

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. PARA
CONTROLE DE *Phytophthora nicotianae***

Jaila Ferreira Melo

Bióloga

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. PARA
CONTROLE DE *Phytophthora nicotianae***

Jaila Ferreira Melo

Orientador: Profa. Dra. Katia Cristina Kupper

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo da Silva Martins

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

2015

Melo, Jaila Ferreira
M528a Avaliação de isolados de Trichoderma spp. para controle de
Phytophthora nicotianae / Jaila Ferreira Melo. -- Jaboticabal, 2015
vii, 31 p. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientador: Kátia Cristina Kuppper

Banca examinadora: Flavia Rodrigues Alves Patricio, Margarete
Camargo

Bibliografia

1. Bioensaio com plântulas de alfa. 2. Citrus spp. 3. Compostos
antimicrobianos. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:634.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

JAILA FERREIRA MELO – nasceu no dia 10 de agosto de 1985, na cidade de Frutal-MG. Inicia o curso de graduação em Licenciatura em Biologia no Centro Universitário do Triângulo Mineiro de Uberlândia, em 2005. Em 2013, inicia o curso de Mestrado no Programa de Microbiologia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV – Campus de Jaboticabal). Inicia sua carreira em 2015, na Universidade Estadual de Minas Gerais, como professora de práticas laboratoriais.

Epígrafe

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

Aos meus pais, Pedro e Iracema, e irmã
Suzana, pelo amor, e apoio incondicional.

Dedico.

A Profa. Dra. Katia Cristina Kupper,
exemplo de profissional, meus sinceros
agradecimentos. Alicerce dessa conquista.

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela força atribuída durante esse tempo em que me dediquei a esse curso, pelas tantas vezes em que pensei em desistir;

À minha família, meu pai Pedro, minha mãe Iracema, minha querida irmã Suzana, e todas as outras pessoas, que esteve do meu lado apoiando e ajudando em todos os momentos;

À equipe do Laboratório da Universidade do Estado de Minas Gerais – UEMG, Olivia, Fernanda, Jorcelino e Marilia, que me acolheram e ajudaram nos momentos de dificuldade. À professora Osania Emericiano Ferreira, ao professor Eduardo da Silva Martins, à professora Renata Campolim Camargoe todos os professores que ajudaram diretamente e indiretamente;

E por último, a todos os meus amigos como Mariana Klein e Tatiane Cunha que me acolheram quando mais precisava, aos companheiros de equipe do Hospital Frei Gabriel e do Centro de Hemodialise que me apoiaram e contribuíram de alguma forma para ajudar e ao meu namorado Daniel que me ajudou e teve paciência em todos os momentos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA TABELAS	v
LISTA SIGLAS	vi
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	09
2.1. Importância econômica da cultura da laranja.....	09
2.2. Doenças causadas pela <i>Phytophthora nicotianae</i> em laranjais	10
2.3. Efeito dos fungicidas sobre os microrganismos do solo.....	12
2.4. Importância do <i>Trichoderma</i> spp. presente no solo	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Microrganismos.....	14
3.2. Influência dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. no crescimento micelial de <i>Phytophthora nicotianae</i>	15
3.3. Avaliação da produção de compostos antimicrobianos pelos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	15
3.3.1.Microrganismos	15
3.3.2.Influência dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. no crescimento micelial de <i>Phytophthora nicotianae</i>	16
3.3.3 Produção de compostos antimicrobianos livres de células de <i>Trichoderma</i> spp.	17
3.3.4Análises Estatísticas.....	17
3.4Efeito de fontes de carbono na produção de compostos voláteis.....	18
3.5.Bioensaio com plântulas de alfafa	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1. Influência do cultivo pareado dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. no crescimento micelial de <i>Phytophthora nicotianae</i>	19
4.2. Produção de compostos antifúngicos voláteis	25
4.3. Produção de compostos antifúngicos termoestáveis	26
4.4 Produção de metabólitos livres de células	26

4.5	Efeito de fontes de carbono na produção de compostos voláteis	27
4.6	Bioensaio com plântulas de alfafa	29
5.	CONCLUSÕES	33
6.	REFERÊNCIAS	34

AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. PARA CONTROLE DE *Phytophthora nicotianae*

RESUMO - A cultura da laranja no Brasil é afetada por várias doenças, como a gomose, causada por *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (synonymous whit *P. parasítica* Dast.), cujo controle é comumente realizado com aplicações de fungicidas e medidas de exclusão. Porém, devido aos custos financeiros e problemas ambientais ocasionados pelo uso intenso destas aplicações, faz-se necessário a busca por métodos alternativos de controle. Este trabalho teve por objetivo avaliar 50 isolados de *Trichoderma* spp. como antagonista de *P. nicotianae*, sendo que os isolados foram avaliados, através da produção de compostos antimicrobianos por meio destes microrganismos, além da realização de um bioensaio com plântulas de alfafa. No cultivo pareado observou-se que todos os isolados inibiram o crescimento micelial do fitopatógeno. Na produção de compostos antimicrobianos, 41 isolados produziram compostos voláteis utilizando dextrose como fonte de carbono. No entanto, em estudos posteriores, foi verificado que a utilização de sacarose ou maltose como fontes de carbono, aumentou a produção destes compostos. Sete isolados de *Trichoderma* produziram compostos termoestáveis e 14 produziram compostos antimicrobianos livres de células do antagonico. No bioensaio com plântulas de alfafa foi observado que quatro isolados de *Trichoderma* inibiram a formação de esporângios e de micélios do fitopatógeno. Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que as avaliações *in vitro* com relação à produção de compostos antimicrobianos pelos isolados de *Trichoderma* e o bioensaio com plântulas de alfafa mostraram capacidade para selecionar isolados com potencial para o controle de *P. nicotianae*. Os isolados TB12, TB14, TB28 e TB 30 foram os que proporcionaram maior controle da doença.

Palavras-chave: Bioensaio com plântulas de alfafa, *Citrus* spp., Compostos antimicrobianos.

EVALUATION OF *Trichoderma* spp. ISOLATES AGAINST *Phytophthora nicotianae*

ABSTRACT - Orange crops in the Brazil are affected by various diseases such as gummosis caused by *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (synonymous whit *P. parasitica* Dast.), which is controlled by chemical fungicides. However, the high costs and environmental problems caused by the intensive use of these fungicides have led to the search for alternative methods of control. The objective of this study was to evaluate the antagonistic activity of 50 *Trichoderma* spp. isolates against *P. nicotianae* by the production of antimicrobial compounds and an alfalfa seedling bioassay. The paired culture showed that all isolates tested inhibited the mycelial growth of the pathogen. In the production of antimicrobial compounds, 41 isolates produced volatile compounds using dextrose as carbon source; however, further assays showed that the use of sucrose or maltose as carbon source increases the production of these compounds. Seven isolates of *Trichoderma* spp. produced thermostable compounds and 14 isolates produced cell-free culture antimicrobial compounds of the antagonist. In the alfalfa seedling bioassay, four isolates of *Trichoderma* spp. inhibited the formation of sporangia and mycelia growth. The evaluation *in vitro* concerning to the antimicrobial compound production by the *Trichoderma* spp. isolates and the alfalfa seedling bioassay both were able to select biocontrol agents to control of *P. nicotianae*. The *Trichoderma* spp. isolates, TB12, TB14, TB28, and TB30 presented the best disease control.

