



**AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DE *Trichoderma spp.* PARA O
CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* E *Meloidogyne incognita*
EM SOJA E PRODUÇÃO EM MEIOS LÍQUIDOS**

Patrícia Elias Haddad

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema
Orientador: Prof. Dr. Luis Garrigós Leite

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

**AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. PARA O
CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* E *Meloidogyne incognita*
EM SOJA E PRODUÇÃO EM MEIOS LÍQUIDOS**

Patrícia Elias Haddad

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientador: Prof. Dr. Luis Garrigós Leite

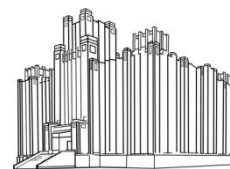
São Paulo

2014



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
**AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS
AGRONEGÓCIOS**
INSTITUTO BIOLÓGICO
Pós-Graduação

Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo - SP
secretariapg@biologico.sp.gov.br



INSTITUTO BIOLÓGICO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do candidato:

Título:

Orientador:

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.
Área de Concentração:

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

*Prof. Dr.:

*Instituição:

Assinatura:

*Prof. Dr.:

*Instituição:

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a):

*Instituição:

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Haddad, Patrícia Elias.

Avaliação de isolados de *Trichoderma spp.* para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Meloidogyne incognita* em soja e produção em meios líquidos.
/Patrícia Elias Haddad.

-- São Paulo, 2014.

100p.

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

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Luiz Garrigós Leite.

Versão do título para o inglês: Evaluation of *Trichoderma spp.* isolates for control of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Meloidogyne incognita* in soybean and production in liquid media.

1. Produção de fungos 2. Mofo branco 3. Nematóide de galha 4. Meios de cultura 5. Biocontrole I. Haddad, Patrícia Elias II. Leite, Luiz Garrigós III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2014/007

Aos meus pais José Fernando Haddad (in memoriam) e Luzia Elías Gonçalves e minha irmã Ana Paula Elías Haddad, ofereço.

Ao meu amado esposo André Alves de Miranda, dedico.

Agradecimentos

À Deus, por estar sempre comigo e me dar forças para continuar em frente independente do que aconteça.

Ao Instituto Biológico e ao programa de Pós Graduação pela oportunidade de aprender com os melhores, desde a minha iniciação científica e também por fornecer a infraestrutura necessária para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor Dr. Luís Garrigós Leite do Laboratório de Controle Biológico, CEIB - Campinas, por aceitar me orientar, sempre me receber bem no laboratório, pela paciência, pela contribuição para melhoria dessa dissertação.

À Dr. Cleusa Maria Mantovanello Lucon do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica - IB, por ter me aceitado como estagiária sem eu nem saber direito o que era um fungo, por me apoiar e ensinar com paciência, por confiar no meu trabalho, por me ajudar sempre que precisei, não só nas questões em relação ao trabalho ou ao laboratório, mas também em assuntos pessoais. E acima de tudo pela amizade e parceria todos esses anos. E principalmente por me entender e aceitar assim, enrolada como sou e nunca ter desistido de mim. Serei eternamente grata a você.

Ao professor Dr. Pedro Luiz Martins Soares do Laboratório de Nematologia da Unesp de Jaboticabal, por aceitar participar da banca e contribuir de forma tão significativa para a melhoria deste trabalho, e por ser uma pessoa super do bem sempre educado e prestativo todas as vezes que eu precisei.

À empresa Biogermany, pelo apoio financeiro e por acreditarem no meu trabalho.

*Ao Dr. Ricardo Harakava do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica - IB, por me receber bem no laboratório desde a iniciação e me ajudar de bom grado todas as vezes que eu precisei de algum equipamento (quase sempre) ou de alguma informação, e por ajudar com o sequenciamento dos isolados de *Trichoderma spp.**

Ao Dr. César Júnior Bueno por aceitar participar da banca examinadora e por contribuir para a melhoria dessa dissertação.

À Laura Bononi, Marta Moitinho, Verônica Nogueira e Amanda de Oliveira, por toda ajuda nos ensaios, pelas dicas, pelas risadas na hora do café, pela parceria no laboratório e pela amizade. A Patrícia Lima e Érica Pedro (in memorian) pelas dicas, risadas, apoio e amizade.

Ao Dr. Cláudio Marcelo Gonçalves de Oliveira do Laboratório de Nematologia do CEIB - Campinas e a sua estagiária Samara Azevedo de Oliveira, por toda a ajuda e paciência para me ensinar a trabalhar com os nematoides, por todo o inóculo cedido e pela simpatia de sempre.

Ao Biólogo Rivanildo Junior do Laboratório de Nematologia da Unesp - Jaboticabal, por me ajudar com as suspensões e os cálculos e ser tão gentil e prestativo.

Ao Dr. Marcos R. Potenza do Laboratório de Pragas em Horticultura - IB, por emprestar a casa de vegetação para montagem dos ensaios, pelo empréstimo de equipamentos e por ser sempre prestativo.

Aos técnicos Edvaldo e João Simione por me levarem ao CEIB para montar experimentos, coletar dados e comprar material. E ao técnico Celso, por ajudar com a lavagem dos vasos e da casa de vegetação.

À minha mãe por todo amor, carinho, paciência e apoio que sempre me deu, por cuidar tão bem de suas filhas mesmo diante das dificuldades impostas pela vida. A minha irmã por ser minha amiga, companheira, por seu amor e apoio, por ser o meu xodó.

Ao meu pai (in memorian), por conseguir que tivéssemos os melhores momentos de pai e filha depois de muitos anos de afastamento, mesmo que por pouco tempo. Descanse em paz.

Ao meu marido André por todo amor, carinho, apoio, parceria e paciência que tem comigo desde que começamos a namorar, e por me ajudar a me manter firme, mesmo quando eu tenho a certeza de que não agüentarei. Por ser meu companheiro em todas as horas, inclusive na hora de carregar terra e areia para a montagem dos ensaios deste trabalho. Obrigada por tudo, eu te amo.

E a todos que participaram de forma direta ou indireta para que esse trabalho fosse concretizado.

À todos, o meu sincero muito obrigada!!!

HADDAD, P.E. AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. PARA O CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* E *Meloidogyne incognita* EM SOJA E PRODUÇÃO EM MEIOS LÍQUIDOS. São Paulo. 2014. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) - Instituto Biológico.

RESUMO

A demanda por produtos que contribuam para uma agricultura mais sustentável é cada vez maior. Dentre eles, os produtos a base de espécies de *Trichoderma* spp. merecem destaque, pois podem ser utilizados no controle de diversos fitopatógenos, inclusive do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* e do nematóide *Meloidogyne incognita*, patógenos que causam grandes prejuízos na cultura da soja. A produção massal de agentes de biocontrole necessita de meios de cultivo eficientes e baratos. Por isso, os objetivos desse trabalho foram avaliar isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *S. sclerotiorum* e *M. incognita* e comparar a produção massal dos melhores isolados em meios líquidos. Vinte e cinco isolados foram avaliados no controle dos patógenos *in vitro* e nove deles em plantas de soja. Foram avaliados três meios líquidos, e diferentes concentrações de sacarose, na produção de três dos melhores isolados de *Trichoderma* spp. Nos ensaios *in vitro*, 22 isolados foram capazes de inibir 100% do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, enquanto que nove se destacaram por colonizar até 80% dos ovos de *M. incognita*. Nos ensaios com plantas de soja, os isolados de *Trichoderma* spp. IB 29/08 e IB 43/14 proporcionaram aumentos na massa seca da parte aérea de até 55 e 24%, respectivamente, em substrato infestado com *S. sclerotiorum*. Cinco isolados promoveram aumentos na massa fresca das raízes na presença de *M. incognita*, de até 228%. Os isolados IB 07/01, IB 18/03, IB 29/08, IB 48/06 e IB 51/07 diminuíram o número de galhas em 87, 76, 62, 45 e 78% respectivamente, em relação a testemunha. E todos os isolados diminuíram significativamente o número de juvenis de segundo estágio nas raízes da soja. A produção de conídios e massa micelial dos três isolados testados foi maior no meio líquido a base de levedura inativada (Hicell®) e o aumento gradativo da concentração de sacarose, de 0,5% a 2%, favoreceu o aumento proporcional na produção de biomassa para os três isolados de *Trichoderma* spp. avaliados.

Palavras-chave: produção de fungos, mofo branco, nematoide de galha, meios de cultura, biocontrole.

HADDAD, P.E. EVALUATION OF *Trichoderma* spp. ISOLATES FOR CONTROL OF *Sclerotinia sclerotiorum* AND *Meloidogyne incognita* IN SOYBEAN AND PRODUCTION IN LIQUID MEDIA. São Paulo. 2014. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) - Instituto Biológico.

ABSTRACT

The demand for products that contribute to a more sustainable agriculture is increasing. Among the tactics for reducing the use of pesticides is biological control practices. Species of *Trichoderma* are widely used to control many pathogens, including the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* and the nematode *Meloidogyne incognita*, pathogens that attack soybean and cause severe damage. The commercial mass production of microbial agents requires the use of cheap and efficient media. Therefore, this study aimed to evaluate isolates of *Trichoderma* spp. against *S. sclerotiorum* and *M. incognita* and to compare liquid broth media to grow the better biological control agents. Twenty five isolates were tested *in vitro* and nine in soybean plants. Furthermore, three liquid culture media with different concentrations of sucrose were tested for production of three isolates of *Trichoderma* spp. *In vitro*, 22 isolates inhibited 100% of mycelial growth of *S. sclerotiorum*, while nine colonized up to 80% of eggs of *M. incognita*. In trials using plants, the two isolates of *Trichoderma* spp. IB 29/08 and IB 43/14 increased dry weight of shoots by 55 and 24% in substrate infested with *S. sclerotiorum*. Five isolates promoted increase of fresh weight of roots in the presence of *M. incognita*, up to 228%. The following isolates IB 07/01, IB 18/03, IB 29/08, IB 48/06 and IB 51/07 reduced the number of galls on 87, 76, 62, 45 and 78%, respectively compared to control. And all isolates significantly reduced the number of nematode juveniles in soybean roots. The productions of conidia and mycelia of the three isolates were higher in the liquid medium with inactivated Yeast (Hicell®). Furthermore, the increasing of sucrose concentrations, 0,5 and 2,5% favored the production of biomass of three *Trichoderma* spp. isolates.

Keywords: fungi production, White mold, root knot nematodes, cultures media, biocontrol.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* em placa de Petri sobre papel de filtro umedecido e esterilizado, após imersão em suspensão de conídios de *Trichoderma* sp.
.....28
- Figura 2.** Terceiro trifólio de soja (cultivar Pintado), sobre a qual foi depositado um disco de meio B.D.A., contendo micélio de *Sclerotinia sclerotiorum*.....29
- Figura 3.** Substrato Tropstrato Hortaliça II tratado com grãos de arroz cozidos e colonizados por *Sclerotinia sclerotiorum*.....30
- Figura 4.** Grãos de arroz cozidos e colonizados por um isolado de *Trichoderma* sp. adicionados ao substrato inoculado com *Sclerotinia sclerotiorum*..... 30
- Figura 5.** A- Deposição do disco de B.D.A. com estruturas propagativas de *Trichoderma* sp., no centro da placa de Petri, em meio ágar-água. B – Distribuição de cinco microgotas de suspensão de *Meloidogyne incognita*, próximas ao disco de B.D.A. com *Trichoderma* sp.
.....32
- Figura 6.** Plantio das sementes de soja cultivar BRS 284 em solo inoculado com grãos de arroz colonizados por *Trichoderma* sp.....33
- Figura 7.** A - Escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* do tratamento controle, germinados oito dias após a desinfestação e plaqueamento em meio B.D.A. B - Escleródios imersos em suspensão de conídios do isolado de *Trichoderma* sp. IB 04/05, e desinfestados oito dias após a inoculação, com posterior plaqueamento em meio B.D.A. e incubação a 25 ± 2 °C.
.....39
- Figura 8.** Escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* imersos em suspensão de conídios do isolados de *Trichoderma* sp. IB 01/03 (A) e IB 49/15 (B), desinfestados oito dias após a inoculação, com posterior plaqueamento em meio B.D.A. e incubação a 25 ± 2 °C.39
- Figura 9.** A - Folha de soja exibindo sintoma provocado por *Sclerotinia sclerotiorum* 48 horas após contato com o disco com micélio do patógeno. B – Detalhe da Figura 9 A.40

- Figura 10.** Folha de soja exibindo sintoma provocado por *Sclerotinia sclerotiorum* 66 horas após contato com o disco com micélio do patógeno. B – Detalhe da Figura 10 A.....41
- Figura 11.** Folha de soja exibindo sintoma provocado por *Sclerotinia sclerotiorum* 90 horas após contato com o disco com micélio do patógeno. B – Detalhe da Figura 11 A.....41
- Figura 12.** Primeiro ensaio de promoção de crescimento e controle de sintomas de mofo branco- Aspecto visual das plantas de soja dos tratamentos testemunha, controle branco e isolado de *Trichoderma* sp. IB 29/08, crescidas em substrato comercial.....44
- Figura 13.** Primeiro ensaio de promoção de crescimento e controle de sintomas de mofo branco - Aspecto visual das plantas de soja dos tratamentos testemunha, controle e isolado de *Trichoderma* sp. IB 07/01, crescidas em substrato comercial.44
- Figura 14.** Repetição do ensaio de promoção de crescimento e controle de sintomas de mofo branco - Aspecto visual das plantas de soja dos tratamentos testemunha, controle e isolado de *Trichoderma* sp. IB 43/14, crescidas em substrato comercial.....45
- Figura 15.** Fragmentos de raízes de soja colonizadas por *Trichoderma* spp. do ensaio com *Sclerotinia sclerotiorum* em casa de vegetação. A: Controle; B: IB 04/05; C: IB 07/01; D: IB 18/03; E: IB 20/02; F: IB 29/08; G: IB 43/14; H: IB 48/06; I: IB 49/15; J: IB 51/07.....48
- Figura 16.** A - Isolado de *Trichoderma* sp. IB 51/07 parasitando recém eclodido de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. B - Isolado de *Trichoderma* sp. IB 49/15 parasitando ovos de *Meloidogyne incognita*.....51
- Figura 17.** A – Ovo de *Meloidogyne incognita* envelado por hifas do isolado de *Trichoderma* sp. IB 18/03. B – Juvenil de *Meloidogyne incognita* parasitado por isolado de *Trichoderma* sp. IB 49/15.....52
- Figura 18.** Aspecto visual das raízes das plantas dos tratamentos testemunha só com *Meloidogyne incognita*, do controle branco (sem nenhum tratamento) e do isolado de *Trichoderma* sp. IB 07/01 na presença de *M. incognita*.....54

Figura 19. Número de conídios produzidos em diferentes meios de cultura por isolados de *Trichoderma* spp.....58

Figura 20. Média de biomassa produzida por isolados de *Trichoderma* em diferentes meios de cultivo.....59

Figura 21. Número de conídios de *Trichoderma* spp. produzidos em diferentes concentrações de sacarose em meio líquido de levedura inativada.....61

Figura 22. Média de massa seca de isolados de *Trichoderma* spp. produzida em diferentes concentrações de sacarose em meio líquido de levedura inativada.....61

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Procedência dos isolados de *Trichoderma* spp. utilizados nos experimentos e coordenadas geográficas do local de isolamento.24
- Tabela 2.** Quantificação da concentração de conídios de *Trichoderma* spp. por grama de arroz esterilizado e determinação da porcentagem de conídios viáveis.26
- Tabela 3.** Média de escleródios germinados após imersão em duas concentrações das suspensões de conídios de isolados de *Trichoderma* spp.....38
- Tabela 4.** Massa média de matéria seca (MMSPA) da parte aérea de plantas de soja, cultivadas em substrato infestado com arroz colonizado com *Sclerotinia sclerotiorum*, na presença ou não de isolados de *Trichoderma* spp. - Primeiro ensaio.42
- Tabela 5.** Massa média de matéria seca da parte aérea (MMSPA) de plantas de soja cultivadas, em substrato infestado com arroz colonizado com *Sclerotinia sclerotiorum*, na presença ou não de isolados de *Trichoderma* spp. - Segundo ensaio.....43
- Tabela 6.** Média e percentual de ovos de *Meloidogyne incognita* parasitados por 25 isolados de *Trichoderma* spp. no ensaio de parasitismo em meio de ágar água.....50
- Tabela 7.** Valores médios e porcentagem de aumento da massa fresca das raízes (MFR) e da massa seca das partes aéreas (MMSPA) das plantas de soja, cultivadas em solo infestado ou não com *Meloidogyne incognita*, tratadas ou não com isolados de *Trichoderma* spp.53
- Tabela 8.** Médias de números de galhas, juvenis de segundo estágio e ovos das raízes das plantas de soja, cultivadas por 60 dias em solo infestado com *Meloidogyne incognita*, tratadas ou não com isolados de *Trichoderma* spp.....55
- Tabela 9.** Número de unidades formadoras de colônia por grama de solo (UFC g⁻¹), quantificado 60 dias após a inoculação de *Trichoderma* spp.57

Tabela 10. Espécies de *Trichoderma* identificadas por seqüenciamento gênico.63

Tabela 11. Porcentagem de similaridade genética entre os isolados de *Trichoderma* spp. sequenciados e as espécies depositadas no banco de dados GenBank.....63

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3.1. A cultura da soja.....	3
3.1.1. Botânica, origem e histórico	3
3.1.2. Importância econômica.....	5
3.1.3. Doenças que acometem a cultura de soja.....	6
3.2. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> agente causal do mofo branco.....	7
3.2.1. Controle da doença.....	9
3.3. Nematoides como agentes causais de doenças de plantas	10
3.3.1. <i>Meloidogyne</i> spp.: Nematoides de galha	11
3.3.2. Ciclo de vida.....	12
3.3.3. Medidas de Controle.....	14
3.4. <i>Trichoderma</i> spp.....	15
3.4.1. Características gerais	15
3.4.2. <i>Trichoderma</i> spp. como agente de controle biológico de doenças de plantas	16
3.4.3. <i>Trichoderma</i> spp. na promoção de crescimento de plantas.....	18
3.5. Produção massal de agentes de biocontrole, com foco em espécies de <i>Trichoderma</i>	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. Material vegetal e substratos de crescimento de plantas	23
4.2. Micro-organismos utilizados nos ensaios	24
4.2.1. <i>Trichoderma</i> spp.....	24

4.2.2.	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	25
4.2.3.	<i>Meloidogyne incognita</i>	25
4.3.	Preparo do inóculo de <i>Trichoderma</i> spp. para os ensaios em casa de vegetação	25
4.4.	Preparo do inóculo de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	26
4.5.	Suspensões de <i>Meloidogyne incognita</i>	26
4.6.	Ensaio com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	27
4.6.1.	Avaliação de <i>Trichoderma</i> spp. quanto ao efeito antagônico a escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>in vitro</i>	27
4.6.2.	Teste de Patogenicidade de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	28
4.6.3.	Avaliação de <i>Trichoderma</i> spp. na promoção de crescimento de soja e na redução dos sintomas de mofo branco, em casa de vegetação	29
4.6.4.	Teste de colonização radicular	30
4.7.	Análise dos Resultados	31
4.8.	Ensaio com <i>Meloidogyne incognita</i>	31
4.8.1.	Avaliação do parasitismo de ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> por <i>Trichoderma</i> spp.	31
4.8.2.	Avaliação de <i>Trichoderma</i> spp. no controle de <i>Meloidogyne incognita</i> em soja, em casa de vegetação	32
4.8.3.	Sobrevivência de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em amostras de solo	33
4.9.	Análise dos Resultados	34
4.10.	Produção de <i>Trichoderma</i> spp. em meios líquidos.....	34
4.10.1.	Seleção do meio de cultura	34
4.10.2.	Efeito de diferentes concentrações de sacarose na esporulação e produção de biomassa de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	35
4.11.	Análise dos Resultados	35
4.12.	Identificação molecular dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	36
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1.	Ensaio com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	36

5.1.1. Avaliação de <i>Trichoderma</i> spp. quanto ao efeito antagônico a escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , in vitro	36
5.1.2. Teste de Patogenicidade de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	40
5.1.3. Avaliação de <i>Trichoderma</i> spp. na promoção de crescimento de soja e na redução dos sintomas de mofo branco, em casa de vegetação	41
5.1.4. Teste de colonização radicular	47
5.2. Ensaio com <i>Meloidogyne incognita</i>	48
5.2.1. Avaliação do parasitismo de ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> por <i>Trichoderma</i> spp.	48
5.2.2. Avaliação de <i>Trichoderma</i> spp. no controle de <i>Meloidogyne incognita</i> em soja, em casa de vegetação	52
5.2.3. Sobrevivência dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em amostras de solo	56
5.3. Produção de <i>Trichoderma</i> spp. em meios líquidos	58
5.3.1. Seleção do meio de cultura	58
5.3.2. Efeito de diferentes concentrações de sacarose na esporulação e produção de biomassa de isolados de <i>Trichoderma</i> spp	60
5.4. Identificação molecular dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	62
6. CONCLUSÕES.....	63
7. REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) se destaca por ser uma das leguminosas mais cultivadas no mundo, uma vez que é utilizada na alimentação humana, na manufatura de diversos produtos processados e semiprocessados, na produção de biodiesel, além da utilização como adubo verde, forragem, silagem, feno e pastagem (SEDIYAMA, 2009). É a cultura agrícola brasileira que mais cresceu nas últimas três décadas e corresponde a 49% da área plantada com grãos no país, cuja produção foi de 81.456,7 milhões de toneladas na safra de 2012/2013 (MAPA, 2013).

