareamento dos fungos antagônicos em que todos obtiveram nota 1 de acordo com a escala de Bell. Os isolados antagonistas selecionados com potenciais antagônicos foram identificados por meio de observações macroscópica e microscópica, cultivados em meio de BDA e incubados a 25 °C. Os resultados obtidos mostraram a identificação dos fungos através das chaves taxonômicas: 1.611 (*T. pseudokoningii*), 2.121 (*Trichoderma virens*), 1.439-B (*T. aureoviride*), 2.130 (*T. harzianum*) e 1.599 (*T. aureoviride*). Para obter a esporulação do isolado 1.599 foi utilizado 3% de carbonato de cálcio, diferentes volumes de água 60 mL, 100 mL e 140 mL) e 36 sacos de polipropileno, contendo 200 g de substrato de grãos de arroz previamente umedecidos autoclavados por duas vezes, em dias alternados, a 120 °C durante 25 minutos. Os resultados mostraram que o isolado 1.599 produziu estatisticamente mais conídios, quando cultivado em substrato de grãos de arroz com adição de carbonato de cálcio em sacos fechados.

ABSTRACT

Several crops, including vegetables such as tomatoes, are subject to various diseases that may limit its production. In particular, inhabiting fungi soil are responsible for important losses in all types of agricultural crops. Species of the genus *Trichoderma* have antagonistic properties capable of controlling a large number of plant diseases such as damping off of seedlings caused by the pathogen *Rhizoctonia solani*. The objective of this study was to evaluate the potential antagonist *Trichoderma* spp. in the control of tomato damping-off in terms of greenhouse. The isolates of *Trichoderma* spp. were provided by the Collection of Microorganisms of Interest agroforestry INPA. While, *R. solani* was obtained from the stem necrosis of tomato plants with characteristic symptoms of damping off, collected in the field of Horticultural Experimental Station Alejo van der Pahlen city of Manaus, AM. For selection of the antagonists, with potential to control *R. solani*, two experiments were conducted: the first in December 2010 using 40 isolates, and the second in January 2011 with the five most efficient in the first experiment. Both experiments in green-house. After preparation of the suspension of antagonists and pathogen inoculum promoted himself to artificial soil infestation. This infestation was selected by 24 g the amount of *R. solani*/100 g soil adjusted quantity to cause damping off in tomato. In a plastic tray mixed 24 g of mycelium of *R. solani* cultivated in rice grains /100 g soil and applied 1.0 mL of the suspension of 10^8 conidia mL⁻¹/100 g soil. After the revolving of mixtures, these were transferred to glasses of 500 ml plastic. The material was incubated for 15 days, for the initial establishment of fungi. Later, proceeded to plant the seeds of tomato cultivar Kada. The results showed that 12 isolates had a similar effect to the control group without pathogen, significantly reducing the incidence of damping off in tomato seedlings. Among the 12 selected antagonists were five isolates of *Trichoderma* (1.611, 2.121, 1.439-B, 2.130 and 1.599) and the latter showed that the percentage of surviving seedlings showed no significant difference among themselves by Tukey test at 5% probability compared with the control treatment without the pathogen. Have the isolate 1.599 resulted in 100% of seedlings survivors similarly the witness without the pathogen. For the evaluation of the in vitro mechanism of action of the antagonist was used in cultivation method paired with five disk BDA antagonistic isolates 1.611, 2.121, 1.439-B, 2.130 e 1.599 against the pathogenic strain 2.329. The results showed that the isolates 1.611, 2.121, 1.439-B, 2.130 and 1.599 showed excellent antagonistic action to the test of direct confrontation in which all had grade 1 according to the scale of Bell. The five selected isolates antagonist with potential antagonist were identified by macroscopic and microscopic observation, grown on plates and incubated at 25 °C. The results showed the identification of fungi using the taxonomic keys: 1.611 (*T. pseudokoningii*), 2.121 (*T. virens*), 1.439-B (*T. aureoviride*), 2.130 (*T. harzianum*) and 1.599 (*T. aureoviride*). To obtain the sporulation of the best strain 1.599, selected as antagonistic fungus was used 3% of calcium carbonate, different moisture contents (60 mL, 100 mL e 140 mL) and 36 polypropylene bags, containing 200 g of substrate of rice grains previously moistened autoclaved for twice, on alternate days, to 120 °C during 25 minutes. The results showed that the isolate 1.599 produced statistically more conidia, when grown in substrate of rice grains in closed bags, include 100 mL water, and addition of calcium carbonate.

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo Geral.....	3
2.2. Objetivos Específicos.....	3
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
3.1. Tomateiro.....	4
3.2. <i>Rhizoctonia</i> spp.....	5
3.3. Sintoma da doença causada por <i>R. solani</i>	6
3.4. Métodos de controle.....	6
3.5. <i>Trichoderma</i> spp. - Aspectos Gerais.....	8
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4.1. Local da pesquisa.....	10
4.2. Obtenção do isolado de <i>Rhizoctonia solani</i> e teste de patogenicidade em casa-de-vegetação	10
4.3. Preparo do inóculo de <i>Rhizoctonia solani</i> cultivado em substrato de arroz e influência da concentração do patógeno na incidência da doença.....	11
4.4. Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e suas respectivas procedências	12
4.5. Seleção de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. para controle de <i>Rhizoctonia solani</i> em condições de casa-de-vegetação	13
4.6. Avaliação do mecanismo de ação por competição de cinco isolados de <i>Trichoderma</i> spp. ao fungo <i>Rhizoctonia solani</i> em cultivo pareado.....	14
4.7. Identificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	15
4.8. Produção massal de conídios do isolado 1.599	16
5. RESULTADOS	18
5.1. Teste de patogenicidade da <i>Rhizoctonia solani</i> em casa de vegetação.....	18
5.2. Teste da quantidade de inóculo de <i>Rhizoctonia solani</i>	18

5.3.	Seleção de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. para controle de <i>Rhizoctonia solani</i> em condições de casa-de-vegetação.....	19
5.4.	Avaliação do mecanismo de ação por competição de cinco isolados de <i>Trichoderma</i> spp. ao fungo <i>Rhizoctonia solani</i> em cultivo pareado.....	21
5.5.	Identificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	22
5.6.	Produção massal de conídios do isolado 1.599	24
6.	DISCUSSÃO.....	25
7.	CONCLUSÃO.....	30
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

1. INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais cultivadas e consumidas no mundo (Lopes, 2005). A espécie pertencente à família *solanaceae*, apresenta um ciclo relativamente curto e com boa rentabilidade (Naika *et al.*, 2006). Entre 1985 e 2005, a demanda mundial *per capita* de tomate cresceu cerca de 36% (Carvalho; Pagliuca, 2007). Segundo o FAOSTAT (FAO, 2010), no ano de 2009 a produção mundial de tomates foi cerca de 141 milhões de toneladas, produzidas em uma área de aproximadamente cinco milhões de hectares. No Brasil, o tomate é o segundo produto agrícola de importância econômica, sendo os Estados de Goiás, São Paulo, e Minas Gerais os maiores produtores, com 1.427.144, 730.385 e 477.921 toneladas respectivamente (IBGE, 2009). O Estado do Amazonas segundo o IBGE (2009) ocupa a 23^o posição, com produção de 1.039 toneladas.

Apesar de ser uma hortaliça apreciada na culinária do mundo inteiro, o cultivo do tomateiro é considerada uma atividade de alto risco, principalmente devido à grande suscetibilidade ao ataque de fitopatógenos e pragas, oscilação no preço de mercado e grande exigência de insumos e serviços. Os altos custos de implementação e manutenção da cultura e a exigência do mercado por produtos de melhor qualidade, estimulam a busca de novas alternativas de cultivo (Cardoso, 2007).

O fungo *Rhizoctonia solani* Kühn é um patógeno importante, pois é capaz de infectar uma ampla gama de hospedeiros, tais como plantas ornamentais, espécies florestais, frutíferas e hortaliças, causando injúrias em sementes e frutos, tombamento das mudas, cancrios de talo, podridão da raiz e infecções nas folhas (Ogoshi, 1985), tendo como consequência à morte prematura da planta e/ou a redução da produtividade (García-Jiménez *et al.*, 2000).

Segundo Ceresini e Souza (1997), no Brasil, *R. solani* causa perdas consideráveis em várias plantas cultivadas, como pimentão (*Capsicum annuum* L.), soja (*Glycine max* (L.) Merr.), amendoimzeiro (*Arachis hypogaea* L.) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). O fungo já foi identificado no Sul do Brasil, destacando-se, Rio Grande do Sul (Ribeiro, 1984) e região Sudeste, em São Paulo (Amaral *et al.*, 1979). Também vem se sobressaindo na região Nordeste, como causador de doenças radiculares em melão (Andrade, 2004). No norte, estado de Roraima, o fungo já foi relatado em culturas como melancia, feijão-caupi, soja, alface, seringueira e feijão-guandu (Zilli *et al.*, 2007) e no estado do Amazonas em diversas hortaliças, entre estas o tomateiro (Santos e Galvão, 1989; Reis e Madeira, 2009).

Desta forma, *R. solani* encontra-se amplamente disseminado pelo país, sendo difícil o controle, devido a complexidade do seu comportamento ecológico, pois forma estruturas de

resistência e sobrevive saprofiticamente. Associado a isso, a gama de espécies hospedeiras é ampla e a sobrevivência das estruturas de resistência, clamidósporos e escleródios é alta, mesmo em condições adversas (F e n i l l e *et al.*, 2002 ; Zilli *et al.*, 2007).

No Brasil, são escassos os trabalhos sobre o patossistema *R. solani* e tomate. Tendo-se como referência trabalhos realizados com outras culturas e/ou em outros países, sob condições edafo-climáticas diferentes das predominantes nas regiões produtoras de tomate no Brasil, implicando em desconhecimento da biologia e da ecologia do patógeno, aspecto importante para embasar estudos sobre medidas de manejo (Michereff Filho *et al.*, 1996).

O manejo integrado de doenças em plantas contempla varias medidas para reduzir a incidência ou severidade e manter o potencial produtivo das culturas agrônômicas, tais como: medidas de exclusão, uso de variedades resistentes, fungicidas químicos, adubação verde, cultivares resistentes, rotação de culturas e controle biológico (Paula Júnior *et al.*, 2008).

O gênero *Trichoderma* Pers. (Hypocreales: Hypocreaceae) constitui hoje o grupo de agentes de biocontrole de fungos fitopatogênicos mais estudado. O rápido crescimento micelial, a alta produção de conídios, a síntese de diversos antibióticos e a capacidade de viver de diversas formas (saprotrófica, simbiote ou micoparasita) são características fundamentais em sistemas agroecológicos ou de produção orgânica, preenchendo vários requisitos não atendidos pelos agroquímicos (Samuels, 2006). Este agente de biocontrole tem sido aplicado em solos para controlar doenças causadas por fungos fitopatogênicos de hortaliças comerciais como tomate (Harman *et al.*, 2004).

