

**Boletim de Pesquisa** 170

---

**e Desenvolvimento** ISSN 1676 - 1340

Dezembro, 2007

**Selección de aislados de *Trichoderma* spp.  
para el control biológico de *Sclerotium  
rolfsii* Sacc.**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

## ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 170***

**Selección de aislados de *Trichoderma*  
spp. para el control biológico de  
*Sclerotium rolfsii* Sacc.**

Sueli C. M. de Mello  
Zilá R. Ávila  
Leonardo M. Braúna  
Raquel R. Pádua

2007

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Serviço de Atendimento ao Cidadão  
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –  
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-  
3624 <http://www.cenargen.embrapa.br>  
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

*Maria de Fátima Batista*

*Maurício Machain Franco*

*Regina Maria Dechechi Carneiro*

*Sueli Correa Marques de Mello*

*Vera Tavares de Campos Carneiro*

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Lara Pereira Machado*

Editoração eletrônica:

1ª edição

1ª impressão (2007):

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

S 464 Selección de aislados de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. / Sueli C. M. de Mello ... [et al.]. -- Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

14 p. -- (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 - 1340; 170).

1. *Sclerotium rolfsii* - controle biológico. 2. *Trichoderma*. I. Mello, Sueli C. M. de. II. Série.

632.96 CDD - 21.

# Selección de aislados de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc.

---

Sueli C. M. de Mello<sup>1</sup>  
Zilá R. Ávila<sup>2</sup>  
Leonardo M. Braúna<sup>3</sup>  
Raquel R. Pádua<sup>4</sup>

## Resumo

En Brasil se ha registrado la ocurrencia de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en diversos cultivos incluido el de soya (*Glycine max* L.). Informaciones de literatura indican que el uso del control biológico ofrece perspectivas para disminuir las poblaciones del patógeno. Este trabajo tuvo como objetivo enriquecer la colección de hongos para control biológico de fitopatógenos de Embrapa Recursos Genéticos y Biotecnología con nuevos aislamientos de *Trichoderma*, identificados a nivel específico y seleccionar aquellos con potencial para el control de *S. rolfsii*. La prospección de cepas nativas de *Trichoderma* se desarrolló en áreas agrícolas de la región de Brasilia (DF). Se identificaron 20 cepas pertenecientes a las especies *T. aureoviride*, *T. harzianum*, *T. crassum* y *T. viride*. La cepa CEN219, indicada como perteneciente a la especie *T. harzianum*, se aisló de una muestra de un producto comercial. The aislado *S. rolfsii* (CEN216) utilizado en los ensayos fue obtenido de la colección de hongos fitopatógenos de Embrapa Cerrados. La inhibición del crecimiento radial de *S. rolfsii* se estudió *in vitro*, en cultivo dual y mediante incorporación de filtrado de colonias de *Trichoderma* al medio de agar-papa-dextrosa (BDA), donde se sembró el patógeno. El potencial de control biológico de las cepas también se estudió *in vivo*. En general, las cepas más eficientes en las pruebas de inhibición fueron también las que presentaron mejor actividad supresora sobre *S. rolfsii*, en plantas de soya.

Palabras clave: *Glycine max*, control biológico, caída de plántulas.

---

<sup>1</sup> Engenheira Agrônoma, PhD., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>2</sup> Engenheira Agrônoma, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>3</sup> Biólogo, Universidade de Brasília.

<sup>4</sup> Bióloga, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

## ABSTRACT

The fungus *Sclerotium rolfsii* Sacc., is a widespread soil-born pathogen in Brazil, attacking a large number of cultivated plants including soybean (*Glycine max* L.). Literature information has indicated the use of *Trichoderma* species as a viable alternative for reducing the pathogen populations. This work was carried out with the objective of enriching the Culture Collection of Fungi for Biocontrol of Plant Pathogens from Embrapa Genetic Resources and Biotechnology with new *Trichoderma* spp. isolates identified at species level and to select isolates for reducing the harmful effect of the pathogen. Twenty isolates, belonging to the species *T. aureoviride*, *T. harzianum*, *T. crassum* and *T. viride*, were collected from soil samples in cultured areas around Brasília (DF). The isolate (CEN219) indicated as *T. harzianum* species was obtained from a commercial formulation. The *S. rolfsii* isolate (CEN216) used in the essays was obtained from the collection of Embrapa Cerrados. Inhibition of the mycelial growth of the pathogen isolate was studied *in vitro* by dual culture method and by the incorporation of culture filtrate of *Trichoderma* at potato-dextrose-agar media previous to sow the pathogen. The potential of biological control of the isolates was also studied *in vivo*. In general, isolates that performed high mycoparasitic activity *in vitro* assay also demonstrated good reduction of the disease in greenhouse.