As doenças estão entre os fatores limitantes para a produção da soja, entre elas, o mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary (Helotiales: Sclerotiniaceae), é uma das mais importantes, pois dependendo das condições ambientais chega a causar perdas de até 100% (HENNEBERG et al., 2012). O fungo *S. sclerotiorum* é um patógeno de solo, não específico, que pode infectar aproximadamente 408 espécies botânicas (BOLAND; HALL, 1994). Sobrevive no solo por meio de escleródios que podem permanecer viáveis por mais de oito anos (PARISI; PATRICIO; OLIVEIRA, 2006). A disseminação é facilitada pela contaminação de sementes ou grãos com escleródios do fungo, que são difíceis de separar durante a colheita (FEHR; CAVINESS, 1977). O controle da doença é feito pelo uso de sementes sadias, utilização de fungicidas, adoção de práticas culturais e utilização de agentes de biocontrole (FURLAN, 2009).

Outra doença bastante importante da cultura da soja é a meloidoginose, causada pelas espécies de *Meloidogyne*, também conhecidos como nematoides de galha. As galhas formadas pelo patógeno no sistema radicular impedem a absorção e transporte de água e nutrientes do solo, provocando deficiência mineral e perda de produtividade que podem variar de 25 a 85% (MENDES; RODRIGUEZ, 2000). Sua ampla distribuição geográfica, polifagia e variabilidade fisiológica dificultam o estabelecimento de medidas de controle (SILVA, 2001). Para o manejo destes parasitas, várias estratégias podem ser utilizadas de forma integrada, tais como rotação/sucessão de culturas não hospedeiras ou hospedeiras não favoráveis, utilização de genótipos resistentes (DIAS et al., 2010a), controle químico e controle biológico (ARAUJO; BRAGANTE; BRAGANTE, 2012).

No manejo de *S. sclerotiorum* e nematoides de galha, o controle biológico vem sendo bastante estudado como mais uma opção na tentativa de controlar as doenças de uma forma mais sustentável. Dentre os agentes de controle biológico, espécies de *Trichoderma* estão entre os fungos mundialmente mais conhecidos e utilizados na agricultura por atuarem contra vários patógenos e por promoverem o crescimento de plantas (KHAN et al., 2011).

São estudados como agentes de biocontrole desde que Weindling, em 1932, sugeriu a utilização desses fungos no controle de doenças (SPIEGEL; CHET, 1998).

Possuem várias características interessantes como serem facilmente isolados do solo, plantas e madeira em processo de decomposição; crescerem rapidamente; esporularem abundantemente e possuírem capacidade de colonizar diversos tipos de substratos, inclusive o sistema radicular de diversas plantas. Além disso, podem parasitar fungos e nematoides (BAHARULLAH; STEPHEN, 2008; BENÍTEZ et al., 2004; ELAD, 2000; INCH et al., 2011; MELO, 1996; WEEDEN; SHELTON; HOFFMAN, 2008) e formar associações com as raízes das plantas, pois apresentam grande diversidade genética e produzem diversos metabólitos e antibióticos de interesse industrial e ecológico (BENÍTEZ et al., 2004; ELAD, 2000; INCH et al., 2011; MELO, 1996; WEEDEN; SHELTON; HOFFMAN, 2008).

As espécies de *Trichoderma* ganharam ampla aceitação comercial como agentes de biocontrole por serem eficazes contra diversos fitopatógenos, principalmente os de solo. Sua eficácia está geralmente relacionada aos diversos mecanismos de ação que podem atuar, tais como antibiose, competição, micoparasitismo e indução de resistência (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010), também, pela facilidade com que são propagados e formulados em condições de laboratório (BENÍTEZ et al., 2004; ELAD, 2000; INCH et al., 2011; MELO, 1996; WEEDEN; SHELTON; HOFFMAN, 2008).

Devido à demanda por agentes de controle biológico ter crescido rapidamente na última década, produtos a base de *Trichoderma* spp. tem sido desenvolvidos e comercializados por algumas empresas brasileiras (LUCON, 2008), embora poucos sejam os produtos registrados junto ao MAPA. Para suprir esse mercado crescente, a produção massal de *Trichoderma* spp. tornou-se um foco de pesquisa bastante importante, pois é imprescindível para o desenvolvimento de bioprodutos pelas empresas (MACHADO et al., 2012).

Os processos de produção de fungos no Brasil, iniciaram-se no final da década de 1960, com a introdução da técnica de Trinidad e Tobago, que consiste no uso de cereais ou grãos pré-cozidos como substrato, principalmente em arroz (LOPES, 2009).

Para uma produção eficaz, é necessário conhecer as necessidades fisiológicas dos isolados de *Trichoderma* spp., assim como selecionar os ingredientes que irão compor a sua formulação (MACHADO et al., 2012).

Portanto, devido ao exposto, o presente trabalho teve como objetivos avaliar isolados de *Trichoderma* spp. quanto ao seu potencial de inibir o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* e parasitar ovos de *M. incognita in vitro*; investigar a capacidade dos isolados que mais se destacarem no controle de mofo branco e *M. incognita* na cultura de soja em

casa de vegetação, bem como testar meios líquidos na produção de estruturas propagativas de isolados de *Trichoderma* spp.

2. OBJETIVOS

1. Verificar a habilidade antagônica de *Trichoderma* spp. à *S. sclerotiorum*, *in vitro*.
2. Conferir a capacidade dos isolados de *Trichoderma* spp. em promover o crescimento de plantas de soja e controlar o mofo branco, em casa de vegetação.
3. Avaliar o potencial de isolados de *Trichoderma* spp. para parasitar ovos de *M. incognita*, *in vitro*.
4. Testar isolados de *Trichoderma* spp. no controle biológico de *M. incognita* em plantas de soja, em casa de vegetação.
5. Avaliar substratos líquidos na produção de estruturas propagativas de *Trichoderma* spp., em laboratório.
6. Avaliar o efeito de diferentes concentrações de carbono na produção de estruturas propagativas de isolados de *Trichoderma* spp. em meio líquido.
7. Identificar molecularmente as espécies de isolados de *Trichoderma* spp. que mais se destacaram nos ensaios realizados.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. A cultura da soja

3.1.1. Botânica, origem e histórico

A soja pertence ao reino Plantae, Filo/Divisão Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida, Ordem Fabales, Família Fabaceae (Leguminosae), Subfamília Faboideae (Papilionoideae), gênero *Glycine*, espécie *Glycine max* e forma cultivada *Glycine max* (L.) Merrill (SEDIYAMA, 2009) e, provavelmente, é descendente da espécie selvagem *Glycine ussuriensis* Regel e Maack (COSTA, 1996).

A cultura da soja apresenta características morfológicas que variam de acordo com a cultivar e ambiente onde é realizado o plantio (SINGH, 2010). É uma planta anual, herbácea, ereta, pubescente, de tricomas brancos, pardos queimados ou tostados. Apresenta caule ramificado, esverdeado e piloso que desenvolve-se a partir do eixo embrionário, apresentando crescimento ortótropo na maioria das cultivares. Possui um par de folhas simples inseridas opostamente ao primeiro nó, acima do nó cotiledonar, com pecíolos longos, porém o comprimento pode variar em função do tipo de folha, posição da folha, da cultivar e das condições de luminosidade. As folhas que crescem após o primeiro par verdadeiro são compostas, trifolioladas, com os folíolos bem desenvolvidos, base obtusa ou arredondada, verdes e pilosas (BERGAMIN; CANCIAN; CASTRO, 1999; MÜLLER, 1981; SEDIYAMA, 2009; SEDIYAMA et al., 1996).

Em condições normais de cultivo, o sistema radicular das plantas se distribui quase totalmente nos primeiros 15 cm do solo. Essas raízes correspondem a 40% da superfície radicular (MITCHELL; RUSSELL, 1971; RAPER; BARBER, 1970). É formado por uma raiz pivotante bem desenvolvida, com presença de raízes secundárias, terciárias e quaternárias, as ramificações são ricas em nódulos de bactérias fixadoras de nitrogênio (FEHR; CAVINESS, 1977; MASCARENHAS et al., 2005; MÜLLER, 1981; SEDIYAMA, 2009; SEDIYAMA et al., 1996).

As flores são completas ou perfeitas, axilares ou terminais, variando de 2 a 35 por racemo, do tipo papilionada, brancas, amarelas ou violáceas, segundo a cultivar. Os frutos, do tipo vagem, são achatados, curtos, de 2 a 7 cm de comprimento, de cor cinzenta, amarelo-palha ou preta e pode chegar a 400 por planta (FEHR; CAVINESS, 1977; MASCARENHAS et al., 2005; MÜLLER, 1981; SEDIYAMA, 2009; SEDIYAMA et al., 1996). As sementes, de número um a quatro por vagem, apresentam coloração, tamanho e forma peculiares a cada variedade (SOUZA, 1992).

Quanto a origem da soja, há muitas controvérsias em relação ao local exato, no entanto, indícios apontam o leste da Ásia, e o local de origem mais aceito é a China. Relatos na literatura chinesa indicam que a soja era bastante cultivada e utilizada como alimento. O registro mais antigo data de 2838 a.C., demonstrando que talvez a soja seja uma das mais antigas espécies de plantas cultivadas pelo homem (BONATO; BONATO, 1987; EMBRAPA SOJA, 2003). Após ser domesticada pelos chineses, a soja foi introduzida na Coreia no período entre II a.C. e III d.C. e posteriormente levada para o Japão. No início do século 18,

os europeus conheceram as possibilidades de uso da soja na alimentação, mas o primeiro plantio só foi realizado em 1739, quando o Jardim Botânico de Paris recebeu sementes enviadas da China (BONATO; BONATO, 1987).

Embora fosse cultivada e conhecida há mais de cinco mil anos no Oriente, a soja só começou a ser explorada comercialmente nos Estados Unidos em 1880, inicialmente como planta forrageira, e mais adiante como produtora de grãos (EMBRAPA SOJA, 2003). Em 1882 foi introduzida no Brasil e os primeiros estudos foram realizados no estado da Bahia, pelo professor Gustavo Dutra, no mesmo ano em que a cultura chegou ao país. No Estado de São Paulo, o Instituto Agrônomo de Campinas iniciou os testes de adaptação de cultivares de soja em 1891. E a partir disso vários estudos foram realizados em diferentes regiões do país, favorecendo o estabelecimento da cultura no Brasil (BONATO; BONATO, 1987; EMBRAPA SOJA, 2003).

3.1.2. Importância econômica

A soja está entre as leguminosas mais produzidas e consumidas no mundo. Seus grãos constituem excelente fonte de proteína de baixo custo e são muito utilizados na indústria alimentícia. Na alimentação humana é consumida *in natura* ou pelo uso do óleo vegetal extraído dos grãos, bastante utilizado no preparo de alimentos. Na alimentação animal é utilizada na produção de ração (BORÉM, 1999; CRISPINO et al., 2001; KLAHOLD et al., 2006; MESSINA, 1999; PAIVA; ALVES; HELENO, 2006; SÁ, 2006).

O grão de soja contém aproximadamente 40% de proteína e 20% de óleo. Portanto, é a cultura que tem o maior teor de proteína e de produção bruta de óleo vegetal entre todas as plantas cultivadas no mundo (QIU; CHANG, 2010).

A China foi o maior produtor e exportador de soja durante a primeira metade do século 20, destacavam-se também a Manchúria, o Japão e a Coreia. Atualmente, o quadro é um pouco diferente, sendo os maiores produtores mundiais da cultura, os Estados Unidos, o Brasil, a Argentina e a China, respectivamente (QIU; CHANG, 2010), com 80% da produção mundial (AMAZONAS, 2013). Os três primeiros países são responsáveis por 90% da comercialização mundial da oleaginosa, sendo o Brasil o segundo maior exportador, já a China consome sua produção internamente (ARANTES; SOUZA, 1993).

A soja é um dos produtos agrícolas mais importantes da economia brasileira, sendo a principal cultura exportada, e com grande potencial de crescimento (KLAHOLD et al., 2006; PAIVA; ALVES; HELENO, 2006; SÁ, 2006). Além de excelente opção ecológica na geração de biocombustíveis, a demanda externa pelo farelo de soja para nutrição animal,

principalmente por países populosos como a China e a Índia, é alta (ALAMBERT, 2010). A produção aumentou no Brasil devido a avanços tecnológicos, manejo e eficiência dos produtores. A soja é cultivada especialmente nas regiões Centro Oeste e Sul do país, onde o sistema adotado é mais ecológico com o uso de práticas de agricultura sustentável, como o sistema integração-lavoura-pecuária e o plantio direto; o que contribui para o melhor uso da terra com menor impacto ambiental, reduzindo a pressão por novas áreas de cultivo preservando o meio ambiente (MAPA, 2013).

Na safra 2013/14, a área plantada de soja ficou estimada em 27.721,6 milhões de ha. A produtividade nacional atingiu em média 2.937 kg/ha representando um recorde de crescimento e um incremento de 10,8% em relação à obtida em 2012. A safra brasileira de 2013/14 obteve a produção recorde de 81.456,7 milhões de toneladas, comparada com 66.383 mil toneladas em 2011/12, representando um aumento de 22,7% (CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2013).

Da soja produzida no país, cerca de 30,7 milhões de toneladas é transformada pela indústria nacional, por ano. São extraídos 5,8 milhões de toneladas de óleo comestível e 23,5 milhões de toneladas de farelo protéico, contribuindo para a competitividade nacional na produção de carnes, ovos e leite. Além disso, os produtos brasileiros possuem alto teor de proteína e padrão de qualidade Premium, garantindo sua aceitação e entrada nos mercados exigentes da União Europeia e Japão (MAPA, 2013).

3.1.3. Doenças que acometem a cultura de soja

As doenças estão entre os principais fatores limitantes para a obtenção de altos rendimentos na cultura da soja. No Brasil já foram identificadas cerca de 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus. E esse número continua crescendo devido a ampliação da soja para novas áreas e o consequente efeito da monocultura (EMBRAPA SOJA, 2011).

A importância econômica de cada doença varia de ano para ano e de região para região, dependendo das condições climáticas de cada safra, além, do tipo de patógeno, o tecido vegetal atacado, o número de plantas afetadas, a suscetibilidade da planta hospedeira, nível de estresse da planta e fase de desenvolvimento. As perdas anuais de produção por doenças são estimadas entre 15% a 20%, entretanto, algumas doenças podem ocasionar perdas de quase 100% (ALMEIDA, 1992; EMBRAPA SOJA, 2011; HARTMAN; HILL, 2010; MICHEREFF et al., 2005; YORINORI, 1992).

A origem de domesticação da soja é a China e a maioria dos patógenos da soja, com algumas exceções, desenvolveu a sua relação com a soja no centro asiático de origem. A cultura pode ser colonizada por vários tipos de micro-organismos, mas poucos estabelecem uma relação patogênica. Mais de 300 espécies de patógenos foram encontradas associadas à soja, destes, como mencionado anteriormente, cerca de 40 causam danos econômicos significativos. Alguns desses patógenos podem incidir ao mesmo tempo na lavoura em diferentes níveis, que variam de safra a safra (DHINGRA; MENDONÇA; MACEDO, 2009; HARTMAN; HILL, 2010; SINCLAIR; BACKMAN, 1982)

Em 1994, a perda estimada em todo o mundo devido a doenças da soja foi de 11%. De 2001 a 2003, esta estimativa saltou para 23%. Destes, 11% devido a doenças causadas por bactérias e fungos, 1% por vírus e 11% por pragas, incluindo nematoides parasitas de plantas (HARTMAN; HILL, 2010).

Dentre as doenças que acometem a soja, as moléstias radiculares, principalmente o mofo branco (*S. sclerotiorum*), tombamento de plântulas (*Rhizoctonia solani* Kühn e *Pythium* spp.), murcha-de-fusário (*Fusarium oxysporum* f.sp. *glycines* Schlecht), murcha-de-esclerócio (*Sclerotium rolfsii* sacc), podridão cinzenta do caule (*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid), podridão radicular vermelha (*Fusarium solani* (Mart.) Sacc.), podridão radicular seca (*Fusarium solani* f.sp. *sojae* (Mart.) Sacc.), podridão radicular mole (*Phytophthora megasperma* Drechsler f.sp. *glycines* Kuan & Erwin), cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum* f.sp. *meridionalis* Cke & Ell.), meloidoginose (*Meloidogyne* spp.), nematoide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe), nematóide das lesões (*Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Filipjev & Schuurmans Stekhoven) entre outras, podem causar danos consideráveis em determinadas condições como solo desequilibrado, diminuição de matéria orgânica, excesso de água, bem como pelo aspecto de dificuldade de controle, comparado a doenças de parte aérea que são manejadas com fungicidas. A origem deste desequilíbrio está na agricultura praticada, que modifica os campos de cultivo fazendo com que percam o balanço ecológico natural, tornando-os mais propensos às perturbações por alguns agentes, dentre os quais os fitopatógenos (MICHEREFF et al., 2005).