Tendo em vista a importância da doença para a cultura do tomateiro na região Amazônica, há necessidade de disponibilizar métodos de controle alternativos, como o controle biológico, para proporcionar o manejo sustentável desta cultura, e melhorar a qualidade de vida dos produtores e consumidores.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial dos isolados de *Trichoderma* spp. no controle do tombamento de tomateiro em condições de casa-de-vegetação.

2.2. Objetivos Específicos

- Selecionar isolados de *Trichoderma* spp. capazes de reduzir a incidência de tombamento causado por *R. solani* em plântulas de tomateiros.
- Estudar o mecanismo de ação dos isolados selecionados como biocontroladores.
- Identificar as espécies dos isolados de *Trichoderma* spp. que foram selecionados.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma planta da classe dicotiledoneae, ordem tubiflorales, família *Solanaceae*, gênero *Solanum* (Peralta e Spooner, 2000). Tem como prováveis centros de origem a região montanhosa dos Andes, o norte do Chile, Bolívia, Equador, Peru e Colômbia. (Filgueira, 2008). O México é considerado o centro de domesticação, sendo distribuído da Europa para a Ásia meridional e oriental, África e Oriente Médio (Peralta e Spooner, 2000).

Segundo Fontes e Silva, (2002) é uma planta herbácea, anual, possuindo raiz pivotante. O caule é flexível, incapaz de suportar o peso dos frutos e mantém-se na posição vertical, cuja arquitetura lembra uma moita, com abundante ramificação natural. As flores são hermafroditas e formam cachos, o que dificulta a fecundação cruzada.

A cultura é considerada cosmopolita, uma vez que é bastante tolerante a variações de fatores climáticos podendo desenvolver-se em altitude de regiões de clima tropical, subtropical e temperado (Filgueira, 2008).

Um dos componentes chaves para a produtividade é o índice de pegamento de fruto. A faixa de temperatura média é cerca de 15-20 °C, sendo muito sensível a variações extremas de temperaturas, com excesso de calor, há abortamento e queda de flores, resultando na produção deficiente de pólen viável, o que condiciona baixa polinização e conseqüentemente reduzida fertilização (Filgueira, 2008).

Outro fator que exerce influência no desenvolvimento do tomateiro é a luminosidade. Quanto maior for a duração da luminosidade, maior será a taxa de produção de folhas e menor o número de flores. Com relação ao fotoperíodo desenvolve-se bem tanto em dias curtos, quanto em dias longos (Giordano e Silva, 2000).

Um dos fatores agroclimático mais prejudicial a tomaticultura é a pluviosidade excessiva. Muita chuva tem um efeito negativo na cultura, pois favorece a proliferação de fungos e bactérias, que reduzem a parte aérea e, por conseqüência diminuem a produção (Souza e Resende, 2003).

O cultivo em ambiente protegido é uma importante alternativa para superar limitações climáticas, especialmente considerando sua eficiência quanto ao aproveitamento de energia natural radiada, da temperatura, água e nutrientes disponíveis (Hora, 2003).

3.2. *Rhizoctonia* spp.

A espécie *Rhizoctonia Solani* Kuhn, é anamorfo de *Thanatephorus* sp., pertence ao Reino Fungi, Filo Basidiomycota, Classe Basidiomycetes, Ordem Ceratobasidiales, Família Ceratobasidiaceae (Kirk *et al.*, 2008). Segundo Botelho *et al.* (2001), é um fungo cosmopolita, habitante de solo, com vasto número de hospedeiros e causa importantes doenças na maioria das plantas cultivadas em todo o mundo.

Geralmente, ocorrem em regiões de temperaturas elevadas e chuvas frequentes, acompanhadas de alta umidade. Chuvas seguidas de frio e subsequente clima quente também favorecem o patógeno. Temperaturas na faixa de 25 °C a 29 °C são ideais para o desenvolvimento da doença (Hartman *et al.*, 1999).

Têm tendência para infectarem tecidos jovens e mudas em sementeiras, causando tombamento de plântulas, especialmente em pré-emergência ou pós-emergência, morte em reboleira, podridão de raízes e de colo com posterior necrose de haste e murcha da planta (Fenille *et al.*, 2002).

Por ser colonizador pioneiro da matéria orgânica e infectar plantas nativas, tornou-se de grande interesse ecológico. O micélio do fungo, o inóculo primário, é disseminado localmente pelo vento, respingos de chuva, enxurrada, animais, seres humanos e implementos agrícolas. Esses propágulos são detectados no solo com relativa facilidade, porém de difícil quantificação. Geralmente, encontram-se nas camadas superficiais do perfil do solo, principalmente nos primeiros 10 cm, devido à dependência de oxigênio (Cardoso, 1994). Os escleródios são estruturas de sobrevivência, responsáveis por focos da doença, servindo de inóculo primário para culturas subsequentes. Sobrevive de um ano para o outro em plantas e em restos de culturas (Sneh *et al.*, 1991). Além disso, sementes infectadas são importantes fontes de inóculo primário (Vilgalys e Cubeta, 1994).

Segundo Krugner (1980), o patógeno penetra através das paredes celulares da epiderme da raiz ou hipocótilo, com a subsequente invasão dos tecidos da planta pelo micélio. O processo infeccioso é promovido pela produção de diversas enzimas extracelulares pelo patógeno, que degradam vários componentes da parede celular vegetal (celulose, lignina e pectina). À medida que o fungo mata as células vegetais, as hifas continuam a crescer e colonizar tecidos mortos, muitas vezes formando escleródios (Sneh *et al.*, 1991).

3.3. Sintoma da doença causada por *Rhizoctonia solani*

Os sintomas apresentados por *R. solani* variam de acordo com os órgãos dos hospedeiros infectados e podem ser confundidos, geralmente com os sintomas de doenças produzidas por outros patógenos (Oliveira *et al.*, 2008).

A importância dessa doença está relacionada, principalmente, com as mudas nos viveiros e no campo, pois ocorrem nas primeiras fases de desenvolvimento da planta. Como consequência, o número desejável de plantas saudáveis pode ser afetado, seguido da produção de produtividade. Conforme Oliveira *et al.*, (2008), a ocorrência deste tipo de doença pode ser influenciada por diversos fatores, principalmente umidade, temperatura, concentração de inóculo, supressividade do solo e vigor da plântula.

Segundo Bedendo (1995), o tombamento de mudas ou "damping-off" é um termo genérico utilizado para designar a ocorrência da morte das sementes durante a fase de germinação, ou da plântula após sua emergência. A doença causa infecção nos tecidos vegetais, ainda, dependentes ou recém-liberados das reservas nutricionais acumuladas nas sementes. Também estão incluídas neste grupo as podridões que ocorrem nas sementes quando essas são colocadas no solo e após o entumescimento, que precede a germinação, quando este se torna mais suscetível ao ataque de patógenos.

No "damping-off" de pré-emergência pode ocorrer a morte das sementes, que se caracteriza, muitas vezes, por necroses nos tegumentos e pela perda de rigidez e apodrecimento. Às vezes, ocorrem encharcamento dos tecidos provenientes da germinação da semente, que rapidamente coalescem e escurecem, levando à sua destruição. Em ambos os casos, exalam odores fétidos provenientes das podridões. Se as plântulas são infectadas após a emergência, morrem devido ao anelamento do coleto, muitas vezes resultando em constrição do tecido vegetal junto à superfície do solo ("damping-off" de pós-emergência) fazendo com que o caule não suporte o peso da plântula, ocasionando seu tombamento (Lopes *et al.*, 2005).

3.4. Métodos de controle

O controle químico do tombamento não é possível sem estar associado a um programa integrado de controle. Os fungicidas mais utilizados em tratamentos de sementes, mudas e solos são triadimenol, pencycuron, tolylfluanid, carboxin, thiram, carbendazim e vitavax. Muitas vezes o uso contínuo de um mesmo fungicida pode desenvolver resistência do

patógeno. Para evitar isso, o uso alternado de diferentes produtos é recomendável (Goulart, 2002; Sadeghi *et al.*, 2009).

A resistência genética destaca-se como uma ferramenta extremamente útil no manejo de doenças causadas por fitopatógenos habitantes do solo. O controle genético desses parasitas deve ter sido praticado inconscientemente pelos primeiros agricultores, ao selecionarem materiais por vezes mais produtivos por serem menos suscetíveis às doenças radiculares (Michereff *et al.*, 2005). Até o momento, não se conhecem cultivares resistentes ao tombamento de plântulas, em razão, principalmente, do complexo de patógenos envolvidos na ocorrência da doença (Henz e Lopes, 2000).

O potencial de controle cultural, ou por práticas culturais, está diretamente relacionado com a oportunidade de manipulação das condições de crescimento das plantas. As principais práticas culturais envolvidas no controle cultural são: rotação de culturas, manejo do solo e dos restos culturais, população adequada de plantas, irrigação, adubação verde, compostagem, fertilização do solo, época de plantio e profundidade de semeadura (Corrêa *et al.*, 2000; Mafia *et al.*, 2005; Brierley *et al.*, 2009).

O controle biológico tem sido bastante estudado nas últimas décadas, principalmente pelos problemas ambientais e de saúde humana decorrentes do uso indiscriminado de agrotóxicos (Peres *et al.*, 2007). Dentre os organismos envolvidos na supressividade de solos, os fungos são os mais estudados. Isso se deve ao interesse na obtenção de produtos comerciais à base de fungos para o controle biológico de patógenos habitantes do solo. E dentre os fungos antagonistas, sem dúvida, os mais estudados pertencem ao gênero *Trichoderma* (Michereff *et al.*, 2005). A eficácia do controle biológico de fitopatógenos depende da interação recíproca entre o agente de controle biológico, o fitopatógeno, a planta e os fatores ambientais.

O controle biológico é uma das estratégias alternativas no controle de doenças de plantas, podendo funcionar com amplas possibilidades de aplicação no biocontrole de patógenos foliares e radiculares de diversas espécies vegetais (Fenille *et al.*, 2002; Gasparotto *et al.*, 2005; Rini e Sulochana, 2007; Montealegre *et al.*, 2010). Entretanto, é importante associar as práticas compatíveis com o objetivo de alcançar um sistema de agricultura sustentável (Lo *et al.*, 1998; Peres *et al.*, 2007).

3.5. *Trichoderma* spp. - Aspectos Gerais

Trichoderma spp. é um fungo mitospórico e anamorfo de *Hypocrea*, pertence ao filo Ascomycota, ordem Hypocreales, família Hypocreaceae (Kirk *et al.*, 2008). A sua taxonomia ainda não está completamente elucidada. Os estudos clássicos, realizados até então, baseados na morfologia não resultaram numa revisão compreensiva e satisfatória (Samuels, 2006). A utilização da morfologia na identificação tem sido efetiva ao nível de gênero, entretanto a diferenciação intraespecífica é mais complexa devido à sobreposição de diversos caracteres distintivos, resultando numa chave bastante artificial e, portanto, sujeita a certo subjetivismo.

