

Avaliação de Isolados de *Trichoderma* no Controle da Mancha Foliar do Eucalipto in Vitro e Quanto a Esporulação em Dois Substratos Sólidos

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

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 225

Avaliação de Isolados de *Trichoderma* no Controle da Mancha Foliar do Eucalipto in Vitro e Quanto a Esporulação em Dois Substratos Sólidos

Magno RodriguesCarvalho Filho
José Eustáquio Menêzes
Sueli Corrêa Marques de Mello
Renato Popov dos Santos

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: *Miguel Borges*

Secretária-Executiva: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Diva Maria de Alencar Dusi*
Luiz Adriano Maia Cordeiro
José Roberto de Alencar Moreira
Regina Maria Dechechi G. Carneiro
Samuel Rezende Paiva

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*
Margot Alves Nunes Dode

Supervisor editorial: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Ligia Sardinha Fortes*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Figura da Capa. Escala diagramática de severidade (% de área foliar lesionada) da mancha - foliar causada por *Cylindrocladium* spp. em eucalipto.

1ª edição

1ª impressão (2008):

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

A 945 Avaliação de isolados de *Trichoderma* no controle da mancha foliar do eucalipto in vitro e quanto a esporulação em dois substratos sólidos. / Magno Rodrigues Carvalho Filho ... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.

- p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; 225).

1. *Trichoderma*. 2. Eucalipto. 3. Controle biológico. I. Carvalho Filho, Magno Rodrigues. II. Série.

632.7 – CDD 21

Sumário

Avaliação de Isolados de *Trichoderma* no Controle da Mancha Foliar do Eucalipto in Vitro e Quanto a Esporulação em Dois Substratos Sólidos

Magno Rodrigues Carvalho Filho¹

José Eustáquio Menêzes²

Sueli Corrêa Marques de Mello³

Renato Popov dos Santos⁴

Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de isolados de *Trichoderma* spp. no controle da mancha-foliar do eucalipto causada por *Cylindrocladium scoparium* por meio de ensaios in vitro e utilizando folhas destacadas, como também, determinar a capacidade de esporulação dos isolados de *Trichoderma* spp. em dois substratos, grãos de arroz parboilizado e de milho. Os experimentos in vitro consistiram em pareamentos de culturas e exposição do patógeno a possíveis metabólitos voláteis e não voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. Foram constatadas, por exames ao microscópio de luz, alterações morfológicas em hifas e inibição no crescimento micelial de *C. scoparium*. Para os testes com folhas destacadas, foram utilizadas folhas de um clone híbrido de eucalipto resultante de cruzamentos entre *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*. Observou-se a supressão de sintomas da doença com todos os isolados de *Trichoderma* nas folhas inoculadas com o isolado CEN 494 de *C. scoparium*, enquanto que com o isolado CEN 517, aparentemente mais agressivo, os isolados de *Trichoderma* spp. não apresentaram a mesma eficiência. A esporulação dos isolados de *Trichoderma* spp. testados, em termos de biomassa colonizada, foi variável, de $5,7 \times 10^9$ a $7,3 \times 10^8$ conídios/g de substrato. Com base nos resultados obtidos, isolados de *Trichoderma* spp. poderão ser usados em estratégias de desenvolvimento de biofungicidas, especialmente o CEN 262, identificado como *T. harzianum*, dado o seu efeito supressivo sobre *C. scoparium* e sua capacidade de esporulação, independente do substrato e do período de avaliação adotados.

Termos para indexação: Controle biológico, produção de inóculo, *Cylindrocladium scoparium*.

¹ Biólogo, M.Sc., Universidade de Brasília

² Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Eng. Agr., Doutora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Eng. Agr., B.Sc., Universidade de Brasília

Evaluation of *trichoderma* spp. Isolates in the spot leaf control of *eucalyptus* species and for the sporulation capability in solid substrates

Abstract

This study aimed to evaluate the potential of *Trichoderma* spp. isolates in the control of eucalyptus leaf-spot caused by *Cylindrocladium scoparium* through of *in vitro* tests using detached leaves, as well as, to determine the capacity of sporulating of *Trichoderma* spp. isolates in two substrates, grains of parboiled rice and millet. The experiments consisted of *in vitro* pairing of cultures and the pathogen exposure to possible non-volatile and volatile metabolites produced by *Trichoderma* spp. were found, for examination under the microscope of light, morphological changes in hyphae and inhibition in mycelial growth of *C. scoparium*. To the detached leaves tests, were used leaves of eucalyptus hybrid clone derived from crosses between *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla*. Was observed the suppression of disease symptoms with all isolates of *Trichoderma* in the inoculated leaves with the isolate CEN 494 of *C. scoparium*, while with the isolate CEN 517, apparently more aggressive, the *Trichoderma* isolates not had the same efficiency. The sporulation of tested *Trichoderma*, in terms of colonized biomass was variable between, 5.7×10^9 to 7.3×10^8 conidia/g for substrate. Based on the results obtained, the *Trichoderma* isolates can be used in the development of strategies biofungicide, especially the CEN 262 isolate, identified as *T. harzianum*, given its suppressive effect on *C. scoparium* and your capacity of sporulation, independent of the substrate and the assessment period adopted.

Index terms: Biological control, inoculum production, *Cylindrocladium scoparium*.

Introdução

A produção de mudas de eucalipto, na maioria das empresas florestais, é realizada por propagação vegetativa, visando uniformidade dos povoamentos, melhor adaptação dos clones às condições locais e aumento da produtividade. Com a expansão da cultura do eucalipto, houve incremento na demanda por mudas clonais, ocasionando ao aumento das doenças em viveiros quando acondicionadas em casas de nebulização. Esses locais, caracterizados pela umidade e temperatura elevadas, apresentam as condições ideais para o enraizamento das miniestacas, porém, favoráveis aos diversos patógenos (XAVIER e COMÉRIO, 1998).

No Brasil, a mancha-foliar de eucalipto, causada por espécies de *Cylindrocladium* Morgan, é uma doença de ocorrência quase sempre severa, em mudas clonais (FERREIRA, 1989). As manchas foliares resultam em necrose das folhas, seguida de morte ou inibição do crescimento das mudas. Estas, se utilizadas para plantio, quase sempre morrem, quer pela ação do patógeno original, quer por ataque de patógenos secundários.