3.2. *Sclerotinia sclerotiorum* agente causal do mofo branco

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* pertence ao Filo Ascomycota, Classe Discomiceto, Ordem Helotiales e Família Sclerotiniaceae (BOLAND; HALL, 1994). É um patógeno necrotrófico e não específico que pode ter como hospedeiros mais de 408 espécies

botânicas, incluindo culturas de importância econômica e diversas plantas daninhas (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006; CABI, 2007).

Entre as plantas afetadas pelo fungo, a Família Fabaceae está em segundo lugar em número de hospedeiros, ficando atrás somente da Família Asteraceae (PURDY, 1979). É considerado um dos patógenos fúngicos mais importantes no mundo e está distribuído em todas as regiões produtoras, sejam elas temperadas, subtropicais ou tropicais (LEITE et al., 2000).

O fungo se desenvolve muito bem em temperaturas amenas (15 a 25 °C) e em ambientes com alta umidade. Em temperaturas abaixo de 0 °C e acima de 32 °C, o fungo apresenta baixa atividade (PURDY, 1979).

É o agente causal da doença conhecida como mofo-branco ou podridão branca da haste (DHINGRA; MENDONÇA; MACEDO, 2009). Produz estruturas de resistência conhecidas como escleródios, que podem sobreviver por até dez anos no solo. São estruturas vegetativas compostas por camadas de hifas, cujas células são melanizadas e de paredes espessas, sendo responsáveis pela resistência do patógeno no solo (LE TOURNEAU, 1979). Quando as condições ambientais se tornam adequadas, os escleródios podem germinar de forma miceliogênica, dando origem a hifas infecciosas, ou de forma carpogênica, formando apotécios (corpos de frutificação) que emergem na superfície do solo e liberam os ascósporos (esporos sexuais) (GRACIA-GARZA; REELEDER; PAULITZ, 1997). Em condições de alta umidade relativa, normalmente, acima de 70% e temperatura ao redor de 20°C, os apotécios podem liberar ascósporos durante várias semanas, infeccionando a parte aérea das plantas (LEITE, 2005).

Os sintomas variam de acordo com o hospedeiro, parte afetada da planta e com as condições ambientais. Mas no geral são caracterizados por necrose no caule ou haste e murchamento seguido de seca das folhas (KIMATI et al., 1997). Com frequência os tecidos radiculares também são infectados, causando o apodrecimento das raízes (ADAMS; TATE, 1975; DORRELL; HUANG, 1978). O sinal da doença é o crescimento de micélio cottonoso e branco na superfície dos tecidos lesionados e a presença de inúmeros escleródios pretos e de formato irregular (GUARESCHI et al., 2012).

Sclerotinia sclerotiorum foi descrito pela primeira vez por Anton de Bary em 1884 (PURDY, 1979). No Brasil, o primeiro relato da ocorrência da doença foi em 1921, Estado de São Paulo na cultura de batata (CHAVES, 1964). Atualmente, o fungo *S. sclerotiorum* está difundido por todo o país, e as áreas mais afetadas são os estados do Sul, Sudeste e Centro-Oeste, locais com condições climáticas favoráveis ao patógeno, ou seja, alta umidade relativa e temperatura amena, característico de regiões acima de 800 m de altitude (ALMEIDA et al., 2005).

O mofo branco tem se tornado uma doença de grande importância para a cultura de soja em muitas regiões do Centro-Sul do Brasil. Além do clima propício a doença (LEITE, 2005), o uso de sementes contaminadas e a rotação de culturas com espécies suscetíveis, colaboram para o alto índice do mofo nos cultivos (GARCIA; JULIATTI, 2012). A fase mais vulnerável ao patógeno estende-se da floração plena ao início da formação de vagens e enchimento dos grãos (DANIELSON; NELSON; HELMS, 2004). O fungo é capaz de infectar qualquer parte da planta, porém, as infecções iniciam-se com mais frequência a partir das inflorescências, das axilas das folhas e dos ramos laterais (ALMEIDA et al., 1997). Em condições favoráveis, o patógeno pode ocasionar danos severos, resultando em grandes perdas de rendimento (VENTUROSOSO et al., 2013).

3.2.1. Controle da doença

O fungo *S. sclerotiorum* é um patógeno de difícil controle por causa da agressividade, dispersão e a longa resistência dos escleródios no solo (HUANG; HOES, 1980).

A recomendação para controlar esse fungo é a adoção de medidas integradas, que pode reduzir a população de escleródios no solo e facilitar a formação de um ambiente desfavorável ao desenvolvimento da doença (LOBO JUNIOR et al., 2009).

Práticas de manejo, tais como o uso de sementes sadias, plantio precoce, preparo do solo, rotação de cultura, irrigação eficiente, formação de palhada, controle químico, controle biológico com antagonistas, maior espaçamento entre linhas e menor densidade de plantas colaboram para uma redução na agressividade de *S. sclerotiorum* (ZANCAN et al., 2012).

Os fungicidas apresentam um efeito temporário e há a necessidade de reaplicação durante o período de crescimento da cultura. Agentes biológicos incluindo fungos e bactérias antagonistas afetam a sobrevivência do escleródio no solo (KIM; KNUDSEN, 2008), pois são capazes de se estabelecer, colonizar e se reproduzir no ecossistema favorecendo o equilíbrio biológico na área de cultivo (ÁVILA et al., 2005).

O controle biológico baseia-se na relação antagônica entre micro-organismos e fitopatógenos, podendo ser caracterizado por diferentes modos de atuação: competição por espaço e nutrientes, antibiose, parasitismo e indução de resistência na planta hospedeira (MELO; AZEVEDO, 1998; MORAES; CAPALBO; MORAES, 1991; PAPAIVIZAS, 1985). O biocontrole é uma prática que vem ganhando bastante destaque no controle de *S. sclerotiorum* (ETHUR et al., 2005). É um método de controle que está em evidência no

agronegócio, pois substitui ou complementa o uso dos produtos químicos. A aplicação melhora e/ou aumenta a qualidade do produto agrícola e contribui para a preservação dos recursos naturais, aumentando a sustentabilidade dos agroecossistemas sem causar poluição ambiental (SUMIDA, 2012).

Na literatura são citadas mais de 30 espécies de fungos e de bactérias com efeitos antagonísticos a *S. sclerotiorum*, os quais parasitam escleródios e previnem sua formação, ou reduzem a germinação carpogênica reduzindo o potencial de inóculo (MORETINI; MELO, 2007). Entre eles podem ser citados, espécies de *Trichoderma* (DOS SANTOS; DHINGRA, 1982; TRUTMANN; KEANE, 1990), de *Penicillium*, *Fusarium*, e os fungos *Coniothyrium minitans*, *Gliocladium virens* e *Sporidesmium schrotivorum* (ETHUR, 2014).

Entre os fungos antagonistas, *Trichoderma* spp. tem se destacado. Espécies de *Trichoderma* têm sido consideradas, ainda, por muitos autores como promotoras de crescimento de plantas (HARMAN, 2000; HARMAN et al., 2004) e tem-se observado o potencial de isolados desse micro-organismo na melhoria da germinação de sementes (HOWEL, 2007).

3.3. Nematoides como agentes causais de doenças de plantas

Os nematoides são os seres pluricelulares mais abundantes no planeta (KIMPINSKI; STURZ, 2003). São organismos essencialmente aquáticos que vivem nos mares e oceanos, nos habitats de água doce e na película de água do solo. A maioria é de vida livre, alimentando-se de bactérias, fungos, protozoários, algas, oligoquetas ou nematoides. Alguns são parasitos de plantas (fitoparasitos), outros são parasitos de animais vertebrados e invertebrados (FERRAZ; MONTEIRO, 2011).

Os fitoparasitos passam parte ou todo seu ciclo de vida no solo. São seres transparentes e de tamanho diminuto, em geral, não são vistos a olho nu. A atividade dos nematoides no solo é influenciada tanto pelos fatores abióticos, tais como variação de temperatura, umidade e aeração, como pelos fatores bióticos, principalmente altas populações de bactérias, fungos, algas, protozoários, insetos, ácaros, outros nematoides e animais do solo (CHEN; DICKINSON, 2004; ROSSI, 2002).

Quando não estão no solo, os nematoides de plantas se encontram no interior de estruturas vegetais. Podem parasitar qualquer parte da planta como folhas, caules e raízes, porém, a maioria dos fitonematoides parasita os órgãos subterrâneos, como o rizoma, tubérculo, raízes e bulbo (LORDELLO, 1984; ROSSI, 2002; FERRAZ; MONTEIRO, 2011). Esses micro-organismos podem interagir com fungos fitopatogênicos habitantes do solo em

áreas cultivadas (FISCHER et al., 2010) e agravar o quadro de infecção na planta. Nestas associações, os nematoides podem favorecer a entrada do patógeno principal, modificar a fisiologia do hospedeiro tornando-o favorável a outro agente, ou ainda alterar o mecanismo de resistência a um determinado patógeno (OLIVEIRA, 2007).

Os nematoides parasitos de plantas possuem um estilete, órgão semelhante a uma agulha de seringa, que é utilizado para introduzir substâncias capazes de digerir o conteúdo celular vegetal, para que possam se alimentar desse líquido (ROSSI, 2002).

A disponibilidade de alimento favorece o aumento da população de certas espécies de nematoides que podem causar danos e, conseqüentemente, prejuízos à agricultura. A responsabilidade pelo dano a uma planta nunca é atribuída a um único indivíduo. É necessário um número significativo de parasitos para ocasionar perdas significativas (ROSSI, 2002).

Os nematoides não tem muita capacidade de deslocamento no solo, locomovem-se poucos centímetros, por isso a disseminação desse agente patogênico depende muito do homem. Geralmente a dispersão ocorre por mudas contaminadas, deslocamento de equipamentos de áreas infestadas para áreas sadias e por meio da irrigação ou água da chuva (RITZINGER; COSTA, 2006).

Os nematoides fitopatogênicos são muito importantes para a agricultura mundial, com destaque para uma ou mais espécies de *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Rodopholus*, *Rotylenchulus*, *Nacobbus* e *Tylenchulus* por causarem perdas econômicas significativas em culturas de importância comercial, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (SIKORA; FERNÁNDEZ, 2005). O prejuízo causado pelos nematoides se torna ainda maior, porque as medidas de controle efetuadas elevam ainda mais os custos de produção reduzindo o lucro dos produtores (KARSSSEN; MOENS; PERRY, 2006).

3.3.1. *Meloidogyne* spp.: Nematoides de galha

As espécies de *Meloidogyne* pertencem ao Filo Nematoda e estão incluídas na Classe Chromadorea, Ordem Rhabditida, Subordem Tylenchina, Superfamília Tylenchoidea e Família Meloidogynidae (DE LEY; BLAXTER, 2002; KARSSSEN; MOENS; PERRY, 2006). Esta família agrega os chamados nematoides de galha ou root-knot nematode em inglês. O gênero *Meloidogyne* foi descrito em 1887 no Brasil, com a descrição da espécie-tipo *Meloidogyne exigua* Goeldi, encontrada em muitos cafezais, na época denominada Província do Rio de Janeiro (FERRAZ; MONTEIRO, 2011).

Os nematoides de galha estão distribuídos mundialmente e são muito importantes devido à capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais que possuem e por parasitarem uma ampla gama de hospedeiros (FREITAS et al., 2009; OYEKANMI; FAWOLE, 2010).

Até o final de 2004 foram descritas cento e seis espécies de *Meloidogyne* (KARSSSEN; MOENS; 2006). Carneiro e Almeida (2001) apontam as espécies *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *Meloidogyne javanica* (Treb) Chitwood, *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood e *Meloidogyne hapla* Chitwood como as mais danosas para a agricultura mundial. Das culturas acometidas por nematoides, a soja é uma das mais importantes. Cerca de 100 espécies de nematoides, envolvendo aproximadamente 50 gêneros, foram associadas à cultura da soja em todo o mundo. No Brasil, para a cultura de soja, as espécies de maior importância são: nematoide das lesões radiculares [*Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Filipjev & Schuurmans Stekhoven], nematoide reniforme (*Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira), nematoide de cisto da soja (*Heterodera glycines*) e nematoides de galha (*Meloidogyne* spp.). Deste último grupo mencionado, os mais importantes para a cultura são *M. incognita* e *M. javanica*. A espécie *M. javanica* tem ocorrência generalizada, enquanto *M. incognita* predomina em áreas cultivadas anteriormente com café ou algodão. Ambas são espécies de locais tipicamente tropicais e subtropicais (DIAS et al., 2010b; OYEKANMI; FAWOLE, 2010).

Os sintomas observados nas plantações de soja atacadas por nematoides de galha, geralmente são manchas em forma de reboleiras, plantas pequenas e amareladas, murcha das plantas nas horas quentes do dia, menor desenvolvimento das plantas, desfolha prematura, sintomas de deficiência mineral e clorose ou necroses entre as nervuras. O tamanho das plantas pode não ser afetado, mas com o florescimento, há um intenso abortamento de vagens e amadurecimento prematuro das plantas. Nas raízes ocorre um engrossamento localizado, formando galhas em número e tamanho variados, dependendo da suscetibilidade da cultivar e da densidade populacional do nematoide no solo. O sistema radicular fica deformado e reduzido, prejudicando a absorção de água e nutrientes. Nos anos que ocorrem “veranicos” na fase de enchimento de grãos, os prejuízos podem ser maiores, comprometendo ou até inviabilizando o cultivo quando a infestação é alta (DIAS et al., 2010b; NUNES; MONTEIRO; POMELA, 2010).

3.3.2. Ciclo de vida

A fêmea de *Meloidogyne* spp. deposita seus ovos em um único local da raiz, formando uma massa de ovos que fica retida por uma matriz gelatinosa excretada pelas glândulas retais da fêmea no momento da postura dos ovos (WEISCHER; BROWN, 2000). As massas podem ser depositadas na superfície das raízes, ou algumas vezes, internamente no parênquima cortical, e contém de 400 a 500 ovos cada (ABAD et al., 2009).

O desenvolvimento do ovo ocorre rapidamente após a postura, em poucas horas o juvenil de primeiro estágio (J1) está formado. Este passa por uma ecdise ainda dentro do ovo, dando origem ao juvenil de segundo estágio (J2), que eclode perfurando a casca com seu estilete (ABAD et al., 2009). Os juvenis infestantes (J2) migram pelo solo em busca de um hospedeiro favorável. Os exsudatos liberados pelas raízes das plantas atraem os J2, que penetram pela extremidade da raiz em direção ao córtex.

O estilete libera secreções das glândulas esofagianas, que causam hipertrofia celular no cilindro central e hiperplasia no periciclo, levando a formação de células gigantes ou nutridoras, que servirão para alimentar os nematoides (LORDELLO, 1984). As células próximas às células nutridoras sofrem um distúrbio hormonal (hiperauxina) que provoca hiperplasia e hipertrofia nessas células formando as galhas, principal sintoma causado por *Meloidogyne* spp. em plantas. Uma vez instalados no sítio de alimentação, os juvenis se tornam sedentários e durante o desenvolvimento assumem um formato salsichoide e sofrem ecdises para o terceiro e o quarto estágio juvenil (J3 e J4). Na última muda se dá a verdadeira transformação da morfologia do macho, que se torna um nematoide longo e filiforme. A fêmea madura mantém a mesma forma do último estágio juvenil, só aumenta o tamanho e torna-se mais periforme. Os machos adultos deixam o sistema radicular e as fêmeas continuam dentro das raízes como endoparasitas sedentárias até o fim de seu ciclo de vida (MOENS; PERRY; STARR, 2009).

Os machos adultos não se alimentam e vivem livres no solo. A maioria das espécies de *Meloidogyne* se reproduz por partenogênese, e não há necessidade de copulação, então os machos permanecem no solo até a morte (EISENBACK; TRIANTAPHYLLOU, 1991).

O ciclo de vida do nematoide de galha é de aproximadamente 28 ou 30 dias, e é completamente afetado pela temperatura, umidade e planta hospedeira. O ciclo do nematoide se torna mais longo quando a temperatura é inferior a 20°C ou superior a 35°C e em condições de solo encharcado ou demasiadamente seco (COSTA et al., 2000).

As fêmeas produzem ovos por três semanas, depois cessam a produção, podendo viver um pouco mais. Os machos vivem semanas e os J2 podem viver de poucos dias a meses (TAYLOR; SASSER, 1983). Para as espécies de *Meloidogyne* ocorre um fenômeno chamado de reversão sexual. Isto ocorre quando as condições ambientais estão incômodas, como alta população de nematoides nas raízes ou planta hospedeira resistente. Normalmente, os juvenis se tornam fêmeas, mas em condições adversas, eles se tornam

machos, pois o primórdio sexual se desenvolve em testículos em vez de ovários. Isso acontece como mecanismo de sobrevivência dos nematoides, dessa forma menos ovos são gerados e o parasitismo sobre a planta é mais suave, garantindo a sobrevivência das poucas fêmeas formadas (FREITAS; OLIVEIRA; FERRAZ, 2006)

3.3.3. Medidas de Controle

Patógenos de solo são muito difíceis de controlar, e os nematoides de galha apresentam dificuldades particulares devido a sua ampla gama de hospedeiros, ciclo de vida curto, alta taxa de reprodução e natureza endoparasítica (AFFOKPON et al., 2011; SHARON et al., 2007)

O controle dos nematoides pode ser feito de forma integrada, e várias estratégias devem ser utilizadas combinadas, tais como medidas de exclusão, utilização de plantas antagonistas, controle químico, adubação verde, cultivares resistentes, rotação de culturas e controle biológico. A utilização de medidas de controle integradas possibilita baixar as populações de nematoides a um nível que não cause danos (DIAS et al., 2010b; FERRAZ, 1992; MORALES, 2007; NUNES; MONTEIRO; POMELA, 2010; OYEKANMI; FAWOLE, 2010).

Com a redução no uso de agroquímicos, devido a falta de efetividade e os altos custos, muitos nematicidas e fumigantes de solo estão sendo retirados do mercado, e isso estimula o uso e a busca por novas técnicas alternativas para o controle dos nematoides (CHEN et al., 1996; DE LEIJ; KERRY, 1991; DICKSON et al., 1994; STIRLING, 1991; VOS et al., 2013).

Os agentes de controle biológico têm um grande impacto na regulação de populações dos nematoides de galha e têm sido utilizados em combinação com outras estratégias para o controle desses agentes patogênicos (MASCARIN; BONFIM JUNIOR; ARAÚJO FILHO, 2012).

Muitos micro-organismos atuam como agentes de biocontrole de fitonematoides, incluindo fungos, bactérias, nematóides predadores, ácaros, entre outros (SOARES; MAIA, 2004). Os fungos nematófagos são os mais estudados pelos pesquisadores e, juntamente com as bactérias, são os que apresentam maior potencial de uso na agricultura. Eles são capazes de capturar, matar e digerir os fitonematoides. Podem ser divididos em predadores, endoparasitas, oportunistas (parasitas de ovos e de fêmeas sedentárias) e produtores de metabólitos tóxicos aos nematoides (FERREIRA et al., 2008; LOPES et al., 2007).