Keywords: Alfalfa seedling bioassay, *Citrus* spp., antimicrobial compounds.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Diâmetro médio da colônia de <i>Phytophthora nicotianae</i> , após cultivo pareado com diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp. ou, sob influência de compostos antimicrobianos produzidos pelos fungos.....	20
Tabela 2: Diâmetro médio da colônia de <i>Phytophthora nicotianae</i> , após cultivo pareado com diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp. ou, sob influência de compostos antimicrobianos produzidos pelos fungos.....	21
Tabela 3: Diâmetro médio da colônia de <i>Phytophthora nicotianae</i> , após cultivo pareado com diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp. ou, sob influência de compostos antimicrobianos produzidos pelos fungos.....	22
Tabela 4: Diâmetro médio da colônia de <i>Phytophthora nicotianae</i> , após cultivo pareado com diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp. ou, sob influência de compostos antimicrobianos produzidos pelos fungos.....	23
Tabela 5: Diâmetro médio da colônia de <i>Phytophthora nicotianae</i> , após cultivo pareado com diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp. ou, sob influência de compostos antimicrobianos produzidos pelos fungos.....	24
Tabela 6: Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de compostos voláteis por <i>Trichoderma</i> spp. e sua ação no desenvolvimento da colônia de <i>Phytophthoranicotianae</i>	28
Tabela 7: Diâmetro médio da colônia de <i>Phytophthora nicotianae</i> , sob influência de compostos voláteis produzidos por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. cultivados em meio BDA suplementado com diferentes fontes de açúcares.....	29
Tabela 8: Seleção de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. quanto ao antagonismo a <i>Phytophthora nicotianae</i> , pelo método de infestação de plântulas de alfafa.....	30
Tabela 9: Seleção de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. quanto ao antagonismo a <i>Phytophthora nicotianae</i> , pelo método de infestação de plântulas de alfafa.....	31

LISTA DE SIGLAS

BDA	Batata-dextrose-ágar
BD	Batata-dextrose
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CA	Cenoura-ágar
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations

1. INTRODUÇÃO

Um dos produtos de exportação de destaque no Brasil é a laranja. No Estado de São Paulo, para a safra 2013/14, a área ocupada com pomares de citros foi estimada em 501,8 mil hectares, sendo a área em produção de 464,4 mil hectares. Na respectiva safra, esse Estado produziu aproximadamente 270 milhões de caixas de 40,8 quilos de laranja (CONAB, 2014). Além disso, o Brasil é o maior exportador de suco concentrado congelado de laranja, cujo valor das exportações, juntamente com as de outros derivados, tem gerado cerca de 1,5 bilhão de dólares anuais (FAO 2014).

Dentre os vários problemas fitossanitários que ocorrem na cultura dos citros, a gomose de *Phytophthora* acarreta redução na produtividade e, conseqüentemente, diminuição no rendimento econômico da cultura. Essa doença surge em todas as regiões produtoras de citros do mundo e é causada por *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (synonymous whit *P. parasítica* Dast.) (GRAHAM; FEICHTENBERGER, 2015)

No Brasil, *P. nicotianae* é responsável pelos maiores danos em viveiros, apesar da *P. citrophthora* (Sm. & Sm,) Leonian e outras espécies de *Phytophthora* já terem sido descritas como causadoras da doença. O principal dano causado é a podridão da raiz e do caule, podendo comprometer o bom desenvolvimento das mudas cítricas no campo ou, até mesmo, levá-las à morte quando a lesão atinge toda a circunferência do tronco (FEICHTENBERGER, 2001).

Phytophthora nicotianae é um oomiceto que produz hifas hialinas, não septadas e esporângios hialinos, se reproduzem tanto na forma sexuada como assexuada; produz estruturas de resistência como oósporos, zoósporos e clamidósporos. A germinação dos esporângios pode ocorrer diretamente pela formação de tubos germinativos, em condições de umidade ou, indiretamente via zoósporos, em condições de água livre ou, estimulada por queda na temperatura (GRAHAM; MENGE, 1999). Em geral, o controle da doença é de forma preventiva por meio do uso de mudas ou porta-enxertos sadios, ou pela utilização de fungicidas como fosetyl-Al e metalaxil (MATHERON; PORCHAS, 2000). Sendo que o fungicida metalaxil não

se encontra no mercado brasileiro, dificultando assim a prevenção de doenças fungicas em citrus.

Entretanto, os custos financeiros e problemas ambientais com aplicações destes produtos têm levado à busca por métodos alternativos de controle e, dentre esses, o controle biológico tem sido estudado, por ser compatível aos agroecossistemas, muitas vezes poupador de capital e, sobretudo, mantém solidamente o caráter de sustentabilidade (CORRÊA et al., 2011).

Dentre os agentes de controle biológico, espécies de fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* spp. têm sido amplamente estudadas, como antagonistas de vários patógenos de solo, como é o caso de *Phytophthora* spp. Tais microrganismos, além de biocontroladores, são, também, agentes promotores de crescimento de plantas e, podem agir como indutores de resistência de plantas a patógenos (SABA et al., 2012; SAKSIRIRAT et al., 2009).

Bioprodutos a base de *Trichoderma* spp. podem ser utilizados tanto para o tratamento de substratos e de sementes, como em pulverizações na parte aérea da planta (HARMAN et al., 2004).

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivos: (i) avaliar a produção de compostos antimicrobianos por diferentes isolados de *Trichoderma* spp. e (ii) realizar um bioensaio com plântulas de alfafa de maneira a selecionar os isolados de *Trichoderma* spp. mais promissores para o biocontrole.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância econômica da cultura da laranja

A cultura da laranja foi introduzida no Brasil na época da colonização, logo após do descobrimento do país, sendo originária da Ásia. As sementes de laranja doce foram trazidas pelos portugueses e introduzidas na região norte e sudeste, devido ao clima e solo favorável dessas regiões, as quais proporcionavam um bom desenvolvimento da cultura e frutos de excelente qualidade. No entanto, somente a partir dos anos 30 do século passado, a citricultura começou a ser implantada comercialmente nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia, tendo apresentado maiores índices de crescimento nos estados do Sudeste e Sul do Brasil (EMBRAPA, 2007).

Atualmente o país se destaca como o maior produtor de laranja e a região Sudeste se destaca, devido ao clima e o solo propício para produção. De acordo com os dados da Embrapa (2007) no que diz respeito a temperaturas ideais, tem-se como exigência mínima da cultura 10°C, temperaturas ótimas de 20 a 30°C e máxima de 35°C. A cultura apresenta ainda certas exigências com relação à textura dos solos, preferindo os solos areno-argilosos, embora possa se adaptar aos solos arenosos, como também aos argilosos, graças ao uso de diferentes porta-enxertos.

Além disso, outras vantagens que tornam a região como importante produtora da laranja estão a disponibilidade de chuva na região, pois de acordo com a CONAB (2013), a taxa de rendimento da fruta está intimamente ligada ao alto índice pluviométrico ocorrido na época de maturação dos frutos. A infraestrutura local é outro grande fator importante, pois a região possui várias fabricas, além de várias rodovias importantes para o escoamento da produção da fruta.

O estado de São Paulo é responsável por grande parte dessa produção. Para a safra de laranja 2013/14 o volume da fruta destinada à moagem industrial foi de 215,3 milhões de caixas de 40,8 kg, a produção de laranja para comercialização *in natura* foi de 53,3 milhões de caixas de 40,8 kg, totalizando produção de 268,6 milhões de

caixas de 40,8 kg, para o estado de São Paulo (CONAB, 2014).

Devido às características regionais, que garantem grande produção, a cultura de laranja é um importante produto do agronegócio brasileiro gerando empregos e exportações. E para manter a boa produtividade, está sendo utilizada a aplicação de recursos naturais, com enfoque na preservação ambiental e sustentabilidade da produção agrícola, através do acompanhamento sistemático da produção pelo monitoramento frequente e pelo uso das técnicas do manejo integrado de pragas (MIP); reduzindo assim o consumo de insumos poluentes e garantindo a diversidade e o equilíbrio do agro-ecossistema, além de garantir condições adequadas e seguras para o trabalhador. (EMBRAPA, 2003).

2.2. Doenças causadas por *Phytophthora nicotianae*

As doenças causadas por *P. nicotianae* estão presentes em todas as regiões brasileiras que cultivam laranja. Elas se manifestam por meio de lesões no caule, podridão das raízes e radículas, até podridão das sementes e problemas de germinação.

A região Sudeste, que é a maior região produtora de laranja do país, também apresenta condições favoráveis à infecção e ao desenvolvimento da doença, tais como altas temperaturas, elevada umidade relativa do ar e umidade do solo (FAWCETT; BITANCOURT, 1940; FEICHTENBERGER, 2001).

Este patógeno se reproduz tanto na forma sexuada como assexuada, produzindo estruturas de resistência, sendo que microrganismos desse potencial mantem se viável no solo por longos períodos na forma de micélios ou esporângios em caule e em raízes infectadas, zoósporos encistados, clamidósporos e oósporos que em condições favoráveis, germinam, produzindo o tubo germinativo que se desenvolvem em micélios (AGRIOS, 2005; FEICHTENBERGER et al., 2005)

Os zoósporos são esporos assexuais, biflagelados e são capazes de se locomoverem em direção aos exsudados das raízes dos hospedeiros, através da umidade ou são disseminados pela água. Em situações de ambiente desfavoráveis,

os zoósporos podem encistar e permanecer como esporos de resistência por longos períodos de tempo no solo (GRAHAM; TIMMER, 2003).