Queiroz et al. (2004) afirmam que espécies de *Trichoderma* têm recebido grande atenção da pesquisa pela sua versatilidade como agentes de biocontrole de fitopatógenos. Resultados de campo com *Trichoderma harzianum* Rifai, por exemplo, indicaram suas diferentes condições ambientais no controle de várias doenças.

A bioatividade desses fungos pode se dar de forma direta, mediada por enzimas degradadoras da parede celular (LIMA et al., 1997; EL-KATATNY et al., 2001), por secreção de diversos antibióticos, competição por espaço e por nutrientes, ou ainda, por indução de resistência de plantas a doenças e ao estresse (HARMAN, 2000; HOWELL, 2003).

Produção de inóculo em condições de laboratório é informação necessária para o desenvolvimento de agentes de biocontrole. O cultivo de fungos em larga escala, em muitos casos, tem-se baseado no uso de substratos sólidos. Grãos de cereais oferecem a vantagem de serem prontamente biodegradáveis (JACKSON, 1997; THANGAVELU et al., 2004; FORTES et al., 2007).

O trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o potencial de isolados de *Trichoderma* spp. no biocontrole da mancha-foliar do eucalipto in vitro e a capacidade de esporulação, dos mesmos isolados, em grãos de arroz e de milho.

Material e Métodos

Isolados do patógeno e do antagonista

O trabalho foi conduzido com 12 isolados de *Trichoderma* spp., sendo CEN 515 (*T. koningii*), CEN 516 (*T. atroviride*), CEN 518, CEN 519 e CEN 520 (*T. harzianum*) obtidos de amostras de solo coletadas em área de plantio de eucalipto localizada em Luziânia-GO; um isolado, CEN 498 (*T. atroviride*) de amostras de solo rizosférico de *Pinus*, coletadas no Parque da Cidade, localizado

em Brasília-DF; um isolado CEN 500 (*T. harzianum*), em campo de produção de goiabas com relatos de infecção por *Cylindrocladium*, no estado do Pernambuco; os outros cinco isolados, pertencentes às espécies *T. asperellum* (CEN 162), *T. harzianum* (CEN 201 e CEN 262), *T. pseudokoningii* (CEN 209) e CEN 492 (*Trichoderma* sp.), são pertencentes à coleção de Culturas de Fungos para o Controle de Fitopatógenos e de Plantas Daninhas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN). Estes últimos foram escolhidos com base em resultados anteriormente obtidos no controle do mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum* de Bary), tombamento (*Rhizoctonia solani* Kühn.) e podridões de raízes e do colo (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) do feijoeiro. As amostras de solo foram processadas segundo o método de diluição seriada (DHINGRA e SINCLAIR, 1985) em meio de Martin e a identificação dos isolados obtidos realizada com chave interativa desenvolvida por Samuels et al. (2008).

Para os ensaios de biocontrole, utilizaram-se dois isolados de *Cylindrocladium scoparium*: CEN 494, doado pela empresa International Paper, de Mogi-Guaçu-SP e CEN 517, obtido de lesões foliares de plantas coletadas em área comercial de eucalipto, situada no município de Luziânia-GO.

Avaliação do antagonismo ao fungo *C. scoparium* por isolados de *Trichoderma* spp. em cultivo pareado

O antagonismo dos isolados de *Trichoderma* spp. contra *C. scoparium* foi avaliado em confronto direto, utilizando-se o método de pareamento de culturas em placas de Petri, de acordo com Dennis e Webster (1971a). A multiplicação inicial, tanto dos isolados de *Trichoderma* spp. quanto dos isolados do patógeno, foi realizada em placas contendo o meio de batata-dextrose-água (BDA), acondicionadas em câmara de crescimento do tipo B.O.D. à 25°C e com fotoperíodo de 12 horas, durante 5 dias. Para o confronto direto dos organismos, foram estabelecidas três repetições. Discos (5 mm de diâmetro) retirados das culturas puras do patógeno e do antagonista foram depositados diametralmente opostos em placas contendo o mesmo meio e incubadas nas mesmas condições descritas. Placas de BDA, contendo só o patógeno, foram utilizadas como controle. Para as avaliações, aos sete dias de cultivo, foram atribuídas notas de acordo com a escala estabelecida por Bell et al. (1982).

Para verificação de alterações morfológicas nas hifas de *Cylindrocladium* sp. atacadas por *Trichoderma* spp., foram preparadas lâminas contendo as estruturas da zona de confronto de ambos os fungos. Sob microscópio óptico com lente de aumento de 40X, foram examinadas a presença de enrolamento e plasmólise de hifas, crescimento de hifas paralelas, bem como alterações estruturais.

Avaliação do efeito inibidor de metabólitos voláteis e não voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. sobre *C. scoparium*

O efeito inibidor de metabólitos voláteis dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre *C. scoparium* foi testado, conforme descrito por Dennis e Webster (1971b). Duas bases de placas de Petri, contendo BDA, foram individualmente inoculadas com discos (5 mm de diâmetro) de culturas do patógeno e do antagonista e, em seguida, incubadas nas condições anteriormente descritas. Após 24 horas, as bases contendo o antagonista e o patógeno foram sobrepostas e unidas por filme de PVC, para impedir o escape de metabólitos voláteis, sendo novamente incubada nas mesmas condições. Como testemunha, foram sobrepostas bases contendo apenas o patógeno. As avaliações do crescimento micelial foram realizadas quando toda a superfície do meio se apresentou colonizada pelo patógeno, nas placas testemunha.