Os nove agregados de espécies (*Trichoderma piluliferum*, *T. hamatum*, *T. polysporum*, *T. koningii*, *T. aureoviride*, *T. pseudokoningii*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. viride*), descritos por Rifai (1969), foram diferenciados primariamente pelo padrão de ramificação dos conidióforos e pela morfologia do conídio. Entretanto, o próprio autor considerou sua revisão como sendo um estudo preliminar da variação intragenérica, e que uma variação mais significativa permanece por ser definida. Ressalta-se que estes agregados também podem ser denominados como “complexos” ou “alianças” na terminologia sistemática.

As espécies do gênero *Trichoderma* possuem distribuições bastante ampla, ocorrendo no mundo inteiro em quase todos os tipos de solos e outros habitats naturais, especialmente aqueles que contêm matéria orgânica (Mello *et al.*, 2007). Alguns deles são utilizados em controle biológico de fitopatógenos foliares e radiculares (Patricio *et al.*, 2001; Mello *et al.*, 2007), outros têm sido intensamente aplicados em processos biotecnológicos (Schuster e Schmol, 2010) e boa parte capazes de proteger plantas por meio de diferentes mecanismos de ação (antibiose, parasitismo, competição), e por colonizar eficientemente o substrato e o sistema radicular de várias espécies de plantas (Harman *et al.*, 2004; Harman, 2006; Woo *et al.*, 2006).

Antibiose é definida como uma interação entre organismos na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo têm um efeito danoso sobre o outro (Brunner *et al.*, 2005). As espécies de *Trichoderma* têm sido estudadas por produzirem uma série de enzimas extracelulares (Le Crom *et al.*, 2009); por degradarem paredes de células fúngicas e por serem ativas na produção de metabólitos extracelulares com atividade antimicrobiana (Benítez *et al.*, 2004). Parasitismo é um mecanismo pelo qual o fungo é capaz de penetrar as estruturas do patógeno, especialmente às hifas, utilizando enzimas que degradam componentes da parede celular. Desta forma, ocorre à degradação enzimática e o consumo de nutrientes oriundos da degradação das estruturas dos fitopatógenos. Por esse fato, os

antagonistas que atuam por este mecanismo são denominados hiperparasitas ou hiperpatógenos (Ruocco *et al.*, 2009); Competição é a interação entre dois ou mais organismos empenhados na disputa principalmente por alimentos, espaço e oxigênio (Benitez *et al.*, 2004). Segundo Howell (2003), a competição é uma das principais características de isolados de *Trichoderma* usados como agentes de biocontrole especialmente na rizosfera.

A ação de *Trichoderma* spp. como agente de biocontrole de patógenos causadores de tombamento, murcha e podridão em mudas, é conhecida. Pode-se utilizar o agente de biocontrole como protetor de sementes que após desenvolver-se na espermosfera acaba acompanhando o desenvolvimento da raiz da nova planta (Harman, 2000). Segundo Harman *et al.*, (2004), alguns isolados são excelentes competidores na rizosfera e por isso colonizam toda a superfície da raiz por várias semanas ou meses. Uma importante observação referente à colonização da rizosfera por *Trichoderma* foi relatada por Harman (2000). O autor descreve que foram encontradas hifas de isolado de *T. harzianum* envolvendo raízes de plântulas de milho.

Os esporos não apresentam ação direta comprovada na ação de biocontrole, embora, geralmente, utilizam-se conídios para o tratamento de sementes ou solo. Segundo Melo (1996) e Faria *et al.*, (2002), os conídios e clamidósporos de *Trichoderma* são formulados e utilizados para tratamento de solos, sementes, estolões e bulbos e, ainda, pulverizados na parte aérea dos vegetais. É importante ressaltar que tanto conídios como clamidósporos são estruturas de resistência dos fungos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Local da pesquisa

Os experimentos foram desenvolvidos no laboratório de Fitopatologia e em casa-de-vegetação da Coordenação em Pesquisas em Ciências Agronômicas (CPCA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

4.2. Obtenção do isolado e teste de patogenicidade em casa-de-vegetação

O isolado de *R. solani* foi obtido a partir do caule necrosado do tomateiro com sintomas característicos do tombamento, coletado no campo da Estação Experimental de Hortaliças Alejo van der Pahlen localizada no km 14 da rodovia AM 010, município de Manaus, AM.

Em condições assépticas, fragmentos de tecidos do caule necrosado foram cortados e imersos em álcool 70% por um minuto, transferidos para uma solução de hipoclorito de sódio a 2% por dois minutos e lavados com água destilada esterilizada. Posteriormente, os fragmentos foram transferidos para placa de Petri contendo o meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (200 g de batata, 20 g dextrose, 20 g ágar em 1000 mL de água destilada) incubados em B.O.D. mantidos à temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h por 7 dias.

Com o desenvolvimento da colônia, o mesmo foi repicado para tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA e mantidos à temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12h por 7 dias. Posteriormente os tubos foram transferidos para refrigerador a 5 °C. O isolado de *R. solani* testado foi depositado na Coleção de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do INPA, no Laboratório de Fitopatologia, com o número 2.329.

O teste de patogenicidade foi realizado com o método de disco de micélio. Após sete dias do crescimento de *R. solani* no meio de cultura de BDA em placas de Petri, quatro discos de 5 mm de diâmetros, foram inoculados no caule de tomateiros jovens (sete dias de idade), de modo que o micélio estivesse em contato com a superfície vegetal. As mudas de tomateiro foram cultivadas em copos de plásticos de 500 mL contendo substrato de terra compostada (30% de composto orgânico, 50% de terra vegetal e 20% de húmus de minhoca) não esterilizado. Após a inoculação, as mudas foram cobertas com sacos de plásticos

borrifados internamente com água durante 24 h (câmara úmida). Decorrido o tempo, as câmaras úmidas foram retiradas e as mudas dos tomateiros receberam irrigações diárias.

Ao todo, 20 mudas de tomateiros da variedade Santa Cruz foram utilizadas, sendo que 10 foram inoculadas com discos de micélios de *R. solani* e 10 mudas sem inoculação, que constituíram a testemunha. A avaliação consistiu da monitoração diária após a inoculação, registrando o número de mudas com aparecimento de sintomas de damping-off.

4.3. Preparo do inóculo de *Rhizoctonia solani* cultivado em substrato de arroz e influência da concentração do patógeno na incidência da doença

Para produção de micélios do isolado 2.329, em sacos de polipropileno de 2 kg foram pesados 200 g de grãos de arroz, e adicionadas 140 ml de água destilada e posteriormente autoclavados por duas vezes, dias consecutivos, a 120 °C durante 25 minutos. Após o resfriamento do arroz foram transferidos dez discos, da colônia 2.329, de cinco mm de diâmetro. Em seguida, os sacos foram semi-fechados com gazes e fixados com dois grampos de metais e incubados durante 15 dias à temperatura de 25 °C. A cada dois dias os substratos foram revolvidos, para promover a troca gasosa, quebra do micélio e aumento da superfície de contato do fungo com os substratos para melhor crescimento vegetativo.

O delineamento neste experimento foi inteiramente casualizados com cinco tratamentos, incluindo a testemunha, 0 g, com dez repetições. Cada repetição foi constituída de uma planta. Os resultados, número de plântulas sobreviventes, foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade e o programa estatístico utilizado foi Assistat 7.0. O primeiro experimento ocorreu no mês de outubro de 2010 e a sua repetição no mês de novembro do mesmo ano.

Após o cultivo do fungo em grãos de arroz, os mesmos foram misturados em solos em diferentes concentrações: 0 g, 4 g, 8 g, 16 g e 24 g por 100 g de solo (não autoclavado, composto de 50% de terra vegetal, 20% de húmus de minhoca e 30% de composto orgânico). Os solos misturados foram transferidos para copos de plásticos de 500 mL até a superfície da borda do copo.

A incubação durou um tempo de 15 dias em casa-de-vegetação conforme metodologia descrita por Michereff Filho *et al.* (1996), com modificações. Decorrido esse período, as sementes de tomateiro da cultivar Santa Cruz foram semeadas nos copos de plásticos contendo as misturas com suas respectivas concentrações de inóculos. A monitoração do

experimento foi efetuada diariamente durante 15 dias após a semeadura, levando em consideração o número de plântulas sobreviventes em cada tratamento.

4.4. Quarenta isolados de *Trichoderma* spp. e suas respectivas procedências

Os 40 isolados de *Trichoderma* spp. foram fornecidos pela Coleção de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do INPA. Atualmente, estão mantidos em frascos de vidros contendo sílica gel. Os isolados foram provenientes de diversos substratos os quais estão descritos na Tabela 1. Estes isolados de *Trichoderma* spp. foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA em temperatura de 25 °C, durante dez dias para serem utilizados nos futuros experimentos.

Tabela1. Isolados de *Trichoderma* spp. testados contra *Rhizoctonia solani* e seus substratos de origem.

ISOLADO (TRATAMENTO) (n=40)	ORIGEM	SUBSTRATO
1611 (T1)	EEK ²	Desconhecido
2121 (T2)	LBF ³	Desconhecido
1439-B (T3)	Sasahara	Solo
2114 (T4)	LBF ³	Desconhecido
1417-1 (T5)	EAR ²	Desconhecido
2041 (T6)	CPPF	Serragem
2117 (T7)	LBF ³	Desconhecido
1589-B (T8)	Desconhecido	Desconhecido
2111 (T9)	LBF ³	Desconhecido
1432 (T10)	Manaus	Solo
2047 (T11)	CPPF ⁴	Desconhecido
1351 (T-12)	Manaus	Solo
1598-B (T13)	Desconhecido	Desconhecido
2113 (T14)	LBF ³	Desconhecido
2127 (T15)	CPPF ⁴	Madeira
2128 (T16)	CPPF ⁴	Madeira
2110 (T17)	LBF ³	Desconhecido
2129 (T18)	CPPF ⁴	Madeira
2130 (T19)	CPPF ⁴	Madeira
2131 (T20)	CPPF ⁴	Madeira
2046 (T21)	CPPF ⁴	Desconhecido
2112 (T22)	LBF ³	Desconhecido
1599 (T23)	EAR ²	Solo
2115 (T24)	LBF ³	Desconhecido
1439 (T25)	Ariaú	Solo
1601-B (T26)	EAR ²	Solo
1572-3 (T27)	Desconhecido	Desconhecido
2123 (T28)	CPPF ⁴	Madeira
2048 (T29)	CPPF ⁴	Desconhecido
1439 (T30)	Sasahara	Solo

1340 (T31)	ZF-2- Manaus	Cardeiro
2132 (T32)	CPPF ⁴	Madeira
1435 (T33)	Sasahara	Solo
2119 (T34)	LBF ³	Desconhecido
2133 (T35)	CPPF ⁴	Madeira
2109 (T36)	LBF ³	Desconhecido
2118 (T37)	LBF ³	Desconhecido
2134 (T38)	CPPF ⁴	Madeira
2125 (T39)	CPPF ⁴	Madeira
2116 (T40)	LBF ³	Desconhecido

¹EAR=Escola Agrotécnica Rainhas dos Apóstolos BR-174-KM; ²EEK=Estação Experimental do Km 14; ³LBF= Laboratório de Biocontrole Farroupilha; ⁴CPPF=Laboratório de Preservação de Madeira.