Na fase sexual da *Phytophthora* há formação de oósporos, caso esteja isolado, através de dois grupos de compatibilidade (A1 e A2) que ao cruzarem, possibilitam o surgimento de recombinantes com características diferentes de adaptabilidade, além disso, os oósporos são esporos que possuem parede celular espessa e resistente a ambientes desfavoráveis à sua proliferação, podendo sobreviver no solo na ausência da planta hospedeira (REIS, 2010).

Nos pomares, os propágulos do patógeno do solo podem também ser levados para as folhas, brotos novos e frutos da parte baixa da copa das plantas, causando infecções secundárias (GRAHAM; TIMMER, 2003; GRAHAM et al., 1998).

A gomose é a principal doença causada por *Phytophthora nicotianae*. Essa doença ocorre em viveiros e pomares e sua intensidade depende de fatores fisiológicos da planta. De acordo com a Embrapa (2003), os sintomas podem variar dependendo da espécie ou cultivar de citros, da idade da planta, dos órgãos onde ocorre o ataque ou das condições ambientais prevalentes.

No campo, os principais sintomas de Gomose de *Phytophthora* são escurecimento e morte da casca e do lenho, exsudação de goma, seca e fendilhamento da casca, podridão do pé e das raízes, amarelecimento e queda de folhas, baixo desenvolvimento, murcha, queda de folhas e morte da planta (SIVIERO et al., 2002). Em viveiros, o fungo pode atacar os tecidos da região do colo das plantinhas, com lesões deprimidas de cor escura que aumentam de tamanho e acabam provocando a morte das mudas. O fungo pode ainda infectar sementes e causar podridões antes mesmo da germinação (EMBRAPA, 2003).

A podridão de radículas é outro grande problema causado por *P. nicotianae*, sendo comum em viveiros, e em pomares novos e adultos. Segundo Siviero et al. (2002), os sintomas típicos da doença são podridão de radículas e de raízes finas, exsudação de goma, escurecimento e morte de raízes nutritivas, redução de radículas de plantas, amarelecimento, seca e morte de mudas. Sua contaminação pode ocorrer pela penetração do patógeno em ferimentos na planta ou, pelo plantio de mudas contaminadas. O ataque às plantas adultas raramente leva-as à morte,

podendo comprometer a produtividade das mesmas somente quando há elevadas concentrações do propágulo do patógeno no solo (FEICHTENBERGER, 2001).

O estiolamento ou damping-off é a principal doença de sementeiras causada por *P. nicotianae*. A maioria das sementes apodrece e não germina e as sementes que conseguem germinar formam plantinhas com folhas amareladas, murchas, seguindo-se, de um apodrecimento na região do colo, próximo à linha do solo, provocando seu tombamento e morte (EMBRAPA, 2003).

2.3.Efeito dos fungicidas sobre os microrganismos do solo

Para o controle de doenças causadas por *P. nicotianae* é frequente a utilização de fungicidas, porém, há uma carência de alternativas para solucionar o problema, sendo necessário o uso constante dos mesmos produtos.

Na cultura da laranja, o fungicida utilizado no controle da gomose, é o Fosetyl-Al, sendo que as medidas e as formas de aplicações dependem de cada patologia, podendo esses fungicidas serem aplicados diretamente na planta, no solo ou através de tratamentos de sementes. Esses fungicidas foram descobertos na década de 70, sendo que o Fosetyl-Al foi o primeiro fungicida comercializado. Tal produto é translocado pelo floema ou xilema induzindo a planta a produzir substâncias protetoras; já o Metalaxyl é absorvido pelas folhas, raízes e haste, translocado apoplasticamente e possui ação curativa e protetora na planta, no entanto esse fungicida não é mais registrado para utilização no Brasil. (EMBRAPA,2003).

Esses produtos não apresentam erradicação sobre o patógeno presente no solo, apenas uma ação inibitória. Uma vez que seu uso é cessado, rapidamente, a *Phytophthora* spp. pode recuperar sua densidade populacional no campo e causar novamente prejuízos à cultura (FEICHTENBERGER, 2001).

Os custos elevados e o uso indiscriminado de fungicidas na agricultura podem causar inúmeros efeitos deletérios ao meio ambiente. Além disso, o uso constante do fungicida Fosetyl-Al, uma vez que o produto Metalaxyl não é mais registrado no Brasil, faz com que esse fitopatógeno adquira linhagens resistentes, comprometendo o controle da doença (MORANDI; BETTIOL, 2009).

Outros aspectos negativos do uso constante de fungicidas, são com relação a outros microrganismos presentes naturalmente no solo e que desempenham papel crucial na ciclagem de nutrientes e na fertilidade dos solos ou como antagonistas (FIGUEIREDO et al., 2013) e, que podem ser atingidos.

2.4.Importância da presença do *Trichoderma* spp. no solo

Atualmente há uma grande discussão em relação a novas alternativas de controle de doenças, onde se utiliza práticas mais baratas e que, sobretudo, não interfiram no meio ambiente. Neste contexto, o controle biológico por meio da utilização de microrganismos antagônicos ao patógeno tem merecido especial atenção, e em várias interações tem-se mostrado eficiente (KUPPER et al., 2003, 2009 e 2012; BETTIOL et al., 2009).

Os microrganismos componentes naturais do solo atuam de diversas maneiras, como fertilizantes, sintetizadores de nutrientes sobre patógenos e outros. Esses microrganismos são essenciais ao solo, pois são responsáveis pela sua manutenção e prevenção de doenças. Sendo que o *Trichoderma* spp. um microrganismo essencial ao solo e um dos agentes de controle biológico de doenças de plantas mais estudados, sendo utilizado comercialmente no Brasil e em outros países da América Latina (BETTIOL et al., 2008).

Do ponto de vista etiológico, as espécies de *Trichoderma* são fungos filamentosos, habitantes naturais do solo e da rizosfera, podendo ser facilmente encontrados em diversos tipos de solos no mundo (HARAN et al., 1996).

De acordo com Pomella; Ribeiro, (2009) espécies de *Trichoderma* são fungos de vida livre, ubíquos e altamente interativos na raiz do solo, bem como no interior de plantas, são considerados saprófitos e têm despertado interesse científico como agentes de controle biológico e produtores de enzimas para uso industrial.

Esses fungos, além de controlarem doenças causadas por outros microrganismos, atuam promovendo o crescimento de plantas, pelo aumento na disponibilidade de nutrientes e produção de hormônios de crescimento (LUCON, 2008) e, como indutores de resistência de plantas (HARMAN et al., 2004). Além disso,

apresentam um sistema enzimático interessante, produzindo enzimas como quitinase, celulase, protease e glucanase. Essas enzimas degradam os polissacarídeos quitina e β -glucanas, que são responsáveis pela rigidez das paredes das células dos fungos, destruindo sua integridade (WOOD; McCRAE, 1977; HARAN et al., 1996; ZALDÍVAR et al., 2001; HOWELL, 2003). De acordo com Howell (2003), *Trichoderma* spp. também produzem uma vasta gama de substâncias antibióticas que inibem outros fungos, podem apresentar mecanismos de ação como por competição e parasitismo.

Devido à comprovada eficácia do fungo, mais de 50 produtos à base de *Trichoderma* spp., são produzidos e vendidos no mercado mundial, sendo recomendados para diversas culturas. Esses produtos são eficientes na redução da incidência de tombamento de plantas, diminuindo a severidade de doenças ocasionadas por patógenos habitantes de solo, como *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium* e *Sclerotinia*. Podem também ser utilizados para o tratamento de substratos e de sementes e pulverização na parte aérea da planta (POMELLA; RIBEIRO, 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microorganismos

Foram avaliados 25 isolados de *Trichoderma* spp. provenientes de solo onde se cultivava a cultura da bananeira em diferentes municípios dos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro (TB01, TB02, TB03, TB04, TB06, TB07, TB08, TB09, TB10, TB11, TB12, TB13, TB14, TB16, TB17, TB18, TB21, TB22, TB25, TB28, TB29, TB30, TB31, TB32, TB34); 25 isolados de *Trichoderma* spp. originários de solo de cultivo da soja de diferentes regiões do Estado de Goiás (CE200, CE300, F1A10O11, F1A2T1001, F1A2T1014, F1A2T2, F1A9T2002, F1A9T2006, F2A3T1024, F2A3T1024, F2A3T18030, F3A3T1010, F3A5T1015, F3A5T1025, F4A5T1, F4A5T1004, F4A5T1005, F4A1T1008, F4A1T1009, F4A4T1022, T1A1029, T1A2F1017, T2T1A2, T2A2F1018, T2A2F1021) e, um isolado de *P.nicotianae* (IAC-01/95).

