

**Secretaria de Agricultura e Abastecimento  
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios  
Instituto Biológico  
Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no  
Agronegócio**

**EFEITO DE *Trichoderma* spp. NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Rhizoctonia solani* E  
NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE TOMATEIRO.**

**José Lourenço Almeida Prado Paes de Barros**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental  
no Agronegócio. Área de concentração: Segurança  
Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

**São Paulo**

**2019**

**José Lourenço Almeida Prado Paes de Barros**

**EFEITO DE *Trichoderma* spp. NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Rhizoctonia solani* E  
NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE TOMATEIRO.**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental  
no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade  
no Agroecossistema

Orientador: Professor Dr. Ricardo Harakava

Coorientador: Dr. Jesus Guerino Töfoli

**São Paulo**

**2019**

Eu, José Lourenço Almeida Prado Paes de Barros, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico, de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**  
**Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios**  
**Instituto Biológico**  
**Núcleo de Informação e Documentação**

---

Barros, José Lourenço A.P.P.

Efeito de *Trichoderma* spp. no controle biológico de *Rhizoctonia solani* e na promoção de crescimento de tomateiro. / José Lourenço A.P. P Barros– São Paulo, 2019.XX p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: **Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema**. Linha de pesquisa: Controle Biológico.

Orientador: Ricardo Harakava. Versão do título para o inglês: Effect of *Trichoderma* spp. biological control of *Rhizoctonia solani* and the promotion of tomato growth.

1. *Trichoderma* spp. 2. *Rhizoctonia solani* 3. Controle biológico I. Barros, José A.P.P. II. Harakava, Ricardo III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título.

IB/Bibl./2019/00x

---

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Nome:** José Lourenço Almeida Prado Paes de Barros

**Título:** Efeito de *Trichoderma* spp. no controle biológico de *Rhizoctonia solani* e na promoção de crescimento de tomateiro.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

**Aprovado em:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### Banca Examinadora

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_ **Instituição:** \_\_\_\_\_

**Julgamento:** \_\_\_\_\_ **Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_ **Instituição:** \_\_\_\_\_

**Julgamento:** \_\_\_\_\_ **Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_ **Instituição:** \_\_\_\_\_

**Julgamento:** \_\_\_\_\_ **Assinatura:** \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

Aos Agricultores familiares de todas as partes do mundo, que lutam pela sobrevivência e  
contra a opressão da Agricultura Industrial.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar a oportunidade de poder aprender controle biológico com *Trichoderma* spp., e assim divulgar aos produtores familiares.

Ao meu orientador espiritual Paramahansa Yogananda, por suas orientações divinas.

À minha esposa, Vera Lucia N.P. Barros pelo carinho, atenção, paciência e pelas orientações e incentivo.

Aos meus pais, *in memoriam*, pelos preciosos incentivos aos estudos.

Às minhas irmãs, cunhados, filho e sobrinhos que muito me incentivaram a chegar até a este momento.

Ao Instituto Biológico de São Paulo, por aceitar-me cursar esse Mestrado.

Ao Prof. Dr. Ricardo Harakava, por aceitar o convite de ser meu orientador e pela disposição em esclarecer dúvidas.

À pesquisadora Dra. Cleusa M. M. Lucon, por suas preciosas orientações e por incentivar-me nos estudos de *Trichoderma* spp.

Ao Dr. Jesus Töfoli, do Laboratório de Doenças de Horticultura do Instituto Biológico de São Paulo, por ter aceito o convite de ser meu coorientador, e pelo esclarecimento de dúvidas.

Ao Prof. Dr. César Junior Bueno, por ter aceito o convite de participação da banca de avaliação, pelas sugestões, e pelo grande auxílio nas questões referentes à estatística.

Ao Dr. Sebastião Wilson Tivelli, por ter aceito o convite de participação da banca de avaliação.

À doutoranda Patrícia Elias Haddad, pelas valorosas orientações, pela convivência, pelo apoio, e pelos incentivos durante essa caminhada.

À doutoranda Amanda Oliveira pelas orientações, convivência e incentivo.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica.

Aos colegas e funcionários da Pós-Graduação, por todos os momentos compartilhados.

Ao colega bibliotecário Roberto e sua assistente Da. Dalva, sempre atenciosos e dedicados.

À Da. Samira, secretária da Pós-graduação, sempre gentil e atenciosa.

Ao meu diretor imediato na CDA/SAA/SP, Dr. Willian Alves Correa, pela compreensão e paciência durante esse período de realização do Mestrado.

À Assistente Agropecuária Cleonice Natália Sguarezi, Presidente da Comissão de Atividades Técnicos-Científicas da CDA/SAA/SP, pela paciência e compreensão.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Capão Bonito, Instituto Agrônômico, que muito me auxiliaram para o desenvolvimento das pesquisas.

À 'Dona Lucia' grande companheira de nossa família, agradeço de coração por ter contribuído com a execução e o cuidado dos experimentos de campo.

Ao pesquisador científico Marcelo Eiras e seus colegas, pertencentes ao laboratório de Virologia Vegetal do Instituto Biológico, pela gentileza de permitir o uso de balanças de alta precisão.

Ao colega de trabalho da CDA em Capão Bonito, Antonio Oliveira Sousa, pelo apoio.

Agradeço a todos vocês.

Muito obrigado.

Enquanto mantiver sua consciência em Deus,  
você jamais sentirá medo.  
Todos os obstáculos serão superados  
pela coragem e pela fé.

Paramahansa Yogananda



## RESUMO

BARROS, J. L. A. P. P. **Efeito de *Trichoderma* spp. no controle biológico de *Rhizoctonia Solani* e na promoção de crescimento de tomateiros.** 2019. 76 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2019.

O cultivo convencional de tomate é prejudicado pelo elevado quantitativo de pragas e doenças, tornando a solanacea objeto de uso de agrotóxicos em grande quantidade e alta frequência. A adoção do controle biológico de doenças de plantas, principalmente para o controle de patógenos de solo, como *Rhizoctonia solani*, torna-se uma alternativa interessante aos produtores para a redução do uso de agrotóxicos nessa cultura. O presente estudo objetivou avaliar, *in vivo*, a eficiência de cinco isolados de *Trichoderma* das espécies *Trichoderma lentiforme* (IB 11/12 e IB 30/07), *Trichoderma koningiopsis* (IB 18/03), *Trichoderma camerunense* (IB 19/17), e *Trichoderma endophyticum* (IB 42/03) no biocontrole de *Rhizoctonia solani* (isolado 13/02 PB), causador do tombamento de plantas, e na promoção de crescimento de tomateiros. Também foram objetivos deste estudo testar, *in vitro*, o antagonismo destes cinco isolados de *Trichoderma* spp. contra *R. solani* 13/02 PB, bem como o efeito de cinco temperaturas no crescimento e na produção de conídios de dois isolados antagonistas (*T. lentiforme* IB 11/12 e *T. koningiopsis* IB 18/03). Os resultados relativos aos experimentos *in vivo*, demonstraram que os isolados *T. lentiforme* IB 11/12 e IB 30/07, *T. koningiopsis* IB 18/03, *T. camerunense* IB 19/17, e *Trichoderma endophyticum* IB 42/03 apresentaram diferença significativa em relação à testemunha para o controle biológico de *Rhizoctonia solani* 13/02 PB. Quanto à promoção de crescimento, os resultados mostraram que os isolados *T. lentiforme* IB 11/12, *Trichoderma koningiopsis* IB 18/03, *Trichoderma camerunense* IB 19/17, e *Trichoderma endophyticum* IB 42/03 apresentaram diferença significativa em relação à testemunha. Quanto aos ensaios de pareamento de culturas *in vitro*, todos os isolados avaliados quanto à inibição de crescimento de colônias de *R. solani* 13/02 PB apresentaram diferença significativa em relação à testemunha, enquanto pela avaliação na escala de Bell, todos os isolados, com exceção de *Trichoderma koningiopsis* IB 18/03, mostraram-se bons antagonistas. Referente aos efeitos de cinco temperaturas no crescimento e na produção de conídios dos isolados de *T. lentiforme* IB 11/12 e *T. koningiopsis* IB 18/03, constatou-se que a faixa de 20°C à 30°C foi a mais favorável.

**Palavras-chave:** tomate, damping-off, biocontrole

## ABSTRACT

BARROS, J. L. A. P. P. **Effect of *Trichoderma* spp. biological control of *Rhizoctonia Solani* and the promotion of tomatoes growth.** São Paulo. 2019. 76 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2019.

Conventional tomato cultivation is hampered by the high quantity of pests and diseases, making solanaceous the object of use of pesticides in high quantity and high frequency. The adoption of biological control of plant diseases, mainly for the control of soil pathogens, such as *Rhizoctonia solani*, becomes an interesting alternative for producers to reduce the use of pesticides in this crop. The present study aimed to evaluate, *in vivo*, the efficiency of five isolates of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*, which causes plant tipping, and in the growth promotion of tomato plants. It was also the objective of this study to test, *in vitro*, the antagonism of the five isolates of *Trichoderma* spp. against *R. solani* and the effect of five temperatures on the growth and conidia production of the two antagonist isolates that most stood out in the *in vivo* assays. The results showed that the isolates of *Trichoderma* IB 11/12, IB18 / 03, IB 19/17 and IB 30/07 presented the highest percentages of control in the three greenhouse tests, reaching 100% control of plant tipping. As for growth promotion, the results showed that the best isolates of *Trichoderma* were IB 18/03, IB 19/17 and IB 42/03, with increases of 245.45, 145.45 and 113.64%, respectively. Regarding the *in vitro* crop pairing assays, the isolates of *Trichoderma* spp. IB 11/12, IB 19/17, IB 30/07 and IB 42/03 showed good antagonists, growing on the whole colony of *R. solani*, and the effect of five temperatures on the growth of two isolates of *Trichoderma* spp. , it was found that the temperatures of 25 ° C and 30 ° C were the most favorable to the growth of the isolates.

**KEYWORDS:** tomato, damping-off, biocontrol.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Número de plantas tombadas de tomate oriundas de vasos contendo substrato infestado ou não com diferentes isolados de *Rhizoctonia solani*. São Paulo – SP. 2017. \_\_\_\_\_ 21
- Figura 2 - Porcentagem de plantas vivas de tomate (cultivar Super Marmande) cultivadas em vasos contendo substrato inoculado simultaneamente com *Rhizoctonia solani* (isolado 13/02 PB) e diferentes isolados de *Trichoderma* sp., além da presença do controle branco. Experimento nº 1 de biocontrole realizado em Capão Bonito- SP. 20018 \_\_\_\_\_ 23
- Figura 3 - Porcentagem de plantas vivas de tomate (cultivar Super Marmande) cultivadas em vasos contendo substrato inoculado simultaneamente com *Rhizoctonia solani* (isolado 13/02 PB) e diferentes isolados de *Trichoderma* sp., além da presença do controle branco. Experimento nº 2 de biocontrole realizado em Capão Bonito - SP. 2018. \_\_\_\_\_ 25
- Figura 4 - Porcentagem de plantas vivas de tomate (cultivar Super Marmande), cultivadas em vasos contendo substrato inoculado simultaneamente com *Rhizoctonia solani* (isolado 13/02 PB) e diferentes isolados de *Trichoderma* sp., além da presença do controle branco. Experimento nº 3 de biocontrole realizado em Capão Bonito – SP. 2018 \_\_\_\_\_ 27
- Figura 5 - Efeito de cinco isolados de *Trichoderma* spp. na média da MMSPA (gramas) de plantas de tomateiro (cultivar Super Marmande), dois meses após o plantio das sementes, em casa de vegetação. Experimento nº 1 de Promoção de crescimento. Capão Bonito – SP. 2018. \_\_\_\_\_ 33
- Figura 6 - Porcentagens de ganhos de MMSPA de cada tratamento, em relação à média do tratamento controle branco (C.b.), referentes às plantas de tomate, cultivar Super Marmande. Experimento nº1 de promoção de crescimento. Capão Bonito – SP. 2018. \_\_\_\_\_ 33
- Figura 7 - Efeito de cinco isolados de *Trichoderma* spp. na média da MMSPA (gramas), de plantas de tomateiro (cultivar Super Marmande), dois meses após o plantio das sementes, em casa de vegetação. Experimento nº 2 de Promoção de crescimento. São Paulo – SP. 2018. \_\_\_\_\_ 35
- Figura 8 - Porcentagens de ganhos de MMSPA de cada tratamento, em relação à média do tratamento controle branco (C.b.), referentes às plantas de tomate, cultivar Super Marmande. Experimento nº 2 de promoção de crescimento. São Paulo – SP. 2018. \_\_\_\_\_ 35
- Figura 9 - Efeito de cinco isolados de *Trichoderma* spp. na média da MMSPA (gramas), de plantas de tomateiro (cultivar Super Marmande), dois meses após o plantio das sementes, em casa de vegetação. Experimento nº 3 de Promoção de crescimento. São Paulo – SP. 2018. \_\_\_\_\_ 37

Figura 10 - Porcentagens de ganhos de MMSPA de cada tratamento, em relação à média do tratamento controle branco (C.b.), referentes às plantas de tomate, cultivar Super Marmande. Experimento nº 3 de promoção de crescimento. São Paulo – SP. 2018. _____	38
Figura 11 - Medidas de diâmetro de crescimento (mm), de colônias de <i>R. solani</i> 13/02 PB (Rs) em ausência e em presença de diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp., ao 3º dia após instalação do experimento. São Paulo – SP. 2018. _____	41
Figura 12 - Diâmetro de crescimento (mm), de colônias de <i>Trichoderma</i> IB 11/12 às temperaturas de 15°C, 20°C, 25°C, 30°C e 35°C. São Paulo – SP. 2018. _____	42
Figura 13 - Diâmetro de crescimento (mm), de colônias de <i>Trichoderma</i> IB 18/03 às temperaturas de 15°C, 20°C, 25°C, 30°C e 35°C. São Paulo- SP. 2018. _____	43
Figura 14 - Resultado do número de conídios em suspensão concentrada do isolado de <i>Trichoderma</i> sp. IB 11/12 em diferentes temperaturas (graus Celsius), expressos em 10 <sup>7</sup> /ml de suspensão concentrada. São Paulo – SP. 2018. _____	45
Figura 15 - Resultado do número de conídios em suspensão concentrada do isolado de <i>Trichoderma</i> sp. IB 18/03 em diferentes temperaturas (graus Celsius), expressos em 10 <sup>7</sup> /ml de suspensão concentrada São Paulo – SP. 2018. _____	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Procedência dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. utilizados nos experimentos. ____	14
Tabela 2 - Número de plantas tombadas de tomate cultivar Super Marmande, cultivadas em vasos contendo substrato infestado ou não com diferentes isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> . São Paulo - SP. 2017. _____	20
Tabela 3 - Mediana $\pm$ semi-amplitude interquartílica de número de plantas tombadas de tomate cultivar Super Marmande, relativo a cada tratamento do experimento da tabela acima. São Paulo – SP. 2017. _____	20
Tabela 4 - Número de plantas de tomate tombadas (cultivar Super Marmande), cultivadas em vasos contendo substrato inoculado, ou não, simultaneamente com <i>Rhizoctonia solani</i> - <i>R.s</i> (isolado 13/02 PB) e diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp.. Experimento de biocontrole nº 1 realizado em Capão Bonito – SP. 2018. _____	22
Tabela 5 - Resultado de cada tratamento composto pela mediana $\pm$ semi-amplitude interquartílica do número de plantas de tomate tombadas (cultivar Super Marmande), do Experimento de biocontrole nº 1 realizado em Capão Bonito – SP. 2018. _____	23
Tabela 6 - Número de plantas de tomate tombadas (cultivar Super Marmande), cultivadas em vasos contendo substrato inoculado simultaneamente com <i>Rhizoctonia solani</i> - <i>R.s</i> (isolado 13/02 PB) e diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp.. Experimento nº 2 de biocontrole realizado em Capão Bonito – SP. 2018. _____	24
Tabela 7 - Resultado de cada tratamento composto pela mediana $\pm$ semi-amplitude interquartílica do número de plantas de tomate tombadas (cultivar Super Marmande), do Experimento de biocontrole nº 2 realizado em Capão Bonito – SP. 2018. _____	25
Tabela 8 - Número de plantas de tomate tombadas (cultivar Super Marmande), cultivadas em vasos contendo substrato inoculado, ou não (c. branco) simultaneamente com <i>Rhizoctonia solani</i> - <i>R.s</i> (isolado 13/02 PB), e diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp. Experimento nº 3 de biocontrole realizado em Capão Bonito – SP. 2018. _____	26
Tabela 9 - Resultado de cada tratamento composto pela mediana $\pm$ semi-amplitude interquartílica do número de plantas de tomate tombadas (cultivar Super Marmande), do Experimento de biocontrole nº 3 realizado em Capão Bonito – SP. 2018. _____	27
Tabela 10 - Variação de porcentagem de controle de <i>R. solani</i> 13/02 PB por <i>Trichoderma</i> spp. apresentada nos experimentos de biocontrole de números 1,2 e 3, com ausência e presença de	

inoculação simultânea em substrato para crescimento de mudas, realizado em Capão Bonito, SP. 2018.	28
Tabela 11 - Número de unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) de substrato comercial Tropstrato® HT Vida Verde, ao final do experimento em casa de vegetação, para cinco isolados de <i>Trichoderma</i> spp.. Referente ao experimento de biocontrole nº 1, realizado em Capão Bonito-SP. 2018.	29
Tabela 12 - Número de unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) de substrato comercial Tropstrato® HT Vida Verde, ao final do experimento em casa de vegetação, para cinco isolados de <i>Trichoderma</i> spp.. Referente ao experimento de biocontrole nº 2, realizado em Capão Bonito-SP. 2018.	30
Tabela 13 - Número de unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) de substrato comercial Tropstrato® HT Vida Verde, ao final do experimento em casa de vegetação, para cinco isolados de <i>Trichoderma</i> spp.. Referente ao experimento de biocontrole nº 3, realizado em Capão Bonito-SP.	31
Tabela 14 - Massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA), em gramas, de plantas de tomate cultivar Super Marmande, oriundas de vasos contendo substrato inoculado ou não, com diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> (Tch). Experimento nº 1 de promoção de crescimento. Capão Bonito – SP. 2018.	32
Tabela 15 - Média de massa de matéria seca da parte aérea $\pm$ Erro Padrão, em gramas, de plantas de tomate cultivar Super Marmande, oriundas de vasos contendo substrato para crescimento de mudas, inoculado ou não com diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp.. Experimento nº 1 de Promoção de crescimento. Capão Bonito – SP. 2018.	32
Tabela 16 - Massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA), em gramas, de plantas de tomate cultivar Super Marmande, oriundas de vasos contendo substrato inoculado ou não, com diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> (Tch). Experimento nº 2 de promoção de crescimento. São Paulo – SP. 2018.	34
Tabela 17 - Média de massa de matéria seca da parte aérea $\pm$ Erro Padrão, em gramas, de plantas de tomate cultivar Super Marmande, oriundas de vasos contendo substrato para crescimento de mudas, inoculado ou não com diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp.. Experimento nº 2 de Promoção de crescimento. São Paulo – SP. 2018.	34
Tabela 18 - Massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA), em gramas, de plantas de tomate cultivar Super Marmande, oriundas de vasos contendo substrato inoculado ou não com diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> (Tch). Experimento nº 3 de promoção de crescimento. São Paulo – SP. 2018.	36

Tabela 19 - Média de massa de matéria seca da parte aérea $\pm$ Erro Padrão, em gramas, de plantas de tomate cultivar Super Marmande, oriundas de vasos contendo substrato para crescimento de mudas, inoculado ou não com diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp.. Experimento nº 3 de Promoção de crescimento. São Paulo – SP. 2018. _____	37
Tabela 20 - Resultados dos experimentos números 1, 2 e 3 de promoção de crescimento de tomateiro, variedade Super Marmande, em ausência e em presença de diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp.._____	38
Tabela 21 - Notas com base nas médias obtidas pela escala de Bell (BELL; WELLS; MARKHAM, 1982), em cultivo dual entre cinco isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e o patógeno <i>Rhizoctonia solani</i> isolado 13/02 PB. São Paulo – SP. 2018. _____	40
Tabela 22 - Avaliação de crescimento (mm), de colônias de <i>Rhizoctonia solani</i> , isolado 13/02 PB, em presença e em ausência de diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp.. São Paulo – SP. 2018. _____	41
Tabela 23 - Resultados das médias de três repetições do número de conídios, em suspensão concentrada, dos isolados de <i>Trichoderma</i> sp. IB 11/12 e IB 18/03 em diferentes temperaturas. São Paulo – SP. 2018. _____	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

1° - Primeiro

2° - Segundo

3° - Terceiro

ACB – Agente de Controle Biológico

BDA – Batata Dextrose Ágar

cv. - cultivar

MMSPA – Massa de matéria seca da parte aérea

Tch – *Trichoderma*

UFC – Unidade Formadora de Colônias



## **LISTA DE SIGLAS**

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ABRASCO – Associação Brasileira de Saúde Coletiva