4.5. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para controle de *Rhizoctonia solani* em condições de casa-de-vegetação

Cada isolado de *Trichoderma* spp. foi cultivado em três placas de Petri contendo meio de BDA, durante 10 dias. Em seguida, foram feitas suspensão de inóculo de *Trichoderma* spp., adicionando-se água destilada esterilizada às placas, raspando a superfície das culturas com uma lâmina de microscopia e filtrando-as em camada dupla de gaze. A concentração de inóculo foi ajustado para 10^8 conídios mL⁻¹ com auxílio da câmara de Neubauer.

Para seleção dos antagonistas, com potencial de controle de *R. solani*, foram realizados dois experimentos: o primeiro no mês de dezembro de 2010 utilizando 40 isolados (Tabela 1), e o segundo no mês de janeiro de 2011, utilizando os cinco mais eficientes do primeiro experimento. Ambos experimentos realizados em casa-de-vegetação.

Cada experimento constituiu de duas testemunhas: a) plantio do tomateiro em solo não infestado e b) plantio de tomateiro em solo infestado apenas com o patógeno. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em ambos experimentos. O primeiro experimento constituiu de 42 tratamentos e nove repetições e segundo experimento de sete tratamentos e vinte repetições. Cada repetição foi constituída de uma planta. Os procedimentos para ambos experimentos foram semelhantes.

Após a preparação da suspensão dos antagonistas e do inóculo do patógeno crescido em arroz promoveu-se a infestação artificial do solo.

Em uma bandeja de plástico misturou-se na proporção de 24 g de micélio de *R. solani* cultivado em arroz/100 g de solo e aplicou-se 1,0 mL da suspensão de 10^8 conídios mL⁻¹ /100 g de solo. Após o revolvimento das misturas, estas foram transferidas para copos de plásticos

de 500 mL. O material foi incubado por 15 dias, para o estabelecimento inicial dos fungos. Posteriormente, procedeu-se o plantio dos tomateiros com sementes da cultivar Santa Cruz.

A avaliação foi realizada diariamente após o plantio dos tomateiros efetuando-se a contagem do número de plântulas sobreviventes em cada tratamento. Os dados de percentagem do número de plântulas mortas e sobreviventes atribuíram-se notas 1 e 2 respectivamente.

No primeiro experimento com 42 tratamentos e nove repetições, os dados de plantas sobreviventes e mortas foram transformados em raiz quadrada de $X+0,5$ e submetidos à análise de variância. Para comparação dos tratamentos as médias foram submetidas ao teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Os dados obtidos no segundo experimento foram submetidos à análise de variância, efetuando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação das médias. O programa estatístico utilizado, para ambos experimentos, foi Assistat 7.0.

4.6. Avaliação do mecanismo de ação por competição de cinco isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Rhizoctonia solani* em cultivo pareado

Para a avaliação do ensaio *in vitro* do mecanismo de ação antagônico foi empregado o método de cultivo pareado em disco de BDA (Mariano, 1993) com cinco isolados antagonistas (1.611, 2.121, 1.439-B, 2.130 e 1.599) contra o isolado patogênico 2.329.

Cada placa de Petri de 9 cm, contendo o meio de cultura de BDA, recebeu dois discos de micélio de 5 mm de diâmetro agarizados de culturas crescidas por sete dias, em lados opostos da placa, sendo um do patógeno e outro do isolado de *Trichoderma* (*T. pseudokoningii*, *T. virens*, *T. aureoviride*, *T. harzianum*) a ser avaliado. Como testemunha, usou-se o patógeno cultivado isoladamente, colocando-se um disco de micélio no centro de cada placa. Em seguida, todas as placas foram mantidas à 25 °C e fotoperíodo de 12 horas durante 7 dias. Ao todo foram utilizados seis tratamentos, uma testemunha e cinco repetições distribuídos ao acaso. O delineamento foi inteiramente casualizado, com sete tratamentos e para cada tratamento foram utilizados 5 repetições. Cada parcela foi constituída de uma placa de Petri.

Medidas do crescimento micelial foram tomadas a cada dia e, a avaliação final após 7 dias, com o auxílio da escala proposta por Bell *et al.* (1982), pela qual são atribuídas notas de 1 a 5.

Nota 1: sobreposição de *Trichoderma* sp., que colonizou toda a superfície do meio e cobriu a colônia do patógeno.

Nota 2: sobreposição de *Trichoderma* sp., que colonizou pelo menos 2/3 da superfície do meio.

Nota 3: *Trichoderma* sp. e patógeno colonizaram mais que 1/3 e menos que 2/3 da superfície do meio.

Nota 4: patógeno colonizou ao menos 2/3 da superfície do meio e resistiu a invasão do *Trichoderma* sp.

Nota 5: sobreposição do patógeno que colonizou toda a superfície do meio.

As notas obtidas (1, 2, 3, 4 e 5) foram expressas em termos de porcentagem de colonização (100%, 75%, 50%, 25%, 0%) respectivamente.

4.7. Identificação dos isolados de *Trichoderma* spp.

Os cinco isolados antagonista 1.611, 2.121, 1.439-B, 2.130 e 1.599 selecionados com potenciais antagonísticos, foram identificados por meio de observação macroscópica, através das características da colônia e microscopicamente através das estruturas de reprodução. Os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo meio de BDA e incubados a 25 °C por 5 dias. De cada isolado foram feitas cinco placas.

A observação microscópica procedeu da visualização e biometria das estruturas fúngicas vegetativa (hifas) e de reprodução (clamidósporos, conidióforos, fiálides e conídios), a partir da preparação de lâminas semipermanentes, coradas com azul de algodão. Tanto as informações obtidas pelas observações macroscópica e microscópica foram comparadas com as descritas nas literaturas especializadas (Rifai, 1969; Samuels, 1996).

4.8. Produção massal de conídios do isolado 1.599

Para obter a esporulação do isolado 1.599 foram utilizados grãos de arroz como substrato, diferentes volumes de água (60 mL, 100 mL e 140), acrescido ou não de 3% de CaCO₃ (Carbonato de cálcio). Os grãos de arroz, 200 g, foram acondicionados em sacos de polipropileno, de 2 Kg, acrescido de água e acrescido ou não de carbonato de cálcio. Em seguida, o material foi autoclavado por duas vezes, em dias alternados, a 120 °C durante 25 minutos.

Após o resfriamento do arroz, 10 discos da colônia do isolado 1.599, cultivado em meio de BDA, de cinco mm de diâmetro, foram transferidos para sacos contendo o substrato de arroz. Os sacos foram semifechados com gazes e fixados com dois grampos de metais e mantidos a 25 °C. Após cinco dias de incubação, metade dos tratamentos tiveram os sacos abertos (Figura 1). No décimo dia todas as amostras foram lidas, visou-se quantificar a concentração de conídios produzidos. Para tanto, foi transferido 1 g de arroz colonizado com o fungo para um béquer e diluído em 50 mL de água destilada. A concentração de inóculo foi avaliada através da contagem de conídios, utilizando-se um hematocitômetro (câmara de Neubauer) ajustado para 10^8 conídios mL⁻¹.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso com esquema fatorial de 2 x 2 x 3 sendo: fator A = embalagens de sacos fechados e sacos abertos; fator B = com CaCO₃ e sem CaCO₃; fator C = porcentagem de umidade. Foram estabelecidas três repetições para cada tratamento e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa ASSISTAT 7.0.

T1) Embalagens de sacos abertos após cinco dias com 200 g de arroz e 60 ml de água.

T2) Embalagens de sacos abertos após cinco dias com 200 g de arroz, 60 mlml de água e 3 % de CaCO₃.

T3) Embalagens de sacos abertos após cinco dias com 200 g de arroz e 100 mL de água.

T4) Embalagens de sacos abertos após cinco dias com 200 g de arroz, 100 ml de água e 3% de CaCO₃.

T5) Embalagens de sacos abertos após cinco dias com 200 g de arroz e 140 ml de água.

T6) Embalagens de sacos abertos após cinco dias com 200 g de arroz, 140 ml de água e 3% de CaCO₃.

T7) Embalagens de sacos fechados com 200 g de arroz e 60 mL de água.

T8) Embalagens de sacos fechados com 200 g de arroz, 60 mL de água e 3% de CaCO₃.

T9) Embalagens de sacos fechados com 200 g de arroz e 100 mL de água.

T10) Embalagens de sacos fechados com 200 g de arroz, 100 mL de água e 3% de CaCO₃.

T11) Embalagens de sacos fechados com 200 g de arroz e 140 mL de água.

T12) Embalagens de sacos fechados com 200 g de arroz, 140 mL de água e 3% de CaCO₃.