3.2. Influência dos isolados de *Trichoderma spp.* no crescimento micelial de *Phytophthora nicotianae*

O efeito antagônico dos isolados de *Trichoderma spp.* no crescimento micelial do fitopatógeno, foi determinado pela técnica de cultivo pareado em placa de Petri, contendo Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (DENNIS; WEBSTER, 1971). Discos de micélio com 05 mm de diâmetro, retirados de colônias ativas de *P. nicotianae* (7 dias de idade) cultivadas em meio Cenoura-Ágar (CA), foram transferidos para placas de Petri contendo BDA à 3 cm de distância de discos de mesmo tamanho de cada isolado de *Trichoderma spp.* (7 dias de idade). As testemunhas foram representadas pelo patógeno sem a presença dos possíveis antagonistas. A incubação das culturas se deu em estufa para B.O.D a 27°C, sob fotoperíodo de 12 h. A avaliação foi realizada após 7 dias de incubação, por meio de medições do crescimento micelial das colônias de *P. nicotianae*, em dois sentidos perpendiculares, sendo que foi observado que em todas as colônias, o *Trichoderma spp.* apresentou crescimento sobre a *Phytophthora nicotianae*. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3. Avaliação da produção de compostos antimicrobianos pelos isolados de *Trichoderma spp.*

3.3.1. Produção de compostos voláteis

Para verificar a produção de compostos voláteis pelos isolados de *Trichoderma spp.*, os ensaios foram realizados utilizando placas de poliestireno, divididas ao meio, as quais impedem que exsudatos não voláteis produzidos pelo fungo tenham contato com *P. nicotianae* através do meio de cultura. Em um dos lados da placa com o meio de BDA, foi adicionado um disco (5 mm) do isolado de *Trichoderma* e do outro lado da placa, contendo o meio de CA, foi adicionado um disco (5 mm) do patógeno. As

placas foram vedadas com parafilme e as culturas foram incubadas em estufa para B.O.D a 27°C e fotoperíodo de 12h. A avaliação do crescimento micelial do patógeno foi realizada através da média entre duas medições diametralmente opostas, após sete dias de incubação.

3.3.2. Produção de compostos antimicrobianos termoestáveis pelos isolados de *Trichoderma spp.*

A avaliação da termoestabilidade dos compostos antifúngicos produzidos pelos isolados de *Trichoderma spp.*, seguiu a metodologia descrita por Frighetto e Melo (1995).

Três discos de meio com crescimento micelial de *Trichoderma spp.* (7 dias de idade) foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de batata-dextrose. Em seguida, as culturas foram incubadas em condições ambientes de laboratório, sob agitação a 150 rpm, por um período de 120 horas. Transcorrido este período, o caldo fermentado obtido foi filtrado em papel de filtro (Whatman nº 4) e, uma alíquota de 10 mL foi transferida para outros frascos erlenmeyer (250 mL) contendo 90 mL de BDA. Os meios foram autoclavados por 20 minutos, a 120°C e 1 atm, de pressão e vertidos para placas de Petri. Após a solidificação, um disco de 5 mm de diâmetro, obtido de colônias ativas de *P. nicotianae* foi transferido para o centro de cada placa de Petri contendo meio e o metabólito produzido pelo antagonista. As testemunhas foram representadas pelo fitopatógeno, sem a presença dos metabólitos do fungo. A incubação das culturas se deu em estufa para B.O.D a 27°C e fotoperíodo de 12 h. A avaliação foi realizada através de medições dos diâmetros da colônia do fungo, em dois sentidos perpendiculares, após sete dias de incubação.

3.3.3. Produção de compostos antimicrobianos livres de células de *Trichoderma* spp.

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram avaliados quanto ao efeito de seus extratos, livres de células, sobre o crescimento micelial de *P. nicotianae*.

Para cada isolado de *Trichoderma* spp., foi utilizado um erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de batata dextrose (BD). Três discos de meio com crescimento micelial de *Trichoderma* spp. foram transferidos para os frascos e, as culturas foram incubadas em condições ambiente de laboratório, sob agitação a 150 rpm, por um período de 120 horas. Do caldo fermentado foi obtido uma alíquota de 15 mL que foi retirada de cada frasco, correspondente a cada isolado de *Trichoderma*, e submetida à centrifugação, após foi filtrado em papel de filtro (Whatman nº 4) e, em seguida, submetido à filtração em membrana millipore (0,45 µm), a fim de se conseguir um filtrado livre de células de *Trichoderma* (FRIGHETTO; MELO, 1995).

Amostras de 10 mL de cada filtrado foram transferidas para erlenmeyers com capacidade para 250 mL, contendo 90 mL de BDA fundente (aproximadamente 70°C). Os meios, correspondentes a cada tratamento, foram vertidos para placas de Petri. Depois de solidificado o meio, foi transferido um disco de 05 mm de diâmetro, contendo o fitopatógeno (7 dias de idade), para o centro das placas. As testemunhas consistiram de placas de Petri contendo BDA sem metabólitos. As culturas foram incubadas a 28°C durante sete dias e, ao final deste período, foi determinado o diâmetro médio da colônia de *Phytophthora*, em dois sentidos perpendiculares.

3.3.4. Análises estatísticas

Para a produção de compostos antimicrobianos foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, a comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

3.4. Efeito das fontes de carbono na produção de compostos voláteis

Em função dos resultados obtidos nos ensaios anteriores, os isolados de *Trichoderma* (12 no total) que apresentaram maior atividade inibitória a *P. nicotianae*, foram submetidos novamente à produção de compostos voláteis com diferentes fontes de carbono no meio de cultura BDA. O meio foi suplementado com 20g/L de glicose, sacarose ou maltose. A metodologia de produção de compostos voláteis seguiu a mesma descrita no item 3.3.1, utilizando placas de poliestireno bipartidas. O controle consistiu do cultivo do fitopatógeno na ausência de *Trichoderma* spp. As placas foram vedadas com parafilme e as culturas incubadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 12 horas. O crescimento micelial foi avaliado pela medição da colônia do patógeno em dois sentidos perpendiculares, após sete dias de incubação. Foi utilizado um delineamento fatorial com 5 repetições e os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), análise fatorial de dados e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.5. Bioensaio com plântulas de alfafa

Os doze melhores isolados de *Trichoderma* spp. selecionados pelos testes *in vitro*, foram avaliados *in vivo* seguindo a metodologia de Leoni e Ghini (2002), com o objetivo de identificar os isolados mais promissores para o biocontrole de *P. nicotianae*.

Neste ensaio, sementes de alfafa (*Medicago sativa*) previamente desinfetadas com hipoclorito de sódio (2% v/v) foram colocadas para germinar. Após sete dias, as plântulas foram transferidas para bandejas de polietileno contendo 20 poços com capacidade para 5 mL cada. Em cada poço foram adicionados: 2 mL de ADE (Água Destilada e Esterilizada), um disco de 5 mm de diâmetro de meio CA contendo *P. nicotianae* (7 dias de idade) e um disco de 5 mm de BDA contendo o isolado antagonista. Os tratamentos controle foram constituídos por plântulas de alfafa em compartimentos contendo apenas ADE. As bandejas foram mantidas à temperatura

ambiente, com fotoperíodo de 12 h, e após quatro dias, um fragmento de 20 mm da extremidade inferior da radícula foi cortado, corado em azul de metileno e levado para avaliação em microscópio óptico de luz.

Neste bioensaio, para determinar o potencial de um ou mais isolados de *Trichoderma* spp. como antagonista, foram utilizadas duas escalas de notas, que classificaram os níveis de infecção de *P. nicotianae* nas plântulas de alfafa. Para a presença de esporângios (Z) as notas foram 0 = sem esporângios; 1 = entre 1 e 5; 2 = entre 6 e 10; 3 = entre 11 e 50 e 4 = mais de 51 esporângios. Para a presença de micélio (M) as notas foram 0 = sem micélio; 1 = pouco; 2 = médio e 3 = muito micélio. O ensaio foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e análise fatorial de dados e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Influências do cultivo pareado dos isolados de *Trichoderma* spp. no crescimento micelial de *Phytophthora nicotianae*

Os resultados mostraram que, do total de 50 isolados de *Trichoderma* spp. testados, todos foram capazes de inibir, significativamente, o crescimento de *P. nicotianae*, com valores de inibições que variaram de 29 a 83% no tamanho da colônia do fitopatógeno (Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5). Sendo que todos os isolados de *Trichoderma* spp. cresceram sobre o fitopatógeno.