FAO - Food and Agriculture Organization

IAC – Instituto Agrônômico

IB – Instituto Biológico

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

OMS – Organização Mundial da Saúde

UPD – Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C - graus Celsius

% - porcentagem

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 OBJETIVOS.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Objetivo geral.....	2
1.1.2 Objetivos específicos.....	2
<b>1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Aspectos gerais sobre <i>Solanum lycopersicum</i> .....	3
1.2.1.1 Origem e história.....	3
1.2.1.2 Taxonomia e características da planta.....	3
1.2.1.3 Exigências climáticas.....	4
1.2.1.4 Situação econômica.....	4
1.2.1.5 Impactos negativos dos agrotóxicos.....	5
<b>1.3 IMPORTÂNCIA DE <i>Rhizoctonia solani</i> COMO AGENTE PATOGÊNICO AO TOMATEIRO.....</b>	<b>5</b>
<b>1.4 <i>Trichoderma</i>: CARACTERÍSTICAS GERAIS E ASSOCIAÇÃO COM PLANTAS.....</b>	<b>6</b>
1.4.1 <i>Trichoderma</i> spp. como agente de controle biológico .....	8
1.4.2 <i>Trichoderma</i> spp. como promotor de crescimento de plantas.....	11
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 MATERIAL VEGETAL, SUBSTRATO DE CRESCIMENTO E LOCAL DOS EXPERIMENTOS.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 MICRORGANISMOS.....</b>	<b>13</b>
2.2.1 <i>Rhizoctonia solani</i> spp.....	13
2.2.2. <i>Trichoderma</i> spp.....	13
<b>2.3 PREPARO DOS INÓCULOS.....</b>	<b>14</b>
2.3.1 Preparo dos inóculos de <i>Rhizoctonia solani</i> .....	14
2.3.2 Preparo dos inóculos de <i>Trichoderma</i> spp.....	14
<b>2.4 TESTE DE PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE <i>Rhizoctonia solani</i>.....</b>	<b>15</b>

<b>2.5 EXPERIMENTOS DE BIOCONTROLE, <i>Rhizoctonia solani</i> VERSUS <i>Trichoderma</i> spp.</b> .....	<b>15</b>
<b>2.5.1 Quantificação de unidades formadoras de colônia (UFC) de <i>Trichoderma</i> spp.</b> .....	<b>16</b>
<b>2.6 EXPERIMENTOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TOMATE POR <i>Trichoderma</i> spp.</b> .....	<b>17</b>
<b>2.7 EXPERIMENTO DE PAREAMENTO DE CULTURAS, <i>Trichoderma</i> spp. VERSUS <i>Rhizoctonia solani</i>, IN VITRO.</b> .....	<b>17</b>
<b>2.8 EFEITO DE CINCO TEMPERATURAS NO CRESCIMENTO DE DOIS ISOLADOS DE <i>Trichoderma</i> spp., EM MEIO BDA.</b> .....	<b>18</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1 EXPERIMENTO DE PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE <i>Rhizoctonia solani</i>.</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2 EXPERIMENTOS DE BIOCONTROLE, <i>Rhizoctonia solani</i> VERSUS <i>Trichoderma</i> spp.</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2.1 Quantificação de unidades formadoras de colônia (UFC) de <i>Trichoderma</i> spp.</b> .....	<b>29</b>
<b>3.3 EXPERIMENTO DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TOMATE POR <i>Trichoderma</i> spp.</b> .....	<b>31</b>
<b>3.4 ISOLADOS PROMISSORES COMO ACB E COMO PROMOTOR DE CRESCIMENTO PARA O TOMATEIRO.</b> .....	<b>39</b>
<b>3.5 EXPERIMENTO DE PAREAMENTO DE CULTURAS, <i>Trichoderma</i> spp. VERSUS <i>Rhizoctonia solani</i>, IN VITRO.</b> .....	<b>39</b>
<b>3.5.1 Avaliação de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. versus <i>Rhizoctonia solani</i>, in vitro, baseada na escala de Bell.</b> .....	<b>39</b>
<b>3.5.2 Avaliação de crescimento de <i>Rhizoctonia solani</i> na presença de <i>Trichoderma</i> spp., com base na medida do diâmetro de crescimento das colônias, em milímetros</b> .....	<b>40</b>
<b>3.6 EFEITO DE CINCO TEMPERATURAS NO CRESCIMENTO DE DOIS ISOLADOS DE <i>Trichoderma</i> spp., EM MEIO BDA.</b> .....	<b>42</b>

<b>3.7 EXPERIMENTO DE QUANTIFICAÇÃO DE CONÍDIOS DE <i>Trichoderma</i> spp. EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....</b>	<b>44</b>
<b>4.CONCLUSÕES.....</b>	<b>47</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>48</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O tomate é uma das olerícolas de maior consumo no mundo (Food and Agriculture Organization of the United Nations and Statistics - FAOSTAT, 2016), devido às diversas possibilidades de uso na gastronomia. O Brasil ocupa o nono lugar na produção mundial de tomate e o primeiro lugar com relação aos países da América do Sul (FAOSTAT, 2016). No Brasil a cadeia de agronegócios do tomate engloba as produções de tomate “para mesa”, onde está o consumo “*in natura*”, e o destinado à industrialização. Levantamentos realizados no ano base 2012, relativo às dez espécies de hortaliças (tomate de mesa, alface, melancia, cebola, cenoura, repolho, melão, quiabo, pimentão e pepino) de maior volume de produção (75,80% do total do grupo de hortaliças), revelaram um volume total de 19.621,70 milhões toneladas, sendo que o tomate foi o segundo colocado, com 3.037 milhões de toneladas (Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas – ABCSEM, 2013).

Em 2017 a produção da tomaticultura nacional faturou R\$ 4.330.563.000,00, que representa 1,40% de participação no total do valor da produção nacional (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2017), e gerou um elevado quantitativo de empregos, principalmente na produção de tomate para consumo “*in natura*”. Estima-se que o grupo de hortaliças gerem dois milhões de empregos diretos (ABCSEM, 2013), sendo a cultura de tomate a maior empregadora de mão-de-obra.

Entretanto, o sistema de cultivo convencional de tomate, largamente praticado pelos produtores, impacta negativamente nos fatores sociais e ambientais, sendo o principal deles a realização de grande número de pulverizações com agrotóxicos. Com isso ocorre um alto índice de contaminação de solo e água, bem como intoxicação de trabalhadores rurais e, no final da cadeia, dos consumidores (Associação Brasileira de Saúde Coletiva - ABRASCO, 2015).

Alimentos contendo substâncias químicas nocivas, podem provocar câncer e consequências danosas para os sistemas reprodutivo, imunitário e nervoso (Organização Mundial de Saúde - OMS, 2016). Por outro lado, o manejo de produção de tomate por práticas agroecológicas, onde a utilização de controle biológico de pragas e doenças é prática rotineira, impacta positivamente na produção e no consumo, uma vez que não acarreta contaminação ao meio ambiente e danos à saúde humana (ABRASCO, 2015).

Dentre os vários problemas fitossanitários que a tomaticultura apresenta, sem dúvida, as doenças radiculares encontram-se entre as mais importantes, e dentre elas

*Rhizoctonia solani* destaca-se pelos sérios prejuízos que ocasionam à cultura (BEDENDO, 1995).

Fungos do gênero *Trichoderma* são bastante utilizados na agricultura como Agentes de Controle Biológico (ACB), principalmente, contra fungos fitopatogênicos de solo. Isso ocorre em função de suas características micoparasitárias e por protegerem as plantas contra fitopatógenos (GUZMÁN-GUZMÁN et al., 2018).

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo geral**

Avaliar cinco isolados de *Trichoderma* spp. quanto ao controle de tombamento, causado por *Rhizoctonia solani* em plantas de tomateiro, e o efeito dos mesmos na promoção de crescimento.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

Avaliar, em condições de ambiente protegido, cinco isolados de *Rhizoctonia solani*, e selecionar o mais patogênico para tomateiros.

Selecionar os melhores isolados de *Trichoderma* spp., em condições de ambiente protegido, quanto à eficácia no controle de tombamento, causado por *R. solani*, em plantas de tomateiros.

Selecionar os melhores isolados de *Trichoderma* spp., em condições de ambiente protegido, que promovam o crescimento de tomateiros.

Avaliar, *in vitro*, a capacidade de antagonismo, pela técnica do pareamento de culturas, entre *R. solani* e *Trichoderma* spp., e verificar o efeito de cinco temperaturas no crescimento e na produção de conídios de dois isolados de *Trichoderma* spp., em meio BDA.

## **1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 1.2.1 Aspectos gerais sobre *Solanum lycopersicum*

### 1.2.1.1 Origem e história

A origem filogenética do tomateiro é divergente entre os autores, visto a falta de registros e dados históricos (SILVEIRA, 2015). Alguns autores defendem que os centros de origem tenham sido na América Central e na região Andina (RICK; HOLLE, 1990). Outros citam a região Andina como único centro de origem. Entretanto antes de ser levado e disseminado ao mundo pela colonização europeia, o tomateiro foi domesticado por indígenas no México (NAIKA et al. 2006). A discordância entre os autores levou Lin et al. (2014), através de estudos com genética molecular, a apresentarem que o tomateiro conhecido atualmente é originário da espécie selvagem *Solanum pimpinellifolium*, ocorrendo entre a região Andina no Norte do Peru e Sul do Equador.

Conforme Blanca et al. (2012), Nesbitt e Tanksley (2002) investigações genéticas têm mostrado que as plantas como ‘*cerasiforme*’ são originárias do cruzamento entre tomates silvestres e cultivados, em vez de serem ‘ancestral’ das espécies cultivadas.

A princípio, o tomate era usado exclusivamente como planta ornamental e não fazia parte da alimentação dos índios americanos. Com o descobrimento de sua notável riqueza vitamínica, junto com sua cor e sabor agradável, seu consumo foi rapidamente popularizado em todo o mundo (ESPINOZA et al., 1991).

### 1.2.1.2 Taxonomia e características da planta

A espécie *Solanum lycopersicum* pertence à ordem Tubiflorae, família Solanaceae e ao gênero *Solanum* (PERALTA; KNAPP; SPOONER, 2006). Em 1753 Linnaeus fez a classificação original utilizando o sistema binomial e o enquadrando ao gênero *Solanum*, descrito como *S. lycopersicum*, e em 1754 a espécie foi reclassificada por Miller, como pertencente ao gênero *Lycopersicum* (PERALTA; KNAPP; SPOONER, 2006). Ainda segundo esses autores, a nomenclatura refletiu dois objetivos principais na taxonomia, quais sejam, as classificações naturais preditivas (*Solanum*) e a manutenção da estabilidade nomenclatural (*Lycopersicon*). Atualmente utiliza-se a denominação *Solanum lycopersicum*.

A planta do tomateiro é perene de porte arbustivo, e é cultivada como cultura de ciclo anual. Possui caule flexível, com ramificação abundante e incapaz de suportar o seu próprio peso, principalmente em fase de frutificação. As flores são pequenas, hermafroditas e



amarelas, com inflorescências agrupadas em cachos. Possui dois tipos de inflorescências: a composta (ramificada) ou simples (não ramificada) (MINAMI; HAAG, 1989). Os frutos são bagas carnosas e suculentas, com dois ou mais lóculos, variam no aspecto, tamanho e peso dependendo da forma de cultivo. Sua coloração mais comum é a vermelha, determinada pela mistura dos pigmentos caroteno (amarelo) e licopeno (vermelho) (FILGUEIRA, 1982; MINAMI; HAAG, 1989). Suas sementes são de formato reniforme e pequenas, e possuem pêlos bem curtos. (MINAMI; HAAG, 1989).

O sistema radicular é do tipo pivotante, com cerca de 80% das raízes nos primeiros 45 cm de profundidade (ESPINOZA, et al., 1991). *Solanum lycopersicum* possui uma arquitetura caracterizada por dois tipos de hábito de crescimento: a) crescimento indeterminado, predominante nas cultivares de produção de frutos para mesa, e b) crescimento determinado para o cultivo rasteiro (FILGUEIRA, 1982).

### **1.2.1.3 Exigências climáticas**

Devido a sua origem, a cultura é melhor adaptada ao cultivo em clima tropical de altitude, como o das regiões serranas, e em clima subtropical ou temperado, seco e com alta luminosidade (FILGUEIRA, 1982).

O tomateiro requer temperaturas diurnas amenas e noturnas menores, com diferença de 7-9 °C entre elas. As temperaturas ótimas são 20-25 °C, de dia, e 11-18 °C, de noite, variando dependendo da cultivar. Temperaturas excessivas, diurnas ou noturnas, prejudicam a frutificação e o pegamento dos frutinhos. Temperaturas diurnas amenas favorecem a produtividade e a polinização. Já temperaturas baixas retardam a germinação, emergência da plântula e o crescimento vegetativo (FILGUEIRA, 1982).

### **1.2.1.4 Situação econômica**

A espécie *Solanum lycopersicum* L. é uma das hortaliças mais produzidas e consumidas no mundo, devido a sua adaptabilidade em diversos tipos de clima e pelo consumo do fruto ser tanto *in natura* quanto processado.

No ano de 2016 a produção mundial de tomate foi de 179 milhões de toneladas, sendo que a China, com 31,84% da produção total do fruto, foi o maior produtor, seguida da Índia (10,46%) e Estados Unidos (11,40%). O Brasil ocupa o nono lugar, representando 2,33 % da produção (FAOSTAT, 2016).

Em 2017 o Brasil produziu um total de 4.230.150 toneladas de tomate, ocupando uma área de 61.640 ha, com produtividade média de 68.745kg/ha (IBGE, 2017).

O aumento do consumo do tomate relaciona-se, entre diversos fatores, à consolidação de redes de “*fast food*”, que utilizam o fruto nas formas fresca e processada. E na crescente demanda por alimentos industrializados, molhos pré-preparados ou prontos para o consumo, como “*catchups*” (CARVALHO; PAGLIUCA, 2007; DOMINGUES, 2012).

#### **1.2.1.5 Impactos negativos dos agrotóxicos**

Os agrotóxicos são potencialmente tóxicos para os seres humanos. Podem induzir efeitos adversos para a saúde, incluindo câncer, consequências sobre a reprodução, sistema imunológico e nervoso (ABRASCO, 2015; OMS, 2016). Além desses problemas, a utilização de agrotóxicos promove o desenvolvimento de resistência nos patógenos, devido à pressão de seleção que exerce sobre os mesmos. Cabe ressaltar que no cultivo de tomate é impraticável o cumprimento do período de carência no uso de agrotóxicos, visto que as colheitas ocorrem a cada 2 dias, e na mesma planta de tomate, a partir de 60 a 70 dias do transplante de mudas, tem-se os três estágios de desenvolvimento ocorrendo simultaneamente, ou seja, há cachos de tomate em processo de maturação na primeira penca, há frutos de tomate se desenvolvendo na segunda penca, e mais próximo ao topo estão as flores.

Pragas destrutivas, como a broca grande, entram no fruto na fase de flor, e com isso, no sistema convencional de produção utilizam-se rotineiramente inseticidas. Como as pulverizações são realizadas na planta toda, o inseticida atinge também os frutos em fase de colheita (primeira penca). Essa é a razão porque no cultivo convencional de tomate não se consegue respeitar o período de carência dos agrotóxicos. Além dos inseticidas, utilizam-se fungicidas, acaricidas, herbicidas, bactericidas e nematicidas.

### **1.3 IMPORTÂNCIA DE *Rhizoctonia solani* COMO AGENTE PATOGÊNICO AO TOMATEIRO**

A produção de tomate é limitada por vários fatores, sendo que os fitopatógenos estão entre os que causam os mais sérios riscos à produção. (KIMATI; MINAMI, 1982). *Rhizoctonia solani* é um patógeno de solo de grande importância, causador de perdas em diversas culturas, inclusive hortaliças (LUCON et al., 2009). Esse patógeno tem preferência por atacar tecidos jovens, em pré e pós-emergência, sendo que na pré-emergência não ocorre a germinação, enquanto na pós-emergência o patógeno provoca danos ao caule, na região do

colo da plântula, promovendo uma contração progressiva do mesmo, fazendo com que este venha a tombar (BEDENDO, 1995), razão da doença ser conhecida como *Damping-off*. Segundo Moreira e Siqueira (2006), e Dias, Berbara e Fernandes (2013), os fungos da espécie *Rhizoctonia solani* Kuhn são classificados como fungos imperfeitos, e estão dentro da divisão Deuteromycota, também conhecidos como deuteromicetos. Esses fungos possuem duas características principais, quais sejam, viver da matéria orgânica em decomposição, ou parasitando inúmeras culturas anuais ou permanentes (LUCON, 2008). *Rhizoctonia solani*, geralmente é encontrado na forma micelial, pois não produz esporos e utilizam como forma de sobrevivência no solo a formação de estruturas globulosas denominadas escleródios ou esclerócios (DIAS; BERBARA; FERNANDES, 2013; KRUGNER; BACCHI, 1995). De acordo com Lucon et al. (2009), essas estruturas de resistência permanecem no solo mesmo em presença de condições climáticas adversas, e sobrevivendo por longos períodos.

#### **1.4 *Trichoderma*: CARACTERÍSTICAS GERAIS E ASSOCIAÇÃO COM PLANTAS**

De acordo com Harman et al. (2004a), *Trichoderma* spp. são fungos de vida livre que são comuns em ecossistemas de solo e raízes, e um gênero de fungos que se reproduzem assexuadamente; pertencem a uma classe de fungos benéficos para as plantas, e são comuns na rizosfera (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2009). A maioria das cepas de *Trichoderma* não foi associada a um estado sexual, o que leva a crer que sejam mitótica e clonal (GAMS; BISSET, 1998). Segundo Lorito et al. (2010), o gênero fúngico *Trichoderma* foi originalmente descrito por Persoon em 1794, enquanto a relação entre o *Trichoderma viride* e o ascomiceto *Hypocrea rufa* foi estabelecida em 1865 (TULASNE, L.R.; TULASNE, C., 1865), e a qualidade de Agente de Controle Biológico (ACB), frente a fungos patógenos, foi descoberta na década de 1930 (LORITO et al., 2010).

As taxonomias destes fungos estão sendo revisadas com frequência, e muitas espécies novas estão sendo reconhecidas (HARMAN; HAYES; ONDIK, 1998; KUBICEK; HARMAN, 1998). Segundo Gams e Bisset (1998) o gênero *Trichoderma* é cosmopolita nos solos e na matéria orgânica em decomposição. Diversas espécies de *Trichoderma* são componentes dominantes da microflora do solo, e estão presentes em diferentes biomas. Isto pode ser atribuído à diversidade da capacidade metabólica das espécies de *Trichoderma* e à sua natureza agressivamente competitiva, qualidades estas que conferem vantagens na competição por espaço e nutrientes com outros microrganismos (ELAD, 1996; HARMAN et al., 2004a).

Em meio de cultura a taxa de crescimento de *Trichoderma* spp. é rápida, e há produção de numerosos esporos (conídios) que variam de tonalidades da cor verde, as quais caracterizam os fungos deste gênero. O lado reverso das colônias pode ser incolor, amarelo, âmbar ou amarelo-esverdeado, e muitas espécies produzem grandes quantidades de esporos com paredes espessas (clamidósporos) no micélio submerso ( GAMS; BISSET, 1998).

Pesquisas realizadas por Harman et al. (2004a), revelam que fungos deste gênero promovem a simbiose, são oportunistas, não virulentos, e exercem o micoparasitismo. Ainda segundo esses autores, algumas cepas colonizam as raízes fortemente e mantém uma relação por longo tempo com as mesmas. Nesse processo de colonização esses fungos penetram na epiderme, e aprofundam um nível mais abaixo de células, liberam vários compostos que ativam as respostas de resistências sistêmica e localizada da planta, sem as prejudicarem. Daí porque não são patogênicos às plantas (HARMAN, 2000; HARMAN et al., 2004a; HARMAN, 2006). Quanto a esse processo de colonização, também concordam Lorito et al. (2010), os quais afirmam que algumas cepas de *Trichoderma*, descritas como rizosfera competentes (AHMAD; BAKER, 1987), causam uma infecção assintomática das raízes, onde a colonização do fungo é limitada às regiões corticais externas (LORITO et al., 2010; YEDIDIA; BENHAMOU; CHET, 1999). Nessa simbiose entre microrganismos e raízes, as plantas são protegidas de diferentes patógenos vegetais, por respostas semelhantes às adquiridas em resistência sistêmica induzida (HARMAN, 2000; HARMAN et al., 2004a).

A colonização de raízes por *Trichoderma* spp., em geral também aumenta o crescimento e o desenvolvimento das raízes, melhora a produtividade das culturas, aumenta a resistência aos fatores abióticos, tal como estresse hídrico, bem como otimiza a absorção de nutrientes (HARMAN et al., 2004a). Esses fungos produzem diversas substâncias antibióticas e parasitam outros fungos (HARMAN et al., 2004a). Estes achados estão de acordo com Hermosa et al. (2012), que confirmam que algumas linhagens de *Trichoderma* podem interagir diretamente com as raízes, aumentando o potencial de crescimento das plantas, a resistência às doenças e a tolerância a estresses abióticos. Adicionado a esses benefícios ocorrem também: a) aumento da resistência da planta ao baixo PH do solo e à temperaturas extremas; b) aumento da eficiência da ciclagem do nitrogênio; c) redução da superexpressão de genes de estresse ou acúmulo de compostos tóxicos durante a resposta da planta à patógenos (LORITO et al., 2010; SHORESH; HARMAN; MASTOURI, 2010). Além desses benefícios à planta, segundo Lucon et al. (2009), esse gênero está entre os microrganismos mais resistentes às toxinas e produtos químicos naturais e sintetizados pelo homem, capazes até mesmo de degradar hidrocarbonetos (HARMAN et al., 2004a; HARMAN, 2006; WOO et al., 2006). Outra importante característica

desse gênero é que muitas de suas linhagens são produtoras prolíficas de esporos e de poderosos antibióticos (WOO et al., 2006).