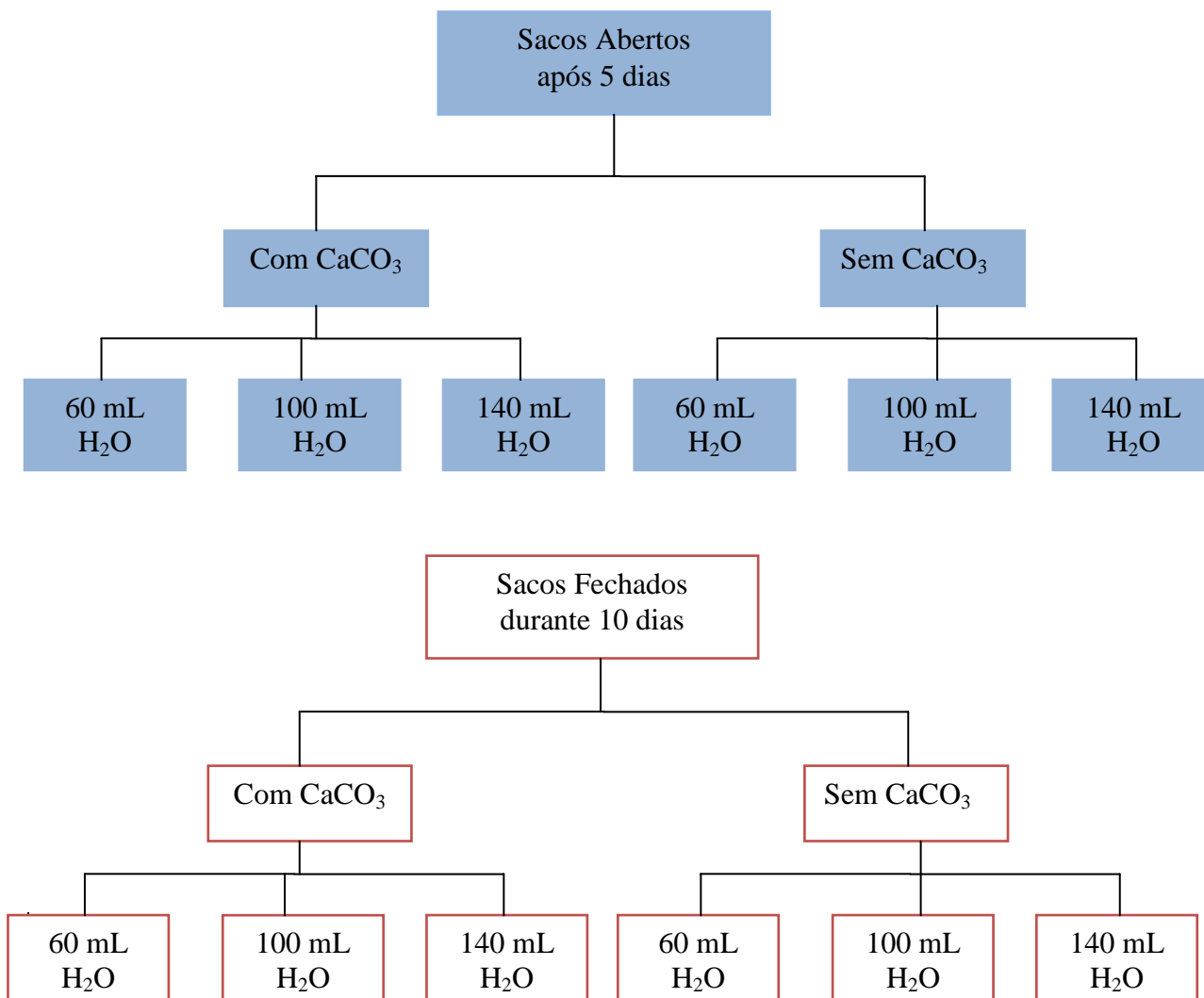


Figura 1. Fluxograma dos tratamentos referente a esporulação do *Trichoderma* sp. (isolado 1.599) em grãos de arroz.

5. RESULTADOS

5.1. Teste de patogenicidade da *Rhizoctonia solani* em casa-de-vegetação

No décimo dia após a inoculação, observou-se necrose e uma posterior podridão no colo do tomateiro, resultando em tombamento das mudas. As mudas que não foram inoculadas apresentaram-se livres de sintomas de damping-off.

5.2. Teste da quantidade de inóculo de *Rhizoctonia solani*

Ao sétimo dia após a semeadura do tomateiro, as quantidades de 4, 8 e 16 g de grãos de arroz cultivado com *R. solani* não foram suficientes para causar o processo de infecção de doença nas plântulas de tomateiro comparados com a testemunha. Já a quantidade de 24 g de inóculo de *R. solani* influenciou significativamente na incidência da doença obtendo 0% de plantas sobreviventes. Os resultados de ambos experimentos foram praticamente semelhantes (Figura 2).

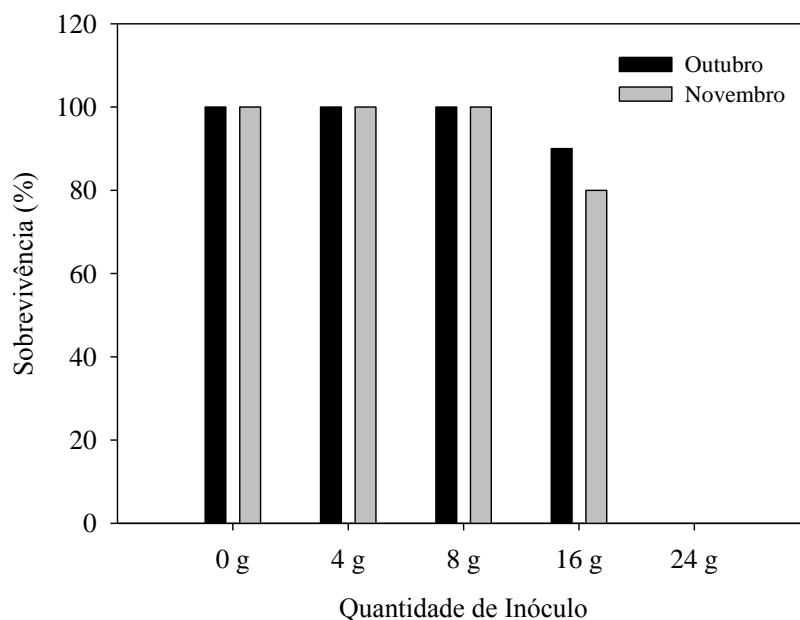


Fig 2. Incidência do tombamento de tomateiros, submetidos a diferentes quantidades de inóculos de *Rhizoctonia solani* cultivado em grãos de arroz e época dos experimentos de testes realizados no mês de Outubro e repetido no mês de Novembro de 2010.

5.3. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para controle de *Rhizoctonia solani* em condições de casa-de-vegetação

Na avaliação de 40 isolados de *Trichoderma* spp. à *Rhizoctonia solani*, 12 isolados tiveram efeito semelhante a testemunha sem patógeno, reduzindo significativamente a incidência de tombamento em plântulas de tomateiros. Enquanto que, 28 isolados tiveram efeito semelhante à testemunha com patógeno, ou seja, não houve controle da doença (Tabela 2).

Tabela 2. Seleção de isolados antagonísticos ao fungo *Rhizoctonia solani*, agente causal do tombamento em plântulas de tomateiro.

*Tratamentos	Isolados (n=40)	**Sobrevivência (%)
***T1	1611	77,82 a
***T2	2121	77,82 a
***T3	1439-B	100,0 a
T4	2114	55,55 a
T5	1417-1	55,55 a
T6	2041	55,55 a
T7	2117	33,33 b
T8	1589-B	33,33 b
T9	2111	22,22 b
T10	1432	55,55 a
T11	2047	33,33 b
T12	1351	44,44 b
T13	1598-B	22,22 b
T14	2113	33,33 b
T15	2127	44,44 b
T16	2128	55,55 a
T17	2110	22,22 b
T18	2129	44,44 b
***T19	2130	88,88 a
T20	2131	44,44 b
T21	2046	55,55 a
T22	2112	11,11 b
***T23	1599	77,82 a
T24	2115	33,33 b
T25	1439	33,33 b
T26	1601-B	22,22 b
T27	1572-3	0,00 b
T28	2123	55,55 a
T29	2048	33,33 b
T30	1439	22,22 b
T31	1340	44,44 b
T32	2132	22,22 b

T33	1435	22,22 b
T34	2119	22,22 b
T35	2133	33,33 b
T36	2109	22,22 b
T37	2118	44,44 b
T38	2134	33,33 b
T39	2125	33,33 b
T40	2116	0,00 b
T41	-	100,0 a
T42	2329	0,00 b
Cv (%)	-	32,25

*Tratamentos: Testemunhas 41 (sem *R. solani*) e 42 (com *R. solani*); T1 a T40 (isolados de *Trichoderma* spp.); **Dados de Plantas sobreviventes transformados pela raiz quadrada de $X+0,5$. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. ***Isolados de *Trichoderma* spp. selecionados para repetição do experimento.

Entre os 12 isolados fúngicos iniciais, foram selecionados cinco isolados de *Trichoderma* spp. (1.611, 2.121, 1.439-B, 2.130 e 1.599), que foram mais eficientes no controle da doença.

A eficácia dos cinco isolados antagonistas selecionados mostrou que a percentagem de plântulas sobreviventes não apresentou diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Esses dados confirmaram os resultados obtidos no primeiro teste conforme descrita na Tabela 3. O isolado 1.599 demonstrou 100% de eficiência no biocontrole de *R. solani* (Tabela 3).

Tabela 3. Percentagem de plântulas de tomateiros sobreviventes em teste de controle biológico de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* em casa-de-vegetação

Tratamentos	Isolados	Sobreviventes (%)
T1	1.611	80,0a
T2	2.121	75,0a
T3	1.439-B	90,0a
T19	2.130	90,0a
T23	1.599	100,0a
Controle sem <i>R. solani</i>	-	100,0a
Controle com <i>R. solani</i>	-	0,0b
CV(%)		15,96

Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$).

5.4. Avaliação do mecanismo de ação por competição de cinco isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Rhizoctonia solani* em cultivo pareado

Os isolados 1.611, 2.121, 1.439-B, 2.130 e 1.599, de *Trichoderma* spp. mostraram-se 100% de crescimento sobre o patógeno e esporulação sobre toda a superfície da placa Petri. Os antagonistas inibiram o crescimento micelial do isolado de *R. solani* quando confrontados em cultivo pareados apresentando nota 1 segundo a escala de Bell *et al.*, (1982). A testemunha cultivada apenas com o patógeno, colonizou toda a superfície do meio de cultura da placa de Petri.

5.5. Identificação dos isolados de *Trichoderma* spp.

Os resultados das observações feitas das colônias dos isolados, 1.611, 2.121, 1.439-B, 2.130 e 1.599, *Trichoderma* spp., cultivadas em placa de Petri, contendo BDA, e suas características morfológicas estão descritas na Tabela 4. As descrições da colônia e das estruturas vegetativas e reprodutivas dos isolados foram comparadas segundo Rifai (1969) e Samuel (1996) e os isolados identificados.

Tabela. 4. Descrição morfológica e identificação dos cinco isolados de *Trichoderma* spp. utilizados nos testes de potencial antagônico a *Rhizoctonia solani*

Isolados	Descrição
1.611	<i>Trichoderma pseudokoningii</i> Rifai apresentou colônias de crescimento rápido, 9 cm de diâmetro aos 4 dias, micélio aéreo cotonoso, ausência de zonação. Cores: amarelo a branco, com reverso amarelo. Massa conidial seca e intensa produção de conídios. As hifas frequentemente formaram clamidósporos globosos e subglobosos, intercalares e terminais 8-11 x 6-9 µm, presença de fiálides 5-10 x 2,0-3,5 µm cuja extremidade mede-se até 15 µm. Na maior parte, os conídios apresentaram-se oblongos, elipsóides de 2,5-4 x 2-4 µm, com intensa produção de esporos.
2.121	<i>Trichoderma virens</i> (Miller, Giddens e Foster) Arx. apresentou colônia de crescimento muito rápido, 9 cm de diâmetro aos 3 dias, micélio aéreo cotonoso, flocoso, ausência de pigmentação e de zonação. Cores da colônia: branco a verde oliva; cor do reverso: verde. Massa conidial seca. Produção abundante de conídios no centro e baixa produção nas bordas. Formação de clamidósporos globosos 8-12 µm, presença de fiálides 5-9 x 3-6 µm e produção de conídios globosos, subglobosos e elipsóides 3-5,5 x 3-5 µm.
1.439-B	<i>Trichoderma aureoviride</i> Rifai apresentou colônias de crescimento rápido, 9 cm de diâmetro aos 4 dias, micélio aéreo cotonoso, flocos verdes no centro da placa e na periferia branco, ausência de pigmentação e de zonação. Cores da colônia: verde a branco; reverso amarelo. Massa conidial seca, pulverulento. Produção abundante de conídios no centro e nas bordas com pouca esporulação. As hifas frequentemente formaram clamidósporos globosos e intercalares 5-10 µm, presença de fiálides, 6-15 x 2,5-3,5 µm, conídios, 2,5-4 x 2,0-3,5 µm.