Várias espécies de fungos, tais como *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson, *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & Gams (sinonímia *Verticillium chlamydosporium* Goddard), *Arthrobotrys* Corda, *Monacrosporium* Oudemans, *Dactylella* Grove, *Trichoderma* spp. e entre outros vêm se destacando como potenciais agentes de controle biológico dos fitonematóides em vários estudos (AFFOKPON et al., 2011; MASCARIN; BONFIM JUNIOR; ARAÚJO FILHO, 2012; SANTIN, 2008; SHARON et al., 2007), mostrando que é possível a utilização de biocontroladores no manejo desses fitopatógenos.

3.4. *Trichoderma* spp.

3.4.1. Características gerais

As espécies de *Trichoderma* estão amplamente distribuídas pelo mundo, são fungos ubíquos colonizadores de materiais celulósicos, encontrados em diferentes tipos de solo, principalmente os ricos em matéria orgânica (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010). São importantes na natureza, pois participam da ciclagem de nutrientes decompondo os resíduos vegetais do solo (TOPOLOVEC-PINTARIĆ; ŽUTIĆ; ĐERMIĆ, 2013). Estão entre os micro-organismos mais estudados no mundo devido ao grande potencial antagônico a vários patógenos (ETHUR, 2006). Muitas espécies de *Trichoderma* produzem enzimas de interesse industrial, e isso os torna muito importantes economicamente (DRUZHININA; KUBICEK, 2005).

Em 1794, Persoon descreveu o gênero *Trichoderma* pela primeira vez e associou a quatro espécies de fungos. A primeira revisão taxonômica foi realizada em 1969 por Rifai, que reclassificou o gênero de acordo com a morfologia e utilizou o conceito de espécies agregadas (RIFAI, 1969). Em concordância com a nova classificação, Rifai reconheceu nove espécies de *Trichoderma*: *T. hamatum* Bain, *T. viride* Persoon, *T. aureoviride* Rifai, *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Lieckfeldt, *T. pseudokoningii* Rifai, *T. longibrachiatum* Bissett, *T. polysporum* Link e *T. glaucum* Rifai.

Bissett revisou em 1991, a classificação definida por Rifai, e propôs que as espécies semelhantes fossem separadas em cinco seções: *Pachybasium*, *Trichoderma*, *Saturnisporium*, *Longibrachiatum* e *Hypocreanum* (BISSETT, 1991abc). Desde então, mais espécies foram agregadas ao gênero *Trichoderma* e atualmente a Subcomissão Internacional sobre *Trichoderma* e *Hypocrea* (ISTH) relata 104 espécies, caracterizadas em nível molecular (ISTH, 2011).

Na fase teleomórfica é classificado como ascomiceto da Ordem Hypocreales e gênero *Hypocrea* (BROTMAN; KAPUGANTI; VITERBO, 2010; MASSOLA; KRUGNER, 2011). Já o estágio sexual anamórfico é classificado como deuteromiceto, Subclasse Hifomicetes, Ordem Moniliales e Família Moniliaceae (MELO, 1998).

As colônias de *Trichoderma* spp. crescem rapidamente, inicialmente com superfície lisa, quase translúcida, tornando-se posteriormente flocosas ou compactas. A coloração da colônia é variável com tons de verde, amarelo, amarelo esverdeado e, por vezes, com tonalidade muito clara (GAMS; BISSET, 1998). A coloração é devida a pigmentação e quantidade de conídios. O micélio é composto de hifas hialinas bem ramificadas com parede lisa, que medem de 5 a 10 μm de diâmetro (WEEDEN; SHELTON; HOFFMAN, 2008). Quase todas as espécies formam clamidósporos, que são esporos assexuais, intercalados nas hifas e ocasionalmente terminais (HOWELL, 2003; MELO, 1991).

Os conidióforos são ramificados, de formato cônico ou piramidal, e geralmente são formados em anéis sazonais, produzindo zonas concêntricas. Os conídios têm formato subgloboso, ovoides, elipsoides ou elíptico-cilíndricos, com parede lisa, rugosa ou estriada, de acordo com a espécie (GAMS; BISSET, 1998), e são produzidos em série e acumulados no ápice das fiálides (MELO, 1991, 1996; WEEDEN; SHELTON; HOFFMAN, 2008). O formato das fiálides varia de ampuliforme a lageniforme, geralmente com centro dilatado e ápice afunilado, ficam dispostas em verticilos terminais nas ramificações do conidióforo (GAMS; BISSET, 1998). Os conídios medem de 3 a 5 μm de diâmetro e a quantidade produzida depende da espécie do *Trichoderma* spp., e das condições do meio de cultura (MELO, 1991; MELO, 1996; WEEDEN; SHELTON; HOFFMAN, 2008).

3.4.2. *Trichoderma* spp. como agente de controle biológico de doenças de plantas

O controle biológico se caracteriza pela redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, por um ou mais organismos, realizado naturalmente, ou através da manipulação do ambiente ou do hospedeiro, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas (COOK; BAKER, 1983). O controle biológico resulta da interação entre o patógeno, o hospedeiro e o antagonista, no qual o sistema biológico sofre isolada ou conjuntamente a influência do ambiente (BETTIOL, 1991).

O papel dos agentes de controle biológico na agricultura vem sendo reconhecido e tem se tornado cada vez mais crucial, em alguns casos, complementando ou substituindo os agroquímicos (TEMPLETON; HEINY, 1989; WHIPPS; LUMSDEN, 2001).

Entre os vários micro-organismos com ação antagonista, destacam-se os fungos, pela relativa facilidade de identificação em nível de espécies e, também, pelo fato de que sua maioria apresenta facilidade de produção em meios artificiais (COPPING; MENN, 2000).

As espécies de *Trichoderma* estão entre os agentes de biocontrole de doenças mais conhecidos e empregados mundialmente, sendo que o emprego desses agentes é considerado como uma estratégia importante, em crescimento na América Latina. Isto em função de ser uma ferramenta cada vez mais importante nos sistemas de cultivo convencional, integrado e orgânico (LOPES, 2009).

Espécies de *Trichoderma* estão entre os micro-organismos mais amplamente utilizados no controle de doenças de plantas, pois possuem várias características interessantes, como a facilidade de obtenção de linhagens a partir de solo, plantas e madeira em decomposição; rápido crescimento, esporulação abundante e capacidade de colonizar diversos tipos de substratos com muita rapidez (INCH et al., 2011; MELO, 1996).

São conhecidos por parasitar outros fungos e formar associações com as raízes de plantas. Apresentam grande diversidade genética e produzem diversos metabólitos e antibióticos de interesse industrial e ecológico, além do mais, são facilmente propagados e formulados em condições laboratoriais (BENÍTEZ et al., 2004; ELAD, 2000; WEEDEN; SHELTON; HOFFMAN, 2008).

A atividade biológica das espécies é baseada em diferentes mecanismos, tais como a produção de metabólitos antifúngicos, micoparasitismo e competição por espaço e nutrientes (SHORESH; YEDIDIA; CHET, 2005; VINALE et al., 2008; WIJESINGHE et al., 2011).

Devido a todas essas características e potencial, as espécies de *Trichoderma* encontram-se entre as que atraem maior atenção no controle biológico (AHMAD; BAKER, 1987; BETTIOL; GHINI, 1995; WHIPPS; LUMSDEN, 2001).

A maioria dos produtos a base de *Trichoderma* spp. comercializados no mercado mundial visa o controle de fitopatógenos de solo, e mais recentemente, o controle de nematoides. No Brasil, esses produtos são utilizados principalmente no controle de *S. sclerotiorum*, agente causal do mofo-branco, que afeta em culturas importantes como soja e feijão, provocando perdas significativas na produtividade (LEITE, 2005; PARISI; PATRICIO; OLIVEIRA, 2006). O efeito de isolados de *Trichoderma* spp. no biocontrole de nematoides tem sido pouco estudado e explorado no país, embora trabalhos recentes indiquem grande potencial contra esse patógeno, devido a capacidade de colonização da matriz gelatinosa, parasitismo dos ovos e juvenis de segundo estágio (SANTIN, 2008).

Atualmente, o uso de agentes de biocontrole encontra-se bem difundido em diversos países. Essa estratégia continua ainda em crescimento na América Latina (ALVES; LOPES, 2008). Além de aspectos socioculturais envolvidos na questão do controle biológico, a

pequena quantidade de produtos disponíveis no mercado nacional colabora para a baixa utilização deste método (LOPES, 2009).

De acordo com Heraux et al. (2005), espécies de *Trichoderma* representam quase 50% do mercado de agentes de controle biológico. As pesquisas utilizando *Trichoderma* spp. para o controle de doenças das plantas começaram com o trabalho de Weidling (1934) que constatou a capacidade de *T. lignorum* em parasitar importantes patógenos de solo (BRAÚNA, 2011).

Muitos isolados das várias espécies de *Trichoderma* podem agir contra patógenos de solo e de parte aérea durante o desenvolvimento da cultura e também contra os micro-organismos de pós-colheita, na fase de armazenamento. Existem diversos trabalhos que relatam o sucesso de *Trichoderma* spp. no biocontrole de vários agentes patogênicos, principalmente os de solo como *R. solani*, *S. rolfsii*, *S. sclerotiorum*, *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitz, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Cylindrocladium scoparium* Morgan e *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus & Moore (CARVALHO FILHO, 2008; CÚNDOM; MAZZA; GUTIÉRREZ, 2003; EL-HASAN; WALKER; BUCHENAUER, 2008; EL-HASAN et al., 2009; ETHUR; CEMBRANEL; SILVA, 2001; ETHUR, 2006; LOUZADA et al., 2009; NASEBY; PASCUAL; LYNCH, 2000; REIS ALMEIDA et al., 2007) e *M. javanica* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) (SHARON et al., 2001).

A atividade de biocontrole de isolados de *Trichoderma* spp. é intensamente estudada, devido principalmente à produção de enzimas líticas extracelulares degradadoras de parede celular de fungos, tais como quitinases, β -1, 4-glucanases e proteases (CORABI-ADELL; LUCON, 2002). A capacidade de *Trichoderma* spp. em degradar quitina permite que esses fungos atuem no controle de nematoides, uma vez que o ovo é constituído por este polímero. Sharon et al. (2001) verificaram a atividade proteolítica de isolados de *T. harzianum* e sugerem que essa atividade pode ser importante no controle biológico de nematoides.

3.4.3. *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento de plantas

Espécies de *Trichoderma* podem ser benéficas atuando diretamente ou indiretamente no desenvolvimento e produtividade de culturas. A aplicação desse agente pode diminuir os custos de produção, gerando uma vantagem econômica aos produtores. Sua utilização pode reduzir o impacto ambiental e melhorar a segurança alimentar, pois o uso regular desse fungo minimiza a necessidade de aplicação de produtos químicos (TOPOLOVEC-PINTARIĆ; ŽUTIĆ; ĐERMIĆ, 2013).

Trichoderma spp. possui alto potencial antagônico e micoparasítico e muitas linhagens são capazes de reduzir a severidade de doenças de plantas, pela inibição de fitopatógenos no solo e nas raízes. Quando agem como simbiontes endofíticos, conseguem mudar a expressão de genes no vegetal, principalmente em mudas, alterando a fisiologia da planta (BROTMAN et al., 2013).

A interação do fungo com o vegetal causa efeitos diretos, propiciando maior eficiência na utilização de fertilizantes nitrogenados, maior resistência a patógenos maiores e menores, eficiência fotossintética, aumento na absorção de nutrientes, aumento na porcentagem e taxa de germinação de sementes e indução de resistência sistêmica (ISR) a doenças. A consequência dessa interação é percebida no aumento de crescimento e maior produtividade da planta (HARMAN et al., 2012; RYDER et al., 2012).

Outro benefício proporcionado por isolados de *Trichoderma* spp. é o aumento da resistência a estresses bióticos e abióticos nas plantas. Esses fatores podem limitar o crescimento e a produtividade de culturas importantes, reduzindo a produção para menos que a metade do que é possível quando a planta encontra-se em condições ideais de crescimento (BROTMAN et al., 2013). Essa habilidade de *Trichoderma* spp. é conhecida, entretanto dados específicos dos mecanismos que controlam os múltiplos fatores que ocasionam o estresse em plantas ainda não foram publicados (HERMOSA et al., 2012).

Atualmente, a promoção de crescimento de plantas por espécies de *Trichoderma* não é só relacionada ao controle dos patógenos, pois a melhora no crescimento de plantas foi observada na ausência de qualquer doença detectável e em solo estéril, demonstrando que esta uma habilidade independente das capacidades antifúngicas (TOPOLOVEC-PINTARIĆ; ŽUTIĆ; ĐERMIĆ, 2013).

A promoção de crescimento de plantas e proteção contra infecções estão relacionadas com a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. colonizarem raízes. A colonização envolve a habilidade de reconhecer e aderir às raízes, penetrar, e suportar metabólitos tóxicos produzidos pelas plantas em resposta à invasão. Para isolados de *Trichoderma* spp., a aderência à superfície das raízes pode ser mediada pelas proteínas hidrofobinas e expansinas. *Trichoderma asperellum* Samuels, produz uma hidrofobina que proporciona suporte à colonização das raízes de plantas e uma proteína tipo expansina, que é capaz de modificar a arquitetura da parede da célula da planta, facilitando a colonização das raízes (SAMOLSKI et al., 2012).

O aumento de produtividade em plantas de milho que foram inoculadas com *Trichoderma* sp. foi relacionado a modificação do sistema radicular pelo fungo. Outros efeitos benéficos observados foram o aumento da produção de biomassa de raízes e maior desenvolvimento das ramificações radiculares. Esses efeitos de crescimento estão

relacionados a produção de auxina que também regula a arquitetura do sistema radicular (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2009).

A resposta positiva no crescimento da planta, ocasionada pela interação planta-fungo, já foi constatada em diversos trabalhos, em várias culturas, quando tratadas com espécies de *Trichoderma*. Há relatos sobre promoção de crescimento em rabanete (*Raphanus sativus* L.), pimenta (*Capsicum* spp.), pepino (*Cucumis sativus* L.), tomate, soja (*Glycine max* (L.) Merrill), alface (*Lactuca sativa* L.), pimentão (*Capsicum annuum* L.), repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) e couve (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C.) (FONTENELLE, 2011; MACHADO et al., 2012; SILVA, 2011).

Trichoderma spp. também tem demonstrado bons resultados no tratamento de sementes. Estudos relataram que em sementes de tomate tratadas com o agente, a germinação foi mais rápida e uniforme, apresentando mudas mais vigorosas. Os estresses osmótico, salino e/ou por temperatura foram minimizados pela indução de proteção fisiológica nas plantas contra danos oxidativos (MASTOURI; BJÖRKMAN; HARMAN, 2010).

Muitos autores acreditam que a promoção de crescimento também pode estar intimamente ligada a solubilização de nutrientes do solo necessários as plantas. Diversos isolados de *Trichoderma* spp. demonstraram capacidade de solubilizar nutrientes a partir de rochas de fosfato, óxido de manganês, óxido de ferro e zinco metálico. A dinâmica de nutrientes no solo é bastante complexa e influenciada pelo pH e microflora presentes, isso afeta a acessibilidade desses compostos para serem absorvidos pelas raízes das plantas, e isso enaltece essa habilidade de *Trichoderma* spp. que pode facilitar o acesso a estes compostos, favorecendo a nutrição e o crescimento da planta (MACHADO et al., 2012).

A capacidade de promoção de crescimento de raízes e todo o sistema vascular de plantas, proporcionadas por espécies de *Trichoderma* pode melhorar a saúde das plantas suprimindo parte das necessidades nutricionais, em consequência a planta tem aumento no crescimento propiciado por este fungo benéfico. A utilização de *Trichoderma* spp. na agricultura poderá ser ampliada quando os mecanismos envolvidos na promoção de crescimento de plantas forem elucidados (HARMAN, 2006).

3.5. Produção massal de agentes de biocontrole, com foco em espécies de *Trichoderma*

O uso de agentes de controle biológico na agricultura tem sido considerado como uma alternativa ambientalmente correta, comparado à aplicação dos agrotóxicos químicos. O desenvolvimento de uma produção massal eficiente e eficaz, em termos de custos de

propágulos viáveis do organismo selecionado, está entre as principais dificuldades a serem resolvidas para que a produção em larga escala de agentes de controle biológico torne-se rotina (JAKUBÍKOVÁ et al., 2006).

A produção massal de *Trichoderma* spp. tornou-se um foco de pesquisa e desenvolvimento industrial na busca de alternativas a tratamentos químicos para o controle de doenças de plantas ocasionadas por micro-organismos presentes no solo e em sementes (MACHADO et al., 2012).

Trichoderma spp. é um dos mais empregados entre os fungos filamentosos devido ao seu grande potencial de aplicação do ponto de vista industrial e biotecnológico (SAMUELS, 1996). Para tanto, a tecnologia e pesquisa envolvidas na obtenção de um bioproduto capaz de apresentar potencial para enquadrar-se no mercado agroindustrial são compostas de várias etapas de estudo (MACHADO et al., 2012).

A seleção de meios de cultura é um aspecto a ser levado em consideração na produção em massa de um agente de controle biológico (KHALIL; SHAH; NAEEM, 1985). A composição do meio pode ter uma estreita relação com o custo e a qualidade do fungo produzido, pois pode influenciar o tipo, formato e quantidade de propágulo (LEITE et al., 2003).

É desejável encontrar para cada micro-organismo as necessidades mínimas de nutrição e, com isso, desenvolver um meio mínimo que contenha somente os compostos realmente necessários ao crescimento e à esporulação (SILVA; MELO, 1999). Micro-organismos requerem fonte de carbono e nitrogênio, macronutrientes, e alguns elementos traços para o seu crescimento. O equilíbrio de fontes de carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P), vitaminas e micronutrientes na composição do meio de cultura, é fator decisivo para o crescimento e esporulação dos micro-organismos (CARLILE; WATKINSON, 1994).

O carbono serve primariamente como fonte de energia, sendo uma pequena fração incorporada dentro da célula (GOLUEKE, 1991). Geralmente o amido, a glicose, sacarose, dextrose e diversos outros açúcares são fontes de C utilizadas no meio de cultura (LEITE et al., 2003). O nitrogênio é um elemento crítico para os micro-organismos, pois compõe as proteínas, ácidos nucléicos, aminoácidos, enzimas e coenzimas necessárias para o crescimento e funcionamento da célula (GOLUEKE, 1991). As fontes de N são geralmente componentes ricos em proteína e/ ou aminoácidos, como extrato de soja e outros subprodutos vegetais, extrato de levedura e peptona, podendo ser utilizado também componentes inorgânicos como o ácido casamino (LEITE et al., 2003).

O carbono e o nitrogênio são elementos essenciais para o desenvolvimento de meios de cultivo para produção porque o crescimento de fungos diminui em condições deficientes de C e N (SILVA; MELO, 1999).