#### **1.4.1. *Trichoderma* spp. como agente de controle biológico**

Há quase 90 anos atrás descobriu-se que *Trichoderma* spp. têm a capacidade de atacar e controlar os fungos patogênicos das plantas (LORITO et al., 2010; WEINDLING; FAWCETT, 1936). Estudos sobre os antagonistas de *Trichoderma* spp. demonstraram o envolvimento de muitas enzimas hidrolíticas (HARMAN et al., 2004a; LORITO et al., 1993), também capazes de agir sinergicamente com antibióticos altamente fungitóxicos (SCHIRMBOCK et al., 1994), e um sistema complexo para detecção de presas fúngicas (ZEILINGER et al., 2005).

Espécies do gênero *Trichoderma* têm sido bastante utilizadas para o controle de diversos fitopatógenos de solo, incluindo *R. solani*, por serem capazes de proteger plantas por diferentes mecanismos de ação (parasitismo, antibiose, competição e indução de resistência), e por colonizarem eficientemente a rizosfera de várias espécies de plantas, incluindo o tomateiro (FONTENELLE, 2011; HARMAN, 2006; MACHADO et al., 2012). Como vantagem adicional, esses microrganismos são referidos como atóxicos ao homem e animais (CARVALHO et al., 2011; MERTZ; HENNING; ZIMMER, 2009), e como simbioses avirulentos associados às plantas (HARMAN et al., 2004a).

Segundo Lucon, Chaves e Bacilieri (2014), as questões envolvendo proteção ao meio ambiente, a demanda crescente por alimentos saudáveis e, principalmente os problemas inerentes ao uso de agrotóxicos, tem despertado em uma parcela dos produtores rurais o interesse por manejos sustentáveis. Ainda segundo esses autores, a utilização de microrganismos como ACB tem contribuído para a redução do uso de agrotóxicos em cultivos convencionais e integrados, em especial o uso *Trichoderma* spp., que são os agentes mais pesquisados e mais empregados na produção agrícola mundial.

Pelo fato de o Brasil e outros países terem como base de sua economia a produção agrícola, aliado à questão da conscientização crescente dos consumidores quanto aos riscos dos resíduos de agrotóxicos nos alimentos, faz com que os ACBs sejam ferramentas indispensáveis a serem utilizadas nos manejos convencional e integrado (LOPES, 2009). Os ACBs levam vantagem sobre os fungicidas químicos, pois atingem alguns nichos onde o controle químico não é capaz de atuar, e porque os agrotóxicos perdem rapidamente seus efeitos em função da seleção natural que promovem nos alvos biológicos, pois quanto mais específico

for o fungicida, mais rapidamente causará resistência aos organismos-alvo. Porém se o agrotóxico não for seletivo, também causará morte aos microrganismos benéficos do solo (HARMAN, 2000).

Em contraste, o uso de microrganismos que antagonizam os patógenos de plantas (controle biológico) é isento de riscos e resultam em aumento de antagonistas residentes (BENÍTEZ et al., 2004). Entretanto, tão somente promover a substituição de um insumo químico por um ACB não é o adequado, o desejável é que ocorra a mudança de manejo da cultura, optando por um manejo preferencialmente agroecológico, ou no mínimo integrado (MORANDI; BETTIOL, 2009). Segundo Howell (2003), um dos destaques da ciência do controle biológico é o estudo dos mecanismos empregados pelos ACBs, que resultam no controle da doença, os quais são diversos e variados, inclusive dentro do gênero *Trichoderma*. Para Benítez et al. (2004), determinadas espécies de *Trichoderma* interferem na vida do fitopatógeno por diversos mecanismos de ação como a competição por espaço e nutrientes, a antibiose, micoparasitismo, a fungistase, a indução de resistência, entre outros.

Os ACBs do gênero *Trichoderma* desenvolveram uma capacidade surpreendente de interagir, parasitaria e simbioticamente com diferentes substratos e organismos vivos, incluindo plantas e microrganismos (KUBICEK; HARMAN, 1998; MONTE, 2001; WOO et al., 2006), e podem utilizar uma vasta variedade de fontes de nutrientes (HARMAN et al., 2004b). Os ACBs de *Trichoderma* controlam fungos ascomicetos, deuteromicetos e basidiomicetos, que são patógenos de solo, mas também transmitidos pelo ar (MONTE, 2001). De acordo com Harman et al. (2004a), os fungos do gênero *Trichoderma* caracterizam-se por serem simbioses de plantas, oportunistas e não virulentos. Monte (2001), complementa ao citar que *Trichoderma* spp. possuem crescimento rápido, produzem muitos esporos e poderosos antibióticos. Ainda segundo esse autor, tais qualidades fazem com que espécies deste gênero obtenham sucesso na ocupação de diferentes biomas, indo desde a Antártica até às regiões desérticas. Dentre os diversos agentes de biocontrole, os do gênero *Trichoderma* destacam-se por serem antagonistas eficazes de uma ampla faixa de fungos fitopatogênicos, inclusive *Rhizoctonia solani*. Segundo Harman et al. (2004a), *Trichoderma* spp. parasitam diversos fungos, e o micoparasitismo é um mecanismo complexo, que ocorre em etapas sendo que inicialmente as cepas de *Trichoderma* detectam outros fungos e crescem tropicamente em direção a eles (CHET; HARMAN; BAKER, 1981); a detecção remota é pelo menos parcialmente devida à expressão sequencial de enzimas degradadoras de parede celular.

Diferentes cepas podem seguir diferentes padrões de indução, mas aparentemente os fungos sempre produzem baixos níveis de exoquitinase extracelular. A

difusão dessa enzima catalisa a liberação de oligômeros de parede celular de fungos alvo, o que induz a expressão de endocitinasas fungitóxicas (BRUNNER et al., 2003), que também difundem e começa o ataque no fungo alvo, antes que o contato seja realmente feito (VITERBO et al., 2002). Uma vez que os fungos entram em contato, *Trichoderma* aproxima-se do hospedeiro e pode enrolá-lo através de apressórios. Em seguida ocorre a dissolução da parede celular do hospedeiro através da liberação de enzimas (HARMAN, 2000; INBAR; MENENDEZ; CHET, 1996). A relação hospedeiro-parasita é caracterizada por um período relativamente longo de contato, que pode ser físico ou metabólico (MELO; FAULL, 2000).

Outro importante mecanismo de biocontrole é a concorrência, a competição por nutrientes, pois muitos fungos fitopatogênicos são sensíveis à falta de alguns nutrientes (BENÍTEZ et al., 2004), e por isso esse é considerado um dos clássicos mecanismos de biocontrole (HARMAN, 2000). Os mecanismos dos ACBs podem agir de forma isolada ou coordenada, mas para que sejam eficazes dependem da cepa do *Trichoderma*, do fungo antagonizado, da espécie a ser cultivada, e das condições ambientais, incluindo a disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura e concentração de ferro (BENÍTEZ et al., 2004). Ainda segundo esses autores a ativação de cada mecanismo implica na produção de compostos e metabólitos específicos. Os bons antagonistas geralmente conseguem superar o efeito fungistático do solo, e condições ambientais extremas (BENÍTEZ et al., 2004)

Segundo Harman et al. (2004a), *Trichoderma* spp. também utilizam o mecanismo da antibiose, que é a produção de metabólitos antifúngicos, inclusive antibióticos, que inibem o crescimento de seus antagonistas. Para Benítez et al. (2004), a colonização implica na capacidade de aderir e reconhecer as raízes das plantas, penetrá-las e resistir a metabólitos tóxicos produzidos pelas plantas em resposta à invasão por um organismo estranho, patógeno ou não. Nisso ganha importância a competência rizosférica, termo que foi introduzido em 1980 por Tex Baker, cuja definição é a capacidade de um microrganismo para crescer e funcionar na rizosfera em desenvolvimento (HARMAN, 2000). Tal fato é fundamental, pois um agente de controle biológico não pode competir por espaço e nutrientes se não for capaz de crescer na rizosfera. Segundo Harman (2000), rizosfera é a área de influência e/ou localização física em volta das raízes, que vão até uma distância de 1 a 3 mm da superfície das mesmas. Daí decorre a importância de que espécies de *Trichoderma* sejam pulverizadas no solo após o plantio, ou durante o período de formação de mudas, ou ainda como tratamento de sementes (HARMAN, 2000; HOWELL et al., 2000).

#### 1.4.2 *Trichoderma* spp. como promotor de crescimento de plantas

Determinadas cepas de *Trichoderma* promovem efeitos positivos no crescimento de plantas (HERMOSA et al., 2012). Em pesquisas conduzidas por Baker, Elad e Chet (1984), e Ya-Chun et al. (1986), constatou-se promoção de crescimento em rabanete, pimenta, pepino e tomate. Segundo Harman (2000), outras pesquisas também demonstraram que *Trichoderma* spp. aumentam o desenvolvimento do sistema radicular, acompanhado de aumentos na proliferação de raízes secundárias, de área foliar, e do peso fresco das plântulas, que por fim resultam em aumento da produtividade.

Em trabalhos realizados por Altomare et al. (1999), constatou-se que *T. harzianum* pode promover a solubilização de vários nutrientes às plantas, enquanto a colonização de raízes de pepino por *T. asperellum* mostrou aumentar a disponibilidade de P e Fe às plantas, com aumentos significativos no peso seco, comprimento da parte aérea e área foliar (YEDIDIA et al., 2001). Tanto na pesquisa acadêmica quanto nas lavouras comerciais, a linhagem de *Trichoderma* T-22 mostrou aumentar o desenvolvimento das raízes no milho e em numerosas outras plantas (HARMAN, 2000; HARMAN et al., 2004b). Essa otimização no desenvolvimento das raízes frequentemente resulta em aumentos na produtividade e na biomassa.

Foram realizados mais de 500 ensaios comerciais e acadêmicos sobre os efeitos do *Trichoderma* T-22 no milho, e o aumento médio da produtividade em relação ao não uso do *Trichoderma* T- 22, foi aproximadamente 5% (HARMAN et al., 2004b). Aumentos no crescimento de plantas também foram observados em outras culturas além do milho (HARMAN, 2000). Segundo HARMAN (2000), HARMAN (2006), e HARMAN et al. (2004b), este efeito de promoção de crescimento de raízes e plantas foi estudado, em especial, com o milho durante 5 a 10 anos pelo Advanced Biological Marketing, pertencente à Universidade de Cornell (USA) e também em outros locais, e mostrou que os benefícios positivos de *Trichoderma* spp. são: a) atuação como ACB através de resistência induzida, e de ataque direto à fitopatógenos; b) Melhor solubilização e absorção de nutrientes no solo; c) quanto às raízes foi observado melhor desenvolvimento, aumento quantitativo de pelos, alteração na composição da microflora, penetração mais profunda no solo e destruição dos metabólitos tóxicos produzidos pela microflora deletéria. Assim sendo, concluem Harman et al. (2004b), o aumento do crescimento das raízes, e as melhorias no crescimento e resistência das plantas, é realizado, provavelmente, por múltiplos mecanismos. Benítez et al. (2004),



relataram que o isolado de *Trichoderma* 2413 estimulou o crescimento de plantas de tomate, tabaco e algodão, além de protegê-las contra diversos patógenos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAL VEGETAL, SUBSTRATO DE CRESCIMENTO E LOCAL DOS EXPERIMENTOS**

Para realização dos experimentos foram utilizadas sementes de *Solanum lycopersicum* da cultivar “Super Marmande”, também conhecido como “Gaucho/Maçã”, oriundos da empresa Isla<sup>®</sup> Sementes Ltda. A semeadura foi realizada em substrato para crescimento de mudas Tropstrato<sup>®</sup> HT Vida Verde em vasos plásticos com capacidade para 500 gramas. Foram semeadas dez sementes por vaso, e posteriormente foi realizado o desbaste para cinco plântulas por vaso. Os experimentos realizados em São Paulo ocorreram na casa de vegetação do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, enquanto em Capão Bonito-SP foram realizados em estufa, na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento (UPD) do Instituto Agrônomo (IAC). Durante o período, as plantas foram irrigadas por microaspersão, em períodos de 7 minutos no verão e 4 minutos no inverno, e com frequência diária de duas regas.

### **2.2 MICRORGANISMOS**

#### **2.2.1. *Rhizoctonia solani***

O isolado de *Rhizoctonia solani* 13/02 PB foi fornecido pelo Prof<sup>o</sup> Dr. César Junior Bueno, Pesquisador Científico do Laboratório de Fitopatologia do Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Sanidade Animal do Instituto Biológico, situado em Campinas-SP. O isolado foi mantido por repicagem sucessiva em meio BDA, à temperatura de 2°C a 4°C, e pelo método Castellani (CASTELLANI, 1964; DHINGRA; SINCLAIR, 1995). Este isolado é oriundo do Instituto Federal de Educação de Pato Branco/PR. Os demais isolados de *Rhizoctonia solani* denominados Alface, Repolho e IB 23/10 são provenientes do laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, enquanto o isolado 22/11 é oriundo de coleção da Micoteca Mário Barreto Figueiredo do Instituto Biológico.

#### **2.2.2 *Trichoderma* spp.**

Para todos os experimentos foram utilizadas cinco culturas monospóricas de *Trichoderma* (Tabela 1) pertencentes à coleção do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica

do Instituto Biológico, que previamente foram testados e considerados bons antagonistas às doenças radiculares do pepineiro. Os isolados foram mantidos por repicagem sucessiva em meio BDA- Batata, Dextrose, Ágar (Acumedia), sob refrigeração. Foram conservados pelos Métodos Castellani e de congelamento a - 20°C em glicerol 13% e em papel filtro. (CASTELLANI, 1964; DHINGRA; SINCLAIR, 1995).

Tabela 1. Procedência dos isolados de *Trichoderma* spp. utilizados nos experimentos.

Isolados	Procedência	Latitude	Longitude
IB 11/12	E. Santo do Pinhal-SP	S 22° 10' 09,5"	W 46° 46' 10,7"
IB 18/03	São José dos Campos-SP	S 23° 09' 07,8"	W 45° 46' 57,2"
IB 19/17	Taubaté-SP	S 22° 59' 56,5"	W 45° 29' 50,5"
IB 30/07	Pedro Barros-SP	S 24° 16' 26,8"	W 47° 24' 54,7"
IB 42/03	Presidente Venceslau-SP	S 21° 51' 55,3"	W 51° 49' 08,9"

## 2.3 PREPARO DOS INÓCULOS

### 2.3.1 Preparo dos inóculos de *Rhizoctonia solani*.

Para o preparo dos inóculos de *Rhizoctonia solani*, foram transferidos assepticamente, e separadamente, três discos com 7 mm de diâmetro de meio de cultura BDA com as estruturas propagativas de cada um dos isolados 13/02 PB, Alface, Repolho, IB 23/10 e IB 22/11 para sacos plásticos de polipropileno transparentes, com capacidade para 300 mL, contendo 100 g de arroz parboilizado e 100 mL de água Milli Q, previamente esterilizados a 121°C a uma atmosfera de pressão, durante uma hora. Os sacos foram fechados parcialmente, com duas dobras na parte superior, e grampeados em cada uma das laterais superiores. Em seguida as culturas foram incubadas em câmara B.O.D a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas, pelo período de sete dias (PAPAVIZAS, 1982). Durante o período de incubação, os sacos com arroz colonizados foram revolvidos manualmente todos os dias para otimizar a aeração e a distribuição dos micélios, bem como para propiciar o aumento da superfície de contato do fungo com os grãos de arroz.

### 2.3.2 Preparo dos inóculos de *Trichoderma* spp.

Para o preparo dos inóculos de *Trichoderma* spp., foram transferidos assepticamente, e separadamente, três discos com 7 mm de diâmetro de meio de cultura BDA

com as estruturas propagativas de cada um dos isolados, sendo *T. lentiforme* IB 11/12 e IB 30/07, *T. koningiopsis* IB 18/03, *T. camerunense* IB 19/17, e *T. endophyticum* IB 42/03 para sacos plásticos de polipropileno transparentes, com capacidade para 500 mL, contendo 100 g de arroz e 100mL de água Milli Q, previamente esterilizados a 121 °C, a uma atmosfera de pressão, durante uma hora. Posteriormente, as culturas foram incubadas em câmara B.O.D. a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas, pelo período de sete dias (PAPAVIZAS, 1982). Os sacos foram fechados parcialmente, com duas dobras na parte superior, e grampeados em cada uma das laterais superiores. O arroz colonizado foi revolvido manualmente todos os dias para otimizar a aeração e a distribuição das estruturas de propagação dos fungos, bem como para propiciar o aumento da superfície de contato do fungo com os grãos de arroz.

#### **2.4 TESTE DE PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Rhizoctonia solani***

No Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico em São Paulo-SP, cinco isolados de *Rhizoctonia solani*, conforme mencionados no item 2.2.1, tiveram seus inóculos transferidos, separadamente, para sacos plásticos de polipropileno contendo 1.500 mL de substrato Tropstrato<sup>®</sup> HT, na proporção de 1,0% do volume e umedecido a 70,0% da capacidade de campo. A incubação foi realizada em câmara de temperatura controlada à 25°C, durante quinze dias, sendo os sacos revolvidos manualmente todos os dias para promover aeração e melhor dispersão dos inóculos no substrato. Após esse período foram distribuídos 500 g do substrato infestado em cada vaso plástico e, em seguida, foi realizada a semeadura de dez sementes de tomate da cultivar Super Marmande. As avaliações quantitativas quanto às plantas tombadas (*Damping-off*) foram realizadas a cada dois dias, por sessenta dias, durante os meses de setembro e outubro de 2017. O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. Foi realizado o Teste Kruskal-Wallis complementado com o teste de múltiplas comparações de Dunn com 5 % de probabilidade. O Programa computacional utilizado foi o GraphPad<sup>®</sup> InStat, versão 3.10 – julho/2009.

#### **2.5 EXPERIMENTOS DE BIOCONTROLE, *Rhizoctonia solani* VERSUS *Trichoderma* spp.**

Foram realizados três experimentos de controle biológico de *R. solani* por isolados de *Trichoderma* spp. na UPD do Instituto Agrônômico, em Capão Bonito-SP, nos meses de março a maio de 2018. A avaliação foi baseada no número de plantas tombadas, em

relação ao tratamento controle sem a aplicação de microrganismos, e a testemunha inoculada só com o patógeno.

Os inóculos de *R. solani* e de *Trichoderma* spp. foram preparados conforme descrito nos itens 2.3.1 e 2.3.2, respectivamente. Em sacos plásticos de polipropileno foram colocados 1.500 mL de substrato para produção de mudas marca Tropstrato<sup>®</sup> HT Vida Verde, e, em seguida, adicionados 15g (1,0%) de inóculo de cada isolado de *Trichoderma*, separadamente, e 7,5 g (0,5%) de inóculo de *R. solani* 13/02 PB. A umidade foi ajustada para 70% da capacidade de campo. A incubação da mistura foi realizada em câmara de temperatura controlada à 25°C, por quinze dias. As misturas foram revolvidas manualmente todos os dias para promover aeração e a melhor dispersão dos fungos no substrato. Após esse período, o substrato colonizado foi distribuído em vasos plásticos com 500 g cada, e em seguida foi feita a semeadura de dez sementes de tomate por vaso, com posterior desbaste para deixar cinco plantulas por vaso. As avaliações foram realizadas pela contagem do número de plantas tombadas (*Damping-off*), a cada dois dias. O período de avaliação foi de dois meses pós-semeadura. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento.

A análise dos dados foi realizada através do Teste Kruskal-Wallis complementado com o teste de múltiplas comparações de Dunn com 5% de probabilidade. O Programa computacional utilizado foi o GraphPad<sup>®</sup> InStat, versão 3.10 – julho/2009.

### **2.5.1 Quantificação de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Trichoderma* spp.**

A capacidade de sobrevivência de *Trichoderma* spp. até o final do experimento do item anterior, foi analisada pela quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC) no substrato de crescimento das plantas de cada tratamento. As cinco amostras de substrato foram retiradas na profundidade de 5 cm de cada vaso, dos sete tratamentos. O volume resultante das amostras coletadas em três repetições de cada tratamento, cerca de 20 g, foi homogeneizado e 10 g foi submetido à técnica de diluição seriada. Alíquotas de 100 µl da série de diluições foram plaqueadas em meio BDA, com estreptomicina (0,03 g.L<sup>-1</sup>) e ampicilina (0,17 g L<sup>-1</sup>), mais Triton X100 (0,1%) como redutor de colônias. Em seguida, as culturas foram mantidas em B.O.D a 25 ± 2°C, com fotoperíodo de 12 h, por 5 a 7 dias. Após esse período, realizou-se a contagem do número de colônias de *Trichoderma* spp. formadas (PAPAVIZAS, 1982).

Os resultados das contagens foram expressos em UFC g<sup>-1</sup> da amostra, levando-se em conta a diluição empregada, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$R = a \cdot 10^b \text{ UFC g}^{-1}$$

Onde:

R= resultado

a= média do número de colônias encontradas por repetição

b= expoente da diluição

## **2.6 EXPERIMENTOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TOMATE POR *Trichoderma* spp**

Dois experimentos de promoção de crescimento de plantas de tomate foram realizados em São Paulo (março à maio de 2017) e um em Capão Bonito (março à maio de 2018).

Os inóculos de *Trichoderma* spp. foram preparados conforme descrito no item 2.3.2. Em sacos plásticos de polipropileno foram colocados 1.500 mL de substrato para produção de mudas marca Tropstrato<sup>®</sup> HT Vida Verde, e, em seguida, adicionados 15g de inóculo de cada isolado de *Trichoderma*, separadamente. A umidade foi ajustada para 70% da capacidade de campo. A incubação da mistura foi realizada em câmara de temperatura controlada à 25°C, por quinze dias. As misturas foram revolvidas manualmente todos os dias para promover aeração e a melhor dispersão dos fungos no substrato. Decorrido esse período, 500 gramas do substrato colonizado, de cada isolado, foi distribuído por vaso plástico, sendo cinco repetições por tratamento. Em seguida, foi feita a semeadura de tomate “Super Marmande”. O período de duração do experimento foi de dois meses pós-semeadura, sendo que ao final foi colhida a parte aérea das plantas de cada repetição para avaliação da massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA). A desidratação foi realizada em sacos de papel em estufa a 65-70°C até a obtenção da massa de matéria seca constante. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, cinco repetições por tratamento. A análise de dados foi realizada através do Teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação de médias. O programa computacional utilizado foi o SASM - Agri (CANTERI et al., 2001).