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram testados quanto à inibição do desenvolvimento do patógeno por metabólitos não voláteis, utilizando-se o método descrito por Agrawal et al. (1977), com modificações. Esse método consistiu no cultivo dos isolados em frascos Erlenmeyer, contendo 250 mL de meio líquido à base de batata-dextrose (5 discos de 5 mm de diâmetro por frasco), retirados de culturas de *Trichoderma* com cinco dias de idade. A incubação ocorreu em agitador orbital, a 150 rpm, à 25°C, em ausência de luz. Após esse período, a parte líquida foi coletada por filtração em papel de filtro e, após passagem por membrana estéril de celulose (0,45 μm), foi incorporada ao meio BDA autoclavado, na proporção de 25% (v/v). Foram preparadas três placas com filtrado de cada antagonista, para cada um dos dois isolados do patógeno. As placas de Petri com o meio foram inoculadas, no centro, com discos de culturas do patógeno e incubadas a 25°C. A testemunha consistiu de placas contendo meio BDA sem filtrado de *Trichoderma*, inoculadas com *C. scoparium*. As medições do crescimento radial foram tomadas quando toda a superfície do meio, nas placas testemunhas, se apresentou colonizada pelo patógeno.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

Preparo de *Trichoderma* spp. para testes em folhas destacadas

O inóculo para os ensaios em folha destacada foi produzido em grãos de arroz parboilizado, utilizando, como inóculo-semente, discos de culturas desenvolvidas em meio BDA. Foram utilizados cinco isolados de *Trichoderma* spp. (CEN 162, CEN 209, CEN 262, CEN 498, CEN 500), selecionados nos ensaios in vitro anteriores.

Grãos de arroz, previamente umedecidos com água destilada a 60% (p/v), foram distribuídos em sacos plásticos de polipropileno (300 g de arroz seco /saco), sendo estes vedados com grampos, e auto-clavados (120°C, por 25 minutos). Cada saco recebeu, assepticamente, oito discos (5 mm de diâmetro) das colônias de *Trichoderma*. A incubação foi em B.O.D. à 25°C com fotoperíodo de 12 horas. A cada dois dias o substrato foi revolvido para promover a troca gasosa, quebra do

micélio e aumento da superfície de contato do fungo com o substrato para a produção mais elevada de esporos (JACKSON, 1997). Após sete dias de incubação, o substrato de cada saco foi lavado com água corrente (aproximadamente 2 litros de água) para a extração do inóculo. A concentração de conídios foi ajustada a 10^7 conídios/mL.

Avaliação da supressão da mancha - foliar causada por *C. scoparium* por *Trichoderma* spp. em folhas destacadas de eucaliptos

Para avaliação da supressão da mancha foliar de *C. scoparium* em folhas destacadas de eucaliptos, primeiramente, foi induzida a esporulação dos patógenos CEN 494 e CEN 517 em meio líquido SG. Após 15 dias de cultivo em agitador orbital com rotação de 170 rpm à 27°C, os conídios foram coletados por filtração em camada dupla de gaze e preparadas as suspensões de inóculo, contendo 10^5 conídios/mL.

Cinco antagonistas foram selecionados a partir de testes in vitro (CEN 162, CEN 209, CEN 262, CEN 498, CEN 500). Para a preparação do inóculo desses isolados de *Trichoderma*, discos retirados da periferia de colônias dos isolados cultivados em BDA (5 mm de diâmetro) foram distribuídos em frascos Erlenmeyer contendo grãos de arroz umedecidos com água destilada (60% p/v), previamente autoclavados. A incubação se realizou a 25°C e 12 horas de luz, durante sete dias.

As folhas destacadas utilizadas nos experimentos foram obtidas de minijardim clonal de eucaliptos livre de doenças, cultivadas em casa de vegetação, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Utilizaram-se folhas jovens, com idade de 10 a 15 dias, que tiveram seus pecíolos destacados junto às hastes. As folhas, previamente lavadas com água destilada, tiveram os pecíolos envolvidos em algodão umedecido com água destilada esterilizada e foram dispostas sobre papel de filtro, também umedecido com água esterilizada e distribuídas em caixas do tipo gerbox (um par de folhas/caixa).

Após inoculação, as caixas gerbox foram envolvidas com película plástica transparente de PVC a fim de manter uma alta umidade relativa do ar no seu interior, sendo mantidas sobre a bancada de laboratório, à temperatura ambiente.

O inóculo foi aspergido sobre as folhas, nas concentrações de 10^5 e 10^7 , para os isolados de *C. scoparium* e *Trichoderma* spp., respectivamente. As pulverizações do antagonista foram imediatamente seguidas de inoculação dos patógenos. Foram incluídos três tratamentos testemunha: 1) pulverização com água destilada; 2) pulverização com os dois isolados de *C. scoparium*; 3) pulverização com isolados do antagonista.

Foram realizadas três repetições por tratamento, constituindo a unidade experimental, uma caixa de gerbox. As avaliações ocorreram aos cinco dias de incubação, com a escala proposta por Alfenas et al. (2004) (Figura 1).

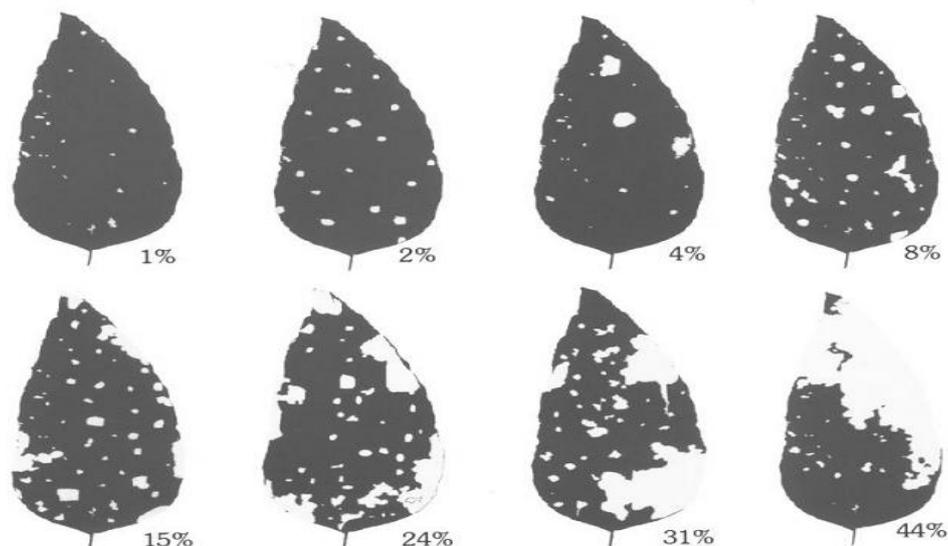


Figura 1. Escala diagramática de severidade (% de área foliar lesionada) da mancha - foliar causada por *Cyindrocladium* spp. em eucalipto.