Segundo Jackson et al. (1996) e Jackson (1997), três etapas devem ser consideradas para desenvolver um meio de cultura. A primeira é selecionar um meio que proporcione uma boa produção da forma desejada do fungo, a segunda é variar os nutrientes e avaliar o seu impacto na produção do micro-organismo e a última é substituir os componentes nutricionais por um substrato complexo, barato e acessível.

Os processos de produção de fungos são realizados em função da estrutura do micro-organismo a ser produzido e utilizado no campo, podendo ser utilizados meios sólidos, líquidos e o sistema bifásico (ALVES; PEREIRA, 1989; LEITE et al., 2003).

Geralmente, a multiplicação em massa dos agentes de biocontrole é por tecnologia de fermentação sólida. No processo de produção em meios sólidos, o fungo é produzido na superfície do meio, dentro de diferentes recipientes conforme o objetivo e escala de produção (ALMEIDA; BATISTA FILHO, 2006). Algumas desvantagens desse método são o requerimento de grande volume de substrato, contaminação durante a fermentação e longo tempo requerido para a fermentação (KHAN et al., 2011).

Na produção em meios líquidos, grandes quantidades de biomassa são obtidas em um pequeno espaço físico e em pouco tempo. As principais dificuldades do processo estão na obtenção de meios de cultura adequados, na determinação de condições favoráveis para o desenvolvimento e esporulação e na prevenção de contaminações (JACKSON, 1997; JACKSON et al., 1996). O processo de produção líquida é um dos mais promissores, mas ainda necessita de criteriosos estudos quanto a economia e adequação dos substratos, padronização, virulência e efetividade dos produtos obtidos (ALVES; PEREIRA, 1989).

Na produção bifásica obtém-se a massa micelial na fase inicial da produção em meio líquido, onde o fungo recebe todos os nutrientes necessários para o crescimento e esporulação. Na segunda fase do processo, essa massa é transferida para substratos sólidos para a obtenção dos conídios (ALVES; PEREIRA, 1989). Este método combina o benefício da alta produção de biomassa obtida no cultivo em meios líquidos, com a produção de conídios estáveis em meios sólidos (JENKINS; GOETTEL, 1997). Esse sistema de produção tem sido utilizado pela companhia Mycotech dos EUA para a produção de *Beauveria bassiana* (LEITE et al., 2003).

Segundo Lopes (2009), a forma de produção de *Trichoderma* spp. mais comum é a fermentação sólida e o processo bifásico, envolvendo etapas de fermentação líquida e sólida. Segundo Harman et al. (1991), o sistema ideal para produção de *Trichoderma* spp. tem que ser realizada preferencialmente em meios líquidos, com elevada taxa de germinação dos propágulos produzidos, livre de contaminantes e que garanta a efetividade e vida longa de prateleira do agente.

O cultivo de fungos em larga escala, em muitos casos, tem-se baseado no uso de substratos sólidos, como por exemplo, grãos de cereais, pois apresentam a vantagem de

serem prontamente biodegradáveis (FORTES et al., 2007), serem de fácil manipulação e de baixo custo (SINGH; SRIVASTAVA; SINGH, 2007). Entretanto, neste tipo de meio, há menor controle da padronização do substrato (HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004) e também maior dificuldade de separação dos esporos. A substituição do meio sólido por meios líquidos é um método eficiente e promissor para contornar os problemas encontrados na fermentação sólida, bem como a diminuição dos custos de produção. Outra vantagem para a adoção de meios líquidos é a relativa facilidade técnica no processo de separação dos conídios e na extração do excesso de água, realizado para manter os propágulos com aproximadamente 10% de água total, aumentando assim o tempo de vida de prateleira dos produtos (BATTA, 2004).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal e substratos de crescimento de plantas

Nos experimentos com *S. sclerotiorum* foram utilizadas sementes de soja cultivar Pintado (Embrapa), fornecidas pelo Dr. Claudio Marcelo Gonçalves de Oliveira, do Laboratório de Nematologia do Centro Experimental Central do Instituto Biológico, Campinas, SP (CEIB), e pelo Dr. Murillo Lobo Junior, pesquisador científico da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO. Os ensaios de controle de *S. sclerotiorum* foram realizados na casa de vegetação do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, São Paulo, SP, o plantio das sementes foi feito em substrato comercial Tropstrato Hortaliça 2 - HT (Vida Verde - Mogi Mirim, São Paulo), em vasos com capacidade para 1 litro. Nos experimentos com *M. incognita* foram utilizadas sementes de soja cultivar BRS 284 (Embrapa), fornecidas por Marcio Titon, do Grupo Agros. Os ensaios foram realizados no mesmo local descrito anteriormente e o plantio das sementes foi feito em embalagens para mudas com capacidade de 0,8 litros (Nutriplan) contendo terra com textura média, misturada com areia na proporção 1:1, previamente autoclavada. As plantas de todos os experimentos foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas por microaspersão automática, duas vezes ao dia durante 5 minutos, com médias de temperaturas variando entre 15 e 32 °C.

4.2. Micro-organismos utilizados nos ensaios

4.2.1. *Trichoderma* spp.

Foram utilizados 25 isolados de *Trichoderma* spp. (Tabela 1), pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, Micoteca Mário Barreto Figueiredo, selecionados em trabalhos anteriores como bons antagonistas a *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum* e *Colletotrichum lagenarium* em plântulas de pepino, *C. lindemuthianum* em feijão e *S. sclerotiorum* em soja. Os isolados foram mantidos por repicagem sucessiva em meio de Batata Dextrose Ágar (B.D.A. comercial) e conservados pelos métodos de congelamento a -20 °C em glicerol 13% e em papel de filtro.

Tabela 1. Procedência dos isolados de *Trichoderma* spp. utilizados nos experimentos e coordenadas geográficas do local de isolamento.

Isolados	Procedência	Latitude	Longitude
IB 01/03	Aguai - SP, solo cultivado, tomate	S 22° 10' 34,3"	W 047° 01' 04,8"
IB 01/13	Aguai - SP, solo cultivado, tomate	S 22° 10' 34,3"	W 047° 01' 04,8"
IB 02/05	Aguai - SP, solo cultivado, pimentão	S 22° 10' 34,3"	W 047° 01' 04,8"
IB 04/04	Itapira - SP, solo	S 22° 19' 11,6"	W 046° 48' 27,5"
IB 04/05	Itapira - SP, solo	S 22° 19' 11,6"	W 046° 48' 27,5"
IB 04/08	Itapira - SP, solo	S 22° 19' 11,6"	W 046° 48' 27,5"
IB 04/09	Itapira - SP, solo	S 22° 19' 11,6"	W 046° 48' 27,5"
IB 07/01	Piracicaba - SP, IPEF/ESALQ, solo	S 22° 42' 21,9"	W 047° 37' 48,0"
IB 07/14	Piracicaba - SP, IPEF/ESALQ, solo	S 22° 42' 21,9"	W 047° 37' 48,0"
IB 08/07	São Paulo - SP, Reserva /IB-USP	S 23° 33' 57,5"	W 046° 43' 43,5"
IB 09/02	São Paulo - SP, Instituto de Botânica	S 23° 38' 34,9"	W 046° 37' 29,8"
IB 11/09	Espírito Santo do Pinhal - SP, solo	S 22° 10' 09,5"	W 046° 46' 10,7"
IB 12/01	Porto Ferreira - SP, solo	S 21° 50' 31,7"	W 047° 25' 04,5"
IB 18/03	São José dos Campos - SP, solo	S 23° 09' 07,8"	W 045° 46' 57,2"
IB 20/02	Aparecida - SP, solo	S 22° 52' 21,6"	W 045° 15' 04,5"
IB 26/10	Caraguatatuba - SP, solo	S 23° 34' 01,8"	W 045° 17' 07,2"
IB 29/08	Itanhaém - SP, solo	S 24° 10' 50,6"	W 046° 48' 38,2"
IB 34/01	Itapetininga - SP, solo	S 23° 35' 13,8"	W 047° 57' 00,7"
IB 43/14	Andradina - SP, solo	S 20° 55' 54,5"	W 051° 18' 26,4"
IB 46/08	Votuporanga - SP, solo	S 20° 22' 30,8"	W 050° 02' 57,9"
IB 47/02	São José do Rio Preto - SP, solo	S 20° 47' 56,3"	W 049° 31' 44,6"
IB 48/06	Olímpia - SP, solo	S 20° 42' 18,1"	W 048° 57' 11,9"
IB 48/13	Olímpia - SP, solo	S 20° 42' 18,1"	W 048° 57' 11,9"
IB 49/15	Morro Agudo - SP, solo	S 20° 43' 46,0"	W 048° 01' 01,7"
IB 51/07	Cravinhos - SP, solo	S 21° 24' 24,3"	W 047° 51' 47,6"

4.2.2. *Sclerotinia sclerotiorum*

O isolado de *S. sclerotiorum* utilizado nos ensaios foi o LQC 122 da coleção de culturas da Embrapa Meio Ambiente. Foi gentilmente cedido pelo Biólogo Lúcio Bertoldo Costa, aluno de doutorado do Dr. Wagner Bettiol, Pesquisador Científico da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

4.2.3. *Meloidogyne incognita*

Uma população de *M. incognita*, raça 3, recuperada de raízes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) procedente da região de Barreiras-BA, cedida pelo Dr. Pedro Luiz Martins Soares, do Laboratório de Nematologia da FCAV/Unesp, Campus de Jaboticabal, SP, foi utilizada no estudo. A espécie foi identificada com base nos caracteres morfológicos do padrão perineal, preparado conforme Taylor & Netscher (1974), na morfologia da região labial dos machos (EISENBACK et al., 1981) e no fenótipo isoenzimático para esterase, obtido pela técnica de Esbenshade & Triantaphyllou (1990) utilizando um sistema tradicional de eletroforese vertical mini protean II da Biorad. A raça 3 de *M. incognita* foi identificada conforme o North Carolina Differential Host Test, segundo Hartman & Sasser (1985).

4.3. Preparo do inóculo de *Trichoderma* spp. para os ensaios em casa de vegetação

No preparo do inóculo dos isolados de *Trichoderma* spp., dois discos de 9 mm de diâmetro de meio de cultura B.D.A. contendo estruturas propagativas dos isolados foram transferidos assepticamente para sacos plásticos de polipropileno transparentes, capacidade de 500 mL, contendo 100 g de arroz umedecidos em água, na proporção de 1:1 (50 g de arroz e 50 mL de água) e previamente autoclavados a 121 °C e 1 atm de pressão, por meia hora. As culturas foram incubadas em B.O.D. a 25 ± 2 °C, fotoperíodo de doze horas de luz e escuro, durante sete dias (PAPAVIZAS, 1982). Abaixo, a Tabela 2 contém a quantidade de conídios por grama de arroz colonizado por cada isolado de *Trichoderma* spp. e a porcentagem de viabilidade dos conídios.

Tabela 2. Quantificação da concentração de conídios de *Trichoderma* spp. por grama de arroz esterilizado e determinação da porcentagem de conídios viáveis.

Isolados	Conídios em 1 g de arroz	% Conídios viáveis
IB 04/05	1,2 x 10 ⁹	89
IB 07/01	1,0 x 10 ⁹	80
IB 18/03	1,5 x 10 ⁹	75
IB 20/02	2,1 x 10 ⁹	69
IB 29/08	1,2 x 10 ⁹	64
IB 43/14	2,9 x 10 ⁹	84
IB 48/06	1,8 x 10 ⁹	81
IB 49/15	1,2 x 10 ⁹	79
IB 51/07	9,3 x 10 ⁸	75

4.4. Preparo do inóculo de *Sclerotinia sclerotiorum*

Os escleródios foram produzidos em meio contendo 20 g de fubá e 80 g de cenoura picada, previamente autoclavado a 121 °C a uma atmosfera de pressão por uma hora. Em câmara de fluxo laminar, inoculou-se três escleródios por frasco de meio de cultura. Os frascos contendo o meio inoculado foram incubados em câmara B.O.D. com fotoperíodo de 12 horas, por 30 dias a 21 ± 2 °C. Após o período de incubação, os escleródios foram lavados em água corrente e colocados sobre papel absorvente em câmara de fluxo laminar até a completa secagem. Posteriormente foram alocados em placas de Petri e mantidos em geladeira a 4 °C.

Uma semana antes da montagem dos ensaios, os escleródios foram transferidos para placas de Petri contendo meio B.D.A. e colocados em B.O.D. com fotoperíodo de 12 horas a 21 ± 2 °C, durante sete dias. Após o período de incubação, quatro discos de meio B.D.A. contendo micélio de *S. sclerotiorum*, foram inoculados dentro de sacos plásticos de polipropileno transparentes, capacidade de 500 mL, contendo 100 g de arroz umedecidos com água na proporção de 1:1 (50 g de arroz e 50 mL de água), e autoclavados a 121 °C e 1 atm de pressão por meia hora. Após a inoculação, os sacos foram acondicionados em câmara climatizada, por doze dias, a 21 °C.

4.5. Suspensões de *Meloidogyne incognita*

As suspensões de *M. incognita* foram gentilmente cedidas pelo Prof^o Dr. Pedro Luiz Martins Soares do Laboratório de Nematologia da FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP e estas

foram obtidas a partir de raízes de tomateiros Santa Cruz Kada (*Lycopersicon esculentum* Mill) com galhas, utilizando a metodologia de Hussey & Barker (1973).

4.6. Ensaio com *Sclerotinia sclerotiorum*

4.6.1. Avaliação de *Trichoderma* spp. quanto ao efeito antagônico a escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*

Foram utilizados 25 isolados de *Trichoderma* spp. crescidos em meio B.D.A., durante 7 dias, conforme descrito anteriormente. As suspensões foram feitas com auxílio de alça de platina, previamente flambada, pela raspagem superficial das estruturas produzidas pelos fungos no meio de cultura. O conteúdo retirado foi transferido para tubos de ensaio, contendo 9 mL de água destilada esterilizada com Tween 20® (0,1%). Em seguida, a suspensão contida nos tubos foi homogeneizada com auxílio do agitador de tubos tipo vortex e a contagem de conídios foi realizada ao microscópio óptico, em aumento de 250X, com auxílio de câmara de Neubauer. As suspensões foram calibradas para as concentrações 1×10^7 e 1×10^9 conídios por mL para então serem utilizadas.

Os escleródios foram imersos, separadamente, por 30 minutos nas suspensões de conídios de *Trichoderma* spp. e em seguida transferidos para placas de Petri com papel filtro umedecido e esterilizado (Figura 1), e incubados em B.O.D. com fotoperíodo 12 horas, a 25 ± 2 °C, por 7 dias. Após o período de incubação, os escleródios foram desinfetados (3 minutos em álcool a 50%, 3 minutos em hipoclorito de sódio a 1%, e enxaguados três vezes em água destilada esterilizada); e imediatamente depositados em meio B.D.A. e incubados nas mesmas condições descritas anteriormente. A avaliação da eficiência dos isolados antagonistas no parasitismo do patógeno foi feita pela contagem do número de escleródios que germinaram, após o período de incubação e foram considerados escleródios inviabilizados aqueles que não apresentaram germinação miceliogênica, sete dias após o plaqueamento em meio B.D.A. (GORGËN et al. 2009). Foram consideradas três repetições com cinco escleródios cada, em um total de 15 escleródios por tratamento. No tratamento controle, os escleródios foram mergulhados em água destilada autoclavada, incubados e desinfetados como descrito anteriormente. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade (PIMENTEL-GOMES, 1990).

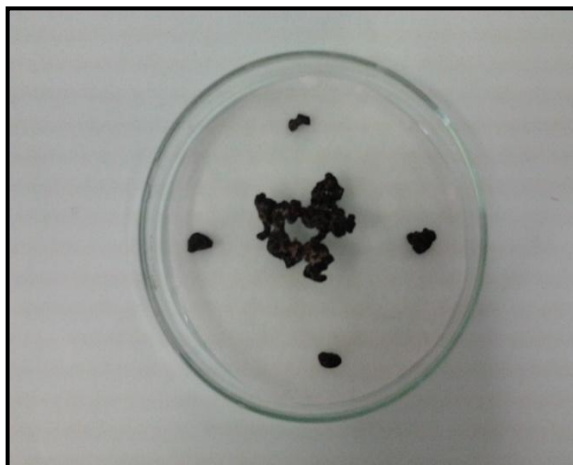


Figura 1. Escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* em placa de Petri sobre papel de filtro umedecido e esterilizado, após imersão em suspensão de conídios de *Trichoderma* sp.

4.6.2. Teste de Patogenicidade de *Sclerotinia sclerotiorum*

O experimento foi realizado utilizando 10 trifólios de plantas saudáveis no estágio de desenvolvimento (V3), sendo cada trifólio considerado uma repetição. O terceiro trifólio de cada planta foi retirado junto à haste principal e imediatamente depositado em uma vasilha com água para o transporte até o laboratório. No laboratório, as amostras foliares foram posicionadas em placa de Petri, sobre três círculos de papel de filtro umedecidos. Discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram retirados das margens do halo formado pelo crescimento do fungo *S. sclerotiorum* em meio B.D.A. e depositados na superfície adaxial da folha ao lado da nervura central (Figura 2). Somente a folha do meio de cada trifólio foi inoculada com o disco de meio de cultura contendo micélio. As placas contendo os trifólios inoculados foram mantidas no escuro, com temperatura ambiente de 20 °C. As folhas inoculadas foram fotografadas após 48, 66 e 90 horas, e foi observada a presença ou ausência de lesões na folha ao redor do local inoculado com o patógeno.

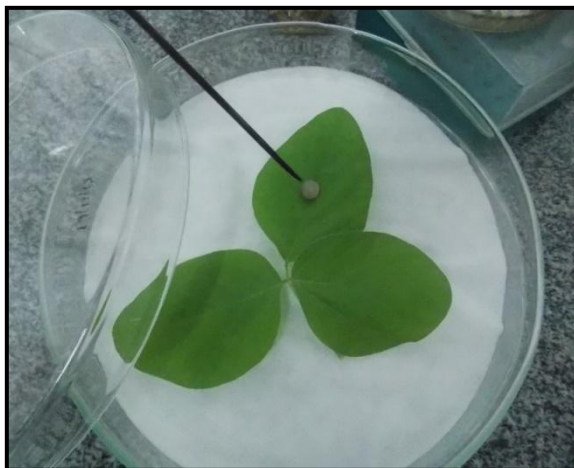


Figura 2. Terceiro trifólio de soja (cultivar Pintado), sobre a qual foi depositado um disco de meio B.D.A., contendo micélio de *Sclerotinia sclerotiorum*.