## **2.7 EXPERIMENTO DE PAREAMENTO DE CULTURAS, *Trichoderma* spp. VERSUS *Rhizoctonia solani*, IN VITRO**

O experimento foi realizado no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico em São Paulo, no mês de dezembro de 2018. Foram utilizados um isolado

de *Rhizoctonia solani* (13/02 PB), e cinco de *Trichoderma* spp. descritos no item 2.2.2. Na técnica de pareamento foram confrontados, um a um, em meio de cultura BDA, os isolados de *Trichoderma* IB 11/12, IB 18/03, IB 19/17, IB 30/07 e IB 42/03 com o isolado de *Rhizoctonia solani* 13/02 PB. As culturas dos fungos foram depositadas sobre meio BDA em placas de Petri, em posição frontal, sendo colocado de um lado um disco de 5 mm de diâmetro de meio BDA com as estruturas de um isolado de *Trichoderma* sp., e de outro, um disco de 5 mm de meio BDA com o isolado de *Rhizoctonia solani* 13/02 PB. Ambas as culturas, antagonista e patógeno, ficaram distantes, aproximadamente, 1 cm da borda da placa. Para cada tratamento foram feitas cinco repetições, inclusive para o tratamento controle, onde foram depositados sobre o meio somente o isolado de *Rhizoctonia solani* 13/02 PB.

Em seguida, as culturas foram incubadas em B.O.D a 25°C pelo período de sete dias, com fotoperíodo luz-escuro de 12 horas. Foram utilizadas duas metodologias para avaliação do experimento, sendo uma baseada na escala de Bell (BELL; WELLS; MARKHAM, 1982), que estabelece o grau de antagonismo através de notas variando em uma série de 1 a 5, sendo nota 1, crescimento de *Trichoderma* sobre o patógeno, ocupando toda a superfície do meio; nota 2 - crescimento de *Trichoderma*, ocupando mais de 2/3 da superfície do meio; nota 3 - crescimento de *Trichoderma*, ocupando aproximadamente metade da superfície do meio; nota 4 - crescimento de *Trichoderma*, ocupando 1/3 da superfície do meio e nota 5 - ausência de crescimento de *Trichoderma*, patógeno ocupando toda a superfície do meio.

Considerou-se o isolado como antagônico ou eficiente quando sua nota era menor ou igual a 2 (dois). A outra avaliação realizada foi pela medida do raio de crescimento das colônias do fitopatógeno (em mm), utilizando-se um paquímetro. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de comparação de médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SASM- Agri (CANTERI et al., 2001). Os dados foram transformados em  $(x+0,5)^{1/2}$ .

## **2.8 EFEITO DE CINCO TEMPERATURAS NO CRESCIMENTO DE DOIS ISOLADOS DE *Trichoderma* spp., EM MEIO BDA**

O experimento em referência foi realizado no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico em São Paulo, no mês de dezembro de 2018.

Neste experimento foram utilizados os isolados de *Trichoderma* spp. IB 11/12 e IB 18/03. Discos de 5 mm de diâmetro de meio BDA, contendo as estruturas de crescimento

dos dois isolados de antagonistas, foram depositados, separadamente, no centro de placas de Petri, contendo meio BDA. Em seguida, foram incubadas em câmaras climatizadas sob as temperaturas de 15°C, 20°C, 25°C, 30°C e 35°C por até 11 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, cinco repetições por tratamento. A avaliação foi realizada pela medida (mm) do crescimento dos raios das colônias de cada isolado, até que cobrisse toda a superfície do meio, através da utilização um paquímetro.

As análises dos dados obtidos foram realizadas por comparação de médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SASM- Agri (CANTERI et al., 2001).

Para avaliar a produção de conídios das culturas nas diferentes temperaturas, foram adicionadas solução esterilizada de 10 ml de água Milli-Q com tween 80 a 0,1% por placa de Petri contendo as culturas crescidas. Com o auxílio de uma alça de Drigalski, a superfície do meio contendo a cultura crescida foi levemente raspada para que ocorresse o desprendimento dos conídios. Em seguida foi removida, com auxílio de uma pipeta milimetrada, 10 ml da suspensão de conídios e transferida para um tubo de ensaio esterilizado, correspondendo à diluição  $10^{-1}$ . Na sequência, foi realizada a técnica de diluição seriada até a diluição  $10^{-2}$ . A concentração dos esporos foi determinada com o auxílio de câmara de Neubauer. A contagem de conídios ao microscópio óptico foi realizada no aumento de 250X ou 400X, nos campos 1 e 2, nos cinco quadrantes, conforme a metodologia de Bettioli et al. (2012), totalizando cinco contagens por campo (E1, E2, E3, E4 e E5). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância e ao teste de Tukey a 1% de probabilidade para a comparação de médias das leituras do número de conídios por tratamento, três repetições, utilizando-se o programa computacional SASM- Agri (CANTERI et al., 2001).



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 EXPERIMENTO DE PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Rhizoctonia solani*

Pelos dados apresentados nas tabelas 2 e 3, e figura 1, observa-se que o único isolado de *Rhizoctonia solani* que destacou-se dos demais isolados quanto à patogenicidade, visto ter provocado o tombamento de 36 plantas (72%), em relação às plantas do tratamento testemunha sem a inoculação de microrganismos, foi o isolado *Rhizoctonia solani* 13/02 PB.

Tabela 2: Número de plantas tombadas de tomate cultivar Super Marmande, cultivados em vasos contendo substrato infestado ou não com diferentes isolados de *Rhizoctonia solani*. São Paulo – SP. 2017.

Resultados	Controle Branco	Diferentes isolados de <i>Rhizoctonia solani</i>				
		Alface	Repólho	13/02 PB	IB 22/11	IB 23/10
<b>Soma</b> <sup>1</sup>	2,0	1,0	4,0	36,0	1,0	2,0
<b>Mediana</b>	0 a	0 a	1 a	8 b	0 a	0 a

<sup>1</sup>Dados originais de número de plantas tombadas em função de incidência de diferentes isolados de *Rhizoctonia solani*.

Letras iguais significam que os tratamentos não diferiram entre si, segundo o Teste Kruskal-Wallis complementado com o teste de múltiplas comparações de Dunn's com 5% de probabilidade.

Tabela 3: Mediana ± semi-amplitude interquartílica de número de plantas tombadas de tomate cultivar Super Marmande, relativo a cada tratamento do experimento da tabela acima. São Paulo – SP. 2017.

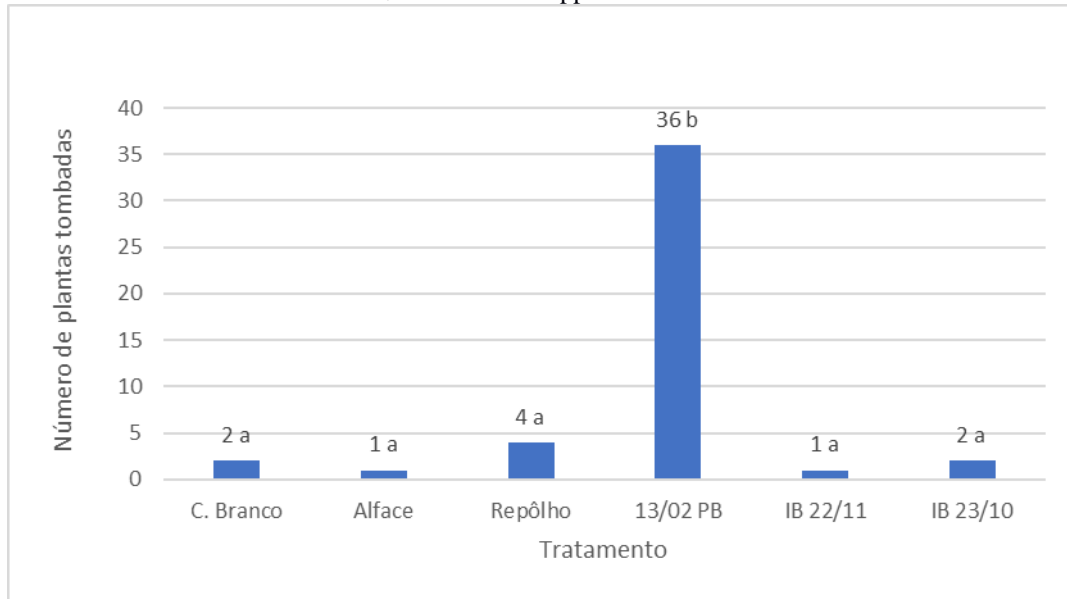
Tratamentos	Mediana <sup>1</sup> ± Semi-amplitude interquartílica
Controle Branco	0,0 ± 0,5 a
<i>R. solani</i> Alface	0,0 ± 0,5 a
<i>R. solani</i> Repólho	1,0 ± 1,0 a
<i>R. solani</i> 13/02 PB	8,0 ± 2,5 b
<i>R. solani</i> IB 22/11	0,0 ± 0,5 a
<i>R. solani</i> IB 23/10	0,0 ± 1,0 a

<sup>1</sup>Médiana ± semi-amplitude interquartílica de plantas tombadas de tomate cultivar Super Marmande, oriundas de vasos contendo substrato infestado ou não com diferentes isolados de *Rhizoctonia solani*.

Letras iguais significam que os tratamentos não diferiram entre si, segundo o Teste Kruskal-Wallis complementado com o teste de múltiplas comparações de Dunn's com 5% de probabilidade.

A figura 1 mostra graficamente o número de plantas tombadas de tomate e as diferenças significativas do isolado *R.solani* 13/02 PB frente aos demais isolados de *Rhizoctonia solani* testados.

Figura 1: Número de plantas tombadas de tomate oriundas de vasos contendo substrato infestado ou não com diferentes isolados de *Rhizoctonia solani* spp. São Paulo – SP. 2017.



Letras iguais significam que os tratamentos não diferiram entre si, segundo o Teste Kruskal-Wallis complementado com o teste de múltiplas comparações de Dunn's com 5% de probabilidade.

Segundo Botelho, Rava e Leandro (2001), *Rhizoctonia solani* é um fungo cosmopolita, com um vasto número de hospedeiros, incluindo o tomateiro.

A variabilidade fitopatogênica em *Rhizoctonia solani* foi relatada por Medeiros et al. (2015), onde referiu-se à mesma como um fungo que possui população extremamente variada, com muitos biótipos que diferem quanto à patogenicidade, conforme constatado no presente experimento.

Segundo Silva-Barreto et al. (2010), isolados patogênicos específicos de solanáceas são do grupo de anastomose três (AG-3), sendo, ainda, subdividido em dois subgrupos: AG-3 PT que causa doenças associadas ao sistema radicular em batata, tomate e berinjela, e AG-3 TB, que causa mancha foliar em fumo. Estes dois subgrupos diferem quanto à biologia, patogenicidade e epidemiologia. Já o AG-4 não é tão específico quanto o AG-3, podendo causar podridão de sementes, *damping off* de pré e de pós-emergência e, ocasionalmente, podridão de raízes em diversas culturas, incluindo tomate e batata. Portanto, os isolados utilizados no ensaio que não se mostraram patogênicos à cultura, provavelmente não pertencem ao AG-3 ou a outros grupos de anastomose menos específicos, mas capazes de causar danos ao tomateiro. Ou ainda, por terem sido mantidos por muitos anos pelo método de repicagem sucessivas podem ter perdido a patogenicidade ao longo do tempo.

Os sintomas de doença observados nas plantas de tomate no decorrer do experimento foram a necrose e uma posterior podridão do colo, seguido de tombamento, em conformidade com as observações feitas por Yangui et al. (2008), e De Curtis et al. (2010).

### 3.2 EXPERIMENTOS DE BIOCONTROLE, *Rhizoctonia solani* VERSUS *Trichoderma* spp.

#### Experimento de biocontrole nº 1

No Experimento de biocontrole nº 1, realizado em Capão Bonito – SP, onde foram inoculados simultaneamente *Rhizoctonia solani* 13/02 PB e cada um dos cinco isolados de *Trichoderma* spp. no substrato de crescimento de plantas, as menores incidências de tombamento e as maiores porcentagens de controle foram observadas nas parcelas tratadas com os isolados IB11/12 e IB18/03, com 100% de controle da doença (Tabela 4, Tabela 5, Figura 2) e diferença significativa em relação à testemunha, cujo substrato foi infestado apenas com o patógeno. Observa-se, ainda, que os resultados para os tratamentos mencionados foram semelhantes aos do controle branco. Por outro lado, os isolados IB19/17, IB30/07 e IB42/03 não diferiram significativamente em relação à testemunha, embora tenham apresentado porcentagens de controle de 90%, 70% e 90%, respectivamente.

Tabela 4: Número de plantas de tomate tombadas (cultivar Super Marmande), cultivadas em vasos contendo substrato inoculado, ou não, simultaneamente com *Rhizoctonia solani* - *R.s* (Isolado 13/02 PB) e diferentes isolados de *Trichoderma* spp.. Experimento de biocontrole nº 1 realizado em Capão Bonito – SP. 2018.

Tratamento	Média <sup>2</sup>	Porcentagem de controle	Mediana <sup>3</sup>
Controle branco (sem <i>R.s</i> <sup>1</sup> )	0	100	0 a
Testemunha ( <i>R.s</i> )	2	0	1 b
<i>R.s</i> + IB11/12	0	100	0 a
<i>R.s</i> + IB18/03	0	100	0 a
<i>R.s</i> + IB19/17	0,2	90	0 ab
<i>R.s</i> + IB30/07	0,6	70	0 ab
<i>R.s</i> + IB42/03	0,2	90	0 ab

<sup>1</sup> *R.s*: *Rhizoctonia solani* isolado 13/02 PB.

<sup>2</sup> Média do número de plantas tombadas em função de incidência de *Rhizoctonia solani* 13/02 PB.

<sup>3</sup> Medianas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste Kruskal-Wallis complementado com o teste de múltiplas comparações de Dunn com 5% de probabilidade.

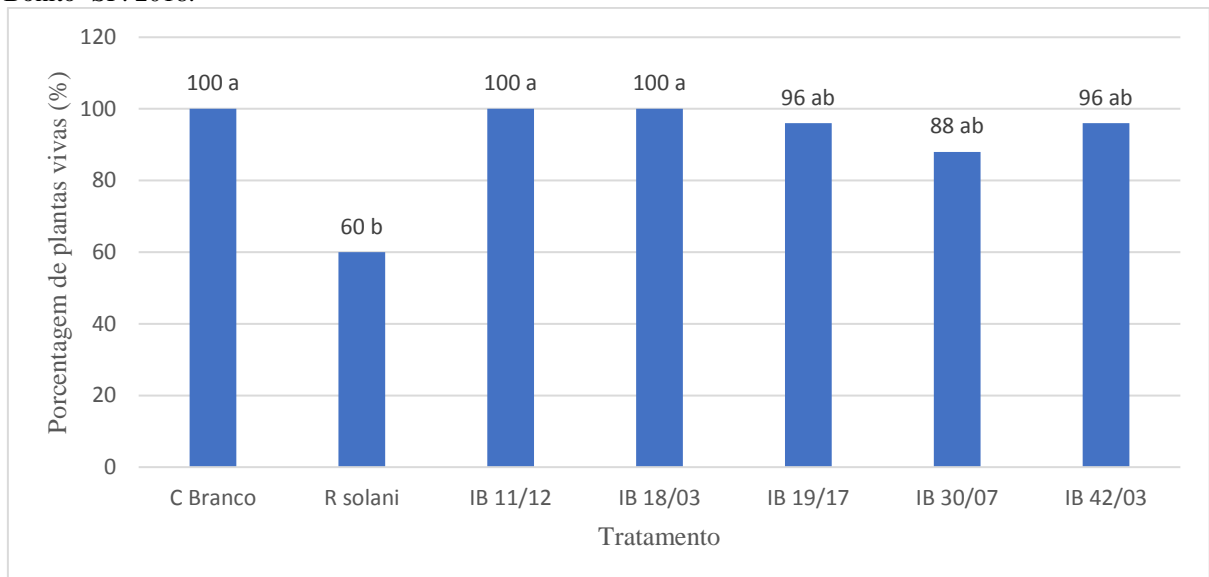
Tabela 5: Resultado de cada tratamento composto pela mediana  $\pm$  semi-amplitude interquartílica do número de plantas de tomate tombadas (cultivar Super Marmande), do Experimento de biocontrole n° 1 realizado em Capão Bonito – SP. 2018.

Tratamentos	Mediana $\pm$ semi-amplitude interquartílica
Controle branco (sem <i>R.s</i> <sup>1</sup> )	0,0 $\pm$ 0,0 a
Testemunha ( <i>R.s</i> <sup>1</sup> )	1,0 $\pm$ 2,5 b
<i>R.s</i> + IB11/12	0,0 $\pm$ 0,0 a
<i>R.s</i> + IB18/03	0,0 $\pm$ 0,0 a
<i>R.s</i> + IB19/17	0,0 $\pm$ 0,5 ab
<i>R.s</i> + IB30/07	0,0 $\pm$ 1,0 ab
<i>R.s</i> + IB42/03	0,0 $\pm$ 0,5 ab

<sup>1</sup>*R.s.*: *Rhizoctonia solani* isolado 13/02 PB.

Letras iguais não diferem pelo Teste Kruskal-Wallis complementado com o teste de múltiplas comparações de Dunn com 5% de probabilidade.

Figura 2: Porcentagem de plantas vivas de tomate (cultivar Super Marmande) cultivadas em vasos contendo substrato inoculado simultaneamente com *Rhizoctonia solani* (isolado 13/02 PB) e diferentes isolados de *Trichoderma* sp., além da presença do controle branco. Experimento n° 1 de biocontrole realizado em Capão Bonito- SP. 2018.



\* Letras iguais significam que não houve diferença entre os tratamentos, segundo o Teste de Tukey a 5%. Dados transformados em arcsen  $[(X/100)^{1/2}]$ . C.V.= 21,55%.

## Experimento de biocontrole n° 2

No Experimento de biocontrole n° 2, os isolados IB11/12, IB18/03, IB19/17, IB30/07 e IB42/03 reduziram significativamente o tombamento de plantas de tomate, sendo estatisticamente semelhantes ao controle branco. Os níveis de controle desses isolados variaram entre 87 e 93% e proporcionaram as maiores porcentagens de plantas vivas (Tabela 6, Tabela 7, e Figura 3).

Tabela 6: Número de plantas de tomate tombadas (cultivar Super Marmande), cultivadas em vasos contendo substrato inoculado simultaneamente com *Rhizoctonia solani* - *R.s* (isolado 13/02 PB) e diferentes isolados de *Trichoderma* spp..Experimento n° 2 de biocontrole realizado em Capão Bonito – SP. 2018.

Tratamento	Média <sup>2</sup>	Porcentagem de controle	Mediana <sup>3</sup>
Controle branco (sem <i>R.s</i> <sup>1</sup> )	0	100	0 a
Testemunha ( <i>R.s</i> )	3	0	3 b
<i>R.s</i> + IB11/12	0,4	87	0 a
<i>R.s</i> + IB18/03	0,4	87	0 a
<i>R.s</i> + IB19/17	0,2	93	0 a
<i>R.s</i> + IB30/07	0,2	93	0 a
<i>R.s</i> + IB42/03	0,4	87	0 a

<sup>1</sup> *R.s*: *Rhizoctonia solani* isolado 13/02 PB.

<sup>2</sup> Média do número de plantas tombadas em função de incidência de *Rhizoctonia solani*.

<sup>3</sup> Medianas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste Kruskal-Wallis complementado com o teste de múltiplas comparações de Dunn com 5% de probabilidade.

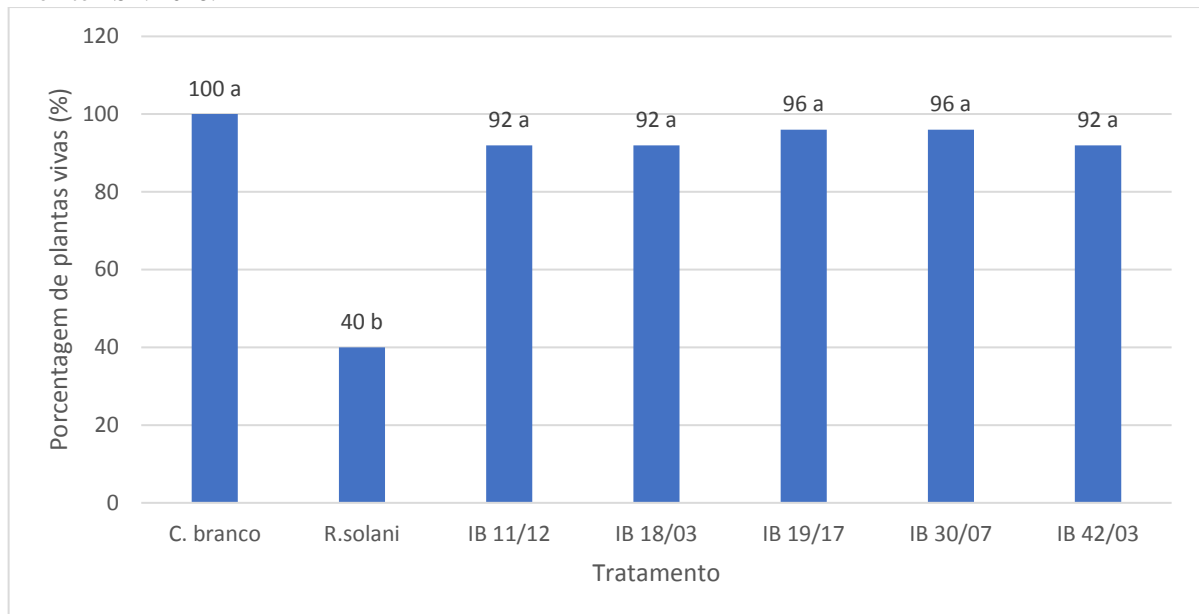
Tabela 7: Resultado de cada tratamento composto pela mediana  $\pm$  semi-amplitude interquartílica do número de plantas de tomate tombadas (cultivar Super Marmande), do Experimento de biocontrole n° 2 realizado em Capão Bonito – SP. 2018.