2.130 *Trichoderma harzianum* Rifai apresentou colônias de crescimento rápido, 9 cm de diâmetro aos 4 dias, micélio aéreo cotonoso, flocos verdes no centro da placa e branco na periferia, sem presença de pigmentação e de zonação. Cores da colônia: branco a verde; cor do reverso: branco. Massa conidial seca, pulverulento. Produção abundante de conídios no centro e com pouca esporulação nas bordas. Formação de clamidósporos intercalares e terminais globosos a subglobosos 7-10 x 6,5-9 μm , presença de fiálides 4-8,5 x 2-3,5 μm , cilíndrico, ampuliforme; produção de conídios globosos a subglobosos 2-4 x 2-3,5 μm .

1.599 *Trichoderma aureoviride* Rifai apresentou colônias de crescimento muito rápido, 9 cm de diâmetro aos 3 dias, micélio aéreo cotonoso, flocoso, ausência de pigmentação e de zonação. Cores da colônia: branco a verde oliva; cor do reverso: verde. Massa micelial seco, pulverulento. Produção abundante de conídios no centro e nas bordas. Presença de clamidósporos intercalares e terminais globosos 7-12 μm , formação de fiálides 4-12 x 2-3,5 μm , produção de conídios globosos, oblongo, em forma de pêra, elipsoidal, truncada na base 2,5-4 x 2-3,5 μm .

5.6. Produção massal de conídios do isolado 1.599

Em geral, a produção de conídios em arroz do isolado 1.599 foi maior quando cultivado em sacos fechados quando adicionados 100 mL de água e carbonato de cálcio (Tabela 5) e (Figura 3).

Tabela 5. Produção conidial do isolado 1.599 cultivado em substrato de grãos de arroz submetido a diferentes fatores.

Tratamentos	10^8 conídios g^{-1}
Com aeração (Embalagens de sacos Abertos)	12.8 b
Sem aeração (Embalagens de sacos Fechados)	14.8 a
Sais de cálcio (Sem carbonato de cálcio)	11.6 b
60 mL de água	8.4 c
100 mL de água	18.4 a
140 mL de água	14.6 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$)

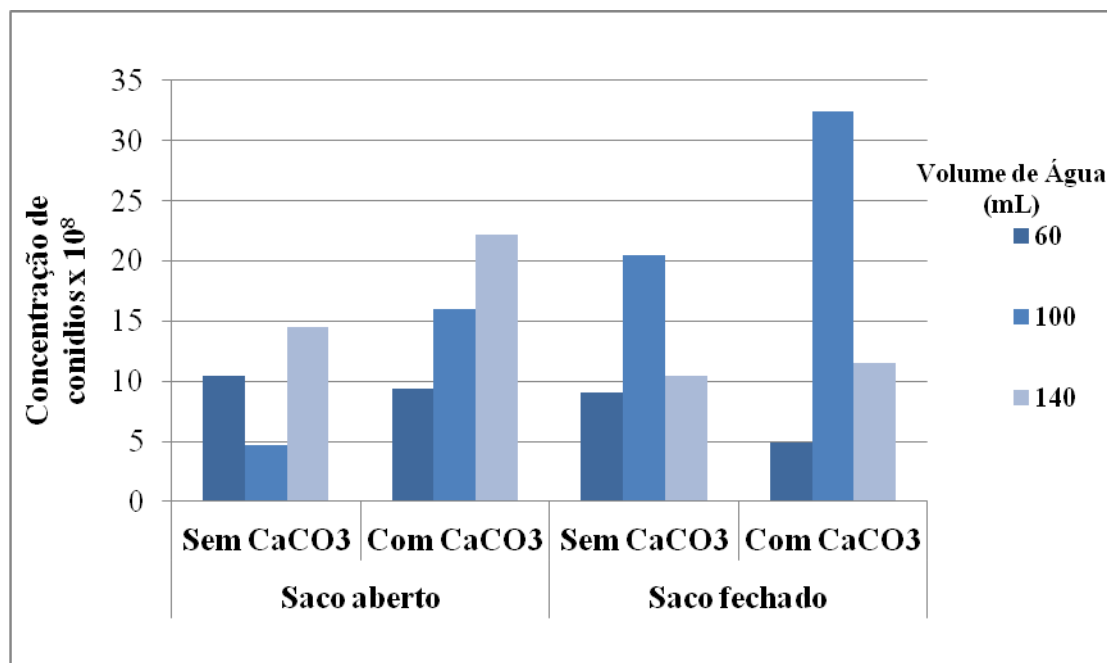


Figura 3. Produção de conídios em substrato de arroz

6. DISCUSSÃO

O teste de patogenicidade comprovou que o isolado 2329 é fitopatogênico. A inoculação, de quatro discos de meio contendo micélio de *R. solani*, diretamente no colo do tomateiro, foi suficiente para causar tombamento das mudas. O reisolamento do fungo obtido das mudas doentes confirmou-se à hipótese. O fungo apresenta colônias de cor castanha, crescimento vigoroso e formação abundante de escleródios, principalmente nas culturas mais velhas, à semelhança do isolado original. Os sintomas observados foram a necrose e uma posterior podridão do colo, seguido do tombamento. A patogenicidade de *R. solani* está em conformidade com Yangui *et al.*, (2008) e De Curtis *et al.*, (2010) em plantas de tomateiro.

O tomate é considerado sensível à infecção de *R. solani*, no teste de tombamento de plântulas, observou-se que a quantidade de 24 g de grãos de arroz colonizado por *R. solani* por 100 g de solo exerceu uma influência significativa na incidência da doença. Outra confrontação é que, aparentemente, não há outros relatos em literatura que informem valores superiores a 24 g de grãos de arroz colonizados por *R. solani*. Talvez a resposta deste estudo no progresso da doença esteja relacionada com a metodologia empregada, optou-se pela obtenção de micélio do fungo colonizado em arroz sem empregar o método de trituração. Com base nessas informações, é possível especular que esta técnica sem trituração apresenta o inconveniente da alta demanda por substrato de arroz responsável por conferir nutrição para a produção de *R. solani*. Trabalhos com abordagens semelhantes ao atual estudo desenvolveram metodologia através da ausência da técnica de trituração do micélio cultivado em arroz, com o uso da alta demanda de substrato para causar doença na cultura do feijão. Rodrigues *et al.*, (2002) ao incorporarem 16 g de grãos de arroz colonizados por *R. solani* em vaso com 1 kg de material de solo na camada de 0-15 cm obteve resposta significativa da podridão-radicular na cultura do feijoeiro. Por outro lado, baseado no método aplicado em trituração do micélio em arroz, justifica otimismo ao potencial da técnica com o emprego da baixa demanda de substrato de arroz podendo utilizar mínimas densidades de micélio para causar damping-off em tomateiros.

Outros casos realizados com intuito de empregar metodologia de multiplicação de inóculo de *R. solani*, em substrato de arroz, apresentaram diferentes tempos para colonização, secagem, armazenagem e viabilidade do inóculo. Oliveira *et al.*, (2008) usaram metodologia da multiplicação de *R. solani* em substrato de arroz e após a colonização do micélio, o substrato colonizado foi acondicionado em saco de papel e seco à sombra, com posterior trituração e peneiração. Em seguida, incorporaram 72 mg de inóculo de *R. solani* por kg de

solo permitindo observar a máxima porcentagem de tombamento de plântulas em pós emergência de cenoura (*Daucus carota* L.). Em outro estudo Andrade *et al.*, (2005) incorporaram 5, 10 e 25 mg de arroz colonizado por *R. solani* por kg de solo e produziram moderadas severidades de rizoctoniose na cultura do meloeiro, estes mesmos autores utilizaram métodos de trituração de fungos.

Outro ponto a ser discutido foi avaliação dos possíveis efeitos antagônicos de isolados de *Trichoderma* spp. à *R. solani* em condições *in vivo*. Apenas doze dos 40 isolados de *Trichoderma* spp. conseguiram reduzir a incidência de tombamento em plântulas de tomateiro. Os demais (28 isolados) não apresentaram atividade contra o fitopatógeno testado. E entre doze isolados que apresentaram potencial para controle de *R. solani*, foram selecionados os cinco mais eficientes antagonistas. Os resultados obtidos mostraram que os cinco isolados, 1.611, 2.121, 1.439-B, 2.130 e 1.599, biocontroladores da doença do damping-off em mudas de tomateiros não apresentaram diferença significativa entre si comparados com o controle sem patógeno (Tabela 3).

Estes mesmos isolados foram utilizados com suspensão de 10^8 conídios mL^{-1} contra o patógeno. Ambos inoculados concomitantes na superfície do solo mostraram que a área infestada ficou totalmente colonizado pelos fungos antagonistas afetando o desenvolvimento do fungo fitopatogênico. O crescimento do *Trichoderma* spp. foi bastante agressivo, conferindo a esses antagonistas uma enorme capacidade de atuação como competidores através da rápida colonização do substrato. As espécies reduziram significativamente o tombamento das plântulas. Entre os cinco isolados reavaliados neste segundo teste, o isolado 1.599 manteve 100% de plântulas vivas.

Para justificar o uso de suspensão com *Trichoderma* spp. no biocontrole de *R. solani*, outro exemplo pode ser explorado com a aplicação de forma inoculativa em condições controladas sobre o solo. Anees *et al.*, (2010) estudando o potencial antagônico de espécies de *Trichoderma* em condições controladas, aplicaram 15 mL de suspensão de 4×10^6 conídios mL^{-1} em 260g de solo no momento da semeadura das mudas de cenoura e três isolados suprimiram o fungo *R. solani*. No presente estudo, as plântulas de tomateiros responderam positivamente a aplicação de 1 mL da suspensão de *Trichoderma* sp. de 10^8 conídios mL^{-1} a cada 100 g de solo infestado com *R. solani*.

Outros resultados realizados *in vitro* através do plaqueamento de cultivo pareado mostraram que as cinco repetições dos isolados 1.611, 2.121, 1.439-B, 2.130 e 1.599 apresentaram 100% de crescimento sobre o patógeno e esporulação sobre toda a superfície da placa Petri, apresentando uma excelente ação antagônica em teste de confrontação direta em

que todos obtiveram nota 1 de acordo com a escala de Bell *et al.*, (1982), atuando como fortes competidores, pois foram capazes de esporular entre 3-4 dias sobre toda a superfície do meio e inibiram o crescimento micelial do fitopatógeno 2.329. Assim, acredita-se que a competição pode ser um dos mecanismos pelos quais estes isolados agem. Muitos estudos clássicos da literatura adotam a atividade antagônica de isolados deste gênero atribuído ao efeito sinérgico de vários mecanismos, como competição por nutrientes, produção de enzimas que degradam a parede celular e antibiose (Brunner *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2004). Nesse caso, o mecanismo de competição, por exemplo, está de acordo com os dados de Longa (2002) ao estudar o confronto direto de 13 isolados de *Trichoderma* spp., sobre *R. solani* em método de cultivo pareado, observou-se que, as espécies antagônicas recobriram completamente a colônia do patógeno *R. solani* até o oitavo dia de incubação, atribuindo-lhes nota 1 de acordo com os critérios de Bell *et al.* (1982).