4.6.3. Avaliação de *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento de soja e na redução dos sintomas de mofo branco, em casa de vegetação

O ensaio foi realizado com nove isolados de *Trichoderma* spp., previamente selecionados em testes *in vitro*, por serem capazes de inibir a germinação de escleródios e parasitar ovos de *M. incognita*. Os fungos foram crescidos em grãos de arroz comercial, como descrito nos itens 4.3 e 4.4. Oitocentos gramas de substrato comercial, Tropstrato Hortaliça 2, foi infestado com 16 g de inóculo de *S. sclerotiorum* (Figura 3). Os vasos com o substrato infestado com o patógeno foram mantidos em câmara úmida, por sete dias. Após esse período, 16 g de grãos de arroz colonizados com cada isolado de *Trichoderma* spp. foram incorporados, separadamente, ao substrato infestado pelo patógeno (Figura 4). Posteriormente, foi realizado o plantio de seis sementes de soja (cultivar Pintado) por vaso, com cinco repetições. Após o plantio, os vasos foram mantidos em casa de vegetação como descrito no item 4.1. No tratamento controle, foi adicionado ao substrato arroz comercial autoclavado, sem a presença do patógeno e do antagonista. No tratamento testemunha somente o inóculo do patógeno foi adicionado ao substrato. Uma semana após a germinação das sementes foi feito o desbaste das mudas, deixando-se três plantas por vaso.

A avaliação do ensaio foi realizada pela incidência de sintomas de mofo branco, de acordo com a porcentagem de plantas com sintomas em relação ao total de plantas sem sintomas e pela medida da massa de matéria seca da parte aérea das plantas (MMSPA), em gramas, 35 dias após o plantio. Para a detecção dos sintomas na cultura foram observados a haste principal, os pecíolos e as folhas, a fim de constatar a presença de lesões encharcadas de coloração parda e consistência mole, com micélio branco de aspecto

cotonoso, cobrindo porções de tecidos nos órgãos afetados. A parte aérea das plantas foi extraída e submetida à secagem em estufa a 65-70 °C, até obtenção de peso constante da massa de matéria seca (MMSPA). A avaliação do ensaio foi realizada pela medida da massa de matéria seca das plantas, em gramas, 35 dias após o plantio. Para isso, a parte aérea das plantas foi coletada e submetida a secagem em estufa a 65-70 °C, até obtenção de peso constante da massa de matéria seca. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por um vaso com três plantas. Os ensaios foram realizados duas vezes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade (PIMENTEL-GOMES, 1990).



Figura 3. Substrato Tropstrato Hortaliça II tratado com grãos de arroz cozidos e colonizados por *Sclerotinia sclerotiorum*.



Figura 4. Grãos de arroz cozidos e colonizados por um isolado de *Trichoderma* sp. adicionados ao substrato inoculado com *Sclerotinia sclerotiorum*.

4.6.4. Teste de colonização radicular

Ao término do ensaio de controle de *S. sclerotiorum* foi verificada se houve ou não colonização das raízes das plantas de soja pelos isolados de *Trichoderma* spp.. Para isso, foram coletadas aleatoriamente três raízes de cada tratamento, lavadas em água corrente, cortadas em fragmentos de 2 cm de comprimento e depositadas em meio B.D.A. comercial contendo antibióticos (0,17 g de ampicilina, 0,05 de pentabiótico para 1 L de meio de cultura) e Triton X-100, como redutor de colônias. Foram realizadas três repetições para cada isolado. As placas foram incubadas em B.O.D., a 25 ± 2 °C, por 3 dias, com fotoperíodo de 12 horas de luz e escuro. A avaliação foi realizada pela visualização do crescimento das colônias dos isolados de *Trichoderma* spp. ao longo das raízes.

4.7. Análise dos Resultados

Os resultados obtidos nos ensaios foram analisados com a utilização do software estatístico Assistat versão 7.6 Beta, desenvolvido pelo Departamento de Engenharia Agrícola do Centro de Tecnologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

4.8. Ensaio com *Meloidogyne incognita*

4.8.1. Avaliação do parasitismo de ovos de *Meloidogyne incognita* por *Trichoderma* spp.

Foram utilizados 25 isolados de *Trichoderma* spp., crescidos em meio B.D.A. durante 7 dias. Discos de B.D.A. de 5 mm de diâmetro, contendo micélio e outras estruturas das linhagens de *Trichoderma* spp., foram removidos das bordas das culturas e transferidos para o centro de placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo ágar-água a 2%. Em seguida, foi adicionado 100 µL de suspensão com ovos e eventuais J2 de *M. incognita*. O inóculo foi distribuído em 5 microgotas de 20 µL, totalizando 100 ovos por repetição. As microgotas de suspensão de *M. incognita* foram depositadas em formato circular em torno do disco de B.D.A. contendo estruturas de *Trichoderma* spp. (Figura 5). As placas foram incubadas em B.O.D., a 25 °C, por 14 dias. Após esse período foram avaliados aleatoriamente 15 ovos por placa, com auxílio de microscópio óptico, e realizado o cálculo

do percentual de ovos colonizados pelos isolados de *Trichoderma* spp. O ensaio foi realizado com três repetições, em delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade (PIMENTEL-GOMES, 1990).

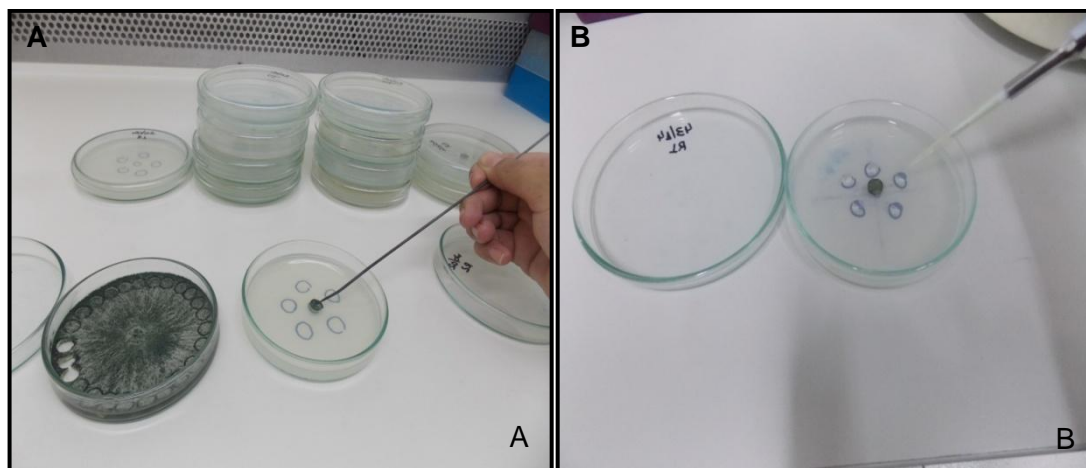


Figura 5. A- Deposição do disco de B.D.A. com estruturas propagativas de *Trichoderma* sp., no centro da placa de Petri, em meio ágar-ágar. B – Distribuição de cinco microgotas de suspensão de *Meloidogyne incognita*, próximas ao disco de B.D.A. com *Trichoderma* sp.

4.8.2. Avaliação de *Trichoderma* spp. no controle de *Meloidogyne incognita* em soja, em casa de vegetação

Neste experimento foram utilizados oito isolados de *Trichoderma* spp., (IB 07/01, 18/03, 20/02, 29/08, 43/14, 48/06, 49/15 e 51/07) escolhidos pela capacidade de parasitar ovos de *M. incognita in vitro*. Os fungos foram crescidos em grãos de arroz comercial, como descrito no item 4.3. Incorporou-se 16 g de grãos colonizados para cada isolado de *Trichoderma* sp. em 800 g de solo autoclavado. Após a introdução do agente de biocontrole foi realizado o plantio de duas sementes de soja (cultivar BRS 284) por vaso (Figura 6). Em seguida, 5 mL da suspensão contendo 5.000 ovos e juvenis de segundo estágio de *M. incognita* foram inoculados próximo as sementes de soja. No tratamento controle e no tratamento com patógeno, foi adicionado ao substrato, arroz comercial esterilizado, sem a presença de *Trichoderma* spp.. Os vasos ficaram em fitocâmara sem irrigação durante três dias, protegidos da luz e do calor. Após esse período, os vasos foram transferidos para casa de vegetação, onde permaneceram por 60 dias. O desbaste foi feito sete dias após a emergência das plântulas para que os tratamentos ficassem com apenas uma planta por vaso, totalizando 5 plantas por tratamento. Para este ensaio foi acrescentado um grupo de padrão de viabilidade, onde quatro plantas de tomateiro 'Rutgers' com 30 dias de idade,

suscetíveis ao nematoide, foram inoculadas com a mesma suspensão de ovos e juvenis de *M. incognita*.

A avaliação do ensaio foi realizada pela contagem do número de galhas formadas nas raízes das plantas, massa fresca das raízes, estimativa da população de nematoides presentes nas raízes e massa seca das plantas de soja. Para avaliação da massa seca, a parte aérea das plantas foi coletada e submetida a secagem em estufa a 65-70 °C, até atingir peso constante. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, e cinco plantas por tratamento. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.



Figura 6. Plantio das sementes de soja cultivar BRS 284 em solo inoculado com grãos de arroz colonizados por *Trichoderma* sp.

4.8.3. Sobrevivência de isolados de *Trichoderma* spp. em amostras de solo

Ao final do ensaio de controle de *M. incognita* em plantas de soja por *Trichoderma* spp., avaliou-se a capacidade dos isolados sobreviverem no solo. Para isso, foram coletadas cinco sub-amostras de solo de cada tratamento. Esse material foi homogeneizado e submetido a técnica de diluição seriada. Um grama da mistura foi transferido para 9 mL de solução salina 0,9% com tween® (9 g NaCl, água destilada até completar 1 L e 1 mL de tween® 20), agitando-se bem em agitador tipo vortex, por três vezes. A seguir foi retirada uma alíquota de 1 mL e transferida para outro tubo contendo 9 mL de solução salina e assim sucessivamente até a diluição apropriada. Alíquotas de 100 µL das diluições foram espalhadas sobre a superfície do meio B.D.A. com antibiótico (119 mg de Ampicilina e 0,50 mg de Pentabiótico em 700 mL de meio de cultura) e Triton X-100 (0,1%). Para cada

diluição foram realizadas três repetições. As culturas foram incubadas em B.O.D. a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 horas de luz, durante 48 horas. Após este período, foi realizada a contagem do número de colônias de *Trichoderma* spp. formadas (PAPAVIZAS, 1982).

Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama de solo (UFC g⁻¹), levando-se em conta a diluição empregada, utilizando-se a seguinte fórmula:

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

Onde:

R= resultado

a= média do número de colônias encontradas por repetição

b= expoente da diluição

4.9. Análise dos Resultados

Os resultados obtidos nos ensaios foram analisados com a utilização do software estatístico Assistat versão 7.6 Beta, desenvolvido pelo Departamento de Engenharia Agrícola do Centro de Tecnologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott com 5% de probabilidade.

4.10. Produção de *Trichoderma* spp. em meios líquidos

4.10.1. Seleção do meio de cultura

Foram testados três meios de cultura para o crescimento de três isolados de *Trichoderma* spp., sendo esses a base de milhocina, levedo de cerveja e levedura inativada (Hi Cell®). Todos os meios foram preparados na proporção de 1% de sacarose (açúcar Cristal União®) e 1% do produto base para cada 100 mL de água destilada. Para cada tratamento foram consideradas cinco repetições, sendo cada repetição representada por um Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, contendo 100 mL de meio líquido, tampados com folha dupla de papel alumínio e autoclavados por 30 minutos, a uma atmosfera de pressão a 120 °C. Após o resfriamento dos meios, os frascos foram abertos em câmara de fluxo laminar, previamente desinfetada com álcool 70% e hipoclorito de sódio a 1%. Com auxílio de uma agulha foi transferido para cada um deles um disco de B.D.A. de 7 mm de diâmetro

contendo estruturas propagativas das cepas de *Trichoderma* spp. Após a inoculação, os frascos foram tampados e acondicionados em agitador orbital dentro de uma sala a 25 ± 2 °C, onde permaneceram sob agitação constante durante 7 dias, a uma velocidade de 150 rpm.

A avaliação dos ensaios foi realizada pela contagem do número de conídios produzidos e medida da biomassa seca de cada isolado. A quantificação de conídios foi feita pela retirada de alíquotas de 1 mL de cada um dos Erlenmeyers e realização da técnica de diluição seriada, conforme item 4.8.3. Os conídios foram contados ao microscópio óptico em aumento de 250x, com auxílio de câmara de Neubauer. A medida da biomassa produzida foi realizada após filtração em papel de filtro, com auxílio de bomba de vácuo. Os discos de papel de filtro contendo a biomassa dos fungos permaneceram na estufa à 60 °C até atingirem peso constante. O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, cinco repetições por tratamento. As médias obtidas para cada tratamento foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade (PIMENTEL GOMES, 1990).

4.10.2. Efeito de diferentes concentrações de sacarose na esporulação e produção de biomassa de isolados de *Trichoderma* spp.

Após a seleção do melhor meio de cultura para a produção líquida dos três isolados de *Trichoderma* spp., foi realizado um ensaio para verificar o efeito da concentração de sacarose na produção de conídios e aumento da biomassa dos isolados em teste. Foram testadas as seguintes concentrações de sacarose: 0%, 0,5%, 1% e 2% no meio de levedura inativada. Foram consideradas cinco repetições para cada concentração de açúcar testado. O procedimento de preparo de meio, inoculação e avaliação foram executados como descrito no item anterior.

4.11. Análise dos Resultados

Os resultados obtidos nos ensaios foram analisados com a utilização do software estatístico Assistat versão 7.6 Beta, desenvolvido pelo Departamento de Engenharia Agrícola do Centro de Tecnologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott com 5% de probabilidade.

4.12. Identificação molecular dos isolados de *Trichoderma* spp.

Foram selecionados para a caracterização molecular, os nove isolados de *Trichoderma* spp. que foram utilizados nos ensaios em casa de vegetação no controle de *S. sclerotiorum* (IB 04/05, 07/01, 18/03, 20/02, 29/08, 43/14, 48/06, 49/15 e 51/07).

A extração de DNA foi realizada conforme método do CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) descrito por Doyle & Doyle (1987). A reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a amplificação do fragmento do gene codificador do fator de alongação (EF) foi realizada com o par de primers tef71F (5' – CAAAATGGGTAAGGAGGASAAGAC – 3') e tef997R (5' – CAGTACCGGCRGCRATRATSAG – 3') (tamanho do produto de aproximadamente 930 pb) (SHOUKOUHI; BISSETT, 2008). As reações foram efetuadas em termociclador PTC100 (MJ Research) seguindo a seguinte programação: desnaturação inicial a 94 °C/2 min, 40 ciclos de 94 °C/30 s – 54 °C/30 s – 72 °C/60 s, extensão final a 72 °C/4 min. Os produtos de PCR foram purificados por precipitação com polietilenoglicol, segundo protocolo descrito por (SCHMITZ; RIESNER, 2006).

O sequenciamento foi realizado pelo método de terminação de cadeia com o reagente BigDye 3.1 (Applied Biosystems) e sequenciador automático ABI3500 (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram comparadas com sequências de espécimes voucher depositadas na página da Internet do ISTH (International Subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ensaio com *Sclerotinia sclerotiorum*

5.1.1. Avaliação de *Trichoderma* spp. quanto ao efeito antagônico a escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*

Dos 25 isolados de *Trichoderma* spp. utilizados, 22 foram capazes de inibir a germinação dos escleródios em 100%, após a desinfecção e plaqueamento dos mesmos em meio B.D.A., tanto na concentração de 1×10^7 quanto na de 1×10^9 conídios mL⁻¹, conforme

dados apresentados na Tabela 3. Na concentração 1×10^9 conídios por mL, os isolados IB 29/08, IB 46/08 e IB 48/13 inibiram em 80%, 88% e 94% a germinação dos escleródios, respectivamente. Enquanto que na concentração 1×10^7 conídios por mL, os isolados IB 07/01, 07/14 e 46/08 inibiram em 94% a germinação do patógeno. Os resultados demonstram que não houve diferença entre as concentrações das suspensões de conídios utilizadas para imersão dos escleródios, para 22 isolados, pois em ambas houve a inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* (Figura 7 e Figura 8).

Os resultados obtidos na inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* por *Trichoderma* spp. estão de acordo com os dados relatados por Ethur, Cembranel e Silva (2001) e Castillo et al. (2011). Ambos verificaram inibição do crescimento micelial do patógeno e relataram controle de até 94% e 63,8%, respectivamente.

Existem muitos trabalhos avaliando o potencial de *Trichoderma* spp. para inibição de *S. sclerotiorum* que corroboram com os dados obtidos no presente estudo, como as pesquisas realizadas por Görgen et al. (2009), Louzada et al. (2009), Figueirêdo et al. (2010) e Kim & Knudsen (2008).

Zancan et al. (2012) constataram a ação de *T. harzianum* na inibição do crescimento micelial de dois isolados de *S. sclerotiorum*. Os autores verificaram que quanto maior a dose do antagonista, maior é a redução do desenvolvimento do patógeno.

Em experimento semelhante ao realizado neste trabalho, Smith e Beltra (2013) também relataram a colonização dos escleródios pelo antagonista após oito dias. As porcentagens de inviabilização dos escleródios que encontraram variaram entre 75 e 80%. No entanto, diferentemente do observado neste ensaio, os pesquisadores constataram que a porcentagem de escleródios colonizados foi inversamente proporcional à porcentagem de escleródios inviabilizados pelos antagonistas. Estes autores sugeriram que alguns isolados podem colonizar os escleródios, mas não são todos que conseguem penetrar nas células ou inativá-las. Essa informação indica que os 22 isolados que se destacaram no presente estudo, de alguma forma, conseguiram inviabilizar 100% dos escleródios do patógeno.

Tabela 3. Média de escleródios germinados após imersão em duas concentrações das suspensões de conídios de isolados de *Trichoderma* spp.