Key words: *Glycine max*, biological control, damping off.

## INTRODUCCIÓN

*Sclerotium rolfsii* Sacc. es un hongo patógeno de suelo que afecta alrededor de 500 especies en 100 familias botánicas (FERREIRA y BOLEY, 2005) en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, y causa los síntomas de caída de plántulas, podredumbres de parte baja del tallo y raíces y marchitamiento. En Brasil su distribución es muy amplia y puede ocasionar pérdidas considerables en diversos cultivos entre los que se destaca la soya (*Glycine max* L.). La supervivencia del patógeno en el suelo es de extrema importancia epidemiológica y está relacionada a la formación de esclerocios, que permanecen viables por varios años, en condiciones de baja humedad con amplio rango de pH y temperatura (POLANCO y CASTRO, 2005). Por otra parte, la actividad miceliar de este microorganismo es bastante elevada en sustratos vegetales en proceso de descomposición (PINEDA y POLANCO, 2005). En este aspecto, la incorporación de material orgánico al suelo incrementa el potencial de inóculo, lo que constituye un serio problema, especialmente en áreas donde la rotación se hace en base a la alternancia de cultivos susceptibles.

Aunque los plaguicidas químicos son efectivos, tienen muchos atributos indeseables (LIMA et al., 1997). El control biológico de fitopatógenos constituye una alternativa para disminuir el potencial de inóculo del suelo sin traer riesgos al medio ambiental. Dentro de los microorganismos más utilizados en el control biológico están los hongos del género *Trichoderma* los que todavía son objeto de investigación y desarrollo en muchos países (AGRAWAL et al., 1977; WELLS et al., 1972; MUKHERJEE y RAGHU, 1997; TSAHOURIDOU y THANASSOULOPOULOS, 2002; PÉRES, 2005; POLANCO y CASTRO, 2005).

Especies de *Trichoderma* se han reportado como hiperparásitos de un gran número de hongos fitopatógenos, al atacar directamente y producir la lisis de micelios y también de esclerocios de hongos (BENHAMOU y CHET, 1996). Resultados obtenidos por Lima et al. (1997) evidenciaron la acción de una quitinasa en la pared celular de *S. Rolfsii* y de *Rhizoctonia solani*. El-Katatny et al. (2001) demostraron la actividad de enzimas quitinasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa contra *S. rolfsii*, en medio de cultivos con las enzimas purificadas, a partir de filtrados de colonia del antagonista. Otros importantes mecanismos de acción que usan estos hongos, en dependencia de la especie y aun de la cepa utilizada dentro de una especie, están relacionados con la secreción de diversos antibióticos, competencia por nutrientes y espacio, inducción de resistencia en la planta y tolerancia a estrés (HARMAN, 2000; HOWELL, 2003). Tales mecanismos pueden operar de manera independiente o simultánea en las interacciones microbianas (HOWELL, 2003). Por otra parte, la efectividad

en controlar un hongo fitopatógono en particular puede variar para un aislamiento del antagonista en la medida de su peculiaridad en termos de adaptación a las condiciones bióticas y abióticas específicas (DENNIS y WEBSTER, 1971a; 1971b).

El objetivo del presente trabajo fue el de enriquecer la colección de hongos para control biológico de fitopatógenos de Embrapa Recursos Genéticos y Biotecnología, con nuevos aislamientos de *Trichoderma* identificados a nivel específico y seleccionar aquellos con potencial para control de *S. Rolfsii*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de cepas de *Trichoderma* y de hongo fitopatógono

Se desarrolló una prospección de cepas nativas de *Trichoderma* en áreas agrícolas (Cooperbrás) de la región del Distrito Federal en Brasil. Las muestras se procesaron según el método de dilución seriada (DHINGRA y SINCLAIR, 1981) en medio de Martin (1950) modificado por Homechin (1987), y las identificaciones y descripciones de las cepas obtenidas se realizaron de acuerdo con claves disponibles en la literatura correspondiente (GAMS y BISSET, 1988; SAMUELS et al., 2005). La cepa CEN219 indicada como perteneciente a la especie *T. harzianum* se aisló de una muestra de un producto comercial. Para los ensayos del biocontrol se utilizó un aislado representativo del patógeno (CEN216) cedido por el sector de fitopatología de Embrapa Cerrado.