Tratamentos	Mediana $\pm$ Semi-amplitude interquartílica
Controle Branco (sem <i>R.s</i> <sup>1</sup> )	0,0 $\pm$ 0,0 a <sup>2</sup>
Testemunha ( <i>R.s</i> )	3,0 $\pm$ 2,0 b
<i>R.s</i> + IB11/12	0,0 $\pm$ 1,0 a
<i>R.s</i> + IB18/03	0,0 $\pm$ 1,0 a
<i>R.s</i> + IB19/17	0,0 $\pm$ 0,5 a
<i>R.s</i> + IB30/07	0,0 $\pm$ 0,5 a
<i>R.s</i> + IB42/03	0,0 $\pm$ 1,0 a

<sup>1</sup>*R.s*:*Rhizoctonia solani* isolado 13/02 PB.

<sup>2</sup>Letras iguais não diferem pelo Teste Kruskal-Wallis complementado com o teste de múltiplas comparações de Dunn com 5% de probabilidade.

Figura 3: Porcentagem de plantas vivas de tomate (cultivar Super Marmande) cultivadas em vasos contendo substrato inoculado simultaneamente com *Rhizoctonia solani* (isolado 13/02 PB), e diferentes isolados de *Trichoderma* sp., além da presença do controle branco. Experimento n° 2 de biocontrole realizado em Capão Bonito - SP. 2018.



\* Letras iguais significam que não houve diferença entre os tratamentos, segundo o Teste de Tukey a 5%. Dados transformados em  $\arcsen [(X/100)^{1/2}]$ . C.V. = 20,28%.

### Experimento de biocontrole nº 3

No experimento nº 3, o isolado IB30/07 reduziu o número de plantas tombadas e proporcionou a maior porcentagem de controle e plantas vivas, sendo semelhante ao controle branco. Os demais isolados de *Trichoderma* sp. não diferiram da testemunha, embora o controle tenha sido de 83%, 92%, 92% e 50% para os isolados IB 11/12, IB 18/03, IB 19/17 e IB 42/03 respectivamente.

Tabela 8: Número de plantas de tomate tombadas (cultivar Super Marmande), cultivadas em vasos contendo substrato inoculado, ou não (c. branco) simultaneamente com *Rhizoctonia solani* - *R.s* (isolado 13/02 PB), e diferentes isolados de *Trichoderma* spp.. Experimento nº 3 de biocontrole realizado em Capão Bonito – SP. 2018.

Tratamento	Média <sup>2</sup>	Porcentagem de controle	Mediana <sup>3</sup>
Controle branco (sem <i>R.s</i> <sup>1</sup> )	0	100	0 a
Testemunha ( <i>R.s</i> )	2,4	0	1b
<i>R.s</i> + IB11/12	0,4	83	0 ab
<i>R.s</i> + IB18/03	0,2	92	0 ab
<i>R.s</i> + IB19/17	0,2	92	0 ab
<i>R.s</i> + IB30/07	0	100	0 a
<i>R.s</i> + IB42/03	1,2	50	0 ab

<sup>1</sup> *R.s.*: *Rhizoctonia solani* isolado 13/02 PB.

<sup>2</sup> Média do número de plantas tombadas em função de incidência de *Rhizoctonia solani*

<sup>3</sup> Medianas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste Kruskal-Wallis complementado com o teste de múltiplas comparações de Dunn com 5% de probabilidade.

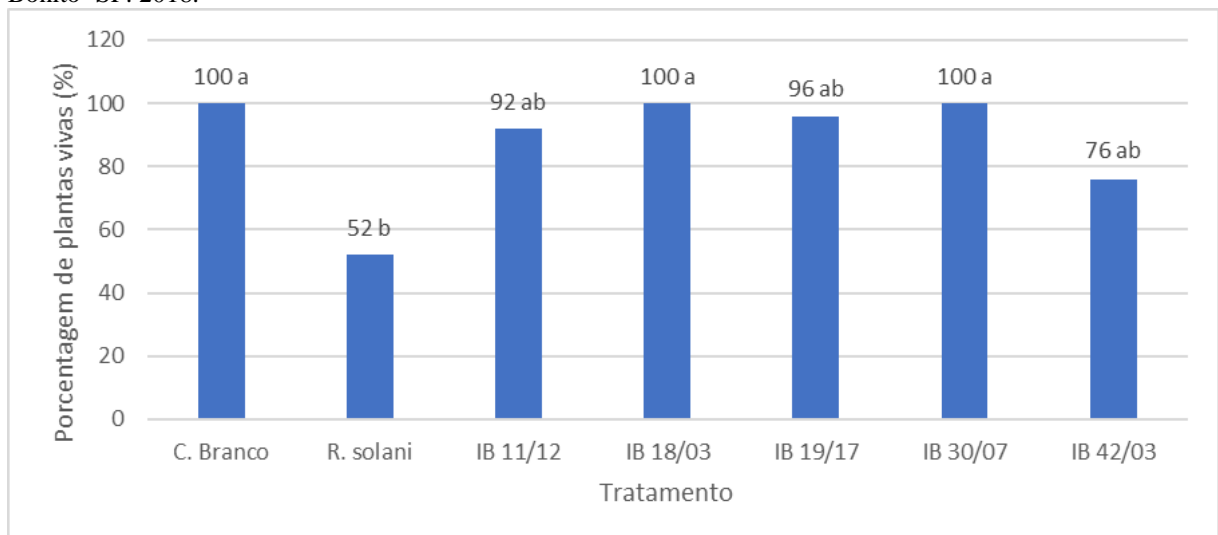
Tabela 9: Resultado de cada tratamento composto pela mediana  $\pm$  semi-amplitude interquartílica do número de plantas de tomate tombadas (cultivar Super Marmande), do Experimento de biocontrole nº 3 realizado em Capão Bonito – SP. 2018.

Tratamentos	Mediana $\pm$ Semi-amplitude interquartílica
Controle Branco (sem R.s <sup>1</sup> )	0,0 $\pm$ 0,0 a
Testemunha (R. s <sup>1</sup> )	1,0 $\pm$ 2,0 b
R. s + IB11/12	0,0 $\pm$ 1,0ab
R. s + IB18/03	0,0 $\pm$ 0,5ab
R. s + IB19/17	0,0 $\pm$ 0,5ab
R. s + IB30/07	0,0 $\pm$ 0,0 a
R. s + IB42/03	0,0 $\pm$ 2,5 ab

<sup>1</sup>R.s: *Rhizoctonia solani* isolado 13/02 PB

Letras iguais não diferem pelo Teste Kruskal-Wallis complementado com o teste de múltiplas comparações de Dunn com 5% de probabilidade.

Figura 4: Porcentagem de plantas vivas de tomate (cultivar Super Marmande), cultivadas em vasos contendo substrato inoculado simultaneamente com *Rhizoctonia solani* (isolado 13/02 PB), e diferentes isolados de *Trichoderma* sp., além da presença do controle branco. Experimento nº 3 de biocontrole realizado em Capão Bonito- SP. 2018.



\* Letras iguais significam que não houve diferença entre os tratamentos, segundo o Teste de Tukey a 5%. Dados transformados em  $\arcsen [(X/100)^{1/2}]$ . C.V. = 27,06%.



Referente aos três experimentos de controle biológico descritos acima, com inoculação simultânea de *R. solani* 13/02 PB, e diferentes isolados de *Trichoderma* spp., realizados em Capão Bonito, SP, os isolados testados apresentaram níveis de controle que variaram de 50% a 100% (Tabela 10), o que permite inferir que apresentaram competência de colonização rizosférica.

Tabela 10: Variação de porcentagem de controle de *R. solani* 13/02 PB por *Trichoderma* spp. apresentada nos experimentos de biocontrole de números 1, 2 e 3, com ausência e presença de inoculação simultânea em substrato para crescimento de mudas, realizado em Capão Bonito, SP. 2018.

Isolados	Porcentagem de controle
IB11/12	83 a 100 %
IB18/03	87 a 100%
IB19/17	90 a 93%
IB30/07	70 a 100%
IB42/03	50 a 90%

Os frutos do tomate são difíceis de serem produzidos por ser a cultura sujeita a muitas doenças, exigindo cuidados intensivos por parte dos produtores. Dentre as doenças, o tombamento de plantas causado por *R. solani* é uma das mais importantes. Segundo Goulart (2016), o tratamento de sementes com fungicidas tem sido a medida mais empregada e eficiente para o controle de *R. solani*, portanto considerado estratégico no manejo da doença. No entanto, a crescente preocupação com o meio ambiente e a saúde humana tem aumentado significativamente a procura por insumos para a substituição, ou diminuição do uso de agrotóxicos nas últimas décadas (CAMPANHOLA; BETTIOL, 2003). Nesta busca, o controle biológico é uma das alternativas mais promissoras e as espécies de *Trichoderma* desempenham um papel importante no controle de fitopatógenos de plantas, especialmente os de solo (HA, 2010).

O grande potencial de isolados de *Trichoderma* no controle de *R. solani* pôde ser constatado no trabalho realizado. Todos os isolados testados para o controle do tombamento em tomateiro apresentaram porcentagens de redução na morte das plantas que variaram entre 50% e 100%. Porcentagens semelhantes de controle da doença em tomateiro foram obtidas por Sales (2011), entre 75 e 100%, quando utilizou cinco isolados de *Trichoderma* spp. (1.611, 2.121, 1.439-B, 2.130 e 1.599). Montealegre et al. (2010), também observaram a capacidade de três mutantes de *T. harzianum* no controle de *R. solani*, em dois cultivares de tomate. Três, dos seis mutantes testados, preveniram a mortalidade de plantas da cv. 92.95 em 100% e na cv. Gondola em 40%, em ensaios em casa de vegetação. Os pesquisadores constataram que, além

da redução da mortalidade das plantas, houve um aumento no desenvolvimento, peso fresco e seco das plantas. Já Lewis e Lumsden (2001), observaram a redução da incidência de tombamento causado por *R. solani* por dois isolados de *Trichoderma* spp. nas culturas de abóbora, berinjela, pepino e repolho.

Segundo Harman et al. (2004a), Harman (2006), e Woo et al. (2006), espécies de *Trichoderma* são muito utilizadas no biocontrole de patógenos do solo, uma vez que ocupam o mesmo ambiente e colonizam com eficiência o sistema radicular das plantas, agindo por competição, indução de resistência, antibiose e parasitismo.

### 3.2.1 Quantificação de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Trichoderma* spp.

#### Unidades formadoras de colônias do Experimento de biocontrole nº1

Tendo em vista os resultados apresentados na tabela 11, os isolados IB 42/03 e IB 19/17 apresentaram as maiores contagens de UFC, quais sejam, respectivamente  $35,3 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup> e  $26,3 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup>. Embora, os outros três isolados também tenham sido capazes de sobreviver no substrato de crescimento até o final do experimento.

Esses resultados confirmaram a capacidade de colonização de *Trichoderma* spp. no substrato onde as plantas de tomateiros foram crescidas.

Tabela 11: Número de unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) de substrato comercial Tropstrato® HT Vida Verde, ao final do experimento em casa de vegetação, para cinco isolados de *Trichoderma* spp.. Referente ao experimento de biocontrole nº 1, realizado em Capão Bonito-SP. 2018.

Isolados <sup>1</sup>	UFC g <sup>-1</sup> (conídios x 10 <sup>4</sup> ) <sup>2</sup>
Controle branco	-----
<i>R. solani</i> 13/02 PB	-----
IB11/12	12,7
IB18/03	20,0
IB19/17	26,3
IB30/07	15,0
IB42/03	35,3

<sup>1</sup>Isolados de *Trichoderma* sp crescidos em grãos de arroz incorporados ao substrato.

<sup>2</sup>Número de unidades formadoras de colônia no substrato de cultivo.

### Unidades formadoras de colônias do Experimento de biocontrole n°2

Conforme os resultados da tabela 12, os isolados IB 19/17 e IB 18/03 apresentaram os maiores valores de UFC, quais sejam, respectivamente  $22,7 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup> e  $21,3 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup>, embora os outros três também tenham sobrevivido até o final do experimento. Esses resultados confirmaram a capacidade de colonização de *Trichoderma* spp. no substrato onde as plantas de tomateiros foram crescidas.

Tabela 12: Número de unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) de substrato comercial Tropstrato® HT Vida Verde, ao final do experimento em casa de vegetação, para cinco isolados de *Trichoderma* spp.. Referente ao Experimento de biocontrole n° 2, realizado em Capão Bonito-SP. 2018.

Isolados <sup>1</sup>	UFC g <sup>-1</sup> (conídios x 10 <sup>4</sup> ) <sup>2</sup>
Controle branco	-----
<i>R.solani</i> 13/02 PB	-----
IB11/12	13,0
IB18/03	21,3
IB19/17	22,7
IB30/07	13,0
IB42/03	16,7

<sup>1</sup>Isolados de *Trichoderma* sp. crescidos em grãos de arroz incorporados ao substrato.

<sup>2</sup>Número de unidades formadoras de colônia no substrato de cultivo.

### Unidades formadoras de colônias do Experimento de biocontrole n°3

Da mesma forma que nos dois experimentos anteriores, todos os isolados de *Trichoderma* sp. permaneceram presentes no substrato onde as plantas de tomateiros foram crescidas. Os resultados quanto ao número de UFCs foram  $20,0 \times 10^4$ ,  $18,0 \times 10^4$ ,  $17,7 \times 10^4$ ,  $17,3 \times 10^4$  e  $11,7 \times 10^4$  para os isolados IB 30/07, IB 42/03, IB 11/12, IB 18/03 e IB 19/17, respectivamente.

Tabela 13: Número de unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) de substrato comercial Tropstrato® HT Vida Verde, ao final do experimento em casa de vegetação, para cinco isolados de *Trichoderma* spp. Referente ao experimento de biocontrole n° 3, realizado em Capão Bonito-SP. 2018.

Isolados <sup>1</sup>	UFC g <sup>-1</sup> (conídios x 10 <sup>4</sup> ) <sup>2</sup>
Controle branco	-----
<i>R.solani</i> 13/02 PB	-----
IB11/12	17,7
IB18/03	17,3
IB19/17	11,7
IB30/07	20,0
IB42/03	18,0

<sup>1</sup> Isolados de *Trichoderma* sp. crescidos em grãos de arroz incorporados ao substrato.

<sup>2</sup> Número de unidades formadoras de colônia no substrato de cultivo.

Esses resultados confirmaram a capacidade de colonização e sobrevivência dos isolados de *Trichoderma* spp. nos substratos de crescimento de plantas de tomateiro.

### 3.3 EXPERIMENTO DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TOMATE POR *Trichoderma* spp.

#### Experimento de promoção de crescimento n° 1

Pelos dados da tabela 14 e Tabela 15, e figuras 5 e 6, pode-se observar que houve diferença significativa no crescimento das plantas tratadas com os isolados IB 11/12 e IB 18/03 em relação ao controle branco. As porcentagens de ganho de crescimento foram de 222,73% e 245,45%, respectivamente. Quanto aos demais tratamentos, embora não tenham diferido significativamente do Controle branco, promoveram ganhos de crescimento superiores a 100%.

Tabela 14: Massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA), em gramas, de plantas de tomate cultivar Super Marmande, oriundas de vasos contendo substrato inoculado ou não, com diferentes isolados de *Trichoderma* (Tch). Experimento nº 1 de promoção de crescimento. Capão Bonito – SP. 2018.

Tratamento	Soma <sup>1</sup> MMSPA (gramas)	Média <sup>2</sup> da MMSPA (gramas)	Aumento de crescimento das plantas <sup>3</sup> (%)
Controle branco <sup>4</sup> (sem Tch)	0,110	0,022 a <sup>5</sup>	0
IB11/12	0,355	0,071 b	222,73
IB18/03	0,381	0,076 b	245,45
IB19/17	0,270	0,054 ab	145,45
IB30/07	0,241	0,048 ab	118,18
IB42/03	0,189	0,047 ab	113,64

<sup>1</sup>Soma da massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA), das plantas (em gramas), de cinco repetições.

<sup>2</sup>Média da MMSPA de cinco repetições.

<sup>3</sup>Porcentagem de aumento de crescimento em relação à média da testemunha.

<sup>4</sup>Sem aplicação de *Trichoderma* spp..

<sup>5</sup>Dados originais transformados em  $(x + 0,5)^{1/2}$ .

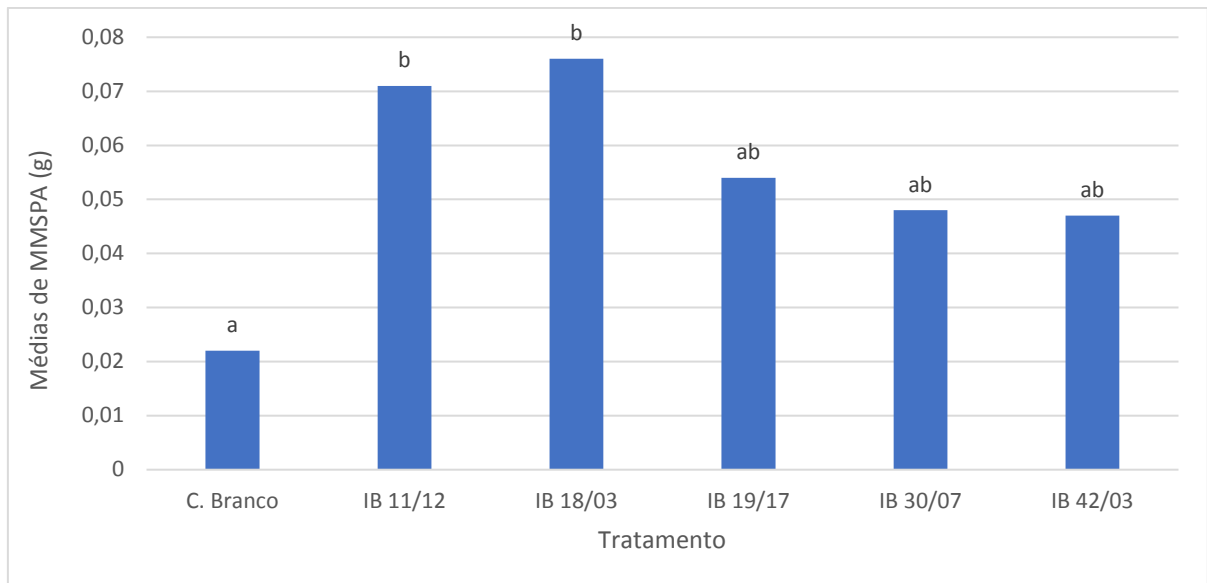
Letras iguais significam que os tratamentos não diferiram entre si, segundo o Teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 15: Média de massa de matéria seca da parte aérea  $\pm$  Erro Padrão, em gramas, de plantas de tomate cultivar Super Marmande, oriundas de vasos contendo substrato para crescimento de mudas, inoculado ou não com diferentes isolados de *Trichoderma* spp.. Experimento nº 1 de Promoção de crescimento. Capão Bonito – SP. 2018.

Tratamento	Média de MMSPA <sup>1</sup> $\pm$ Erro Padrão <sup>2</sup>
C. branco (sem Tch)	0,022 $\pm$ 0,006 a
IB11/12	0,071 $\pm$ 0,013 b
IB18/03	0,076 $\pm$ 0,007 b
IB19/17	0,054 $\pm$ 0,010 ab
IB30/07	0,048 $\pm$ 0,008 ab
IB42/03	0,047 $\pm$ 0,009 ab

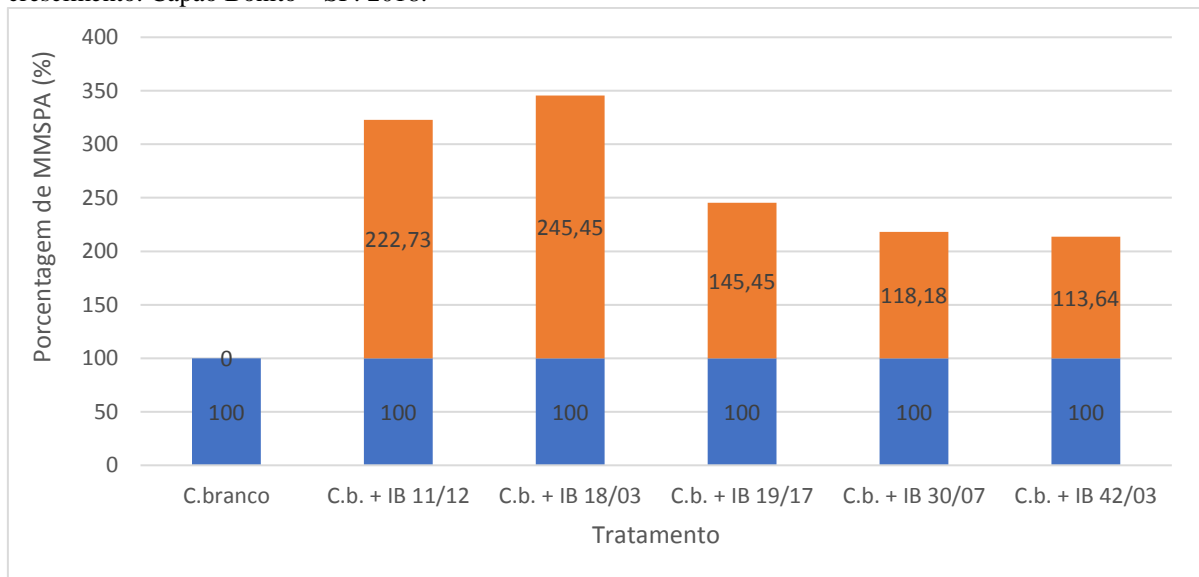
<sup>1</sup>Média da massa de matéria seca da parte aérea de cinco repetições de plantas de tomate, cultivar Super Marmande, onde os dados originais de cada repetição foram transformados em  $(x + 0,5)^{1/2}$ . <sup>2</sup>Erro Padrão da média de MMSPA (gramas), de cada tratamento.