Avaliação da esporulação de *Trichoderma* spp. em grãos de arroz parboilizado e de milho

Os mesmos isolados de *Trichoderma* spp., utilizados no cultivo pareado, foram utilizados para a realização desse experimento. Foram utilizados frascos Erlenmeyer de 125 mL, cada um recebendo 25 g do substrato, adicionado de água destilada (60% p/v). Após vedação com tampão de algodão, os frascos foram autoclavados a 120 °C, durante 25 minutos. Foi transferido, assepticamente, três discos (5 mm de diâmetro) de BDA, contendo micélio e esporos dos agentes de biocontrole. Os frascos foram incubados na B.O.D., à temperatura de 25°C, em fotoperíodo de 12 horas, por sete e 11 dias. A cada dois dias, os frascos com substrato foram revolidos para promover a aeração, quebra do micélio para aumentar a superfície de contato com o intuito de aumentar a taxa de esporulação dos fungos. Amostras do substrato colonizado foram processadas para determinação da concentração de esporo por grama de substrato, conforme descrito anteriormente, aos 7 e aos 11 dias.

O presente experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, em arranjo fatorial 12x2x2, representados pelos 12 isolados de *Trichoderma* spp., pelos períodos de incubação e pelos dois substratos sólidos. Os dados obtidos em todos os experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tukey, ao nível de 5% utilizando-se o programa de estatística SAEG (RIBEIRO, 2001).

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos na inibição do crescimento micelial dos isolados de *C. scoparium*, quando confrontados em cultivo pareado com os 12 isolados de *Trichoderma* spp. são mostrados na Tabela 1. Cinco isolados (CEN 162, CEN 209, CEN 262, CEN 498 e CEN 500) apresentaram grau máximo (classe 1) da escala de Bell et al. (1982), reduzindo o crescimento de ambos os

isolados do patógeno e esporulando sobre toda a superfície das placas. Os isolados CEN 201, CEN 519 e CEN 520 colonizaram pelo menos 2/3 da superfície do meio (classe 2), apresentando potencial de biocontrole, juntamente com outros isolados que se colocaram ora na classe 1 (CEN 515 e CEN 516), ora na classe 2 (CEN 518), dependendo do isolado do patógeno utilizado. O isolado CEN 492, foi o único que não exerceu atividade antagonica contra os isolados do patógeno nos testes de pareamento de culturas, uma vez que estes avançaram sobre ele e colonizaram a maior superfície do meio.

Tabela 1. Classificação dos isolados de *Trichoderma* spp. quanto ao antagonismo exercido sobre dois isolados de *Cylindrocladium scoparium*, no teste de pareamento de culturas⁽¹⁾.

Isolados	<i>C. scoparium</i> (CEN 494)	<i>C. scoparium</i> (CEN 517)
CEN 162 <i>T. asperellum</i>	1	1
CEN 201 <i>T. harzianum</i>	2	2
CEN 209 <i>T. pseudokoningii</i>	1	1
CEN 262 <i>T. harzianum</i>	1	1
CEN 492 <i>Trichoderma</i> sp.	3	3
CEN 498 <i>T. harzianum</i>	1	1
CEN 500 <i>T. harzianum</i>	1	1
CEN 515 <i>T. harzianum</i>	1	2
CEN 516 <i>T. atroviride</i>	1	2
CEN 518 <i>T. harzianum</i>	2	1
CEN 519 <i>T. harzianum</i>	2	2
CEN 520 <i>T. harzianum</i>	2	2

⁽¹⁾Escala de Bell et al. (1982): nota 1-sobreposição de *Trichoderma*, que colonizou toda a superfície do meio e reduziu a colônia do patógeno; nota 2-sobreposição de *Trichoderma*, que colonizou pelo menos 2/3 da superfície do meio; nota 3-*Trichoderma* e patógeno colonizaram mais que 1/3 e menos que 2/3 da superfície do meio; nota 4-patógeno colonizou ao menos 2/3 da superfície do meio e resistiu à invasão por *Trichoderma*; nota 5-sobreposição do patógeno que colonizou toda a superfície do meio.

Quanto as amostras de micélio retiradas da zona de confronto, cujos isolados de *Trichoderma* spp. foram classificados com notas 1 e 2 frente a *C. scoparium* no pareamento das culturas encontram-se na Tabela 2. Ao serem examinadas ao microscópio óptico, tais amostras revelaram crescimento paralelo e enrolamento das hifas de *Trichoderma* spp. em torno das hifas do patógeno, bem como plasmólise de hifas do patógeno. Os exames de amostras retiradas de placas cultivadas apenas com os isolados do patógeno, por sua vez, não evidenciaram tais alterações, que foram atribuídas à ação do antagonista (Figura 2).

Tabela 2. Interações antagonistas entre hifas de *Trichoderma* spp. e de isolados de *Cylindrocladium scoparium*, observadas ao microscópio óptico, com aumento de 40x ⁽¹⁾.

Interações	Isolados de <i>Trichoderma</i> spp.											
	CEN 162	CEN 201	CEN 209	CEN 262	CEN 492	CEN 498	CEN 500	CEN 515	CEN 516	CEN 518	CEN 519	CEN 520
Crescimento de hifas paralelas	+	-	+	+	*	+	+	+	+	+	-	-
Enrolamento de hifas	+	-	+	+	*	+	+	+	+	+	-	-
Plasmólise de hifas	+	-	+	+	*	+	+	+	+	+	-	-

⁽¹⁾Interações: não observadas (*), ausência (-) e presença (+).