Evaluación del antagonismo al hongo *S. rolfsii* por las cepas aisladas *Trichoderma* spp. en cultivo dual

El antagonismo al hongo *S. rolfsii* se evaluó con las cepas aisladas de *Trichoderma* spp. en cultivo dual. En las pruebas *in vitro* se siguió el método de cultivo dual de acuerdo con Dennis y Webster (1971a) y se utilizó el medio de agar-papa-dextrosa (BDA). Para cada aislamiento se establecieron cuatro réplicas. La incubación se realizó a 25°C. Para las evaluaciones se tomaron las medidas de diámetro de colonias después de 120 horas de incubación, y mediante observaciones de la formación de una zona de demarcación entre los inóculos. Se calcularon los valores medios de porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) por la fórmula

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

donde:

R1 = diámetro del testigo y

R2 = diámetro del organismo ensayado

También se compararon las cepas con respecto a la capacidad antagonista, de acuerdo con la escala de notas establecida por Bell et al. (1982):

Clase	Características
Clase 1	Sobre-crecimiento de <i>Trichoderma</i> , que colonizó toda la superficie del medio y redujo la colonia del patógeno
Clase 2	Sobre-crecimiento de <i>Trichoderma</i> , que colonizó al menos 2/3 de la superficie del medio
Clase 3	<i>Trichoderma</i> y patógeno colonizaron medio a medio (más que 1/3 y menor que 2/3), uno no se sobrepuso al otro
Clase 4	Hongo patógeno colonizó al menos 2/3 de la superficie del medio, y resistió la invasión por <i>Trichoderma</i>
Clase 5	Sobre-crecimiento del hongo patógeno que colonizó toda la superficie del medio

#### Evaluación del antagonismo a *S. rolfsii* mediante incorporación de filtrado de colonias de *Trichoderma* al medio

Para las pruebas de producción de sustancias difusibles por las cepas aisladas de *Trichoderma* se utilizó el método descrito por Agrawal et al. (1977) con algunas modificaciones que consistieron en el cultivo de los aislados en medio líquido de batata-dextrosa (BD), por 12 días con agitación constante (50 rotaciones por minuto) sin presencia de luz, y temperatura de 25°C. Después de este período de incubación, la parte líquida se colectó en papel de filtro y posteriormente esterilizada por filtración en membrana milipore de (0,45µm). El filtrado se adicionó al medio BDA en la proporción de 25% (v/v). Para cada aislamiento de *Trichoderma* se establecieron cuatro réplicas. Las placas de Petri con el medio se inocularon en su centro con discos de micelio de *S. rolfsii*. La incubación se realizó a 25°C y cuando toda la superficie de las placas del testigo (colonias *S. rolfsii* crecidas en ausencia de filtrado de *Trichoderma*) se presentó colonizada por el hongo patógeno se realizó la medición de su crecimiento radial.

#### Evaluación del antagonismo de las cepas obtenidas de *Trichoderma* sobre *S. rolfsii* en casa de cultivo

Para la preparación de inóculo se utilizaron discos de micelio de los hongos antagonistas y fitopatógeno, los que se retiraron de la periferia de colonias cultivadas en BDA por cinco días y se colocaron en frascos que contenían granos de arroz humedecidos con agua destilada (60% p/v) y esterilizados a 120°C por 20 minutos. La incubación se realizó a 25°C y 12 horas diarias de luz durante seis días.

En vasos de 500 g de capacidad con suelo fertilizado y esterilizado se adicionaron 2,5g de granos de arroz colonizado por cada hongo (*S. rolfsii* y *Trichoderma*). Para cada aislamiento de *Trichoderma* se establecieron cuatro réplicas; también se establecieron tratamientos sin inóculos de *S. rolfsii*, sin *Trichoderma* y sin ninguno de ambos, para servir como testigos.