Isolados	Suspensão de 1×10^9 conídios por mL		Suspensão de 1×10^7 conídios por mL	
	Escleródios germinados	% de inibição	Escleródios germinados	% de inibição
Controle	5,0 ± 0,0 a	-	5,0 ± 0,0 a	-
IB 01/03	0,0 ± 0,0 d	100	0,0 ± 0,0 b	100
IB 01/13	0,0 ± 0,0 d	100	0,0 ± 0,0 b	100
IB 02/05	0,0 ± 0,0 d	100	0,0 ± 0,0 b	100
IB 04/04	0,0 ± 0,0 d	100	0,0 ± 0,0 b	100
IB 04/05	0,0 ± 0,0 d	100	0,0 ± 0,0 b	100
IB 04/08	0,0 ± 0,0 d	100	0,0 ± 0,0 b	100
IB 04/09	0,0 ± 0,0 d	100	0,0 ± 0,0 b	100
IB 07/01	0,0 ± 0,0 d	100	0,3 ± 0,3 b	94
IB 07/14	0,0 ± 0,0 d	100	0,3 ± 0,3 b	94
IB 08/07	0,0 ± 0,0 d	100	0,0 ± 0,0 b	100
IB 09/02	0,0 ± 0,0 d	100	0,0 ± 0,0 b	100
IB 11/09	0,0 ± 0,0 d	100	0,0 ± 0,0 b	100
IB 12/01	0,0 ± 0,0 d	100	0,0 ± 0,0 b	100
IB 18/03	0,0 ± 0,0 d	100	0,0 ± 0,0 b	100
IB 20/02	0,0 ± 0,0 d	100	0,0 ± 0,0 b	100
IB 26/10	0,0 ± 0,0 d	100	0,0 ± 0,0 b	100
IB 29/08	1,0 ± 0,0 b	80	0,0 ± 0,0 b	100
IB 34/01	0,0 ± 0,0 d	100	0,0 ± 0,0 b	100
IB 43/14	0,0 ± 0,0 d	100	0,0 ± 0,0 b	100
IB 46/08	0,6 ± 0,3 bc	88	0,3 ± 0,3 b	94
IB 47/02	0,0 ± 0,0 d	100	0,0 ± 0,0 b	100
IB 48/06	0,0 ± 0,0 d	100	0,0 ± 0,0 b	100
IB 48/13	0,3 ± 0,3 cd	94	0,0 ± 0,0 b	100
IB 49/15	0,0 ± 0,0 d	100	0,0 ± 0,0 b	100
IB 51/07	0,0 ± 0,0 d	100	0,0 ± 0,0 b	100

Médias ± erro padrão seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

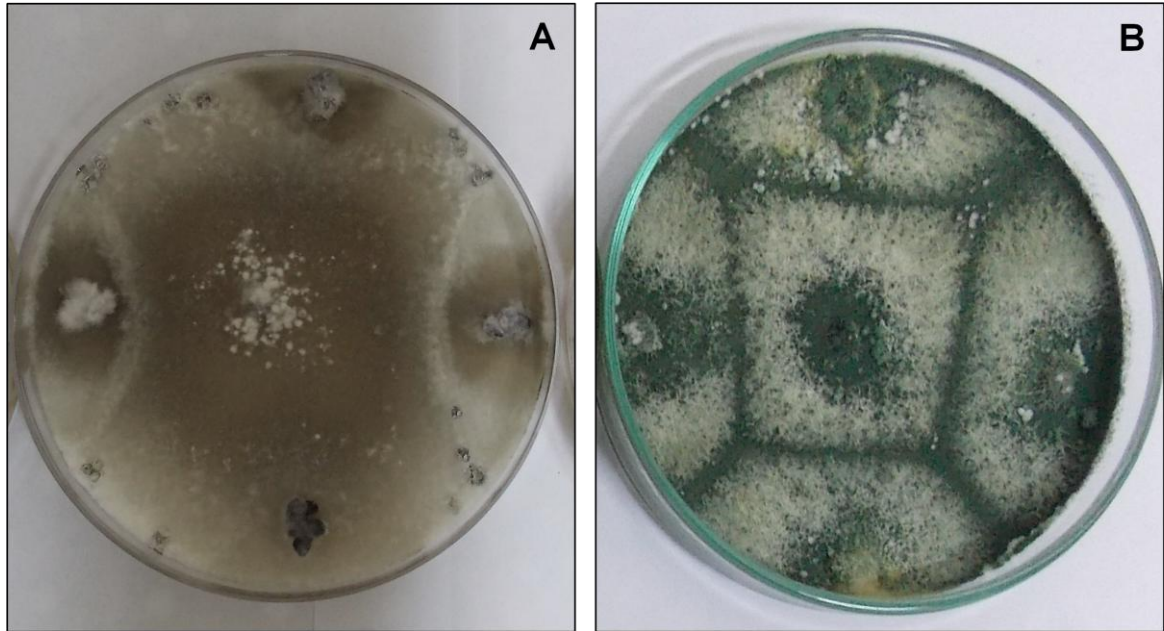


Figura 7. A - Escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* do tratamento controle, germinados oito dias após a desinfestação e plaqueamento em meio B.D.A. B - Escleródios imersos em suspensão de conídios do isolado de *Trichoderma* sp. IB 04/05, e desinfestados oito dias após a inoculação, com posterior plaqueamento em meio B.D.A. e incubação a 25 ± 2 °C.

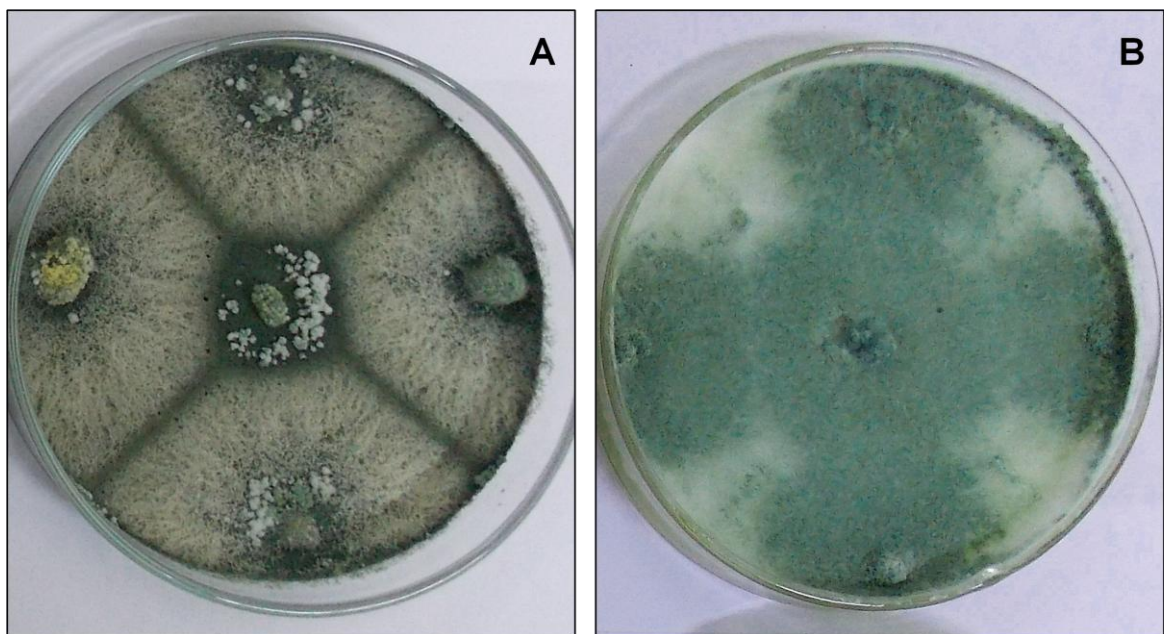


Figura 8. Escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* imersos em suspensão de conídios do isolados de *Trichoderma* sp. IB 01/03 (A) e IB 49/15 (B), desinfestados oito dias após a inoculação, com posterior plaqueamento em meio B.D.A. e incubação a 25 ± 2 °C.

Em 1996, Inbar, Menendez e Chet, estudaram as interações das hifas de *T. harzianum* com *S.sclerotiorum* em testes *in vitro* e em casa de vegetação. Observaram que as hifas do antagonista conseguem crescer ao longo das hifas do patógeno e penetrar nas

células dissolvendo a parede celular do hospedeiro. Sugeriram que os antibióticos produzidos por *T. harzianum* são mais do que enzimas de degradação de parede celular, estando envolvidos também na deterioração de *S. sclerotiorum*.

Segundo Hjeljord e Tronsmo (2003), isolados de *Trichoderma* spp. podem agir por diferentes mecanismos para controlar fitopatógenos, podendo envolver antibiose, a produção de metabólitos tóxicos, voláteis ou não voláteis; micoparasitismo e/ou competição por espaço, nutrientes e oxigênio. Por esse motivo são considerados eficientes micoparasitas, antagonistas e agentes de biocontrole (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010).

5.1.2. Teste de Patogenicidade de *Sclerotinia sclerotiorum*

O isolado de *S. sclerotiorum* LQC 122 utilizado no presente trabalho, mostrou-se viável e patogênico à cultivar de soja Pintado (Figura 9, Figura 10 e Figura 11). Os sintomas começaram a surgir 48 horas após a inoculação e as lesões aumentavam conforme o tempo de contato da folha com o disco de B.D.A. contendo o micélio do patógeno.]



Figura 9. A - Folha de soja exibindo sintoma provocado por *Sclerotinia sclerotiorum* 48 horas após contato com o disco com micélio do patógeno. B – Detalhe da Figura 9 A.

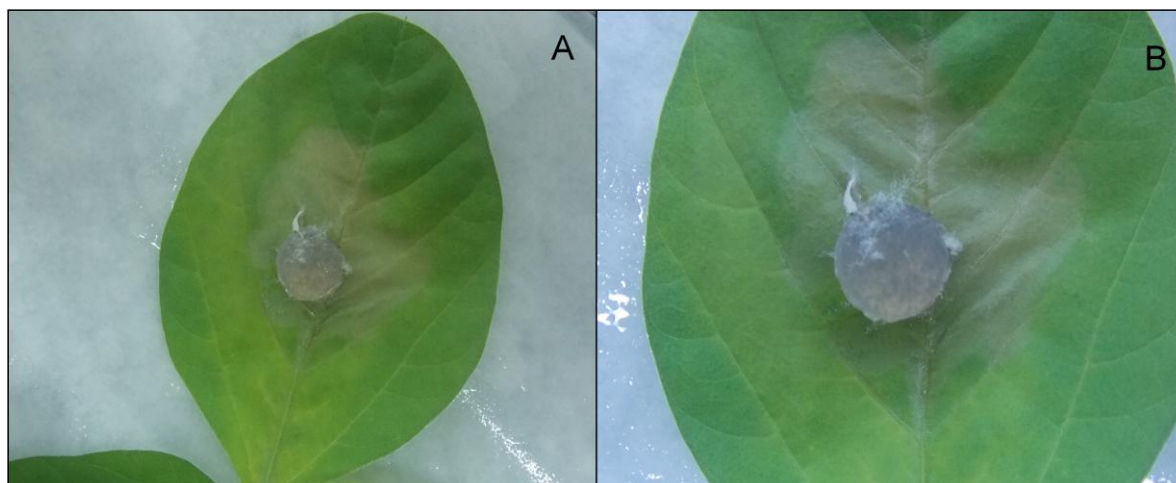


Figura 10. Folha de soja exibindo sintoma provocado por *Sclerotinia sclerotiorum* 66 horas após contato com o disco com micélio do patógeno. B – Detalhe da Figura 10 A.



Figura 11. Folha de soja exibindo sintoma provocado por *Sclerotinia sclerotiorum* 90 horas após contato com o disco com micélio do patógeno. B – Detalhe da Figura 11 A.

As observações nos períodos de 48, 66 e 90 horas corroboram com as realizadas por Cunha (2010). O autor encontrou médias das áreas lesionadas, necrose e clorose, nas folhas destacadas da variedade de soja BR-16 de 1.42, 6.48 e 17.62 cm² para os tempos de 42, 66 e 90 horas, respectivamente.

5.1.3. Avaliação de *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento de soja e na redução dos sintomas de mofo branco, em casa de vegetação

Os resultados mostraram-se bem variados nas duas repetições realizadas do ensaio. No geral, entre os nove isolados de *Trichoderma* spp. avaliados, dois promoveram o

aumento na massa de matéria seca (MMS) da parte aérea das plantas de soja nos dois ensaios realizados. Os isolados de *Trichoderma* spp. IB 29/08 (Figura 12) e IB 43/14 promoveram aumento da MMS que variaram entre 10 e 54,98%, diferindo estatisticamente das plantas testemunhas e não das plantas do grupo controle (Tabela 4 e Tabela 5). Na primeira repetição do ensaio, os isolados de *Trichoderma* spp. IB 04/05, IB 07/01, IB 18/03, IB 20/02, IB 29/08, IB 43/14, IB 49/15 e IB 51/07 proporcionaram aumentos na MMS da plantas de soja acima de 14%. Destes, o isolado IB 07/01 (Figura 13) apresentou aumento de 96,19% em relação ao tratamento controle, diferindo estatisticamente. Já na segunda repetição do ensaio (Tabela 5), somente dois isolados, IB 29/08 e IB 43/14 (Figura 14) apresentaram aumentos na MMS, porém, estatisticamente não diferiram das plantas do grupo controle.

Nos dois ensaios realizados, as plantas não apresentaram sintomas de mofo branco, inviabilizando a avaliação desse parâmetro.

Tabela 4. Massa média de matéria seca (MMSPA) da parte aérea de plantas de soja, cultivadas em substrato infestado com arroz colonizado com *Sclerotinia sclerotiorum*, na presença ou não de isolados de *Trichoderma* spp. - Primeiro ensaio.

Tratamentos ¹	MMSPA (g) ²	% de aumento ³
Controle branco ⁴	0,724 ± 0,056 d	--
Testemunha ⁵	0,878 ± 0,026 bcd	21,28
IB 04/05	1,131 ± 0,033 bcd	56,17
IB 07/01	1,420 ± 0,040 a	96,19
IB 18/03	0,953 ± 0,092 bcd	31,69
IB 20/02	1,011 ± 0,062 bc	39,69
IB 29/08	1,122 ± 0,066 b	54,98
IB 43/14	0,898 ± 0,037 bcd	24,12
IB 48/06	0,708 ± 0,043 d	-2,13
IB 49/15	0,856 ± 0,081 bcd	18,31
IB 51/07	0,827 ± 0,066 cd	14,25

CV= 13,65%

¹ Isolados de *Trichoderma* incorporados ao substrato Tropstrato Hortaliça 2 – HT.

² Massa média de matéria seca da parte aérea em gramas ± erro padrão. Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% (P<0,05).

³ Determinada em relação ao controle branco.

⁴ Tratamento sem adição de isolados de *Trichoderma* spp. e sem a presença do patógeno.

⁵ Tratamento inoculado somente com o patógeno.

Tabela 5. Massa média de matéria seca da parte aérea (MMSPA) de plantas de soja cultivadas, em substrato infestado com arroz colonizado com *Sclerotinia sclerotiorum*, na presença ou não de isolados de *Trichoderma* spp. - Segundo ensaio.

Tratamentos ¹	MMSPA (g) ²	% de aumento ³
Controle branco	0,7657 ± 0,027 ab	--
Testemunha	0,5156 ± 0,012 c	-32,67
IB 04/05	0,6423 ± 0,029 bc	-16,12
IB 07/01	0,7076 ± 0,028 ab	-7,59
IB 18/03	0,7361 ± 0,049 ab	-3,87
IB 20/02	0,7585 ± 0,052 ab	-0,95
IB 29/08	0,8633 ± 0,028 a	12,75
IB 43/14	0,8423 ± 0,024 a	10,00
IB 48/06	0,7527 ± 0,035 ab	-1,70
IB 49/15	0,7909 ± 0,034 ab	3,29
IB 51/07	0,6518 ± 0,024 bc	-14,88

CV= 10,24%

¹ Isolados de *Trichoderma* incorporados ao substrato Tropstrato Hortaliça 2 – HT.

² Massa média de matéria seca em gramas ± erro padrão. Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% (P<0,05).

³ Determinada em relação ao controle branco.

⁴ Tratamento sem adição de isolados de *Trichoderma* spp. e sem a presença do patógeno.

⁵ Tratamento inoculado somente com o patógeno.

Os dados obtidos no primeiro ensaio de promoção de crescimento corroboram com os resultados verificados por Ayoubi, Zafari e Mirabolfathy (2012), que utilizaram isolados de *Trichoderma* spp. separadamente e em associação com *Bradyrhizobium japonicum* no tratamento de sementes de soja. Os autores utilizaram solo esterilizado e as plantas cresceram por 30 dias. Ao final do ensaio observaram que tanto as plantas de soja tratadas somente com isolados de *Trichoderma* spp., quanto as tratadas com a combinação de *Trichoderma* spp. mais *B. japonicum* apresentaram aumento de crescimento da parte aérea e do sistema radicular. Os autores observaram que a MMS da parte aérea das plantas dobrou em relação as plantas do grupo controle.

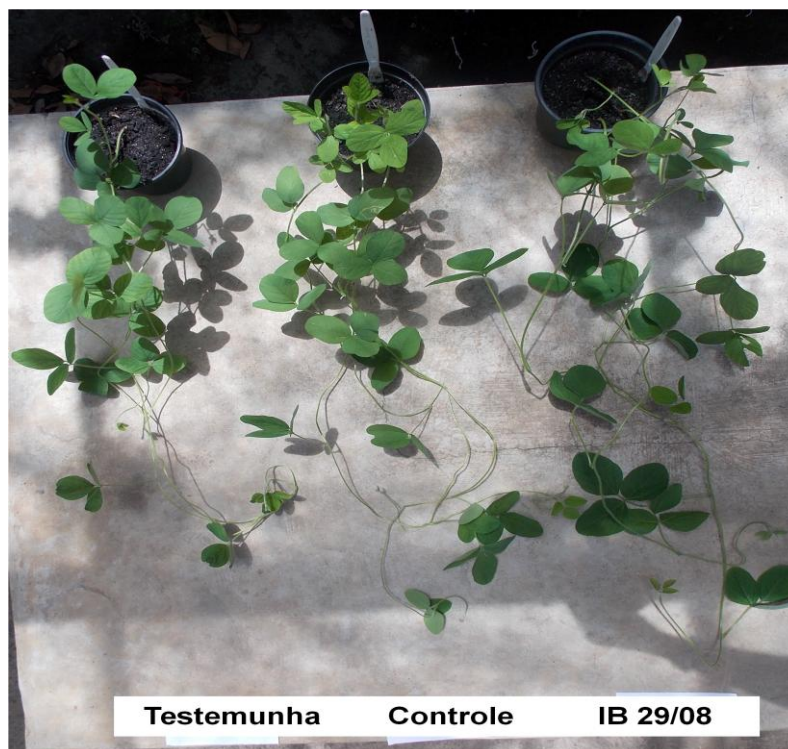


Figura 12. Primeiro ensaio de promoção de crescimento e controle de sintomas de mofo branco - Aspecto visual das plantas de soja dos tratamentos testemunha, controle branco e isolado de *Trichoderma* sp. IB 29/08, crescidas em substrato comercial.

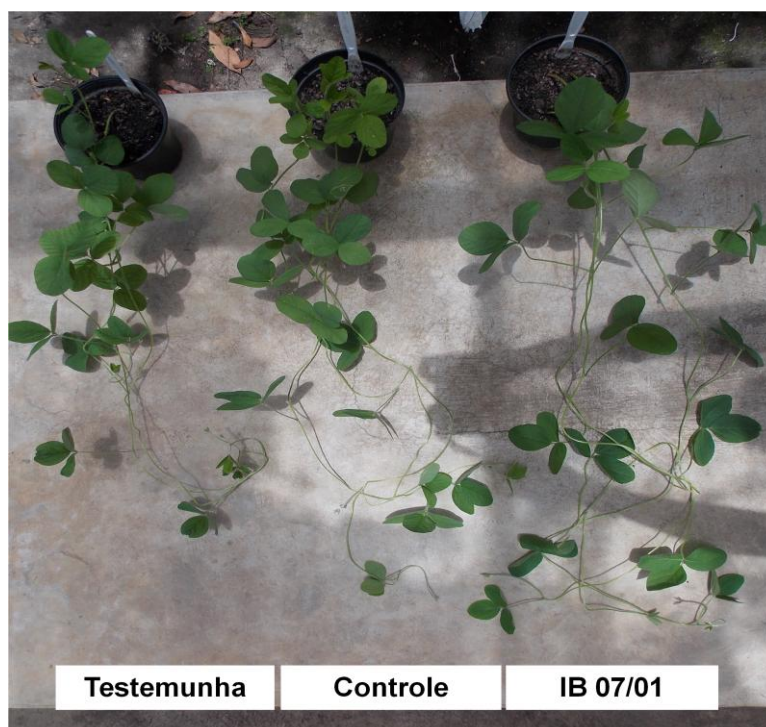


Figura 13. Primeiro ensaio de promoção de crescimento e controle de sintomas de mofo branco - Aspecto visual das plantas de soja dos tratamentos testemunha, controle e isolado de *Trichoderma* sp. IB 07/01, crescidas em substrato comercial.