Devido a esta característica de crescimento rápido, resultados satisfatórios para controlar ou inibir o crescimento micelial de outros fitopatógenos já foram relatados. Rini e Suloccana (2007) em seus estudos *in vitro* testaram 26 isolados de *Trichoderma* e 11 foram eficazes em suprimir *R. solani*. Segundo os mesmos autores, as diferentes espécies antagônicas (*T. longibrachiatum*, *T. virens*, *T. pseudokoningi*, *T. viride*, *T. harzianum*) inibiram 59% do crescimento micelial do fungo patogênico com apenas seis dias após a inoculação.

Já, a descrição morfológica dos cinco isolados de *Trichoderma* spp. da Tabela 4 mostraram a identificação dos fungos 1.611, 2.121, 1.439-B, 2.130 e 1.599 e suas respectivas espécies *T. pseudokoningi*, *T. virens*, *T. aureoviride*, *T. harzianum* e *T. aureoviride*, através das chaves taxonômicas de (Rifai, 1969 e Samuels, 1996). A identificação inicial foi realizada visualmente através dos aspectos morfológicos das colônias e outras características como cor e ornamentação dos esporos, forma dos clamidósporos, forma e dimensões das fiáldes e dos conídios. Foram feitas lâminas dos isolados utilizados nos ensaios para certificar se trataram de *Trichoderma*, uma vez que gêneros afins, como *Gliocladium* e *Clonostachys*, podem apresentar características semelhantes a algumas espécies de *Trichoderma*. O gênero *Hypomyces* (forma anamórfica *Cladobotryum* sp.), citado por Samuels *et al.* (2010), também pode apresentar características de colônia muito semelhantes.

A utilização da técnica clássica de culturas em lâmina mostrou-se adequada para os cinco isolados de *Trichoderma* spp. analisados. As espécies foram de fácil cultivo e rápida identificação morfológica em nível macro e microscópico apresentando colônias de crescimento rápido a muito rápido, culturas com conídios em sua maioria com coloração verde, variando de globosos, subglobosos e elipsóides, outros oblongos. Em outros estudos,

Howell, (2003) constatou abundante produção de conídios, cuja coloração variaram entre os tons de verde em espécies de *Trichoderma* spp. Em outros exemplos Santos (2010) estudando vários isolados de *Trichoderma* através da chave taxonômica de Samuels *et al.*, (2010), encontraram culturas com conídios verde-claros, lisos, variando de subglobosos a elipsoidais outras subglobosos a globosos e elipsoidais com fiálides ampuliformes de $6,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$ e $7,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$.

Outro teste realizado *in vitro* discorre sobre o efeito da incorporação de sais de cálcio e adição de diferentes volumes de água em grãos de arroz para obtenção da esporulação do *T. aureoviride* cultivado em ambiente aberto e fechado. Os resultados dos diferentes volumes de água mostraram que 60 mL é uma quantidade inadequada para a produção de conídios enquanto que 140 mL é superior as expectativas do antagonista. Já em ambientes abertos, o fungo cultivado obteve um resultado distinto do encontrado para o fungo cultivado em ambiente fechado. A baixa produção de conídios pode ter sido pela perda de umidade através das embalagens de sacos abertos o quais permitiram aeração. Enquanto que na ausência de aeração este teste indicou que o isolado 1.599 apresentou mais eficiência, principalmente quando se adicionaram 3% de carbonato de cálcio e 100 mL de água, estimulou significativamente a produção de conídios, os quais atingiram o teor ótimo. É bom salientar que a inclusão de sais de cálcio neste estudo assegurou uma maior esporulação do *T. aureoviride* (Tabela 5).

Além disso, outra pesquisa feita por Hanada *et al.*, (2009) confirmou o aumento da produção de conídios com a espécie *Trichoderma martiale*, o qual resultou em efeito positivo e significativo da adição de CaCO_3 incorporado em grãos de arroz.

Outros estudos com substratos sólidos demonstraram que sais de cálcio melhoram a esporulação e produção de certas enzimas (Chiu *et al.*, 1998; Saxena *et al.*, 2001; Wuyep *et al.* 2003), provavelmente devido aos efeitos sobre a nutrição mineral e pH (Horst *et al.*, 2005; Krishna, 2005). As formulações de cálcio também tendem a melhorar a vida de prateleira e atividade do antagonista após a aplicação (Spadaro e Gullino, 2004). Em consonância com estes resultados, Shahin e Shepard (1979) relataram que a adição de carbonato de cálcio ao meio de cultura pode favorecer a esporulação, mas não está bem definido se o efeito ocorre pelo aumento de pH ou pelo fornecimento de cálcio.

Este resultado sugere que a produção de conídios pode variar em razão da espécie de fungo antagonico e do substrato sólido empregado no cultivo. Isso pode ser consequência das diferenças genéticas entre as espécies, que determinam habilidades distintas na utilização dos recursos nutricionais presentes em diversos substratos. O arroz mostrou que houve produção e

viabilidade de conídios do isolado antagônico 1.599 (*T. aureoviride*), além de fácil obtenção e baixo custo estudos complementares devem ser priorizados para obtenção de substrato na produção massal de *Trichoderma* spp.

7. CONCLUSÃO

Os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram antagônicos em potencial contra *R. solani* na cultura do tomateiro em condições de casa-de-vegetação. Associado a isso, estudos mais detalhados destes isolados de *Trichoderma*, ainda são necessários para fornecer uma melhor compreensão dos mecanismos de ação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaral, R.E.M. Issa, E.; Souza D.M.; Malavolta, V.M.A.; Leite, L.C.; Jesus, L.M. 1979. Estudos sobre a queima das bainhas do arroz *Oryza sativa* L. *Arquivos do Instituto Biológico*, 46 (3): 55-62.

Andrade, D.E.G.T. 2004. *Frequência de fungos associados ao colapso do meloeiro e influência da densidade de inoculo e isolados de Monosporascus cannonballus na severidade da doença*. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 49 pp.

Andrade, D.E.G.T.; Silva, C.F.B.; Silva, L.G.C.; Michereff, S.J.; Júnior, R.S.; Assis, T.C. 2005. Influência da densidade do inóculo e de isolados de *Rhizoctonia solani* na severidade da rizoctoniose do meloeiro. *Caatinga*, 18(3): 164-168.

Anees, M.; Tronsmo, A.; Edel-Hermann, V.; Gautheron, N.; Faloya, V.; Steinberg, C. 2010. Biotic changes in relation to local decrease in soil conduciveness to disease caused by *Rhizoctonia solani*. *European Journal Plant Pathology*, 126:29–41.

Bedendo, I.P. 1995. Damping-off. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. (Eds). *Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos*. Vol. 1. Agronômica Ceres, São Paulo. p. 820-828.

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

Benítez, T.; Rincón, A.M.; Limón, M. C.; Codón, A.C. 2004. Biocontrol, Mechanisms of *Trichoderma* Strains. *International Microbiology*, 7: 249-260.

Botelho, S.A.; Rava, C.A.; Leandro, W.M. 2001. Supressividade induzida a *Rizoctonia solani* pela adição de diferentes resíduos vegetais. *Fitopatologia Brasileira*, (31)1:35-42.

Brierley JL, Stewart JA, Lees AK. 2009. Quantifying potato pathogen DNA in soil. *Applied Soil Ecology*, 41: 234–238.

Brunner, K.; Zeilinger, S.; Ciliento, R.; Woo, S.L.; Lorito, M.; Kubicek, C.P.; Mach, R.L. 2005. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 3959-3965.

Cardoso, J. E. 1994. Podridões radiculares. In: Sartorato, A.; Rava, A. (Eds). *Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle*. Embrapa, Brasília p.151-164.

Cardoso, F.B. 2007. *Produtividade e qualidade de tomate com um e dois cachos em função da densidade de plantio em hidroponia*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosas. Viçosas, Minas Gerais. 49 pp.

Carvalho, J.R.; Pagliuca, L.G. 2007. Tomate, um mercado que não pára de crescer globalmente. *Revista Hortifruti Brasil*, 58: 6-14.

Ceresini, P.C.; Souza, N. L. 1997. Associação de *Rhizoctonia* spp. binucleadas e de *R. solani* Kühn GA4 HGI e GA 2-2 IIIB ao feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, 23(1): 14- 24.

Chiu, S.W.; Chan, Y.H.; Law, S.C.; Cheung, K.T.; Moore, D.; 1998. Cadmium and manganese in contrast to calcium reduce yield and nutritional values of the edible mushroom *Pleurotus pulmonarius*. *Mycological Research*, 102: 449–457.

Corrêa, G.C.; Rocha, M.R.; Júnior, J.P.O.; Carneiro, I.F.; Cardoso, J.E. 2000. Supressividade de diferentes solos a *Rhizoctonia solani*, nos cerrados do estado de Goiás. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 30(2): 29-33.

De Curtis, F.; Lima, G.; Vitullo, D.; De Cicco, V. 2010. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* on tomato by delivering antagonistic bacteria through a drip irrigation system. *Crop Protection*, 30:1–8.

FAO, 2010. FAOSTAT (<http://www.faostat.fao.org>). Acesso: 01/06/11.

Faria, A.Y.K.; Cassetari Neto, D.; Albuquerque, M. C.A. 2002. Atividade antagônica in

in vitro de *Trichoderma harzianum* a patógenos de sementes de algodoeiro. *Revista Agricultura Tropical*, (6)1: 59-68.

Fenille, R.C.; Souza, N.L.; Kuramae, E.E. 2002. Characterization of *Rhizoctonia solani* associated with soybean in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 783–792.

Filgueira, F.A.R. 2008. *Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia Moderna na Produção e Comercialização de Hortaliças*. Universidade Federal de Viçosa. UFV. Viçosa: 421 pp.

Fontes, P.C.R.; Silva, D.J.H. 2002. *Produção de tomate de mesa*. Aprenda Fácil, Viçosa, Minas Gerais, 193pp.

García-Jiménez, J.; Armengol, J.; Sales J.R., R.; Jordá, C.; Bruton, B.D. 2000. Fungal pathogens associated with melon plants collapse in Spain. *Bulletin*, 30: 169-173.

Gasparotto, L.; Pereira, J.C.R.; Urban, A.F; Hanada, R.E. 2005. *Heliconia psittacorum*: hospedeira de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal da Sigatoka negra da bananeira. *Fitopatologia Brasileira*, 30(4): 423-425.