Seguidamente el suelo se humedeció y se mantuvo sin nuevos riegos por 24 horas, entonces se realizaron las siembras de las semillas de soja de la variedad BRS Milena, a razón de seis semillas por vaso, los que se mantuvieron en la casa de cultivo a una humedad relativa alrededor de 80% y temperatura de 23–40°C). A los 15 días de sembradas las semillas se evaluó el número de plantas vivas.

Los datos obtenidos en las evaluaciones se sometieron análisis de varianza (ANOVA) y las medias comparadas por la prueba de Tukey a un nivel de 5%.

## Resultados y discusión

Obtención de cepas de *Trichoderma* y de hongo fitopatógeno

Se identificaron 20 cepas, de las cuales 15 pertenecen a la especie *T. harzianum*. Las otras fueron *T. aureoviride* (2), *T. crassum* (2) y *T. viride* (1). La cepa 219 indicada como perteneciente a la especie *T. harzianum* se aisló de una muestra del producto comercial. Las cepas se incorporaron a la colección de hongos para control biológico de fitopatógenos de Embrapa Recursos Genéticos y Biotecnología con sus respectivos códigos (Tabla 1).

Evaluación del antagonismo al hongo *S. rolfsii* por las cepas aisladas *Trichoderma* spp. en cultivo dual

Los resultados de la actividad antagónica de las cepas de *Trichoderma* por el método de cultivo dual se presentan en la Fig. 1 y en la Tabla 1. Todas las cepas inhibieron el crecimiento del hongo patógeno cuando se aislaron en cultivo dual, en la proporción de 18,97 hasta 44,12%, comparado con el crecimiento del testigo. Las cepas CEN220, CEN249, CEN260, CEN262 y CEN266 fueron los que presentaron actividad antagónica y parasítica más elevada, al mostrar una colonización total sobre *S. rolfsii* a las 120 horas, por lo que recibieron calificación de 1 en la escala de clasificación de Bell et al. (1982). Una vez alcanzada la zona de demarcación entre los inóculos, estas cepas continuaron su crecimiento hasta invadir totalmente la superficie de la colonia del hongo patógeno, sobre el que produjeron esporas. También las cepas CEN199, CEN207, CEN219, CEN252, CEN254, CEN255 y CEN264 revelaron buenas potencialidades contra el patógeno ensayado, y recibieron calificación de 2 en la misma escala. De otra parte, las cepas CEN224, CEN250, CEN251, CEN263 y CEN265, aparentemente no ejercieron acción antagonista sobre el hongo patógeno, pues este avanzó sobre las mismas, al colonizar toda la superficie del medio.

Evaluación del antagonismo a *S. rolfsii* mediante incorporación de filtrado de colonias de *Trichoderma* al medio

El porcentaje de inhibición del crecimiento de *S. rolfsii* frente al testigo, a través de incorporación de filtrado de colonias, fue distinto con las cepas de *Trichoderma* ensayadas. El valor medio más elevado se obtuvo con la cepa CEN252 (PICR = 72,35%), que todavía no se diferenció de los valores obtenidos con CEN199, CEN260 y CEN266, que de otra parte no fueron diferentes de la CEN254 (Fig. 2). Las cepas CEN219, 220 y CEN249, que estuvieron entre las de buenas potencialidades contra el hongo patógeno en prueba anterior, no presentaron el mismo efecto en este ensayo, que no permite el contacto directo entre las hifas. Por lo tanto, se puede inferir probablemente que no hay acción por metabolitos tóxicos biológicamente difusibles en el medio de cultivo que recibió el filtrado de colonias de cualquier de estas tres cepas.

Evaluación del antagonismo de las cepas obtenidas de *Trichoderma* sobre *S. rolfsii* en casa de cultivo

De acuerdo con la Fig. 3, hubo diferencia significativa con respecto a la capacidad de las cepas de *Trichoderma* de suprimir *S. rolfsii* en la prueba desarrollada en casa de cultivo. El tratamiento que recibió sólo el hongo patógeno, presentó más bajo porcentaje de plantas, en la evaluación hecha 15 días después de sembradas las semillas. Por lo tanto, el tratamiento del suelo con *Trichoderma* redujo la enfermedad y promovió la germinación y supervivencia de las plantas en niveles, con variaciones entre 32 y 100%. El mejor resultado se alcanzó con la cepa CEN254, que no presentó diferencia frente al tratamiento con *Trichoderma* en la ausencia del hongo patógeno. El análisis de varianza no mostró diferencia significativa entre esta y otras 14 cepas, donde 10 cepas mostraron valores medios de porcentaje de supervivencia de plántulas mayor que 60%.