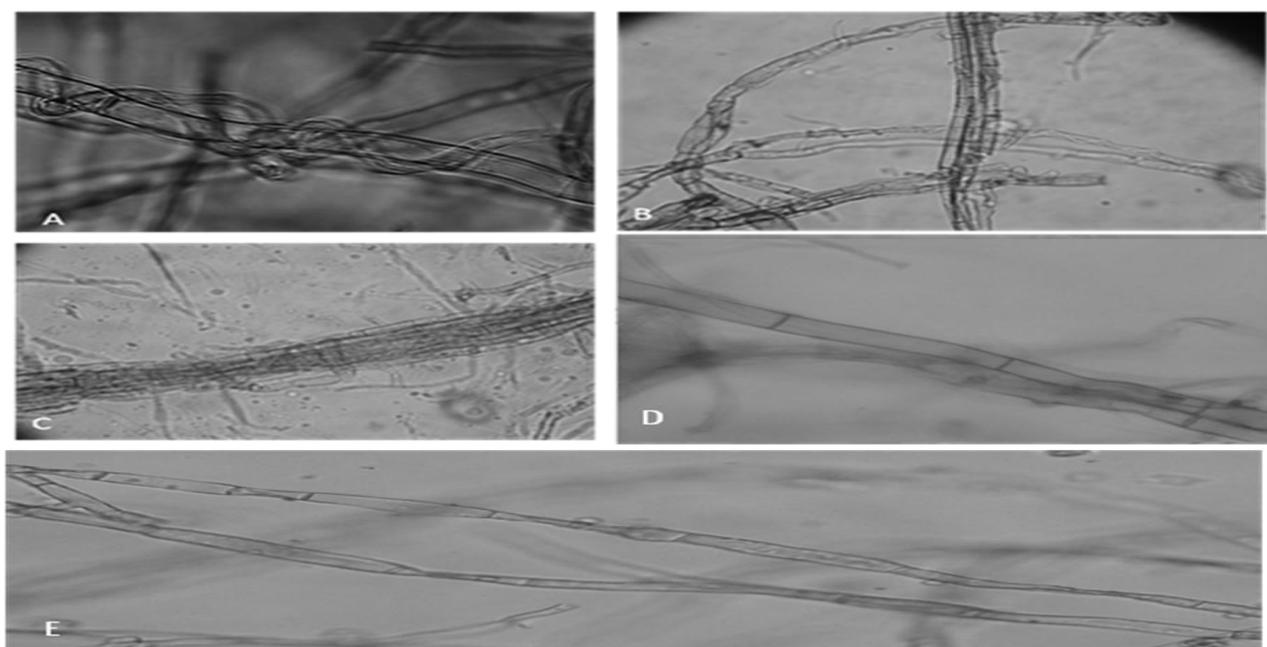


Figura 2. Interações observadas ao microscópio óptico entre hifas de *C. scoparium* e *Trichoderma* spp. : A: (CEN 209) e B: (CEN 500) - enrolamento das hifas de *Trichoderma* em hifas de *Cylindrocladium scoparium*; C: (CEN 498) - crescimento de hifas paralelas de *Trichoderma* e *C. scoparium*; D: hifa sadia de *C. scoparium*; E: plasmólise em hifas de *C. scoparium* induzida pelo isolado CEN 162 de *Trichoderma*.

Rocha e Oliveira (1998), também, relataram alterações em *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Saccardo, quando confrontado com isolados de *Trichoderma*. Segundo Papavizas (1985) essas alterações evidenciam o micoparasitismo direto exercido por *Trichoderma*. Entretanto, mais de um mecanismo de ação pode estar simultaneamente envolvido na ação antagonista de *Trichoderma*. Competição, por exemplo, embora mais difícil de ser determinado, é considerado um dos mais eficientes, podendo resultar em limitação, para o patógeno, de nutrientes e água, ou de sítios onde esses fatores nutricionais são mais abundantes, durante o período de pré-penetração (PERELLÓ et al., 2003).

Quanto aos resultados relativos aos experimentos com metabólitos voláteis e não voláteis, houve pouca diferença no comportamento dos isolados de *Trichoderma* frente aos dois isolados do patógeno (Tabelas 3 e 4). Com relação aos metabólitos voláteis, os valores médios da porcentagem de inibição micelial, exercida sobre os isolados CEN 494 e CEN 517 do patógeno,

variaram de 7,4% (CEN 519) a 37,7 % (CEN 162, CEN 262 e CEN 498) e de 11,1% (CEN 520) a 33,3% (CEN 209 e CEN 500), respectivamente. Em termos de diâmetro médio de crescimento micelial, seis dos 12 isolados diferiram da testemunha, porém, não diferiram entre si, no confronto com o isolado CEN 494. Já, em relação ao isolado CEN 517, todos os isolados de *Trichoderma* diferiram da testemunha. Entre isolados, essa diferença só foi significativa com o isolado CEN 520 comparado aos quatro melhores isolados (CEN 162, CEN 209, CEN 262, CEN 498, CEN 500) deste ensaio

Tabela 3. Bioatividade de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. em relação ao crescimento micelial de dois isolados *Cylindrocladium scoparium* (CEN 494 e CEN 517)⁽¹⁾.

Isolados	CEN 494		CEN 517	
	Diâmetro médio (cm)	Inibição (%)	Diâmetro médio (cm)	Inibição (%)
CEN 162 - <i>T. asperellum</i>	5,66 a	37,7	6,33 ab	29,6
CEN 201 - <i>T. harzianum</i>	7,66 bc	14,8	7,66 bc	14,8
CEN 209 - <i>T. pseudokoningii</i>	6,33 ab	29,6	6,0 a	33,3
CEN 262 - <i>T. harzianum</i>	5,66 a	37,7	6,33 ab	29,6
CEN 492 - <i>Trichoderma</i> . sp.	7,66 bc	14,8	7,0 abc	22,2
CEN 498 - <i>T. harzianum</i>	5,33 a	40,7	6,33 ab	29,6
CEN 500 - <i>T. harzianum</i>	5,66 a	37,7	6,0 a	33,3
CEN 515 - <i>T. harzianum</i>	7,0 abc	22,2	7,0 abc	22,2
CEN 516 - <i>T. atroviride</i>	6,33 ab	29,6	7,33 abc	18,5
CEN 518 - <i>T. harzianum</i>	7,66 bc	14,8	7,33 abc	18,5
CEN 519 - <i>T. harzianum</i>	8,33 c	7,44	7,0 abc	22,2
CEN 520 - <i>T. harzianum</i>	8,0 bc	11,1	8,0 c	11,1
Controle9,0 c	0	9,0 d	0
C.V.	9,3		8,0	

⁽¹⁾Médias seguidas pelas mesmas letras, nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quanto aos testes de metabólitos não voláteis, a variação dos valores médios de porcentagem de inibição micelial verificada foi de 4,4% (CEN 519) a 42,2% (CEN 498) e de 4,3% (CEN 492) a 26,6% (CEN 162 e CEN 209), para os isolados CEN 494 e CEN 517, respectivamente. Neste caso, em termos de diâmetro médio de inibição, seis dos 12 isolados diferiram da testemunha, porém, quatro se destacaram dentre esses melhores (CEN 262, CEN 498, CEN 500 e CEN 515), no confronto com o isolado CEN 494. Já em relação ao isolado CEN 517, embora seis isolados tenham diferido da testemunha, não houve diferença significativa entre isolados, exceto para o isolado CEN 492, que apresentou o maior valor de diâmetro médio de colônia do patógeno. Esses dados obtidos revelaram maior tolerância do isolado CEN 517 aos metabólitos voláteis e não voláteis produzidos por *Trichoderma* spp.