Figura 5: Efeito de cinco isolados de *Trichoderma* spp. na média da MMSPA (gramas) de plantas de tomateiro (cultivar Super Marmande), dois meses após o plantio das sementes, em casa de vegetação. Experimento n° 1 de Promoção de crescimento. Capão Bonito – SP. 2018.



\*Letras iguais significam que os tratamentos não diferiram entre si, segundo o Teste Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 6: Porcentagens de ganhos de MMSPA de cada tratamento, em relação à média do tratamento controle branco (C.b.), referentes às plantas de tomate, cultivar Super Marmande. Experimento n°1 de promoção de crescimento. Capão Bonito – SP. 2018.



## Experimento de promoção de crescimento n° 2

Observando-se os dados das Tabelas 16 e 17, e das Figuras 7 e 8, constata-se que alguns tratamentos diferiram entre si ( $P > 0,05$ ). Os isolados IB18/03, IB19/17 e IB42/03 diferiram significativamente do tratamento Controle branco, com aumentos na massa de

matéria seca de 214,71%, 111,76% e 108,82%, respectivamente. Os resultados com os isolados IB 11/12 e IB 30/07 não diferiram em relação à testemunha.

Tabela 16: Massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA), em gramas, de plantas de tomate cultivar Super Marmande, oriundas de vasos contendo substrato inoculado ou não, com diferentes isolados de *Trichoderma* (Tch). Experimento nº 2 de promoção de crescimento. São Paulo – SP. 2018.

Tratamento	Soma <sup>1</sup> MMSPA (gramas)	Média <sup>2</sup> da MMSPA (gramas)	Aumento de crescimento das plantas <sup>3</sup> (%)
Controle branco <sup>4</sup> (sem Tch)	0,178	0,036 c <sup>5</sup>	0
IB11/12	0,172	0,034 c	5,88
IB18/03	0,535	0,107 a	214,71
IB19/17	0,360	0,072 b	111,76
IB30/07	0,160	0,032 c	5,88
IB42/03	0,357	0,071 b	108,82

<sup>1</sup>Soma da massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA), das plantas (em gramas), de cinco repetições.

<sup>2</sup>Média da MMSPA de cinco repetições.

<sup>3</sup>Porcentagem de aumento de crescimento em relação à média da testemunha.

<sup>4</sup>Sem aplicação de *Trichoderma* spp..

<sup>5</sup>Dados originais transformados em  $(x + 0,5)^{1/2}$ .

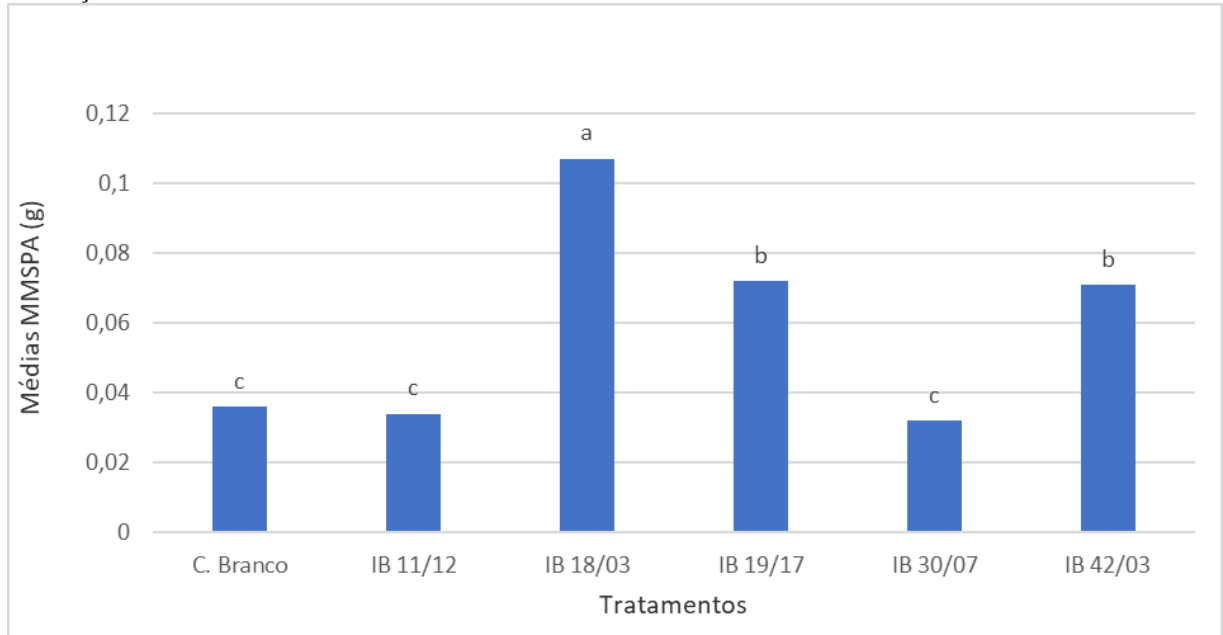
Letras iguais significam que os tratamentos não diferiram entre si, segundo o Teste Tukey a 5% de probabilidade

Tabela 17: Média de massa de matéria seca da parte aérea ± Erro Padrão, em gramas, de plantas de tomate cultivar Super Marmande, oriundas de vasos contendo substrato para crescimento de mudas, inoculado ou não com diferentes isolados de *Trichoderma*. Experimento nº 2 de Promoção de crescimento. São Paulo – SP. 2018.

Tratamento	Média de MMSPA <sup>1</sup> ± Erro Padrão <sup>2</sup>
Controle branco (sem Tch)	0,036 ± 0,002 c
IB11/12	0,034 ± 0,004 c
IB18/03	0,107 ± 0,007 a
IB19/17	0,072 ± 0,006 b
IB30/07	0,032 ± 0,005 c
IB42/03	0,071 ± 0,006 b

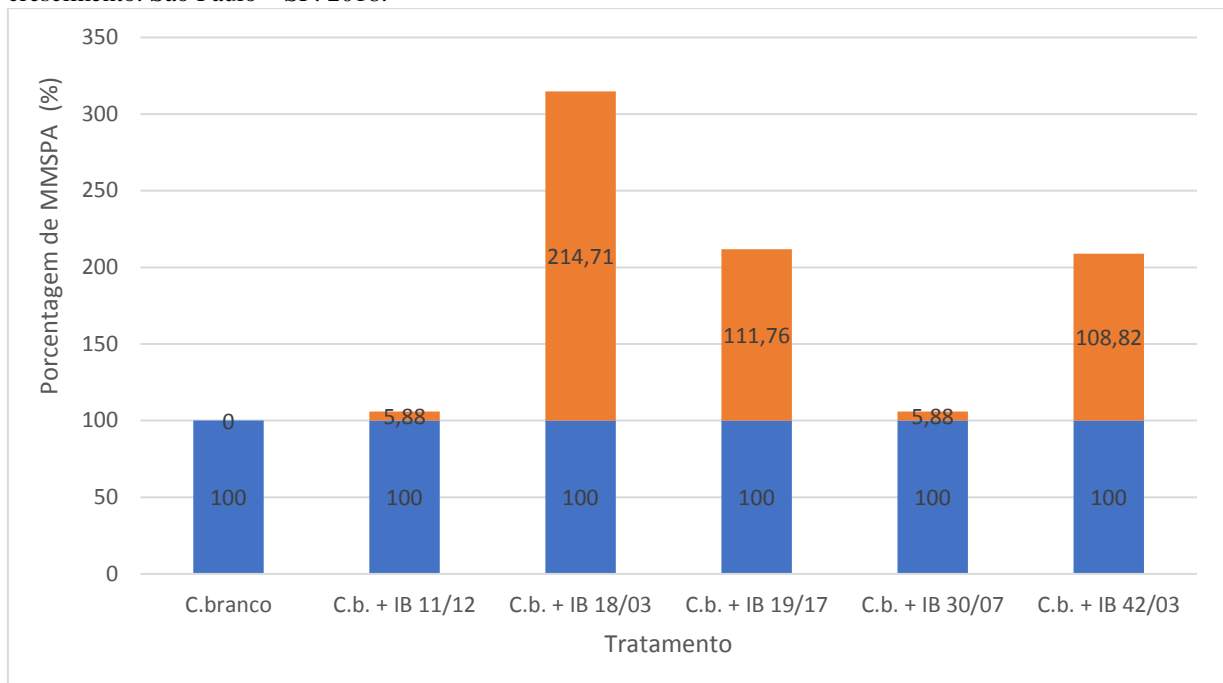
<sup>1</sup>Média da massa de matéria seca da parte aérea de cinco repetições de plantas de tomate, cultivar Super Marmande, onde os dados originais de cada repetição foram transformados em  $(x + 0,5)^{1/2}$ . <sup>2</sup>Erro Padrão da média de MMSPA (gramas), de cada tratamento.

Figura 7: Efeito de cinco isolados de *Trichoderma* spp. na média da MMSPA (gramas), de plantas de tomateiro (cultivar Super Marmande), dois meses após o plantio das sementes, em casa de vegetação. Experimento n° 2 de Promoção de crescimento. São Paulo – SP. 2018.



\*Letras iguais significam que os tratamentos não diferiram entre si, segundo o Teste Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 8: Porcentagens de ganhos de MMSPA de cada tratamento, em relação à média do tratamento controle branco (C.b.), referentes às plantas de tomate, cultivar Super Marmande. Experimento n° 2 de promoção de crescimento. São Paulo – SP. 2018.



### Experimento de promoção de crescimento n° 3



Observando-se os dados das Tabelas 18 e 19, e das Figuras 9 e 10, constata-se que alguns tratamentos diferiram entre si ( $P > 0,05$ ). O isolado IB 18/03 diferiu significativamente do Controle branco. Embora os isolados IB 19/17 e IB 42/03 não tenham diferido estatisticamente da testemunha, apresentaram aumentos na massa de matéria seca da parte aérea em 64,10% e 94,87%, respectivamente.

Tabela 18: Massa da matéria seca da parte aérea (MMSPA), em gramas, de plantas de tomate cultivar Super Marmande, oriundas de vasos contendo substrato inoculado ou não com diferentes isolados de *Trichoderma* (Tch). Experimento n° 3 de promoção de crescimento. São Paulo – SP. 2018.

Tratamento	Soma <sup>1</sup> (MMSPA) (gramas)	Média <sup>2</sup> da MMSPA (gramas)	Aumento de crescimento das plantas <sup>3</sup> (%)
Controle branco <sup>4</sup> (sem Tch)	0,195	0,039 b <sup>5</sup>	0
IB11/12	0,215	0,043 ab	10,26
IB18/03	0,427	0,085 a	117,95
IB19/17	0,320	0,064 ab	64,10
IB30/07	0,200	0,040 b	2,56
IB42/03	0,381	0,076 ab	94,87

<sup>1</sup>Soma da massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA), das plantas (em gramas), de cinco repetições.

<sup>2</sup>Média da MMSPA de cinco repetições.

<sup>3</sup>Porcentagem de aumento de crescimento em relação à média da testemunha.

<sup>4</sup>Sem aplicação de *Trichoderma* spp..

<sup>5</sup>Dados originais transformados em  $(x + 0,5)^{1/2}$ .

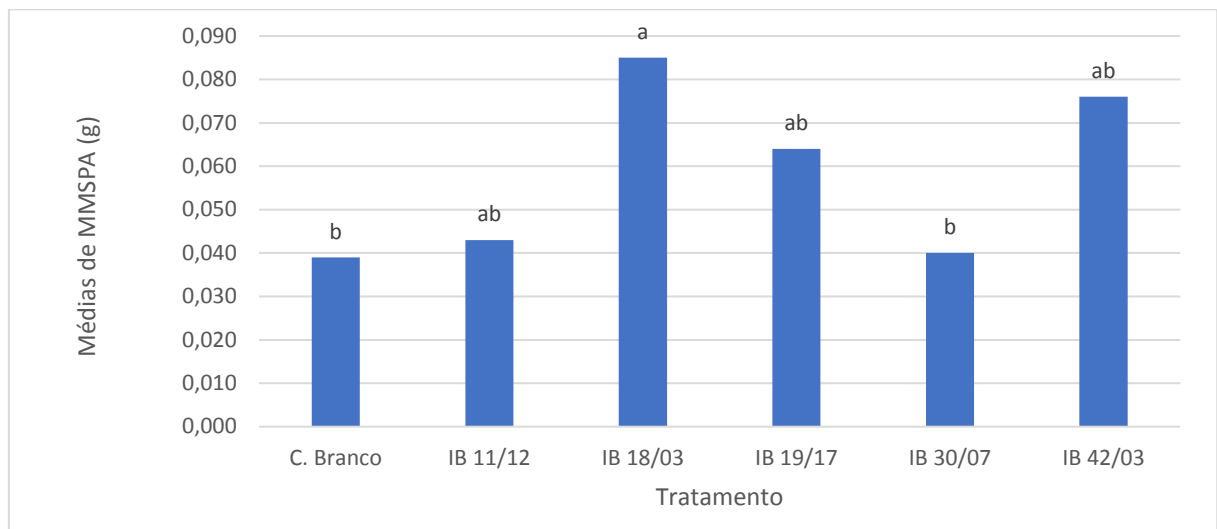
Letras iguais significam que os tratamentos não diferiram entre si, segundo o Teste Tukey a 5% de probabilidade

Tabela 19: Média de massa de matéria seca da parte aérea  $\pm$  Erro Padrão, em gramas, de plantas de tomate cultivar Super Marmande, oriundas de vasos contendo substrato para crescimento de mudas, inoculado ou não com diferentes isolados de *Trichoderma*. Experimento n° 3 de Promoção de crescimento. São Paulo – SP. 2018.

Tratamento	Média de MMSPA <sup>1</sup> (g) $\pm$ Erro Padrão <sup>2</sup>
C. branco (sem Tch)	0,039 $\pm$ 0,006 b
IB11/12	0,043 $\pm$ 0,006 ab
IB18/03	0,085 $\pm$ 0,012 a
IB19/17	0,064 $\pm$ 0,012 ab
IB30/07	0,040 $\pm$ 0,005 b
IB42/03	0,076 $\pm$ 0,010 ab

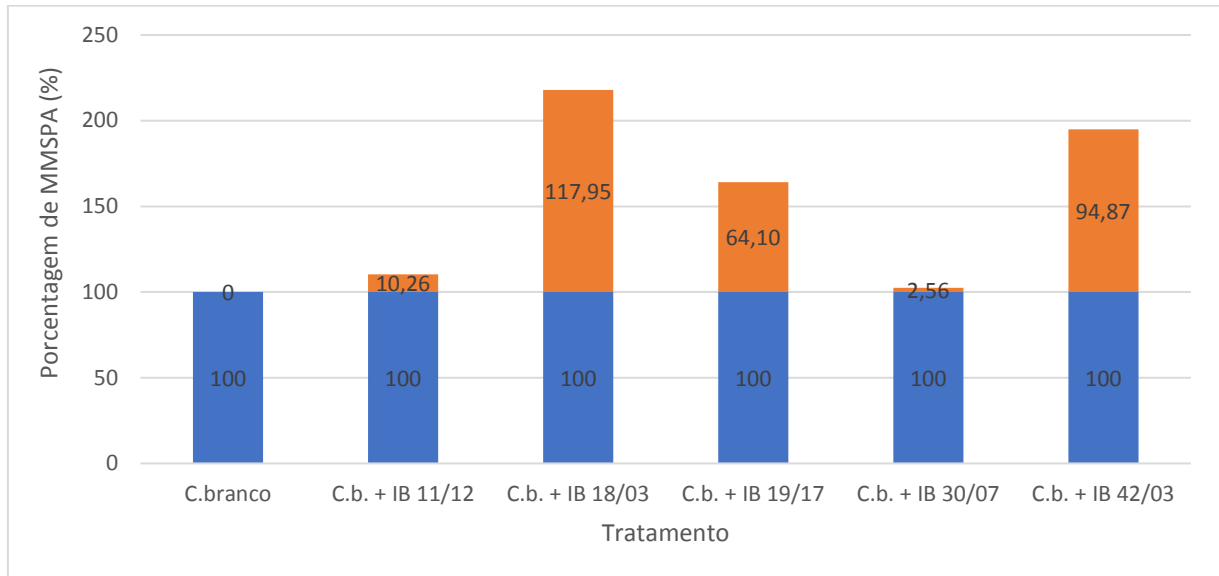
<sup>1</sup>Média da massa de matéria seca da parte aérea de cinco repetições de plantas de tomate, cultivar Super Marmande, onde os dados originais de cada repetição foram transformados em  $(x + 0,5)^{1/2}$ . <sup>2</sup>Erro Padrão da média de MMSPA (gramas), de cada tratamento.

Figura 9: Efeito de cinco isolados de *Trichoderma* spp. na média da MMSPA (gramas), de plantas de tomateiro (cultivar Super Marmande), dois meses após o plantio das sementes, em casa de vegetação. Experimento n° 3 de Promoção de crescimento. São Paulo – SP. 2018.



\*Letras iguais significam que os tratamentos não diferiram entre si, segundo o Teste Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 10: Porcentagens de ganhos de MMSPA de cada tratamento, em relação à média do tratamento controle branco (C.b.), referentes às plantas de tomate, cultivar Super Marmande. Experimento nº 3 de promoção de crescimento. São Paulo – SP. 2018.



Conforme os resultados apresentados nos experimentos de Promoção de Crescimento, destacaram-se o isolado IB18/03 nos três experimentos, e os isolados IB 11/12 no primeiro e IB 19/17 e IB 42/03 no segundo experimento, o que os qualificam como os mais promissores para promoção de crescimento em tomateiro.

Tabela 20: Resultados dos experimentos números 1, 2 e 3 de promoção de crescimento de tomateiro, cultivar Super Marmande, em ausência e em presença de diferentes isolados de *Trichoderma* spp.

Nº do ensaio	Melhores tratamentos <sup>1</sup>
1	IB 11/12 e IB 18/03
2	IB 18/03, IB 19/17 e IB 42/03
3	IB 18/03

<sup>1</sup>Tratamentos com *Trichoderma* spp. que apresentaram diferença significativa em relação ao Controle Branco.

Esses resultados estão de acordo com Hermosa et al. (2012) que confirmam que algumas linhagens de *Trichoderma* podem interagir diretamente com as raízes, aumentando o crescimento das plantas. Para Harman et al. (2004a) e Harman et al. (2004b), *Trichoderma* otimiza a absorção de nutrientes, melhorando o desenvolvimento vegetativo das plantas.

Segundo Machado et al. (2012), os mecanismos de ação dos fungos promotores do crescimento vegetal são específicos e podem variar conforme o ambiente, disponibilidade de nutrientes e interferência de outros microrganismos. A promoção do crescimento por isolados de *Trichoderma* pode estar relacionada ao controle de fitopatógenos (MELO, 1996), à

disponibilização e/ou aumento na captação e translocação de nutrientes pelas raízes da planta, influenciados pela microbiota presente, e produção de hormônios ou outros fatores de crescimento (ALTOMARE et al., 1999; KLEIFELD; CHET, 1992). Hoyos-Carvajal, Orduz e Bisset (2009), avaliaram a produção de metabólitos por 101 isolados de *Trichoderma* spp. Constataram a produção de ácido indolacético (AIA) ou análogos da auxina por 60% das cepas estudadas, 20% delas foram capazes de produzir formas solúveis de fosfato de rocha fosfática, e 8% mostraram capacidade de produzir sideróforos que são agentes quelantes de ferro.

### **3.4 ISOLADOS PROMISSORES COMO ACB E COMO PROMOTOR DE CRESCIMENTO PARA O TOMATEIRO**

Pelo resumo dos seis experimentos realizados em cultivo protegido (Controle Biológico e Promoção de Crescimento) acima descritos, pode-se constatar que os isolados que apresentaram diferença significativa em relação à testemunha foram, para o controle biológico, os isolados IB11/12, IB18/03, IB19/17, IB30/07 e IB 42/03, enquanto para promoção de crescimento de tomateiro foram os isolados IB11/12, IB18/03, IB19/17 e IB 42/03.