Varios estudios sobre antagonismo de *Trichoderma* conducidos en el pasado no describieron el hongo con lo cual se trabajaron (WELLS et al., 1972). Además, hay discordancia entre taxonomistas con respecto a la clasificación del género *Trichoderma*. De acuerdo con el concepto de Bisset (1991), que incluye todos los hongos de la fase asexual de *Hipocrea* en ese género, una clara definición morfológica para *Trichoderma* constituye un problema, pues la estructura de conidióforos es altamente variable y en muchos casos superficialmente semejan los género *Gliocladium* Corda o *Verticillium* Nees. Todo eso torna difícil diferenciar aislados en niveles de especie y dentro de una misma especie. No obstante, un análisis de características morfológicas permanece como primer recurso para la identificación de especies y se utilizó en este trabajo, con base en las claves propuestas por Gams y Bisset (1998) y Samuels et al. (2005), que emplean la clasificación revisada por Bisset (1991).

El primer trabajo que describe a *Trichoderma* como agente de biocontrol se publicó por Weindling (1932). Desde entonces, varias especies del género siguen en investigación y desarrollo para el control de diversos hongos patógenos incluido *S. rolfsii* (AGRAWAL et al., 1977; ELAD et al., 1980; BELL et al., 1982; POLANCO y CASTRO, 2005), en diferentes cultivos agrícolas. Este trabajo presenta datos que indican la eficiencia de cepas de *Trichoderma* contra *S. rolfsii* en plántulas de soya.

Aunque la mayoría de los agentes empleados en control biológico de hongos patógenos presenten cierto grado de especialización, se han referido especies de *Trichoderma* como parásitas de una amplia gama de patógenos. El nivel de control de un patógeno puede variar de acuerdo con la cepa utilizada y con su adaptabilidad a las condiciones biótica y abióticas específicas (DENNIS y WEBSTER, 1971a; 1971b), dentro y entre especies de *Trichoderma*. También Wells et al. (1972) observaron que especies de *Trichoderma* pueden ser diferencialmente selectivas contra diferentes hongos. Bells et al. (1982) al comentar ese hecho, recomiendan la selección de antagonistas contra enfermedad específica y, la evaluación de mezclas de antagonistas para amplias aplicaciones. Este trabajo representa un esfuerzo para seleccionar aislados altamente activos contra *S. rolfsii*. Varias cepas de *Trichoderma* se revelaron altamente efectivas *in vitro* y en los ensayos conducidos con soya en casa de cultivo. Ese potencial ahora necesita ser mejor examinado bajo condiciones de campo.

Finalmente, varios estudios han evidenciado que, además del parasitismo directo (BENHAMOU y CHET, 1996) algunos metabolitos secundarios pueden estar involucrados en la acción antagonista de especies de *Trichoderma* contra *S. rolfsii*, entre ellos los antibióticos (DENNIS y WEBSTER, 1971a) y una enzima quitinasa (LIMA et al., 1997; EL-KATATNY et. al., 2001), así como  $\beta$ -1,3 glucanasa (EL-KATATNY et. al., 2001) entre otras. Aun, la actividad micoparásita de *Trichoderma* spp. puede ser resultado de mecanismos distintos o combinación de esos mecanismos (HARMAN, 2000; HOWELL, 2003). En este trabajo, tres cepas elegidas entre las de buenas potencialidades en los ensayos en cultivo dual no se destacaron de igual manera en medio que contenía filtrado de cultivos, lo que es índice que esas cepas no fueron tan hábiles para producir metabolitos tóxicos en el medio. Eso permite sugerir que por lo menos dos mecanismos están involucrados en la acción antagonista de cepas de *Trichoderma* ensayadas contra *S. rolfsii* en el presente estudio.