Tabela 4. Bioatividade de metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. em relação ao crescimento micelial de dois isolados de *Cylindrocladium scoparium* (CEN 494 e CEN 517)⁽¹⁾.

Isolado de <i>Trichoderma</i>	Metabólitos não voláteis			
	CEN 494		CEN 517	
	Diâmetro médio (cm)	Inibição (%)	Diâmetro médio (cm)	Inibição (%)
CEN 162 - <i>T. asperellum</i>	7,0 abc	22,2	6,66 a	26,6
CEN 201 - <i>T. harzianum</i>	8,0 bc	11,1	7,66 abcd	14,8
CEN 209 - <i>T. pseudokoningii</i>	6,0ab	33,3	6,66 a	26,6
CEN 262 - <i>T. harzianum</i>	5,3 a	40,7	7,0 ab	22,2
CEN 492 - <i>Trichoderma</i> . sp.	7,8 bc	13,3	8,66 cd	4,3
CEN 498 - <i>T. harzianum</i>	5,2 a	42,2	7,0 ab	22,2
CEN 500 - <i>T. harzianum</i>	5,4 a	40	7,0 ab	22,2
CEN 515 - <i>T. harzianum</i>	5,66 a	37,7	7,66 abcd	14,8
CEN 516 - <i>T. atroviride</i>	6,7 ab	25,5	7,33 abc	18,5
CEN 518 - <i>T. harzianum</i>	8,0 bc	11,1	8,0 abcd	11,1
CEN 519 - <i>T. harzianum</i>	8,6 c	4,4	7,66 abcd	14,8
CEN 520 - <i>T. harzianum</i>	8,0 bc	11,1	8,33 abcd	7,4
Controle	9,0 c	0	9,0 d	0
C.V.	9,3		6,0	

⁽¹⁾Médias seguidas pelas mesmas letras, nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O nível de controle biológico de um patógeno pode variar com o isolado do agente de biocontrole utilizado e com sua adaptabilidade às condições bióticas e abióticas específicas (DENNIS e WEBSTER, 1971a, 1971b), dentro e entre espécies de *Trichoderma*. Bell et al. (1982), recomendaram a seleção de antagonistas contra doenças específicas. Antibiose exerce importante papel no controle biológico, podendo atuar em conjunto com a competição e agir sinergisticamente com o micoparasitismo, resultando em maior nível de controle (HARMAN, 2000). Testes in vitro, baseados nesses mecanismos de biocontrole têm sido largamente utilizados para seleção de isolados e servem, como indicativos do modo de ação do antagonista. Este trabalho representa um esforço para selecionar isolados ativos contra *C. scoparium*, tendo sobressaído os isolados CEN 162, CEN 209, CEN 262, CEN 498 e CEN 500 como promissores para testes in vivo.

Nos ensaios para avaliação da supressão da mancha-foliar causada por *C. scoparium* conduzidos com folhas destacadas de eucaliptos (Tabela 5), com os cinco isolados selecionados de *Trichoderma* spp., observou-se um melhor efeito do antagonista contra o CEN 494 de *C. scoparium*. Nestes tratamentos, todos os isolados do antagonista apresentaram eficiência em suprimir a doença. Os valores médios de severidade da mancha-foliar não ultrapassaram o nível de 1% da escala proposta por Alfenas et al. (2004). Exceção foi verificada com o isolado CEN 498, para o qual esses valores chegaram a 4%. Já nos tratamentos utilizando-se o isolado CEN 517 do patógeno, índices de doença inferiores aos observados na testemunha foram obtidos com

os isolados CEN 162, CEN 262 e CEN 500 (15% de doença). Com o isolado CEN 209 a severidade média de doença foi de 31%, superando a testemunha, com 24%.

Tabela 5. Efeito de isolados de *Trichoderma* spp. na supressão da mancha-foliar de *C. scoparium*, em folhas destacadas de eucalipto.

Isolado	Severidade média	
	Isolados de <i>C. scoparium</i>	
	CEN 494 (%)	CEN 517 (%)
CEN 162 - <i>T. asperellum</i>	1	15
CEN 209 - <i>T. pseudokoningii</i>	1	31
CEN 262 - <i>T. harzianum</i>	0	15
CEN 498 - <i>T. atroviride</i>	4	24
CEN 500 - <i>T. harzianum</i>	1	15
Testemunha	24	24

Testes com folhas destacadas têm se mostrado úteis na determinação do potencial de agentes de biocontrole. Tatagiba et al. (1998) selecionaram isolados de *T. inhamatum* e *Gliocladium roseum*, para controle de *Botrytis cinerea*, em folhas de roseira. Segundo esses autores, foi possível diferenciar isolados com níveis de redução de esporulação nas lesões, da ordem de 90 a 100%. Gomes et al. (2001) embora não tenham alcançado sucesso na avaliação de isolados de *Trichoderma* para controle da mancha-foliar causada por *C. spathulatum*, em folhas destacadas de erva-mate, selecionaram isolados de *Bacillus subtilis*, utilizando esse método. Neste trabalho, aparentemente essa metodologia, com folhas destacadas de eucaliptos, não foi totalmente satisfatória para avaliação da ação antagonista dos isolados de *Trichoderma* spp.. Aos cinco dias de inoculadas com *C. scoparium*, o índice da doença atingido nas parcelas testemunhas foi de 24%, quando o valor máximo da Tabela proposta por Alfenas et al.(2004) é de 44%. O experimento teve que ser encerrado após a primeira leitura, dada à rápida deterioração das folhas, após este período. De qualquer modo, experimentos de campo são sempre necessários para melhor avaliar as potencialidades dos isolados selecionados em laboratório.