TABELA 1- Diâmetro médio da colônia de *Phytophthora nicotianae*, após cultivo pareado com diferentes isolados de *Trichoderma* spp. ou, sob influência de compostos antimicrobianos produzidos pelos fungos. Ensaio 1

Isolados	Compostos antimicrobianos							
	Pareamento		Voláteis		Termoestáveis		Livres de células	
	Diâmetro da colônia (cm)	% inibição	Diâmetro da colônia (cm)	% inibição	Diâmetro da colônia (cm)	% inibição	Diâmetro da colônia (cm)	% inibição
Testemunha	5,65 a(1)	-	4,93 a	-	3,95 a	-	3,90 a	-
TB01	3,58 bc	36%	4,90 a	0,6%	3,69 ab	6%	3,67 a	6%
TB02	3,15 bc	44%	4,55 ab	8%	2,72 ab	31%	2,40 c	38%
TB03	3,30 bc	41%	4,94 a	-0,2%	3,92 ab	0,8%	3,93 a	-0,8%
TB04	3,85 bc	32%	4,58 ab	7%	2,86 ab	27%	3,06 b	21%
TB06	3,64 bc	36%	4,55 ab	8%	2,05 b	48%	2,65 bc	32%
TB07	3,94 b	36%	4,62 ab	6%	3,77 ab	4%	3,66 a	6%
TB08	3,85 bc	32%	4,76 ab	3%	2,64 ab	33%	2,14 c	45%
TB09	3,07 c	46%	4,33 ab	12%	2,30 ab	42%	2,60 bc	33%
TB10	3,38 bc	40%	4,20 b	15%	3,15 ab	20%	2,40 c	38%
TB11	3,49 bc	38%	4,73 ab	4%	3,30 ab	16%	3,98 a	-2%
DMS	0,80341	-	0,63881	-	1,88187	-	0,59528	-
CV %	10,08	-	6,41	-	28,10	-	8,88	-

⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

TABELA 2- Diâmetro médio da colônia de *Phytophthora nicotianae*, após cultivo pareado com diferentes isolados de *Trichoderma* spp. ou, sob influência de compostos antimicrobianos produzidos pelos fungos. Ensaio 2

Isolados	Compostos antimicrobianos							
	Pareamento		Voláteis		Termoestáveis		Livres de células	
	Diâmetro da colônia (cm)	% inibição	Diâmetro da colônia (cm)	% inibição	Diâmetro da colônia (cm)	% inibição	Diâmetro da colônia (cm)	% inibição
Testemunha	6,96 a ⁽¹⁾	-	7,15 a	-	3,92 ab	-	3,79 a	-
TB18	3,69 b	47%	3,12 b	56%	3,75abc	4%	3,72 a	2%
TB21	2,88 bc	59%	2,98 b	58%	2,08 e	47%	1,47 c	61%
TB22	1,73 c	75%	3,19 b	55%	3,47 cd	11%	2,79 b	26%
TB25	2,54 bc	63%	2,96 b	59%	3,94 ab	-0,5%	3,62 a	4%
TB28	2,38 bc	66%	2,52 b	65%	3,26 d	17%	1,91 c	50%
TB32	3,03 bc	56%	3,29 b	54%	4,12 a	-5%	4,03 a	-6,3%
F1A2T1001	2,05 bc	70%	3,86 b	46%	3,52 cd	10%	3,64 a	4%
F1A2T1014	2,00 bc	71%	2,84 b	60%	3,60 bcd	8%	3,92 a	-3,4%
CE200	1,20 c	83%	3,00 b	58%	3,98 ab	-1,5%	3,74 a	1%
CE300	1,40 c	80%	3,06 b	57%	4,00 a	-2%	3,71 a	2%
DMS	1,88	-	1,61	-	0,39	-	0,57	-
CV %	32,32	-	21,86	-	5,15	-	8,08	-

(1) Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

TABELA 3- Diâmetro médio da colônia de *Phytophthora nicotianae*, após cultivo pareado com diferentes isolados de *Trichoderma* spp. ou, sob influência de compostos antimicrobianos produzidos pelos fungos. Ensaio 3

Isolados	Compostos antimicrobianos							
	Pareamento		Voláteis		Termoestáveis		Livres de células	
	Diâmetro da colônia (cm)	% inibição	Diâmetro da colônia (cm)	% inibição	Diâmetro da colônia (cm)	% inibição	Diâmetro da colônia (cm)	% inibição
Testemunha	6,85 a ⁽¹⁾	-	7,25 a	-	4,29 abc	-	4,20 bc	-
TB29	2,25 bc	67%	2,88 c	60%	3,57 abc	17%	4,06 bc	3%
TB30	2,41 bc	65%	2,97 c	59%	3,94 abc	8%	1,90 e	55%
F1A2T2013	3,64 b	47%	4,62 b	36%	3,80 abc	11%	5,06 ab	-20,5%
F1A9T2006	2,05 c	70%	3,11 c	57%	3,15 bc	27%	2,03 e	52%
F2A3T1830	3,67 b	46%	3,20 c	56%	4,77 a	-11,1%	4,15 bc	1%
F2T1A1029	3,20 bc	53%	2,50 c	65%	4,70 a	-10%	2,90 de	31%
F3A5T1015	2,83 bc	59%	3,30 bc	54%	4,15 abc	3%	3,70 cd	12%
F3A5T1025	2,34 bc	66%	2,90 c	60%	3,78 abc	12%	4,70 abc	-12%
F4A5T1003	3,30 bc	52%	3,49 bc	52%	2,82 c	34%	5,50 a	-31%
F4A4T1022	3,25 bc	52%	2,80 c	61%	4,40 ab	-2,6%	4,20 bc	0%
DMS	1,58	-	1,35	-	1,52	-	1,08	-
CV %	22,75	-	17,80	-	18,06	-	13,13	-

(1) Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

TABELA 4- Diâmetro médio da colônia de *Phytophthora nicotianae*, após cultivo pareado com diferentes isolados de *Trichoderma* spp. ou, sob influência de compostos antimicrobianos produzidos pelos fungos. Ensaio 4

Isolados	Compostos antimicrobianos							
	Pareamento		Voláteis		Termoestáveis		Livres de células	
	Diâmetro da colônia (cm)	% inibição	Diâmetro da colônia (cm)	% inibição	Diâmetro da colônia (cm)	% inibição	Diâmetro da colônia (cm)	% inibição
Testemunhas	6,00 a ⁽¹⁾	-	7,08 a	-	3,95 bc	-	3,69 abc	-
TB12	4,10 b	32%	3,15 bc	55%	3,92 cd	0,8%	2,13 d	42%
TB13	2,45 d	59%	3,33 bc	53%	3,45 de	13%	2,45 cd	34%
TB14	2,70 d	55%	3,75 b	47%	4,05 bc	-2,5%	1,80 d	51%
TB16	3,00 cd	50%	2,72 c	62%	3,97 bc	-0,5%	4,12 a	-12%
F3A3T1010	3,90 bc	35%	3,27 bc	54%	4,43 ab	-12%	4,05 ab	-10%
F4A1T1009	2,95 cd	51%	3,67 bc	48%	4,79 a	-21%	4,80 a	-30%
F4A5T1005	2,75 d	54%	3,18 bc	55%	4,06 bc	-3%	4,86 a	-32%
T1A1029	3,85 bc	36%	3,28 bc	54%	4,05 bc	-2,5%	4,69 a	-27%
T2A2F1021	3,25 bcd	46%	3,13 bc	56%	3,22 e	18%	4,58 a	-24%
TK2002	3,30 bcd	45%	3,99 b	44%	3,84 cd	3%	2,69 bcd	27%
DMS	0,96	-	0,97	-	0,48	-	1,42	-
CV %	12,95	-	12,33	-	5,66	-	18,28	-

(1) Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

TABELA 5- Diâmetro médio da colônia de *Phytophthora nicotianae*, após cultivo pareado com diferentes isolados de *Trichoderma* spp. ou, sob influência de compostos antimicrobianos produzidos pelos fungos. Ensaio 5