### **3.5 EXPERIMENTO DE PAREAMENTO DE CULTURAS, *Trichoderma* spp. VERSUS *Rhizoctonia solani*, IN VITRO.**

#### **3.5.1 Avaliação de isolados de *Trichoderma* spp. versus *Rhizoctonia solani*, in vitro, baseada na escala de Bell.**

Pelos dados apresentados na Tabela 21, pode-se constatar que os isolados de *Trichoderma* IB 11/12, IB 19/17, IB 30/07 e IB 42/03 ocuparam praticamente toda a superfície da placa, crescendo sobre *R. solani* 13/02 PB, recebendo a nota 1 da escala de Bell (BELL; WELLS; MARKHAM,1982). Quanto ao isolado IB 18/03, ocupou aproximadamente metade da superfície da placa, recebendo nota 3. Esse teste demonstrou que quatro dos isolados de *Trichoderma* são antagonistas ao patógeno porque, de acordo com escala de Bell (BELL; WELLS; MARKHAM,1982), as médias das notas apresentadas foram menores que dois.

Tabela 21: Notas com base nas médias obtidas pela escala de Bell (BELL; WELLS; MARKHAM, 1982), em cultivo dual entre cinco isolados de *Trichoderma* spp. e o patógeno *Rhizoctonia solani* isolado 13/02 PB. São Paulo – SP. 2018.

Avaliação <sup>1</sup>	Classificação Escala de Bell <sup>2</sup>				
	IB 11/12	IB 18/03	IB 19/17	IB 30/07	IB 42/03
Notas	1	3	1	1	1

<sup>1</sup>Decorridos 7 dias após início do experimento.

<sup>2</sup>Classificação média de cinco repetições para cada tratamento de acordo com a escala de Bell (BELL; WELLS; MARKHAM, 1982).

Os resultados apresentados estão de acordo com Elias, Arcos e Arbeláez (1993), que fizeram o teste de pareamento entre 17 isolados de *Trichoderma* e dois patógenos, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*. Segundo esses autores, foi constatado maior antagonismo sobre *Rhizoctonia solani*, sendo que todos os isolados de *Trichoderma* reduziram de forma considerável o desenvolvimento do patógeno, além de esporularem abundantemente sobre a colônia do patógeno. Remuska e Dalla Pria (2007), em testes de cultivo pareado, constataram que *Trichoderma* spp. exerceu controle significativo sobre *Sclerotium rolfsii*, embora não tenha impedido a formação de escleródios. Isaias et al. (2014), testaram 20 isolados de *Trichoderma* spp. contra *S. rolfsii* e *Verticillium dahliae*, e constataram a inibição do crescimento micelial dos isolados dos fitopatógenos, sendo que o isolado CEN691 (*Trichoderma harzianum*) apresentou grau máximo (classe 1) de antagonismo da escala de Bell (BELL; WELLS; MARKHAM, 1982), contra esses fitopatógenos. Os autores Hoyos-Carvajal et al. (2008), realizaram testes *in vitro* de confrontamento com oito isolados de *Trichoderma*, e demonstraram que todos foram antagônicos a *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*.

### 3.5.2 Avaliação de crescimento de *Rhizoctonia solani* na presença de *Trichoderma* spp., com base na medida do diâmetro de crescimento das colônias, em milímetros.

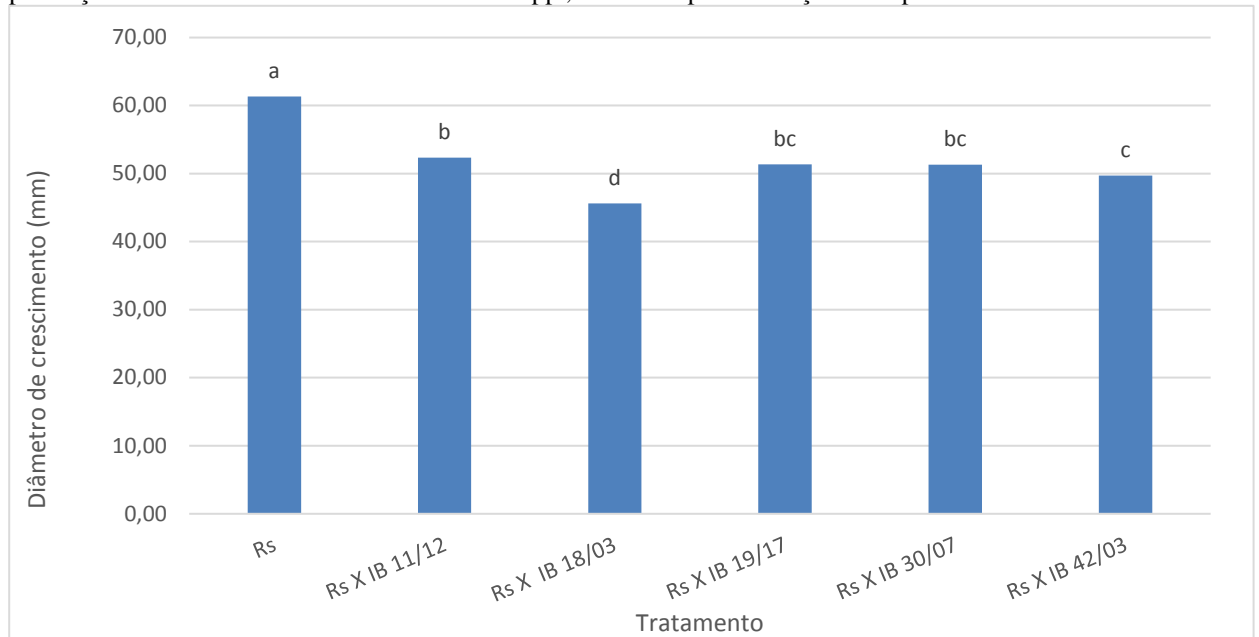
A análise estatística ratificou que todos os isolados de *Trichoderma* spp. testados tiveram diferença significativa em relação ao tratamento controle, sendo o isolado IB18/03 o que causou maior inibição no crescimento das colônias do isolado *Rhizoctonia solani* 13/02 PB.

Tabela 22: Avaliação de crescimento (mm), de colônias de *Rhizoctonia solani*, isolado 13/02 PB, em presença e em ausência de diferentes isolados de *Trichoderma* spp. São Paulo – SP. 2018.

Isolado	Médias de crescimento <sup>1</sup> (mm)
<i>R. solani</i> 13/02 PB <sup>2</sup>	61,36 a
IB11/12	52,34 b
IB18/03	45,61 d
IB19/17	51,37 bc
IB30/07	51,30 bc
IB42/03	49,70 c

<sup>1</sup>Experimento de competição entre *Trichoderma* spp. e *R.solani* 13/02 PB com leitura realizada no 3º dia. <sup>2</sup>Presença somente do patógeno *Rhizoctonia solani* 13/02 PB.

Figura 11: Medidas de diâmetro de crescimento (mm), de colônias de *R. solani* 13/02PB (Rs), em ausência e em presença de diferentes isolados de *Trichoderma* spp., ao 3º dia após instalação do experimento. São Paulo - SP. 2018.



Letras iguais significam que os tratamentos não diferiram entre si, segundo o Teste de Tukey a 5%.

Esses resultados estão de acordo com o ensaio de Hoyos-Carvajal, Duque e Orduz (2008), onde constataram em cultivos *in vitro* a inibição promovida por 46 isolados de *Trichoderma* spp. a *R. solani*. Fernandez Barbosa e Suarez Meza (2009), testaram pelo método de pareamento *in vitro*, através de cultivo dual em placas de Petri, seis isolados de *Trichoderma harzianum*, sendo três comerciais (TCC-001, TCC-005 e TCC-006) e três selvagens (TCN-009, TCN-010, TCN-014), contra um isolado de *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* (FSM-003). Constataram que todos os seis isolados de *Trichoderma harzianum* apresentaram raios de crescimento superiores aos do isolado do patógeno, o que sugere a competência de antagonismo

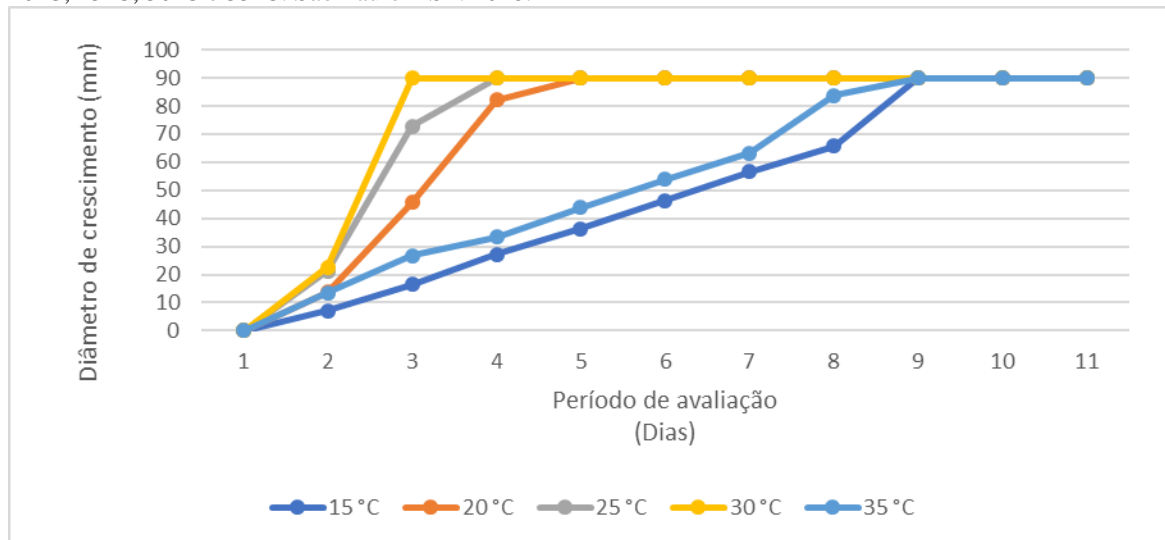
desses isolados frente aos fitopatógenos. Igualmente Suárez Meza et al. (2008), avaliaram o antagonismo *in vitro*, entre seis isolados de *Trichoderma*, sendo três selvagens de *Trichoderma harzianum* Rifai, e três comerciais, contra dois isolados de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.. Os resultados demonstraram que houve antagonismo, em menor e maior grau, dos isolados selvagens e comerciais frente aos dois isolados de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc..

Em trabalho semelhante, Martínez et al. (2014), testaram em cultivo de pareamento, 27 isolados de *Trichoderma* spp. e 2 isolados de *Sarocladium oryzae* (Sawada) W. Gams & D. Hawksworth. Os autores constataram um percentual de 85,18% de isolados de *Trichoderma* spp. com competência para inibição dos isolados dos patógenos.

### 3.6 EFEITO DE CINCO TEMPERATURAS NO CRESCIMENTO DE DOIS ISOLADOS DE *Trichoderma* spp., EM MEIO BDA.

Para o isolado de *Trichoderma* IB 11/12 (Figura 12) constata-se que a melhor temperatura para seu desenvolvimento foi a de 30°C, visto que em 3 dias o crescimento micelial atingiu a totalidade da placa, seguida da temperatura de 25°C com 4 dias. Isso sugere que este isolado possa ter boa eficiência em regiões com temperatura na faixa de 25°C à 30°C.

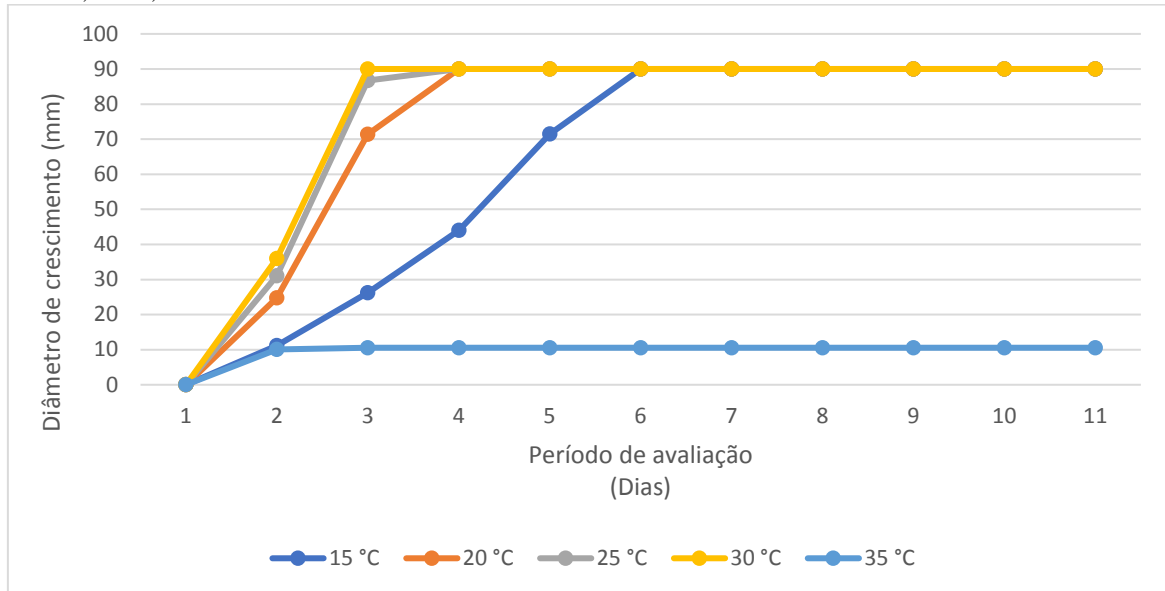
Figura 12 – Diâmetro de crescimento (mm), de colônias de *Trichoderma* IB 11/12 às temperaturas de 15°C, 20°C, 25°C, 30°C e 35°C. São Paulo – SP. 2018.



Para o isolado de *Trichoderma* IB 18/03 (Figura 13) constata-se que a melhor temperatura para seu desenvolvimento foi a de 30°C, visto que em 3 dias o crescimento micelial atingiu a totalidade da placa, seguida das temperaturas de 25°C e 20°C com 4 dias. Importante

observar que no 3º dia, os isolados submetidos à 25°C apresentaram crescimento micelial bem próximo de completar a totalidade da placa. Isso sugere que este isolado deva ter boa eficiência em regiões com temperatura na faixa de 20°C à 30° C.

Figura 13: Diâmetro de crescimento (mm), de colônias de *Trichoderma* IB 18/03 às temperaturas de 15°C, 20°C, 25°C, 30°C e 35°C. São Paulo – SP. 2018.



Esses resultados referentes aos isolados de *Trichoderma* spp. IB 11/12 e IB 18/03, concordam com pesquisas de Klein e Eveleigh (1998), segundo os quais, vários estudos de laboratório publicados constataram que a temperatura ideal para crescimento da maioria de *Trichoderma* spp. está na faixa entre 25°C e 30°C. Entretanto a literatura também mostra que uma ampla faixa de temperaturas, dentre as quais, espécies de *Trichoderma* também podem crescer, produzir substâncias inibidoras, assim como realizar interação hifal contra diversos patógenos (TRONSMO; DENNIS, 1978). Esses autores realizaram pesquisas com 54 isolados de *Trichoderma* de diversas espécies, e constataram que 32 isolados cresceram a 2°C e 48 a 5°C. Ensaio realizado por Zehra et al. (2017), mostraram que o intervalo de temperatura entre 25°C e 40°C foi favorável para o crescimento e esporulação de isolados de *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride*, enquanto para *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma hamatum* foi a faixa de 25°C à 35°C. Experimentos realizados por Kumar et al. (2017), revelaram que o crescimento ótimo para *Trichoderma harzianum* ocorreu na temperatura de 25 ± 1°C. Em ensaios realizados por Singh et al. (2014), sete espécies de *Trichoderma* foram testados nas temperaturas de 20°C, 25°C, 30°C e 35°C, e as melhores temperaturas de crescimento situaram-se na faixa de 25°C à 30°C.



### 3.7 EXPERIMENTO DE QUANTIFICAÇÃO DE CONÍDIOS DE *Trichoderma* spp. EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Pelos resultados constantes na Tabela 23, pode-se observar que as melhores temperaturas para a produção de conídios, em meio BDA, para ambos os isolados, foi entre 20°C e 30°C, sendo a de 25°C a ideal. O isolado IB 18/03, ao contrário do isolado IB 11/12, não foi capaz de produzir conídios nas temperaturas de 15°C e 35°C. Portanto, o isolado IB 11/12 teria melhor capacidade de sobreviver e germinar em ambientes mais diversos quanto à temperatura quando comparado ao isolado IB 18/03, indicando que talvez fosse o isolado mais interessante para ser comercializado no país, haja vista as diferentes temperaturas encontradas nas diferentes regiões brasileiras. O isolado de *Trichoderma* IB 11/12 apresentou maior número de conídios à 25°C, e não diferiu significativamente das temperaturas de 20°C e de 30°C, enquanto as temperaturas de 15°C e 35°C apresentaram menor produção de conídios. Igualmente o isolado de *Trichoderma* IB 18/03 apresentou maior número de conídios à 25°C, e não diferiu significativamente das temperaturas de 20°C e de 30°C.

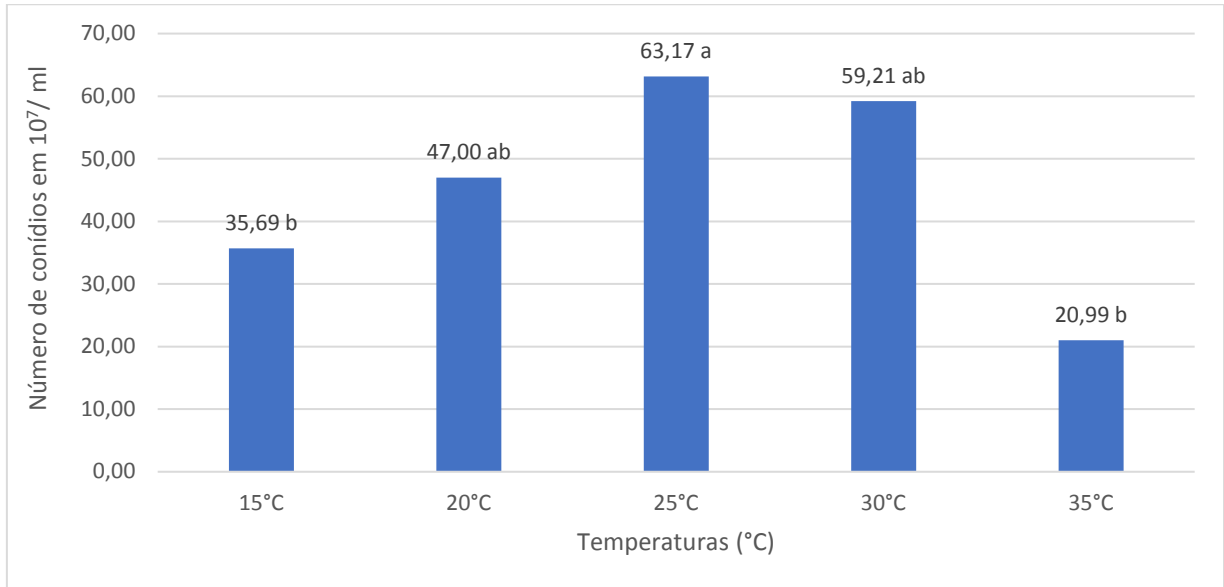
Tabela 23: Resultados das médias de três repetições do número de conídios, em suspensão concentrada, dos isolados de *Trichoderma* sp. IB 11/12 e IB 18/03 em diferentes temperaturas. São Paulo – SP. 2018.

Isolados	Nº de conídios x 10 <sup>7</sup> .ml <sup>-1</sup>				
	Temperaturas <sup>1</sup>				
	15° C	20° C	25° C	30° C	35° C
<b>IB 11/12</b>	35,69 b	47,00 ab	63,17 a	59,21 ab	20,99 b
<b>IB 18/03</b>	0 b	7,87 a	9,41 a	7,07 a	0 b

<sup>1</sup>Unidade em graus Celsius.

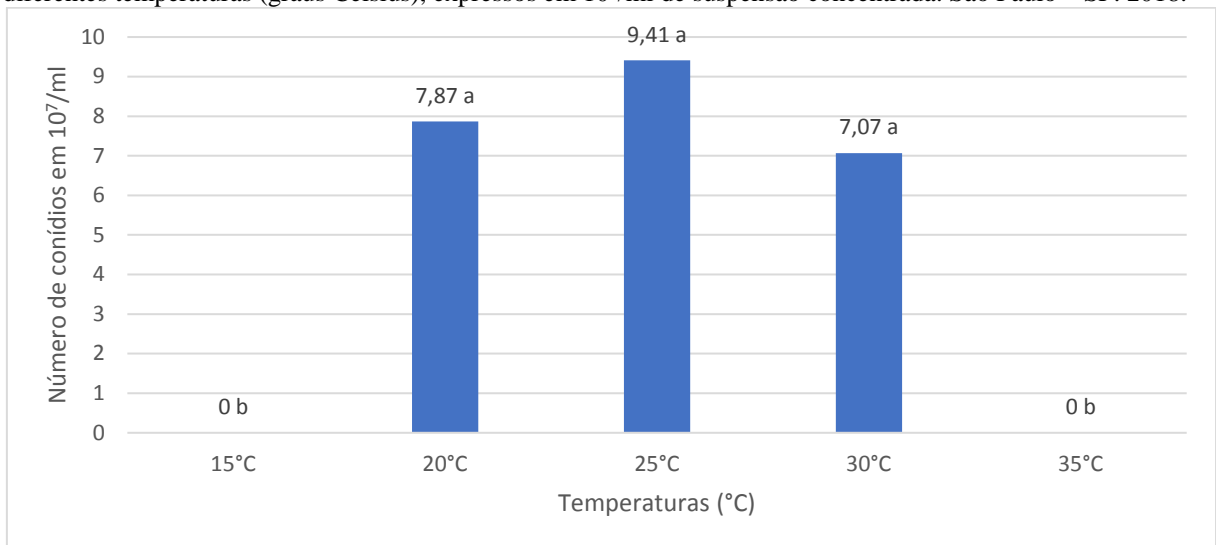
Letras iguais significam que os tratamentos não diferiram entre si, segundo o Teste de Tukey a 1%.