O bom desempenho dos isolados de *Trichoderma*, CEN 162, CEN 209, CEN 262, CEN 498 e CEN 500, nos experimentos in vitro mostram que estes, além de práticos, servem para avaliação preliminar da capacidade antagonista e, ainda, o comportamento dos microrganismos, em termos de capacidade de adaptação, crescimento e reprodução. Entretanto, esses testes possuem limitações por não reproduzirem o ecossistema para os quais os organismos são selecionados, podendo os resultados, não coincidirem com aqueles obtidos em condições normais de ambiente (FORTES et al., 2007).

Na esporulação de *Trichoderma* em dois substratos sólidos (grãos de arroz parboilizado e milho), houve interação tripla entre os três fatores (isolados dos antagonistas, períodos de incubação e substratos), de acordo com as Tabelas 6, 7 e 8. Em termos gerais, maiores taxas de esporulação dos isolados de *Trichoderma*, foram obtidas em arroz parboilizado em relação ao milho, sendo que os valores médios de esporulação dos isolados de *Trichoderma* foram de 3,37

x 10⁹conídios/g e 2,84 x10⁹ conídios/g, respectivamente. Com respeito ao tempo de incubação, a melhor taxa de esporulação foi obtida aos 11 dias, quando foram contados 3,37 x 10⁹ conídios/g do substrato, enquanto aos sete dias esse valor foi de 2,85 x 10⁹ conídios/g.

Tabela 6. Efeito dos substratos e tempo de incubação na esporulação de *Trichoderma*⁽¹⁾.

Efeito substrato		Efeito período de incubação	
Substrato	x.10 ⁹ Esporos.g ⁻¹	Tempo	x.10 ⁹ Esporos.g ⁻¹
Arroz	3,38 a	7 dias	2,85 b
Milheto	2,84 b	11 dias	3,37 a
C.V.	11,23	C.V.	9,85

⁽¹⁾Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Ao ser analisado o período de incubação de sete dias em relação aos dois substratos, observou-se que os isolados CEN 262, CEN 498 e CEN 519, alcançaram maiores níveis de esporulação. As médias variaram entre 5,6 x 10⁹ (CEN 262) e 5,8 x 10⁹ (CEN 498) conídios/g, em milho e 4,9 x 10⁹ conídios/g, (CEN 519), em arroz parboilizado. Os isolados CEN 209, CEN 492, CEN 515, CEN 518 e CEN 520 apresentaram menores índices de esporulação em arroz parboilizado (CEN 518), milho (CEN 209, CEN 515 e CEN 520) ou em ambos os substratos (CEN 492) com variação de 0,6 x 10⁹ (CEN 518) a 2,4 x 10⁹ (CEN 209) conídios/g. Os isolados CEN 162, CEN 201, CEN 500 e CEN 516 esporularam em níveis intermediários, variando em 1,9 x 10⁹ (CEN 201) a 4,4 x 10⁹ (CEN 500) conídios/g, sendo que os isolados CEN 162 e CEN 516 proporcionaram maiores níveis de esporulação em arroz parboilizado, enquanto os isolados CEN 201 e CEN 500, em milho (Tabela 7).

Tabela 7. Esporulação de isolados de *Trichoderma* spp. em dois substratos sólidos diferentes, aos 7 dias de incubação⁽¹⁾.

Isolados	Esporulação em conídios por grama	
	Arroz parboilizado	Milho
CEN 162 - <i>T. asperellum</i>	3,5 A c	3,0 B cd
CEN 201 - <i>T. harzianum</i>	1,9 B d	2,6 A cd
CEN 209 - <i>T. pseudokoningii</i>	2,4 A d	0,8 B e
CEN 262 - <i>T. harzianum</i>	5,0 B a	5,6 A a
CEN 492 - <i>Trichoderma</i> . sp.	1,0 A e	1,0 A e
CEN 498 - <i>T. atroviride</i>	4,8 B ab	5,8 A a
CEN 500 - <i>T. harzianum</i>	4,3 B b	4,4 A b
CEN 515 - <i>T. harzianum</i>	2,0 A d	1,0 B e
CEN 516 - <i>T. atroviride</i>	3,5 A c	2,5 B d
CEN 518 - <i>T. harzianum</i>	0,6 B e	3,25 A c
CEN 519 - <i>T.harzianum</i>	4,9 A ab	2,5 B d
CEN 520 - <i>T. harzianum</i>	4,3 A b	0,73 B e
C.V.	10,91	7,34

⁽¹⁾Esporulação média (x 10⁹ esporos.g⁻¹ de substrato). Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Quanto ao tempo de incubação de 11 dias, utilizando os mesmos substratos, observaram-se maiores níveis de esporulação, variando de $4,5 \times 10^9$ (CEN 162) a $7,7 \times 10^9$ (CEN 262) conídios/g de substrato com os isolados CEN 162, CEN 201 e CEN 262, sendo que os isolados CEN 162 e CEN 201 esporularam melhor em arroz parboilizado e o CEN 262, em milho. Os isolados CEN 209, CEN 500, CEN 515, CEN 516, CEN 518 e CEN 519 apresentaram os menores índices de produção de esporos em milho (CEN 209, CEN 519); arroz parboilizado (CEN 515) ou em ambos os substratos (CEN 500, CEN 516 e CEN 518), com variação de $1,0 \times 10^9$ (CEN 516) a $1,6 \times 10^9$ (CEN 518 e CEN 519) conídios/g de substrato. Os isolados CEN 492, CEN 498 e CEN 520 esporularam em níveis medianos, variando de $2,1 \times 10^9$ (CEN 520) a $7,0 \times 10^9$ (CEN 498) conídios/g de substrato (Tabela 8).

Os experimentos para avaliação da esporulação de agente de *Trichoderma* demonstram que a variabilidade dos isolados também, em termos de exigência nutricional e tempo de incubação para produção de esporos. Por outro lado, disponibilidade, custo, rendimento e praticidade são requisitos importantes a serem considerados na escolha do substrato para cultivo do agente de controle, especialmente quando o intuito é o desenvolvimento de biofungicida. Grãos de cereais oferecem essas vantagens, por isso são os mais utilizados (JACKSON, 1997; THANGAVELU et al., 2004; FORTES et al., 2007). Eles são prontamente biodegradáveis, facilitando as aplicações no campo e, adicionalmente, apresentam facilidade para quantificação dos propágulos produzidos.