Isolados	Compostos antimicrobianos							
	Pareamento		Voláteis		Termoestáveis		Livres de células	
	Diâmetro da colônia (cm)	% inibição	Diâmetro da colônia (cm)	% inibição	Diâmetro da colônia (cm)	% inibição	Diâmetro da colônia (cm)	% inibição
Testemunhas	4,48 a ⁽¹⁾	-	6,00 a	-	3,78 abc	-	4,09 a	-
TB17	2,53 def	44%	4,75 bcd	21%	3,71 abc	2%	3,87 a	5%
TB31	2,73 cde	39%	5,00 bc	17%	3,65 bc	3%	2,92 a	29%
TB34	2,97 cd	34%	4,85 bcd	19%	4,01 abc	-6%	4,01 a	2%
F1A1011	2,18 efg	51%	4,30 cde	28%	3,48 c	8%	3,42 a	16%
F1A9T2002	3,16 bc	29%	4,90 bc	18%	4,20 a	-11%	3,30 a	19%
F2A3T1024	3,16 bc	29%	5,15 b	14%	4,25 a	-12%	3,85 a	6%
F4A1T1008	2,75 cd	39%	4,80 bcd	20%	4,23 a	-12%	4,14 a	-1,2%
T1A2F1017	1,95 g	56%	4,15 de	31%	4,15 ab	-10%	4,10 a	-0, 2%
T2A2F1018	2,68 cde	40%	3,65 ef	39%	3,91 abc	-3%	3,42 a	16%
T2T1A2016	2,05 fg	54%	3,20 f	47%	3,91 abc	-3%	3,16 a	23%
DMS	0,55	-	0,71	-	0,54	-	1,66	-
CV %	9,25	-	7,23	-	6,49	-	21,17	-

(1) Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Dias (2011) testando doze isolados de *Trichoderma* spp. pareados com *Sclerotium rolfsii* e *Rhizoctonia solani*, observou que nove isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram um crescimento micelial superior a 70% em relação a *Sclerotium rolfsii* e comparando com *Rhizoctonia solani*, observou que nove desses doze isolados demonstraram domínio acentuado sobre o patógeno, sendo que um dos isolados de *Trichoderma* spp. ocupou 100% da distância entre as colônias. Através desses resultados, pode se observar a ocorrência de mecanismos de ação do fungo contra o

fitopatígeno, assim como Corrêa et al. (2011) observaram uma redução do crescimento da colônia de *P. parasítica* na presença de *Trichoderma* spp., em cultivo pareado, atribuindo à produção de compostos tóxicos e/ou ao esgotamento de nutrientes do meio de cultura.

Relacionando com os resultados obtidos com Corrêa et al., (2011), os resultados *in vitro* relatados pelos autores mostraram que *T. pseudokoningii* ACB-37 e *T. virens* ACB-32 foram os que mais inibiram o desenvolvimento de *P. parasítica* por meio do cultivo pareado e pela produção de metabólitos tóxicos ao patógeno, demonstrando que, possivelmente, os mecanismos responsáveis pelo controle da doença nas plantas de limão cravo se deu, provavelmente, por competição e antibiose, uma vez que os mesmos não apresentaram atividade celulolítica. Com relação a *T. aureoviride* ACB-33, o mesmo inibiu o crescimento micelial de *P. parasítica*, quando em cultivo pareado e produziu enzimas capazes de degradar a celulose presente no meio de cultura, indicando a ocorrência dos mecanismos de ação por competição, antibiose e micoparasitismo no biocontrole da doença *in vivo*.

4.2 Produções de compostos antifúngicos voláteis

Os resultados obtidos mostraram que dos 50 isolados testados, 41 foram capazes de produzir compostos voláteis que inibiram, significativamente, o desenvolvimento da *P. nicotianae*. No primeiro ensaio, o melhor resultado foi obtido com o isolado TB10, que apresentou 15% de inibição (Tabela 1). Nos seguintes ensaios todos os isolados proporcionaram maior controle sobre o fitopatígeno, com uma variação de 15% a 65% (Tabelas 2, 3, 4 e 5).

Isaias et al. (2014) verificaram que apenas metabólitos produzidos pelos isolados *T. harzianum*, *T. koningiopsis* e *T. asperellum* apresentaram inibições, significativamente superiores a 60%, na colônia de *S. rolfsii* e, inibições entre 40% e 60% na colônia de *Verticillium dahliae*. Já Martins-Corder e Melo (1998), verificaram que de sete isolados de *Trichoderma* spp., quatro apresentaram maior inibição da colônia de *Verticillium dahliae* ao produzirem compostos voláteis, apesar de não diferirem entre si. Por meio dos estudos de interação de hifas de *Trichoderma* spp. e

V. dahliae, estes autores verificaram várias formas típicas de parasitismo, sendo crescimento paralelo das hifas de ambos os fungos, formação de estruturas semelhantes a ganchos que cresciam em direção aos feixes de hifas do hospedeiro, enrolamentos de hifas do antagonista sobre o patógeno e intensa fragmentação de hifas do *V. dahliae*.

4.3 Produção de compostos antifúngicos termoestáveis

Com relação à produção de compostos antifúngicos por *Trichoderma* spp. que suportam altas temperaturas, os resultados obtidos indicaram que apenas sete isolados produziram substâncias que inibiram o crescimento do fitopatógeno. Como se pode observar, no primeiro ensaio apenas o isolado TB06 inibiu o desenvolvimento do fitopatógeno em 48% (Tabela 1). No ensaio 2 os isolados TB21, TB22, TB28 e F1A2T1001 inibiram o crescimento da *P.nicotianae* de 10% a 47%. (Tabela 2). No ensaio 4, os isolados TB13 e T2A2F1021 foram capazes de produzir metabólitos termoestáveis que afetaram o desenvolvimento da colônia do fitopatógeno (Tabela 4), com valores de inibições de 13% e 18%, respectivamente. Já nos ensaios 3 e 5, os isolados de *Trichoderma* spp. testados não diferiram estatisticamente da testemunha (Tabela 3 e 5).

Resultados similares foram observados por Isaias et al., (2014), quando foi avaliada a produção de metabólitos não-voláteis termoestáveis de vinte isolados de *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotium rolfisii* e *V. dahliae*, sendo que quatro isolados apresentaram inibição de *S. rolfisii* superior a 50%, e quanto a *V. dahliae*, o mesmo apresentou uma inibição de 54% a 60%.

4.4 Produção de compostos antifúngicos livre de células

Na produção de metabólitos livres de células, observou-se no primeiro ensaio que os melhores resultados foram obtidos pelos isolados TB02, TB04, TB06, TB08, TB09 e TB10, com valores de inibição que variaram de 21% à 45% (Tabela 1). No

segundo ensaio, os que se desenvolveram melhor foram os isolados TB21, TB22 e TB28 que inibiram significativamente o desenvolvimento da *P. nicotianae*, com valores de inibições que variaram de 26% a 61% (TB21) (Tabela 2). No terceiro ensaio, os isolados que diferenciaram do fitopatógeno foram TB30, F1A9T2006 e F2T1A1029, com valores de inibições da colônia de 31 a 55% (Tabela 3). Já no quarto ensaio apenas dois isolados TB12 e TB14 proporcionaram controle de *P. nicotianae*, com inibições da colônia de *Phytophthora*, que variaram de 42% a 51%. (Tabela 4). Já no quinto ensaio, nenhum isolado apresentou diferença estatística com a testemunha (Tabela 4). Bonfim et al., (2010), avaliando o efeito de extratos livres de células de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *Rhizopus stolonifer* observaram que quatro isolados inibiram o desenvolvimento micelial do fitopatógeno, produzindo um notável efeito fungistático.

4.5 Efeito de fontes de carbono na produção de compostos voláteis

Ao avaliar o efeito de diferentes fontes de carbono acrescidas em meio de cultura BDA para produção de compostos voláteis por isolados de *Trichoderma* spp., verificou-se que a produção destes compostos dependeu não somente do isolado do antagonista, mas também da fonte de carbono que foi suplementada ao meio de cultivo (Tabela 6). Sacarose e maltose favoreceram a produção destes compostos voláteis (Tabela 6) e, embora, todos os isolados testados tenham produzidos compostos voláteis em quantidades suficientes para inibir a colônia do patógeno, os valores de inibição da colônia de *Phytophthora* variam de 14% (TB22 em meio com sacarose) a 55% (TB10 em meio com maltose ou glicose) (Tabela 7).