## **CONCLUSIONES**

1. Se obtuvieron 20 nuevas cepas de *Trichoderma* spp. en áreas agrícolas de la región de Brasilia (Brasil) y se incorporaron a la colección de hongos para el control biológico de fitopatógenos de Embrapa Recursos Genéticos y Biotecnología.
2. Doce cepas mostraron buenas potencialidades contra *S. r olfsii* en los ensayos, mientras cinco de estas se destacaron aun en la prueba de producción de metabolitos tóxicos en el medio.
3. Son necesarios estudios de campo con las cepas más promisorias encontradas en este trabajo, con el fin de conocer su comportamiento frente a las condiciones ambientales, en el sistema agroecológico.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue realizado con apoyo financiero del Consejo Nacional de Desenvolvimento Científico y Tecnológico (CNPq). Los autores agradecen a Marta Cesar Ferreira Silva, por su precioso auxilio en las actividades de aislamiento, purificación y conservación de las cepas usadas en este trabajo.

## **Referencias**

- AGRAWAL, S. C.; KHARE, M. N.; AGRAWAL, P. S. Biological control of *Sclerotium rolfsii* causing collar rot of lentil. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 30, p. 176-179, 1977.
- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens, **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 72, p. 379-382, 1982.
- BENHAMOU, N.; CHET, I. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 86, p. 405-416, 1996.
- BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, p. 2357-2372, 1991.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* I. Production of non-volatile antibiotics. **Transactions / British Mycological Society**, Cambridge, GB, v. 57, p. 25-39, 1971a.

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

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton, US: CRC Press, 1981. 355 p.

ELAD, Y.; CHET, I.; KATAN, J. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 70, p. 119-121, 1980.

EL-KATATNY, M. H.; GUDELJ, M.; ROBRA, K. H.; ELNAGHY, M. A.; GÜBITZ, G. M. Characterization of a chitinase and an endo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, p. 137-143, 2001.

FERREIRA, S. A.; BOLEY, R. A. *Sclerotium rolfsii*. Disponível em: <[http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/Crop/Type/s\\_rolfs.htm](http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/Crop/Type/s_rolfs.htm)>. Acesso em: nov. 2005.

GAMS, W.; BISSET, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. (Ed.). ***Trichoderma and Gliocladium*: basic biology, taxonomy and genetics**. London: Taylor & Francis Ltd., 1998. v. 1. p. 3-34.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions research on *Trichoderma harzianum* t-22. **Plant Disease**, Saint Paul, US, v. 84, p. 377-393, 2000.

HOMECHIN, M. **Potencial e emprego de isolados brasileiros de *Trichoderma harzianum*, Rifai, para controle de patógenos de soja**. 1987. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

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

LIMA, L. H. C.; ULHOA, C. J.; FERNANDES, A. P.; FELIX, C. R. Purification of a chitinase from *Trichoderma* sp. and its action on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* cell walls. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 43, p. 31-37, 1997.

MARTIN, J. P. Use of acid, rose Bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Science**, Baltimore, US, v. 69, p. 215-232, 1950.

MUKHERJEE, P. K.; RAGHU, K. *Trichoderma* sp. as a microbial suppressive agent of *Sclerotium rolfsii* on vegetables. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, GB, v. 13, p. 497-499, 1997.

PÉRES, L. M. **Bases moleculares del control biológico de fitopatógenos: experiencia chilena**. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, 2005. 10 p.

PINEDA, J. B.; POLANCO, C. D. Control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en *Phaseolus vulgaris* mediante la utilización de *Penicillium notatum* Westl. **Agronomia Tropical**, Maracay, VE, v. 31, p. 265-281, 2005.

POLANCO, C. D.; CASTRO, J. L. Estudios sobre el control biológico de *Sclerotium rolfsii*. **Agronomia Tropical**, Maracay, VE, v. 27, p. 539-547, 2005.

SAMUELS, G. J.; CHAVERRI, P.; FARR, D. F.; MCCRAY, E. B. *Trichoderma* on line, Systematic botany & Mycology, Laboratory, ARS, USDA. 2005. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>>. Acesso em: feb. 2005.

TSAHOURIDOU, P. C.; THANASSOULOPOULOS, C. C. Proliferation of *Trichoderma koningii* in the tomato rhizosphere and the suppression of damping-off by *Sclerotium rolfsii*. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, US, v. 34, p. 767-776, 2002.

WELLS, H. D.; BELL, D. K.; JAWORSKI, C. A. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 62, p. 442-447, 1972.

WEINDLING, R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 22, p. 837-845, 1932.