Figura 14: Resultado do número de conídios em suspensão concentrada do isolado de *Trichoderma* IB 11/12 em diferentes temperaturas (graus Celsius), expressos em  $10^7$ /ml de suspensão concentrada. São Paulo – SP. 2018.



Letras iguais significam que os tratamentos não diferiram entre si, segundo o Teste de Tukey a 1%.

Figura 15: Resultado do número de conídios em suspensão concentrada do isolado de *Trichoderma* IB 18/03 em diferentes temperaturas (graus Celsius), expressos em  $10^7$ /ml de suspensão concentrada. São Paulo – SP. 2018.



Letras iguais significam que os tratamentos não diferiram entre si, segundo o Teste de Tukey a 1%.

A eficiência dos isolados em sobreviver, crescer e se multiplicar nos ambientes, depende, além da temperatura, de outras características ambientais, fatores abióticos, que podem interferir diretamente na eficiência do controle de fitopatógenos e, conseqüentemente no biocontrole da doença em condições de campo (SINGH et al., 2014). Entre elas poderiam ser mencionadas as características físicas e químicas do solo, principalmente o pH e a umidade, já que *Trichoderma* é um fungo de solo e é nesse ambiente que ele depende para exercer suas

funções de antagonista. Em pesquisa semelhante desenvolvida por Daryaei et al. (2016), com *Trichoderma atroviride* LU132 nas temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C, os autores constataram produção máxima de conídios à 25°C após 20 dias. Porém resultaram em maior germinação a 30°C, quando comparados com as temperaturas de 20°C e 25°C. Em ensaios realizados por De Los Santos-Villalobos et al. (2012), com *Trichoderma asperellum* T8a, após 8 dias de incubação a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , verificou-se alta produção de esporos. Cavalcante et al. (2008), realizaram ensaios para produção de esporos de *Trichoderma* das cepas *T. harzianum* sp., *T. viride* sp., *T. koningii* sp., e *T. polysporum* sp., à temperatura de  $30,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , por 7 dias, e os resultados mostraram que todas as cepas produziram esporos nessa temperatura, sendo obtidas contagens altas de esporos com *T. harzianum* sp.

## 4.CONCLUSÕES

O isolado de *Rhizoctonia solani* 13/02 PB foi selecionado, através de teste de patogenicidade, para ser utilizado nos ensaios de controle biológico frente aos cinco isolados de *Trichoderma* spp. (IB 11/12, IB 18/03, IB 19/17, IB 30/07 e IB 42/03).

Os cinco isolados de *Trichoderma* spp. avaliados protegem os tomateiros da variedade Super Marmande, quando inoculados simultaneamente com o patógeno *Rhizoctonia solani* no substrato de mudas. Os isolados de *Trichoderma* apresentaram níveis de controle que variaram de 50% a 100%.

Os isolados de *Trichoderma* spp. avaliados nos experimentos de biocontrole apresentaram capacidade de colonização do substrato de plantio até setenta e cinco dias após a co-inoculação com o antagonista.

Os isolados de *Trichoderma* spp. IB 11/12, IB 18/03, IB 19/17 e IB 42/03, testados nos três experimentos de promoção de crescimento, possuem potencial como promotores de crescimento de plantas de tomate variedade Super Marmande.

Os isolados de *Trichoderma* spp. IB 11/12, IB 18/03, IB 19/17, IB 30/07 e IB 42/03 apresentaram capacidade de hiperparasitismo nos experimentos *in vitro*, frente ao patógeno *Rhizoctonia solani* 13/02 PB.

O intervalo de temperatura entre 20°C e 30°C foi o mais favorável para o crescimento micelial dos isolados de *Trichoderma* spp. IB 11/12 e IB 18/03, enquanto a temperatura de 25°C foi a ideal para produção de conídios desses isolados.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCSEM. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMÉRCIO DE SEMENTES E MUDAS. **2º Levantamento de dados socioeconômicos da cadeia de hortaliças no Brasil. 2013.**

Disponível

em:[http://www.abcsem.com.br/imagens\\_noticias/Apresenta%C3%A7%C3%A3o%20completa%20dos%20dados%20da%20cadeia%20produtiva%20de%20hortali%C3%A7as%20-%2029MAIO2014.pdf](http://www.abcsem.com.br/imagens_noticias/Apresenta%C3%A7%C3%A3o%20completa%20dos%20dados%20da%20cadeia%20produtiva%20de%20hortali%C3%A7as%20-%2029MAIO2014.pdf). Acesso em 6 out.2018

ABRASCO. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA. **Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.** Carneiro, F.F.(Org.). Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

AHMAD, J.S.; BAKER R. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v. 77, p.182–189, 1987.

ALTOMARE, C. et al. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.7, p.2926-2933, 1999.

BAKER, R.; ELAD, Y., CHET, I. The controlled experiment in the scientific method with special emphasis on biological control. **Phytopathology** v. 74, p.1019-1021, 1984.

BEDENDO, I. P. Damping-off. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos.** 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 820 - 828.

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

BENÍTEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, n.4, p. 249-260, 2004.

BERTAGNOLLI, B.L.; Dal Soglio, F.K., SINCLAIR, J.B. Perfis de enzima extracelular do agente patogénico fúngico *Rhizoctonia solani* isolado 2B-12 e de dois antagonistas, *Bacillus megaterium* estirpe B153-2-2 e *Trichoderma harzianum* isolado Th008. I. Possíveis correlações com inibição do crescimento e biocontrole. **Physiol Mol Plant Pathol** v.48, p. 145–160, 1996.

BERTAGNOLLI, B.L.; DALY, S.; SINCLAIR, J.B. Compostos antimicóticos do fitopatógeno *Rhizoctonia solani* e seu antagonista *Trichoderma harzianum*. **Journal of Phytopathology**, v. 146, p. 131-135, 1998.

BETTIOL, W. et al. **Curso de Avaliação da qualidade de produtos à base de Trichoderma.** EMBRAPA Meio Ambiente. Jaguariúna, SP. v. 1, n. 1, p.1-45, 2012.

BLANCA, J. et al. Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. **PloS one**, v. 7, n. 10, e48198, 2012.

- BOTELHO, S.A.; RAVA, C.A.; LEANDRO, W.M. Supressividade induzida a *Rhizoctonia solani* pela adição de diferentes resíduos vegetais. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 35-42, 2001.
- BRUNNER, K. et al. The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. **Curr. Genet.** v.43, p.289–295, 2003.
- CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil**. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (Ed.). **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, p. 13-51. 2003.
- CANTERI, M. G. et al. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelo métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24. 2001.
- CARVALHO, D. D.C. et al. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzium*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n.1, p. 028-034, 2011.
- CARVALHO, J.L.; PAGLIUCA, L.G. Tomate, um mercado que não pára de crescer globalmente. **Brasil Hortifruti**, n.58, p.6-14. 2007.
- CASTELLANI, Aldo. The “Water Cultivation” of Pathogenic fungi. **Ann. Soc. Belge Méd. Trop.**, [s.l.], v. 44, n. 2, p.217-220, 1964.
- CAVALCANTE, R. S. et al. Effect of moisture on *Trichoderma* conidia production on corn and wheat bran by solid state fermentation. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, n. 1, p. 100-104, 2008.
- CHET, I.; HARMAN, G. E.; BAKER, R. *Trichoderma hamatum*: its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. **Microb. Ecol.** v.7, p.29–38, 1981.
- CONTRERAS-CORNEJO, H. A. et al. *Trichoderma virens*, a Plant Beneficial Fungus, Enhances Biomass Production and Promotes Lateral Root Growth through an Auxin-Dependent Mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, March 2009, Vol. 149, pp. 1579–1592, 2009.
- DARYAEI, A. et al. Effects of temperature, light and incubation period on production, germination and bioactivity of *Trichoderma atroviride*. **Journal of applied microbiology**, v. 120, n. 4, p. 999-1009, 2016.
- DE CURTIS, F. et al. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* on tomato by delivering antagonistic bacteria through a drip irrigation system. **Crop Protection**, v.29, n.7, p. 663-670, 2010.
- DE LOS SANTOS-VILLALOBOS, S. et al. Production of *Trichoderma asperellum* T8a spores by a “home-made” solid-state fermentation of mango industrial wastes. **BioResources**, v. 7, n. 4, p. 4938-4951, 2012.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Long-term storage of plant pathogens. In: DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton: CRC Press, 1995. p. 61-68.

DIAS, P.P.; BERBARA, R.L.L.; FERNANDES, M.C.A. Controle de *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* por biopreparados de isolados de *Trichoderma* spp. **Summa Phytopathologica**, v.39, n.4, p.258-262, 2013.

DOMINGUES, D. P. **Etiologia e controle da mancha-de-estenfílio do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) no Estado do Rio de Janeiro**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

ELAD, Y. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. **European Journal of Plant Pathology**, v. 102, n. 8, p. 719-732, 1996.

ELÍAS, R.; ARCOS, O.; ARBELÁEZ, G. Estudio del antagonismo de algunas especies de *Trichoderma* aisladas de suelos colombianos en el control de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. **Agronomía Colombiana**, v. 10, n. 1, p. 52-61, 1993.

ESPINOZA, W. et al. **Manual de produção de tomate industrial no Vale do São Francisco**. Brasília: Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco, 1991.

FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of the United Nations and Statistics**. 2016. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> . Acesso em 14/10/2018.

FERNANDEZ BARBOSA, R. J.; SUAREZ MEZA, C. L. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* em maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana. **Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín**, v. 62, n. 1, p. 4743-4748, 2009.

FILGUEIRA, F.A.R. **Manual de olericultura: cultura e comercialização de hortaliças**. 2.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, 1982. 358p.

FONTENELLE, A. D. B. **Promoção de crescimento e indução de resistência em tomateiro a *Xanthomonas vesicatoria* e *Alternaria solani* por *Trichoderma* spp.** 2011. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio). Instituto Biológico, São Paulo.

GAMS, W.; BISSET, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Harman, G.E.; KUBICEK, C.P.(Ed.). **Trichoderma & Gliocladium**. London: Taylor and Francis, 1998.p. 3-34.

GOULART, A. C. P. Reação de cultivares de algodoeiro a *Rhizoctonia solani* na fase de plântula e benefícios do tratamento de sementes com fungicidas. **Summa phytopathol.** Botucatu, v. 42, n. 4, p. 308-312, Dez. 2016.

GUZMÁN-GUZMÁN, P. et al. *Trichoderma* Species: Versatile Plant Symbionts. **Phytopathology**, v. 109, n. 1, p. 6-16, 2018. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1094/PHTO-07-18-0218-RVW> . Acesso em 9/04/2019.

- HA, Tran N. Using *Trichoderma* species for biological control of plant pathogens in Vietnam. **J. ISSAAS**, v. 16, n. 1, p. 17-21, 2010.
- HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* Species – Opportunistic, Avirulent, Plant Symbionts. **Nature Reviews Microbiology**. v.2, n.1, p.43-56, 2004a.
- HARMAN, G. E. et al. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of this interaction on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v.94, p.147-153, 2004b.
- HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; ONDIK, K. L. Asexual genetics in *Trichoderma* and *Gliocladium*: Mechanisms and implications. **Trichoderma and Gliocladium**, v. 1, p. 243, 1998.
- HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. **Plant Dis.**, v.84, p.377–393, 2000.
- HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. In Symposium the Nature and Application of Biocontrol Microbes II: *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v.96, p.190-194, 2006.
- HERMOSA, R. et al. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v.158, p. 17–25, 2012.
- HOYOS-CARVAJAL, L.; DUQUE, G; ORDUZ, S. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp. **Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas**, v. 2, n. 1, p. 76-86, 2008.
- HOYOS-CARVAJAL, L., et al. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. **Agronomía Colombiana** 26(3), 451-458, 2008.
- HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological control**, v. 51, n. 3, p. 409-416, 2009.
- HOWELL, C. R., et al. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. **Phytopathology**, v.90, p.248-252, 2000.
- HOWELL C. R., Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts The American. **Plant Disease** v.87, n.1, p. 4-10, 2003.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Produção Agrícola Municipal. Rio de Janeiro, v. 44, p.1-8, 2017. Disponível em <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-epecuaria/9117-producaoagricola-municipal-culturastemporarias-e-permanentes.html>. Acesso em 10/10/2018.



- INBAR, J.; MENENDEZ, A.; CHET, I. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. **Soil Biol. Biochem.**, v.28, p.757-763, 1996.
- ISAIAS, C. O. et al. Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathol**, v. 40, n. 1, p. 34 - 41, 2014.
- KIMATI, H; MINAMI, K; Doenças fúngicas do tomateiro. **Agroquímica Defesa Vegetal e Animal**. v.18, p.4-9. 1982.
- KLEIFELD, O.; CHET, I. *Trichoderma harzianum* - interaction with plants and effect on growth response. **Plant and soil**, v. 144, n. 2, p. 267-272, 1992.
- KLEIN, D; EVELEIGH, D.E. Ecology of *Trichoderma*. In: Harman, G.E.; Kubicek, C.P. **Trichoderma & Gliocladium**. London: Taylor & Francis, 1998.p. 57-74.
- KRUGNER, T. L.; BACCHI, L. M. A. Fungos. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, cap. 4, p. 85. 1995.
- KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. Taylor and Francis. London. 1998.
- KUMAR, K., et al. Interaction of milky mushroom (*Calocybe indica*) with *Trichoderma harzianum* at different temperature and pH levels. **Indian Journal of Health & Wellbeing**, v. 8, n. 10, p.1151-1154, 2017.
- LEWIS, J. A.; LUMSDEN, R. D. Biocontrol of damping-off of greenhouse grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp. **Crop Protection**, v. 20, n.1, p. 49–56, 2001.
- LIN, Tao et al. Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. **Nature Genetics**, v. 46, p. 120-126, 2014.
- LOPES, R.B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil. In: Bettiol, W. e Morandi, M.A.B. (Ed.) - **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 15–28, 2009.
- LORITO, M. et al. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*—antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. **Phytopathology**, v.83, p.302–7, 1993.
- LORITO, M. et al. Translational Research on *Trichoderma*: From ‘Omics to the Field’. **Rev. Phytopathol.**, v.48, p.1–19, 2010.
- LUCON, C. M. M. **Trichoderma no controle de doenças de plantas causadas por patógenos de solo**. São Paulo: Instituto Biológico, 2008. Disponível em: <http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/publicacoes/comunicados-documentos-tecnicos/comunicados-tecnicos/trichoderma-no-controle-de-doencas-de-plantas-causadas-por-patogenos-de-solo> . Acesso em: 14/09/2018.

LUCON, C. M. M.; CHAVES, A.L.R.; BACILIERI, S. **Trichoderma: o que é, para que serve e como usar corretamente na lavoura**. São Paulo: Instituto Biológico, 28p. 2014.

LUCON, C. M. M. et al. Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 3, p. 225-232, 2009.

MACHADO, D. F. M. et al. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 35, n.1, 2012.

MARTÍNEZ, B. et al. Antagonismo in vitro de cepas de *Trichoderma* spp. frente a *Sarocladium oryzae* (Sawada) W. Gams & D. Hawksworth. **Revista de Protección Vegetal**, v. 29, n. 2, p. 106-111, 2014.

MEDEIROS, A. C. et al. Methods of inoculation of *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* in melon (*Cucumis melo*). **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 4, p. 281-286, 2015.

MELO, I.S. de. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão anual de Patologia de Plantas**, v. 4, n. 1, p. 261-295, 1996.

MELO, I. S.; FAULL, J. L. Parasitismo de *Rhizoctonia solani* por cepas de *Trichoderma* spp. **Sci. agric.**, Piracicaba, v. 57, n. 1, p. 55-59. 2000.

MERTZ, L.M; HENNING, F.A.; ZIMMER, P.D. Bioprotetores e fungicidas químicos no tratamento de sementes de soja. **Ciência Rural**, v.39, n.1, p.13-18, 2009.

NAIKA, S. et al. **A cultura do Tomate**. Wageningen: Fundação Agromisa e CTA, v. 104, p. 104, 2006.

NESBITT, T. C.; TANKSLEY, S. D. Comparative sequencing in the genus *Lycopersicon*: implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes. **Genetics**, v. 162, n. 1, p. 365-379, 2002.

MINAMI, K.; HAAG, H. P. **O Tomateiro**. 2.ed, Campinas: Fundação Cargill, 1989. 397p.

MONTE, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. **Int. Microbiol**, v.4, p.1-4, 2001.

MONTEALEGRE, J. et al. Biological control of *Rhizoctonia solani* in tomatoes with *Trichoderma harzianum* mutants. **Electron. J. Biotechnol.** Valparaíso, v. 13, n. 2, p. 1-2, março 2010.

MORANDI, M.A.B. e BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: Bettioli, W; Morandi, M.A.B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p.07-14. 2009.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2006. 626 p.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). 2016. **Resíduo de Agrotóxicos nos Alimentos?** Perguntas e respostas. Disponível em:< <http://www.who.int/features/qa/87/es/>> . Acesso em 10/10/2018

PAPAVIZAS, G. C. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in pea and bean rhizospheres. **Phytopathology**, v. 72, n. 1, p. 121-125, 1982.

PERALTA, I. E.; KNAPP, S.; SPOONER, D. M. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. **TGC Report**, v. 56, p. 6-12, 2006. Disponível em <http://tgc.ifas.ufl.edu/vol56/html/vol56featr.htm>. Acesso em 29/06/2019.

REMUSKA, A. C.; DALLA PRIA, M. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento de fungos fitopatogênicos. **Publ. UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng.**, v. 13, n.3, p.31-36. 2007.

RICK, C. M.; HOLLE, M. Andean *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*: genetic variation and its evolutionary significance. **Economic Botany**, v. 44, n. 3, p. 69, 1990.

SALES, R. S. A. **Controle biológico de *Rhizoctonia solani*, agente causal do tombamento do tomateiro, com *Trichoderma* spp.** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Ciências Agrárias, Ciências Humanas). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.

SAMUELS, G. J. et al. The *Trichoderma koningii* aggregate species. **Studies in Mycology**. V. 56, p. 67-133, 2006.

SCHIRMBOCK, M. et al. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.60, n. 4364–4370, 1994.

SHORESH, M.; HARMAN, G.E.; MASTOURI, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Annual Review Phytopathology**. v. 48, p.21–43, 2010.

SILVA-BARRETO, F. A. D. et al. Associação de *Rhizoctonia solani* Grupo de Anastomose 4 (AG-4 HGI e HGIII) à espécies de plantas invasoras de área de cultivo de batata. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p. 145-154, 2010.

SILVEIRA, R. P. **Diversidade de variedades crioulas de tomate conservadas por camponeses no município de Anchieta, Oeste de Santa Catarina.** 2015. Dissertação (Mestrado Profissional em Recursos Genéticos Vegetais). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

SINGH, A. et. al. Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma* species at varying pH, temperature and agitation. **Virology and Mycology**, v.3, n.1, p. 127-134, 2014.

SPOONER, D. M. et al. Plant nomenclature and taxonomy: an horticultural and agronomic perspective. **Horticultural Reviews**, v. 28, p. 1-60, 2003.

SPONNER, D. M.; PERALTA, I. E.; KNAPP, S. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes *Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill) Wettst. **Taxon**, v. 54, p. 43-61, 2005.

SUÁREZ MEZA, C. L. et al. *Trichoderma harzianum* Rifai in vitro antagonism against *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., associated to withering in passion fruit. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 10, n. 2, p. 35-43, 2008.

TRONSMO, A.; DENNIS, C. Effect of temperature on antagonistic properties of *Trichoderma* species. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 71, n. 3, p. 469-474, 1978.

TULASNE, L.R.; TULASNE, C. *Selecta fungorum carpologia*, vol. 3. Paris: Imperial Press.1865.

VITERBO, A. et al. Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (T. *harzianum* T-203). **Curr. Genet.**, v.42, p. 114–122, 2002.

WEINDLING, R., FAWCETT H. S..Experiments in the control of *Rhizoctonia* damping-off of citrus seedlings. **J. Agric. Sci. CA Agric. Exp. Stn.**v.10, n.1, p.1–16, 1936.

WOO, S. L. et al. The Molecular Biology of the Interactions Between *Trichoderma* spp., Phytopathogenic Fungi, and Plants. In: Symposium The Nature and Application of Biocontrol Microbes II: *Trichoderma* spp. 2006. **The American Phytopathological Society**. v. 96, n. 2, 2006.

YA – CHUN, C. et al. Increased Growth of Plants in the Presence of the Biological Control Agent *Trichoderma harzianum*. **Plant Disease**, v.70, p.145-148, 1986.

YANGUI, T. et al. Control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* using olive mill waste water and some of its indigenous bacterial strains. **Crop Protection**, v.27, n.2, p.189-197, 2008.

YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; CHET, I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Appl. Environ. Microb.**, v.65, p.1061–70, 1999.

YEDIDIA, I., et al. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant Soil**, v.235, p.235–242, 2001.

ZEHRA, A. et al. Effect of different environmental conditions on growth and sporulation of some *Trichoderma* species. **Journal of Environmental Biology**, v. 38, n. 2, p. 197-203, 2017.

ZEILINGER, S. et al. Signal transduction by Tga3, a novel G protein alpha subunit of *Trichoderma atroviride*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.71, p.1591–1597, 2005.