Tabela 8. Esporulação de isolados de *Trichoderma* spp. em dois substratos sólidos aos 11 dias de incubação⁽¹⁾.

Isolados	11 dias de incubação	
	Esporulação (conídios.g ⁻¹ de substrato)	
	Arroz parboilizado	Milho
CEN 162	4,5 Aa	2,8 Ba
CEN 201	4,5 Aa	2,0 Bd
CEN 209	1,5 Acde	1,1 Ba
CEN 262	5,0 Ba	7,7 Aa
CEN 492	3,3 Ab	3,3 Ac
CEN 498	3,3 Bb	7,0 Ab
CEN 500	1,3 Ade	1,5 Aef
CEN 515	1,1 Bde	3,3 Ac
CEN 516	1,0 Ae	1,0 Af
CEN 518	1,6 Acd	1,6 Adef
CEN 519	3,8 Ab	1,6 Bdef
CEN 520	2,1 Ac	2,2 Ad
C.V.	4,37	4,57

⁽¹⁾Esporulação média ($\times 10^9$ esporos.g⁻¹ de substrato). Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na vertical e minúscula na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Conclusões

- 1) O isolado CEN 517 de *C. scoparium* é mais tolerante do que o CEN 494 à ação dos isolados de *Trichoderma* testados.
- 2) Bioensaios em folhas destacadas podem ser úteis na seleção prévia do agente de biocontrole da mancha-foliar do eucalipto, porém, tais testes devem ser validados em viveiros de produção de mudas.
- 3) Em termos de esporulação em substrato sólido, os isolados de *Trichoderma* apresentam respostas variáveis, com o tipo de substrato e período de avaliação utilizado.

Referências

- 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.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. de. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa. Editora UFV, 2004. 442 p.
- ANTAL, Z.; VARGA, J.; KREDICS, L.; SZEKERES, A.; HATVANI, L.; MANCZINGER, L.; VAGVOLGYI, C.; NAGY, E. Intraspecific mitochondrial DNA polymorphism within the emerging filamentous fungal pathogen *Trichoderma longibrachiatum*. **Journal of Medical Microbiology**, London, GB, v. 55, p. 31-35, 2006.
- 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.
- CROUS, P. W.; WINGFIELD, M. J. A monograph of *Cylindrocladium*, including anamorphs of *Calonectria*. **Mycotaxon**, Ithaca, USA, v. 51, p. 341-435, 1994.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotic. **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, Florida: CRC Press, 1985. 355 p.
- DRUZHININA, I.; KUBICEK, C. P. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? **Journal of Zhejiang University Science**, Hangzhou, China, v. 6, p. 100-112, 2005.
- EL-KATATNY, M. H.; GUDELJ, M.; ROBBA, K. H.; ELNAGHY, M. A.; GUBITZ, G. M. Characterization of chitinase and an endo- β -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, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Programa e resumos...** São Carlos, SP: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal: principais doenças florestais do Brasil.** Viçosa, MG: SIF, 1989. p. 570.

FORTES, F. O.; SILVA, A. C. F.; ALMANÇA, M. A. K.; TEDESCO, S. B. Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, p. 221-228, 2007.

GOMES, N. S. B.; GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C. G. Seleção de antagonistas para o controle de *Cylindrocladium spathulatum* em erva mate. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, PR, n. 43, p. 123-138, 2001.

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

HERMOSA, M. R.; GONDONA, I.; MINGUEZ, J. M. D.; ITURRIAGA, E. A.; MONTE, E. Development of a strain-specific SCAR marker for the detection of *Trichoderma atroviride* 11, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. **Current Genetics**, New York, US, v. 38, p. 343-350, 2001.

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.

INTERNATIONAL SUBCOMMISSION ON *TRICHODERMA* AND *HYPOCREA* TAXONOMY. ***Trichoderma* in biological control: a taxonomic reports.** Disponível em: <http://isth.info/materials/topic.php?material_id=3>. Acesso em: 13 de abril de 2008.

JACKSON, M. A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, GB, v. 19, p. 180-187, 1997.

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.

MELLO, S. C. M.; ÁVILA, Z. R.; BRAÚNA, L. M.; PÁDUA, R. R.; GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* spp., para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* SACC. **Fitosanidad**, v. 11, p. 3-9, 2007.

MELO, I. S.; FAULL, J. L. Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. **Scientia Agricola**, Piracicaba, SP, v. 57, p. 55-59, 2000.

PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, US, v. 23, p. 23-54, 1985.

PERELLÓ, A.; MÓNACO, C.; SIMÓM, M. R.; SISTERMA, M.; DALL BELLO, G. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan spot of wheat in Argentina. **Crop Protection**, Guildford, GB, v. 22, p. 1099-1106, 2003.

QUEIROZ, P. R.; VALADARES-INGLIS, M. C.; INGLIS, P. W. Survival in soil and detection of co-transformed *Trichoderma harzianum* by nested PCR. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, p. 403-405, 2004.

RIBEIRO, J. R. **Análises estatísticas no SAEG**. Viçosa, MG: UFV, 2001. 301 p.

ROCHA, J. R. S.; OLIVEIRA, N. T. *In vitro* antagonistic potential of *Trichoderma* spp. against *Colletotrichum gloeosporioides* agent of anthracnose in the passion fruit (*Passiflora*). **Boletim Micológico**, Valparaíso, Chile, v. 13, p. 103-110, 1998.

SAMUELS, G. J.; CHAVERRI, P.; FARR, D. F.; MCCRAY, E. B. ***Trichoderma* online, systematic mycology and microbiology laboratory, ARS, USDA**. Disponível em: < <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm> >. Acesso em março de 2008.

TATAGIBA, J. S.; MAFFIA, L. A.; BARRETO, R. W.; ALFENAS, R. W.; ALFENAS, A. C.; SUTTON, J. C. Biological control of *Botrytis cinerea* in residues and flowers of rose (*Rosa hybrida*). **Phytoparasitica**, Bet Dagan, Israel, v. 26, p. 1-12, 1998.

THANGAVELU, R.; PALANISWAMI, A.; VELAZHAHAN, R. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing fusarium wilt of banana. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, NL, v. 103, p. 259-263, 2004.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia na clonagem de *Eucalyptus*. **Informativo Técnico SIF**, Viçosa, MG, v. 11, p. 10, 1998.