Por outro lado, Rossi-Rodrigues et al., (2009) avaliando o crescimento de quatro espécies de *Trichoderma* em meios suplementados com sacarose e glicose, verificaram que a taxa de crescimento dos mesmos em meios suplementados com glicose foi cinco vezes maior, em comparação com a sacarose, sendo que o crescimento do *T. hamatum* foi 40% maior com a glicose do que com a sacarose. Essa inibição ocorre devido ao fato de que o *Trichoderma* spp. tem capacidade de produzir enzimas que atuam contra o fitopatógeno.

TABELA 6 – Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de compostos voláteis por *Trichoderma* spp. e sua ação no desenvolvimento da colônia de *Phytophthoranicotianae*

Fontes de Açúcar	Diâmetro médio da colônia (cm)
Sacarose	2,78 b ⁽¹⁾
Maltose	2,86 b
Glicose	3,32 a

(1) Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

TABELA 7- Diâmetro médio da colônia de *Phytophthora nicotianae*, sob influência de compostos voláteis produzidos por isolados de *Trichoderma* spp. cultivados em meio BDA suplementado com diferentes fontes de carbono.

Isolados	Sacarose		Maltose		Glicose	
	Diâmetro da colônia (cm)	% inibição	Diâmetro da colônia (cm)	% inibição	Diâmetro da colônia (cm)	% inibição
Testemunhas	3,85 a	-	5,25 a	-	5,18 a	-
TB10	2,25 cd	42%	2,38 b	55%	2,31 c	55%
TB12	2,62 bcd	32%	2,60 b	50%	3,20 bc	38%
TB13	2,67 bcd	31%	3,07 b	41%	3,25 bc	37%
TB14	2,99 bc	22%	3,07 b	41%	2,90 c	44%
TB21	2,68 bcd	30%	2,75 b	48%	2,52 c	51%
TB22	3,30 ab	14%	2,62 b	50%	3,16 bc	39%
TB28	2,60 bcd	32%	2,38 b	55%	3,08 bc	40%
TB30	2,15 d	44%	2,84 b	46%	3,24 bc	37%
F1A2T1001	3,00 bc	22%	2,56 b	51%	4,38 ab	15%
F2T1A1029	2,82 bcd	27%	3,25 b	38%	4,38 ab	15%
F1A9T2006	2,70 bcd	30%	2,80 b	47%	3,56 bc	31%
T2A2F1021	2,56 bcd	33%	2,45 b	53%	2,50 c	52%
DMS	0,80	-	1,08	-	1,46	-
CV%	13,14	-	16,98	-	20,25	-

⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

4.6 Bioensaio com plântulas de alfafa

Os dados referentes ao bioensaio com plântulas de alfafa mostraram que os isolados TB10, TB12, TB14, TB21, TB28, TB30 e F1A9T2006 inibiram a formação de esporângios de *P. nicotianae* (Tabela 9). Com relação à quantidade de micélios, somente os isolados TB12, TB14, TB28 e TB30 inibiram, significativamente, a

formação dessa estrutura (Tabela 10). Verifica-se, ainda, que esses últimos isolados foram capazes de afetar tanto a formação de esporângio como a de micélios, sendo considerados promissores como agentes de controle biológico de *P. nicotianae*, pelo método de infestação de plântulas de alfafa.

TABELA 8-Seleção de isolados de *Trichoderma* ssp. quanto à produção de esporângio de *Phytophthora nicotianae*, pelo método de infestação de plântulas de alfafa.

Tratamentos	Nível de infestação com <i>P. nicotianae</i> (presença de esporângio) em plântulas de alfafa
Test. não inoculada	0,71 b ^(z)
Test. inoculada	1,56 a
TB10	0,71 b
TB12	0,71 b
TB13	0,88 ab
TB14	0,71 b
TB21	0,71 b
TB22	1,39 ab
TB28	0,71 b
TB30	0,71 b
F1A2T1001	1,05 ab
F2T1A1029	0,88 ab
F1A9T2006	0,71 b
T2A2F1021	1,22 ab

^(z) Nota média para o número de esporângio por plântula de alfafa. Escala de notas para número de esporângios, em que: 0 = sem esporângios; 1 = entre 1 e 5; 2 = entre 6 e 10; 3 = entre 11 e 50 e 4 = mais de 51 esporângios. Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$

TABELA 9-Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. quanto à produção de micélios de *Phytophthora nicotianae*, pelo método de infestação de plântulas de alfafa.

Tratamentos	Nível de infestação com <i>P. nicotianae</i> (presença de micélio) em plântulas de alfafa
Test. não inoculada	0,71 b ^(M)
Test. inoculada	1,48 a
TB10	0,84 ab
TB12	0,71 b
TB13	0,97 ab
TB14	0,71 b
TB21	0,84 ab
TB22	1,22 ab
TB28	0,71 b
TB30	0,71 b
F1A2T1001	0,97 ab
F2T1A1029	0,84 ab
F1A9T2006	0,84 ab
T2A2F1021	0,97ab

^(M) Nota média para quantidade de micélio por plântula de alfafa. Escala de notas para quantidade de micélio, onde: 0 = sem micélio; 1 = pouco; 2 = médio e 3 = muito micélio. Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$

Comparando com os resultados obtidos por Leoni e Ghini (2002), no qual os autores avaliaram o potencial de antagonismo de 35 isolados de bactérias, 32 de actinomicetos e 52 fungos contra *P. nicotianae*, foi relatado que apenas dois isolados se destacaram para o biocontrole, os isolados F9.1 (*Aspergillus* sp.) e A12.1 (actinomiceto, não identificado), sendo que um isolado de *Trichoderma* spp. (F12.3) inibiu o crescimento de esporângios na raiz das plântulas.

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que TB12, TB14, TB28 e TB30 apresentam potencial para utilização como agentes de controle biológico de *P. nicotianae*. No entanto, testes com plantas de citros são necessários para confirmar a potencialidade destes isolados de *Trichoderma* spp. como agentes de controle

biológico da doença. Acredita-se ainda que, um estudo sobre a interação entre planta-patógeno-antagônico, em diversas condições de ambiente e o conhecimento sobre a possibilidade de sobrevivência destes isolados de *Trichoderma* spp. no solo, são fatores importantes a serem abordados nos próximos estudos.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

- a) Avaliações *in vitro* com relação à produção de compostos antimicrobianos pelos isolados de *Trichoderma* e o bioensaio com plântulas de alfafa mostraram capacidade para selecionar isolados com potencial para o controle de *Phytophthora nicotianae*;
- b) TB12, TB14, TB28 e TB30 apresentam potencial para utilização como agentes de controle biológico de *P. nicotianae*;
- c) Os mecanismos de ação que podem estar envolvidos no biocontrole são a produção de compostos voláteis e livres de células pelos antagonistas.

6.REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Pant pathology**. Amsterdam: Elsevier Academic Press, p.922, 2005
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS EXPORTADORES DE SUCOS CÍTRICOS. **A indústria brasileira de suco de laranja**. São Paulo, p1-69, nov.2010. Disponível em:<<http://citrusbr.com>> Acesso em: 05 maio.2015.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M.A. B.; PINTO, Z.V.; PAULA Jr, T.J.; CORREA, E.B., MOURA, A. B.; LUCON, C.M.M.; COSTA, J. B.; BEZERRA, J.L.Bioprotetores comerciais para o controle de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 17, p. 111-147, 2009.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B.; STADINK, M.J.; KRAUS, U.; STEFANOVA, M.; PRADO, A.M.C. Controle biológico de doenças de plantas na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Eds.) Controle **Microbiano de Pragas na América Latina – Avanços e Desafios**. Piracicaba. FEALQ. p.303-331, 2008.
- BONFIM, M. P.; SÃO JOSÉ, A. R.; REBOUÇAS, T. N. H.; ALMEIDA, S. S.; SOUZA, I. B. B.; DIAS, N. O. Avaliação anatagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**. v. 36, p.61-67, 2010.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento, **Acompanhamento da Safra Brasileira de Laranja, Terceiro Levantamento**, Brasília, p. 1-11, 2013. Disponível<<http://www.conab.gov.br>>Acesso em: 05 Maio. 2015
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento, 2014. Disponível em:[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_12_12_09_53_25_boletim de_laranja.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_12_12_09_53_25_boletim_de_laranja.pdf). Acesso em: 10 Junho. 2015
- CORRÊA. E.B.; KUPPER. K.C.; GOES. A. Controle biológico da podridão radicular em plantas de limão cravo. **Citrus Research & Technology**, v.32, n.3, p.127-132, 2011.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interaction. **Transactions of the British Mycological Society**. v.57, p. 363-369, 1971.
- DIAS, P.P. **Controle biológico de fitopatógenos de solo por meio de isolados de fungos do gênero *Trichoderma* e sua contribuição para o crescimento de plantas**. Tese (Doutorado em Agronomia Ciências do Solo) Instituto de Agronomia. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Seropédica, 2011.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Produção integrada de citros.BA: **Embrapa mandioca e fruticultura**, 2007. (Sistema de Produção 15)

Disponível<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/.../FontesHTML/Citros/CitrosBahia_2ed/importancia.htm/ />. Acesso em: 04 abril.2014

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Produção integrada de citros. BA: **Embrapa mandioca e fruticultura**, 2003. (Sistema de Produção 15) Disponível<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosBahia.htm/> /> Acesso em: 10 junho. 20014

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sistema de produção de citros para o Nordeste.BA: **Embrapa mandioca e fruticultura**, 2003. (Sistema de Produção 16). Disponível<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/.../Citros/CitrosNordeste.htm/> />. Acesso em: 04 abril. 2014.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014. Disponível em: <http://www.faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em 10 de agosto de 2015.