Giordano, L.B.E.; Silva, J.B.C. 2000. Clima e época de pantio. *In*: Silva, J.B.C.; Giordano, L.B.E. (Eds.). *Tomate para processamento industrial*. Embrapa, Brasília, Distrito Federal. p. 3-168.

Goulart, A. C. P. 2002. Efeito do tratamento de sementes de algodão com fungicidas no controle do tombamento de plântulas causado por *Rhizoctonia solani*. *Fitopatologia Brasileira*, (27)4: 399-402.

Hanada, R.E.; Pomella, A.W.V.; Ramirez, W.S.; Loguercio, L.L.; Pereira, J.O. 2009. Biocontrol potential of *Trichoderma martiale* against black-pod disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao. *Biological Control*, 50: 143-149.

Harman, G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84: 377-393.

Harman, G.E.; Howell, C.R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 43–56.

Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and use of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96: 190-194.

Hartman, G.L.; Sinclair, J.B.; Rupe, J.C. 1999. *Compendium of soybean diseases*. 4 ed. Academic Press. Saint Paul, Minnesota. 100pp.

Henz, G. P.; Lopes, C. A. 2000. Doenças das Apiáceas. In: Zambolim, L.; Vale, F. X. R.; Costa, H. (Eds). *Controle de doenças de plantas: hortaliças*. Vol. 2. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. p. 447-450.

Hora, R.C. 2003. *Aplicação de luz na faixa do vermelho-extremo em mudas e diferentes sistemas de condução do tomateiro cultivado em ambiente protegido*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, São Paulo. 56pp.

Horst, L.E.; Locke, J.; Krause, C.R.; McMahon, R.W.; Madden, L.V.; Hoitink, H.A.J. 2005. Suppression of Botrytis blight of begonia by *Trichoderma hamatum* 382 in peat and compost-amended potting mixes. *Plant Disease*, 89:1195–1200.

Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87: 4–10.

IBGE. 2009. Produção Agrícola Municipal. V.36. (<http://www.ibge.gov.br>). Acesso:15/01/11.

Kirk, P.M.; Cannon, P.F.; David, J.C.; Stalpers, J.A. 2008. *Dictionary of the Fungi*. 10th edition. CABI International, Wallingford. 771 pp.

Krishna, C. 2005. Solid-state fermentation systems – an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, (25): 1–30.

Krugner, T.L. 1980. Doenças do eucalipto - *Eucaliptus* spp. In: Galli, F. Manual de Fitopatologia. V.2. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, São Paulo. p. 275-296.

Le Crom, S. Schackwitz, W.; Pennacchio, L.; Magnuson, J.K.; Culley, D.E.; Collett, J.R.; Martin, J.; Druzhinina, I.S.; Mathis, H.; Monot, F.; Seiboth, B.; Cherry, B. Rey, M.; Berka, R.; Kubicek, C.P.; Baker, S.E.; Margeot, A. 2009. Tracking the roots of cellulase hyperproduction by the fungus *Trichoderma reesei* using massively parallel DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 106:16151–56.

Lo, C.T.; Nelson, E.B.; Hayes, C.K.; Harman, G.E. 1998. Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. *Phytopathology*, 88:129-136.

Longa, C.M.O. 2002. *Ocorrência, patogenicidade e controle alternativo de Rhizoctonia solani Kühn em boa-noite (Catharanthus roseus G. Don.) pelo uso de Trichoderma spp. e composto orgânico*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia. Salvador, Bahia, 107p.

Lopes, C.A. 2005. Introdução geral. In: Lopes, C.A.; Ávila, A.C. (Eds). *Doenças do tomateiro*. Embrapa Hortaliças, Brasília. p.11-15.

Lopes, C.A.; Reis, A.; Makishima, N. 2005. *Como prevenir o “tombamento” em mudas de hortaliças*. Embrapa Comunicado Técnico 28. Brasília, Distrito Federal. 4pp.

Lu, Z.; Tombolini, R.; Woo, S.; Zeilinger, S.; Lorito, M.; Jansson, J.K. 2004. *In vivo* study of *Trichoderma* -pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3073-3081.

Mafia, R.G.; Alfenas, A.C.; Maffia, L.A.; Ventura, G.M.; Ferreira, E.M.; Neves, I.F.; Vanetti, C.A.; Silva, C. 2005. Queima Foliar e Tombamento de Mudas em Plantas Medicinais Causadas por *Rhizoctonia solani* AG1 - 1B. *Fitopatologia Brasileira*, (30):3. 1-5.

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

Melo, I. S. 1996. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. 4: 261-295.

Mello, S.C.M.; Ávila, Z.R.; Brauna, L.M.; Pádua, R.R. 2007. Cepas de *Trichoderma* para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitossanidad*, 11: 3-9.

Michereff Filho, M.; Michereff, S.J.; Silva, E.B.; Andrade, D.E.G.T.; Antunes Sobrinho, S.; Noronha, M.A.; Mariano, R.L.R. 1996. Influência de tipos de solo do estado de Pernambuco na intensidade da doença induzida por *Rhizoctonia solani* em feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 21(1): 19-25.

Michereff, S. J.; Andrade, D.E.G.T.; Menezes, M. (Eds). 2005. Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Pernambuco. p. 2-398.

Montealegre, J.; Valderrama, L.; Sánchez, S.; Herrera, R.; Besoain, X.; Pérez, L.M. 2010. Biological control of *Rhizoctonia solani* in tomatoes with *Trichoderma harzianum* mutants. *Electronic Journal of Biotechnology*, (13)2: 1-11.

Naika, S.; Jeude, J. V. L. De; Goffau, M.; Hilmi, M.; Dam, B. V. 2006. *A cultura do tomate produção, processamento e comercialização*. Agrodok 17. 104 pp.

Ogoshi, A. 1985. Anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia*. *Fitopatologia Brasileira*, 10: 371-390.

Oliveira, A.C.C.; Souza, P.E.E.; Pozza, A.; Manerba, F.C.; Lopes, M.F. 2008. Metodologias de inoculação de *Rhizoctonia Solani* na cultura da cenoura. *Ciências e Agrotecnologia*, 32(3): 992-995.

Paula Júnior, T.J.; Vieira, R.F.; Teixeira, H.; Coelho, R.R.; Carneiro, J.E.S. Andrade, M.J.B.; Rezende, A.M. 2008. *Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central brasileira: 2007-2009*. EPAMIG-CTZM, Viçosa, Belo Horizonte. 180 pp.

- Patricio, F.R.A.; Kimati, H.; Barros, B.C. 2001. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonísticos a *Pythium aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani*. *Summa Phytopathologic*, 27: 223-229.
- Peralta, I. E.; Spooner, D. M. 2000. Classification of wild tomatoes: a review. *Kurtziana*, 28(1): 45-54.
- Peres, F.; Moreira, J.C.; Claudio, L. 2007. Os impactos dos agrotóxicos sobre a saúde e o ambiente. *Ciência e Saúde coletiva*, 12: 4.
- Reis, A.; Madeira, N. R. 2009. Diagnóstico dos Principais Problemas no Cultivo de Hortaliças no Estado do Amazonas. Embrapa *Circular Técnica* 82. Brasília, DF. 12 pp.
- Ribeiro, A. S. 1984. *Doenças do arroz irrigado*. 2. ed. Embrapa Circular Técnica 19. Pelotas, Rio Grande do Sul. 56 pp.
- Rifai, M.A. 1969. A Revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*, 116: 1-56.
- Rini, C.R.; Sulochana, K.K. 2007. Usefulness of *Trichoderma* and *Pseudomonas* against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* infecting tomato. *Journal of Tropical Agriculture*, 45(1-2): 21–28.
- Rodrigues, F.A.; Carvalho, E. M.; Ribeiro, X. F. 2002. Severidade da podridão-radicular de *Rhizoctonia* do feijoeiro influenciada pela calagem, e pelas fontes e doses de nitrogênio. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 37(9):1247-1252.
- Ruocco, M.; Lanzuise, S.; Vinale, F.; Marra, R.; Turra, D.; Woo, S.L.; Lorito, M. 2009. Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22:291–301.
- Sadeghi, A.; Hesan, A.R.; Askari, H.; Qomi, N.D.; Farsi, M.; Hervan, E.M. 2009. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of sugar beet with native *Streptomyces* strains under field conditions. *Biocontrol Science and Technology*, (19)9: 985-991.

Samuels, G.J. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. *Mycological Research*, 100(8): 923-935.

Samuels, G.J. 2006. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, 96:195–206.

Samuels, G.J.; Chaverri, P.; Farr, D.F.; Mccray, E.B. 2010. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. (<http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>). Acesso: 2/06/2010.

Santos, J.R.M.; Galvão, E.U.P. 1989. Avaliação de doença em germoplasma de arroz em várzea e terra firme no Amazonas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 24(12): 1483-1488.

Santos, M.V.O. 2010. *Phytophthora spp. em cultivos diversos no sul da Bahia e identificação de agentes de biocontrole a estes patógenos*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia.105pp.

Saxena, R.K.; Sangeetha, L.; Vohra, A.; Gupta, R.; Gulati, R.; 2001. Induction and mass sporulation in lignin degrading fungus *Ceriporiopsis subvermispora* for its potential usage in pulp and paper industry. *Current Science*, 81: 591– 594.

Schuster, A; Schmol, M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 87:787– 799.

Shahin, E.A.; Shepard, J.F. 1979. An efficient technique for inducing profuse sporulation of *Alternaria* species. *Phytopathology*, 69: 618-620.

Sneh, B.; Burpee, L.; Ogoshi, A. 1991. *Identification of Rhizoctonia species*. Academic Publishers Press. Saint Paul, United State. 132 pp.

Souza, J.L. Resende, P. *Manual de Horticultura Orgânica*. 2003. Aprenda Fácil. Viçosa. 564 pp.

Spadaro, D.; Gullino, M.L.; 2004. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology* 91:185–194.

Vilgalys, R.; Cubeta, M.A. 1994. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. *Annual Review of Phytopathology*, 32: 135-155.

Woo, S.L.; Scala, F.; Ruocco, M.; Lorito, M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*, 96: 181-185.

Wuyep, P.A.; Khan, A.U.; Nok, A.J; 2003. Production and regulation of lignin degrading enzymes from *Lentinus squarrosulus* (mont.) Singer and *Psathyrella atroumbonata* Pegler. *African Journal of Biotechnology*, 2 (44): 444–447.

Yangui, T.; Rhouma, A.; Triki, M. A.; Gargouri, K.; Bouzid, J. 2008. Control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* using olive mill waste water and some of its indigenous bacterial strains. *Crop Protection*, 27: 189 – 197.

Zilli, J. E.; Nechet, K. L.; Almeida, B. Halfeld-Vieira; Vital, M. S. 2007. Diversidade de microrganismos do solo com potencial biotecnológico. Resumo do Workshop Pan-Amazônico de Biodiversidade do Solo. Rio Branco, Acre. 5pp.