FAWCETT, H. S.; BITANCOURT, A.A. **Occurrence, pathogenicity and temperature relations of *Phytophthora* species on citrus in Brazil and other South American countries**. Arquivos do Instituto Biológico. v.11, p.107-119, 1940.

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: Luz, E.D.M.N., Matsuoka, K., SANTOS, A.F.; BEZERRA, J.L. (Eds.). **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas. Livraria Rural. p.283-342, 2001.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE, Jr.J.Doenças dos Citros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM, Filho. A.; CAMARGO, L. E. A (Eds). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo, v.2, p. 239-270, 2005.

FIGUEIREDO, J.E.F.; SILVA, J.A.A.; KARAM, D. **Efeito in vitro de Glyphosate sobre bactérias do gênero *Bacillus* spp**. Circular Técnica 191. p.1-7, 2013.Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/101854/1/circ-191.pdf/> /> Acesso em: 10 abril 2014.

FRIGHETO, R.T.S MELO, I.S. Produção de antibióticos por microrganismos. In: MELO, I.S.; SANHUEZA, R.M.V. (Coords). Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, p.40-46, 1995.

GRAHAM, J.H.; MENGE, J.A. Root diseases.In: L. W.; Timmer L. W.; Duncan. **Citrus health management**. American Phytopathology Society. Sant Paul. cap.12, p.126-135, 1999. Disponível em:< http://www.crec.ifas.ufl.edu/academics/classes/PMA5205/PDF/Root_diseases_Ch12.pdf>. Acesso em: 07 Abr. 2014

GRAHAM, J.H.; FEICHTENBERGER, E. Citrus phytophthora diseases: Management challenges and successes. **Journal of Citrus Pathology**. p. 1-11, 2015.

GRAHAM, J.H.; TIMMER, L.W. *Phytophthora* diseases of citrus. SL-127, **Florida Cooperative Extension Service**, IFAS, University of Florida. 2003. Disponível em: <http://orange.ifas.ufl.edu/mg/mg_compendium/pdffiles/ch/CH08700.pdf>. Acesso em: 03 Abr. 2014.

GRAHAM, J. H.; TIMMER, L. W.; DROUILLARD, D. L.; PEEVER, T. L. Characterization of *Phytophthora* spp. causing outbreaks of citrus brown rot in Florida. **Phytopathology**.v.88,p.724729,1998. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.1998.88.7.724>>. Acesso em: 03 Abr. 2014.

HARAN, S.; SCHICKLER, H.; CHET, I. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. **Microbiology**, v.142, p. 2321-2331, 1996. Disponível em: <<http://mic.sgmjournals.org/content/142/9/2321.full.pdf> >. Acesso em: 30 jan. 2014.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET. I.; LORITTO, M. *Trichoderma* species – opportunistic avirulent plant symbionts. **Nature Reviews**. v.2, p.43-56, 2004.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**. v.87, n.1, p.4-10, 2003.

ISAIAS, C.O.; MARTINS, I.; SILVA, J.B.T.; SILVA, J.T.; MELLO, S.C.M. Ação antagônica e de metabolitos biotivos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahlia*. **Suma Phytopathologica**. v. 40, nº 1, 2014. Disponível: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052014000100005. Acesso em: 18 de Maio, 2015.

KUPPER, K.C.; BELLOTTE, J. A. M.; GOES, A. Controle alternativo de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 31, n. 4, p.1004-1015, 2009.

KUPPER, K.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**. v.28, n.3, p.251-257, 2003

KUPPER, K. C.; CORRÊA, E. F.; AZEVEDO, F. A. D.E.; SILVA, A. C. *Bacillus subtilis* to biological control of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum* under field conditions. **Scientia Horticulturae**. v.134, p. 139-143, 2012

LEONI, C.; GHINI, R. Efeito do Lodo de Esgoto na Indução de Supressividade *in vitro* a *Phytophthora nicotianae*. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.67-75, 2002.

LUZ, W.C. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.1, p.16-20, 2000.

LUCON, C. M. M. *Trichoderma* no controle de doenças de plantas causadas por patógenos de solo. Instituto Biológico, 2008. São Paulo. Publicações. **São Paulo: Secretaria de Agricultura e abastecimento**, 2008. Disponível em: <<http://www.biologico.sp.gov.br/artigos/>>. Acesso em: 20 out. 2013.

MARTINS-CORDER, M.P.; MELO, I.S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* kleb. **Scientia Agricola**. v.55, p.1-7, 1998

MATHERON, M.E.; PORCHAS, M. Impacto f Azoxytobin, Dimethomorph, Fluazinam, Fosetyl-Al, and Metalaxyl on Growth, Sporulation, and Zoospore Cyst Germination of Three *Phytophthora* spp. **Plant Disease**. v.84,p.454-458, 2000.

MORANDI, M.A. B.; BETTIO, W.G. Controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol W & Morandi MAB (Eds). **Biocontrole de doenças de plantas: usos e perspectivas**. Jaguariúna, p.7-14, 2009.

POMELLA, A.W.V.; RIBEIRO, R.T.S. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas – Uma visão empresarial. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas** p.235-244, 1º ed. Jaguariuna,2009.

REIS, A.**Requeima:doença destrutiva e comum ao tomateiro e à batateira**. Comunicado Técnico. ISSN 1414-9850, Novembro, 2010.

ROSSI-RODRIGUES, B.C.; BROCHETTO-BRAGA, M.R.; TAUKE-TORNISIELO, S.M.; CARMONA, E.C.; ARRUDA, V.M.; NETTO, J.C. Comparative grown of *Trichoderma* strains in different nutritional sources, using bioscreen c automated system. **Brazilian Journal Microbiology**. v.40, p.404-410, 2009.

SABA, H.; VIBHASH, D.; MANISHA, M.; PRASHANT, K.S.; FARHAN, H.; TAUSEEF, A. ***Trichoderma*– a promising plant growth stimulator and biocontrol agent**. Mycosphere. v.3, p. 524-531, 2012.

SAKSIRIRAT, W.; CHAREERAK, P.; BUNYATRACHATA, W.Induced systemic resistance of biocontrol fungus, *Trichoderma* spp. against bacterial and gray leaf spot in tomates. **Asian Journal Food Ag-Ind**. p.99-104, 2009

SILVA, C.M.M.S., MELO, I.S. **Biodegradação de fungicidas benzimidazóis**. MICROBIOLOGIA AMBIENTAL. EMBRAPA, Jaguariúna, p.141-165, 1997.

SIVIERO, A.; FURTADO, E.J.; MACHADO, M.A. Métodos de inoculação e avaliação de doenças causadas por *Phytophthora* em citros. **LARANJA-FITOPATOLOGIA**, v.23, nº 1, p.203-219, 2002.

WOOD, T. M.; MACRAE, S. The cellulase of *Trichoderma koningii*. Purification and properties of some endoglucanase components with special reference to heir action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase. **Biochemical Journal**. v. 171, p.61-72, 1977.

ZALDÍVAR, M.; VELÁSQUEZ, J. C.; CONTRERAS, I.; PÉREZ, L. M. *Trichoderma aureoviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol. **Electronic Journal of Biotechnology**.v.4,nº3,2001.

Disponível em:< <https://tspace.library.utoronto.ca/retrieve/2423/ej01029.pdf> >. Acesso em: 30 jan. 2014.