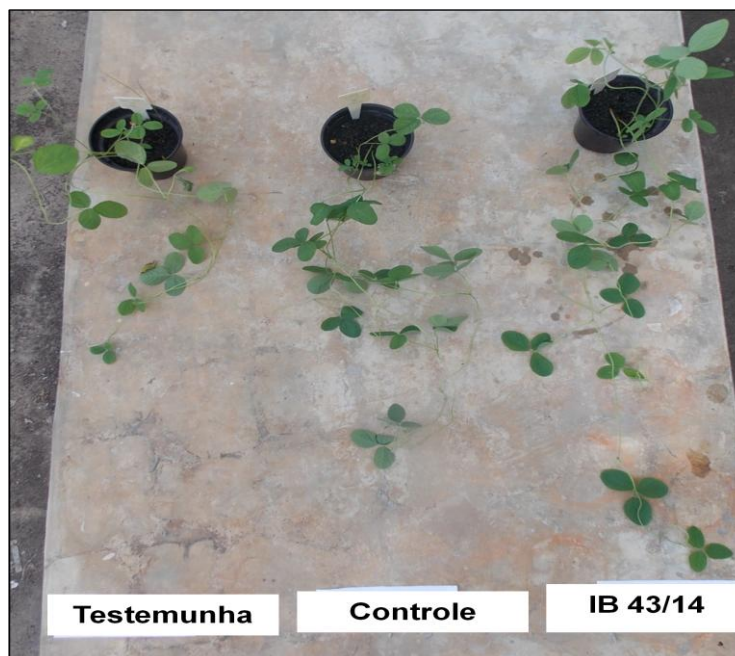


Figura 14. Repetição do ensaio de promoção de crescimento e controle de sintomas de mofo branco - Aspecto visual das plantas de soja dos tratamentos testemunha, controle e isolado de *Trichoderma* sp. IB 43/14, crescidas em substrato comercial.

Os resultados obtidos também corroboram parcialmente com os dados encontrados no trabalho realizado por Guareschi et al. (2012), os autores realizaram os experimentos utilizando solo esterilizado e não esterilizado, ambos infestados com *S. sclerotiorum* e avaliaram o efeito de um isolado *Trichoderma* sp. proveniente de um produto comercial no crescimento de plantas e no controle de mofo branco nas culturas da soja e do girassol. Para dados coletados aos 15, 30, 45 e 60 dias após a emergência das plântulas, verificaram que o isolado de *Trichoderma* sp. utilizado no tratamento das sementes das duas culturas promoveu aumento significativo de crescimento na parte aérea das plantas de soja em solo autoclavado, não tendo sido observado o mesmo efeito significativo em solo não autoclavado como foi observado neste ensaio.

Quanto ao mofo branco, assim, como observado previamente neste estudo, Guareschi et al. (2012) não observaram sintomas da doença nas plantas de soja nos ensaios que realizaram. Os autores atribuíram esses resultados às elevadas temperaturas, acima de 28 °C, durante o transcorrer do ensaio. Temperaturas estas semelhantes às médias das máximas temperaturas constatadas durante os dois meses, novembro e dezembro, de 26,3 °C e 28,5 °C, quando da realização dos ensaios. Além disso, a umidade relativa do ar mínima de alguns dias desses meses foram de 12% e 23% (IAG/USP, 2013). Segundo Venette (1998) e Leite et al. (2000), para que *S. sclerotiorum* cresça e cause sintomas de doença é necessário que umidade elevada, temperaturas entre 15 °C e 25 °C e pouca incidência de luz, portanto condições opostas aos meses em que os ensaios foram

realizados. Segundo Almeida et al. (1997), a falta de uma das condições ideais para o patógeno retarda ou paralisa o progresso da doença. Além das temperaturas elevadas dos meses em que os ensaios foram realizados, o tempo de execução, de 35 dias, pode não ter sido suficiente para a manifestação dos sintomas da doença. Isto em função das plantas terem sido retiradas antes do início do florescimento pleno (R2) e da formação de vagens e enchimento dos grãos (R3/R4), considerados como períodos ideais para o surgimento de sintomas de mofo branco na cultura da soja (EMBRAPA SOJA, 2011).

Já os dados observados na repetição do ensaio (Tabela 4) demonstram que houve diferença significativa na MMS da parte aérea das plantas tratadas com a maioria dos isolados de *Trichoderma* spp., na presença de *S. sclerotiorum*, em relação ao tratamento controle, sem micro-organismos, embora não tenham diferido em relação às plantas testemunhas. Portanto, as plantas se desenvolveram melhor no substrato infestado pelo patógeno na presença dos isolados de *Trichoderma* spp., indicando a capacidade destes isolados no controle dos efeitos do patógeno nas raízes das plantas.

Os resultados do ensaio corroboram em parte com os de Machado et al. (2001) que constataram a redução na massa fresca da parte aérea e raízes de plantas de soja quando trataram as sementes com *S. sclerotiorum*. Redução na massa de matéria seca da parte aérea das plantas de soja, em média de 33% aos 28 dias de idade, também foi constatada por Botelho (2011) quando tratou sementes de soja com *S. sclerotiorum*.

Os resultados obtidos não estão de acordo com os observados no trabalho realizado por Tancic et al. (2013) eles não constataram aumento de crescimento da parte aérea das plantas de soja, tratadas ainda como sementes, com isolados de *Trichoderma* spp.. No entanto, os autores notaram que alguns isolados promoveram efeito benéfico na germinação e comprimento de raízes.

Assim como em soja, o efeito benéfico e bastante variado no crescimento de plantas causado por *Trichoderma* spp. já foi relatado por muitos autores em diversas culturas, tais como repolho, tomate, mamão, alface, pimenta, feijão, pimentão, morango, pepino, algodão, *Arabidopsis* sp., tabaco, eucalipto e *Salix fragilis* (ADAMS; LYNCH; DE LEIJ, 2007; CARVALHO-FILHO et al., 2008; CONTRERAS-CORNEJO et al., 2009; FONTENELLE et al., 2011; HARMAN et al., 2004; KOROLEV; RAV DAVID; ELAD, 2008; PEDRO; HAKAKAVA; LUCON, 2012; SILVA et al., 2011; TAVARES, 2009; WINDHAM; ELAD; BAKER, 1986). O incremento na MMS pode variar em função do isolado de *Trichoderma* sp. utilizado e da cultura. Tavares (2009) observou aumento de até 110,73% na massa de matéria seca de mudas de mamoeiro e Fontenelle et al. (2011) constataram aumentos de até 1.244,83% em tomateiro. Carvalho Filho et al. (2008) observaram aumentos significativos, entre 57% e 136% na massa de matéria seca de plântulas de

Eucalyptus urophylla e Pedro et al. (2012) aumentos em plantas de feijão que variaram entre 3,12 e 57,81%.

A promoção de crescimento em plantas proporcionado por *Trichoderma* spp. tem sido relacionado a muitos fatores, tais como proteção de plantas contra patógenos da rizosfera, produção de hormônios, aumento no crescimento e desenvolvimento do sistema radicular, aumento da absorção e translocação de nutrientes minerais e aumento da solubilidade e disponibilidade de micronutrientes (HARMAN, 2000; YEDIDIA et al., 2001; CONTRERAS - CORNEJO et al., 2009).

Segundo Altomare et al. (1999), fungos do gênero *Trichoderma* estão entre os micro-organismos mais comumente estudados como agentes de biocontrole que apresentam, também, atividade de promoção de crescimento.

5.1.4. Teste de colonização radicular

Ao final do ensaio de redução de sintomas de mofo branco e promoção de crescimento em plantas de soja por *Trichoderma* spp., as raízes das plantas foram lavadas, cortadas e colocadas sobre meio B.D.A.. Após três dias de incubação, a avaliação da capacidade de colonização das raízes pelos isolados foi feita de acordo com a visualização do crescimento de *Trichoderma* spp. ao redor das raízes. Todos os isolados conseguiram colonizar o sistema radicular das plantas. A **Figura 15** mostra o crescimento de colônias do agente nos fragmentos de raízes de soja.

Muitos trabalhos destacam a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. em colonizar raízes de plantas (HARMAN, 2000; HOWELL et al., 2000). Essa habilidade dos isolados de *Trichoderma* spp. na colonização de raízes é uma característica importante para a atuação desses agentes no controle biológico ou promoção de crescimento de plantas. Para competir com patógenos ou outros micro-organismos prejudiciais às plantas, por espaço e/ou nutrientes, esses fungos devem ser capazes de crescer na rizosfera (HARMAN, 2000; SAMUELS, 2006), bem como se estabelecer para poder garantir a interação com a planta (FREITAS, 1994).

A interação de espécies de *Trichoderma* com as raízes das plantas se dá pela colonização da epiderme e das células do córtex, assim o fungo aumenta o sistema radicular e o vegetal consegue absorver mais nutrientes, e isso pode ser refletido no crescimento da planta. Além do mais, o contato com as raízes pode ativar as defesas da planta que fica previamente preparada para uma possível invasão de fitopatógenos (HARMAN, 2006).

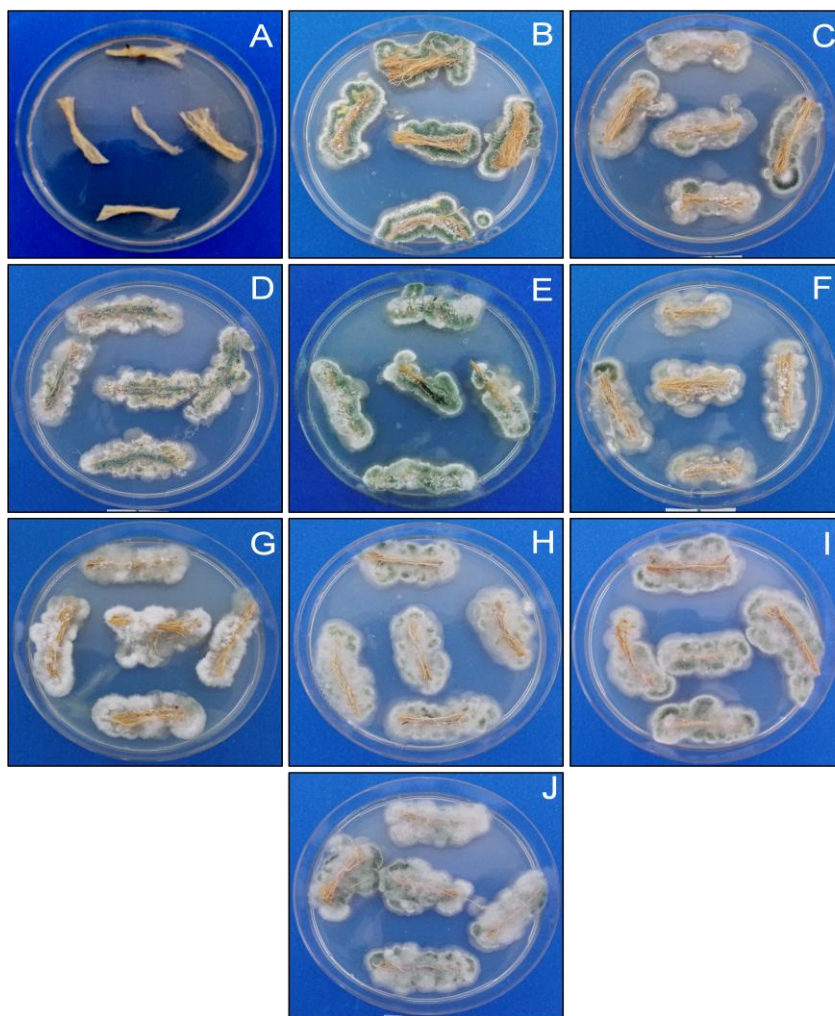


Figura 15. Fragmentos de raízes de soja colonizadas por *Trichoderma* spp. do ensaio com *Sclerotinia sclerotiorum* em casa de vegetação. A: Controle; B: IB 04/05; C: IB 07/01; D: IB 18/03; E: IB 20/02; F: IB 29/08; G: IB 43/14; H: IB 48/06; I: IB 49/15; J: IB 51/07.

5.2. Ensaio com *Meloidogyne incognita*

5.2.1. Avaliação do parasitismo de ovos de *Meloidogyne incognita* por *Trichoderma* spp.

Dos 25 isolados avaliados, 9 diferiram estatisticamente do grupo controle, com variações na média de ovos de *M. incognita* colonizados entre 40% e 80%, conforme a Tabela 6. Os cinco isolados que mais se destacaram foram IB 43/14, IB 29/08, IB 18/03 (Figura 17A), IB 04/05 e IB 49/15 (Figura 16Figura 17B) com os maiores percentuais de colonização de ovos de 80%, 77,8%, 71,1%, 57,8% e 51,1%, respectivamente.

As variações na capacidade de parasitismo de ovos de nematoides por fungos em ensaios *in vitro* também foram observadas por outros autores (FREITAS et al., 2012;

SANTIN, 2008; FERREIRA et al., 2008; BAHARULLAH; STEPHEN, 2008; EAPEN; BEENA; RAMANA, 2005). Santin (2008) avaliou quatro isolados de *Trichoderma* spp. no parasitismo de ovos de *M. incognita* e observou que um isolado se destacou, com 48% de ovos parasitados, os demais apresentaram percentual de parasitismo de no máximo 13%. No trabalho desenvolvido por Ferreira et al. (2008), as porcentagens de ovos parasitados de *M. exigua* variaram entre 33,33% e 53,33%. No ensaio realizado por Carneiro & Gomes (1993), 100% dos ovos imaturos de *M. javanica* foram parasitados por *P. lilacinus* e *P. fumosoroseus* e no máximo 86,1% dos ovos maduros. Os pesquisadores concluíram que os ovos com juvenis completamente desenvolvidos são mais resistentes à colonização por *P. lilacinus*, quando comparados aos ovos em estádios embrionários iniciais.

Em contraposição aos resultados encontrados, Neves et al. (2010) avaliaram cinco linhagens de *Trichoderma* spp. e uma de *P. lilacinus* contra *M. javanica* e observaram 0% e 87,5% de parasitismo de ovos, respectivamente.

Segundo Sahebani & Hadavi (2008), a proporção de ovos de nematoides infectados aumenta simultaneamente com o aumento da atividade de quitinase do fungo. Isto devido à quitina ser parte da composição da casca do ovo do nematoide. Os autores concluíram que *T. harzianum*, assim como outros fungos nematófagos, devem ser capazes de produzir quitinase extracelular, bem como outras proteases, que estão envolvidas na penetração dos ovos de nematoides. Sabe-se que espécies de *Trichoderma* são bastante competitivas nas raízes, solo e ambiente foliar. Entre os mecanismos antagonistas, tais como a produção de antibióticos, competição por espaço ou nutrientes, inclui-se ainda, a excreção de diversas enzimas líticas (glucanases, quitinases, proteases e lipases) utilizadas para degradar os componentes das paredes celulares de outros microbios (BAKER; GRIFFIN, 1995; CHET; INBAR; HADAR, 1997; ELAD; CHET; HENIS, 1982; LORITO et al., 1993; SIVAN; CHET, 1989). O que leva *Trichoderma* spp. a ser um antagonista efetivo contra micro-organismos que contém quitina é sua habilidade de produzir enzimas quitinolíticas. Esse potencial antagônico pode variar entre as espécies e linhagens de *Trichoderma* spp., o que ressalva a importância dos ensaios para avaliar o parasitismo *in vitro* (SHARON et al., 2007; SUAREZ et al., 2004).

Tabela 6. Média e percentual de ovos de *Meloidogyne incognita* parasitados por 25 isolados de *Trichoderma* spp. no ensaio de parasitismo em meio de ágar água.

Tratamento	Média de ovos parasitados	% de ovos parasitados
Controle	0,0000 ± 0,00 c	0,0
IB 01/03	0,3333 ± 0,33 c	2,2
IB 01/13	2,0000 ± 1,53 c	13,3
IB 02/05	1,3333 ± 0,88 c	8,9
IB 04/04	3,3333 ± 1,86 c	22,2
IB 04/05	8,6667 ± 1,86 b	57,8
IB 04/08	0,0000 ± 0,00 c	0,0
IB 04/09	3,0000 ± 1,00 c	20,0
IB 07/01	7,0000 ± 4,16 b	46,7
IB 07/14	2,3333 ± 1,20 c	15,6
IB 08/07	3,0000 ± 1,53 c	20,0
IB 09/02	2,3333 ± 0,33 c	15,6
IB 11/09	2,0000 ± 0,88 c	11,1
IB 12/01	1,0000 ± 0,58 c	6,7
IB 18/03	10,6667 ± 1,20 a	71,1
IB 20/02	6,0000 ± 3,79 b	40,0
IB 26/10	6,0000 ± 2,00 b	40,0
IB 29/08	11,6667 ± 1,67 a	77,8
IB 34/01	4,0000 ± 0,58 c	26,7
IB 43/14	12,0000 ± 1,15 a	80,0
IB 46/08	4,6667 ± 1,20 c	31,1
IB 47/02	3,0000 ± 1,00 c	20,0
IB 48/06	6,6667 ± 1,33 b	44,4
IB 48/13	0,6667 ± 0,67 c	4,4
IB 49/15	7,6667 ± 3,67 b	51,1
IB 51/07	4,0000 ± 1,00 c	26,7

Médias ± erro padrão seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

Além da capacidade de *Trichoderma* spp. para parasitar nematoides, há relatos sobre a ação de metabólitos e competição na mortalidade de ovos. Harman et al. (2004) sugerem que as espécies de *Trichoderma* podem competir por exsudatos liberados pelas sementes no processo de germinação e desenvolvimento radicular, e que esse fator pode inibir a eclosão de juvenis de segundo estágio por falta de estímulo, ocasionado pela redução ou ausência de exsudatos.

Apesar de testes *in vitro* não representarem as condições naturais de campo, uma vez que são realizados em condições controladas de temperatura, umidade e nutrientes, Carneiro & Gomes (1993) lembraram que no trabalho realizado por Irving e Kerry em 1986, com 103 isolados de *V. chlamydosporium*, os que não foram bons *in vitro* não apresentaram boa atividade no solo e, portanto, poderiam ter sido eliminados antes dos testes em casa de vegetação, poupando tempo e material no processo de seleção. Embora sejam poucos os trabalhos realizados a fim de selecionar isolados de *Trichoderma* spp. *in vitro* para o controle de fitonematoides, este tipo de teste pode ser muito importante para acelerar o processo de busca por um bom agente de controle de nematoides, uma vez que possibilitam identificar o mecanismo de ação dos isolados e a fase do desenvolvimento na qual o fungo é capaz de atuar (SAHEBANI e HADAVI, 2008).

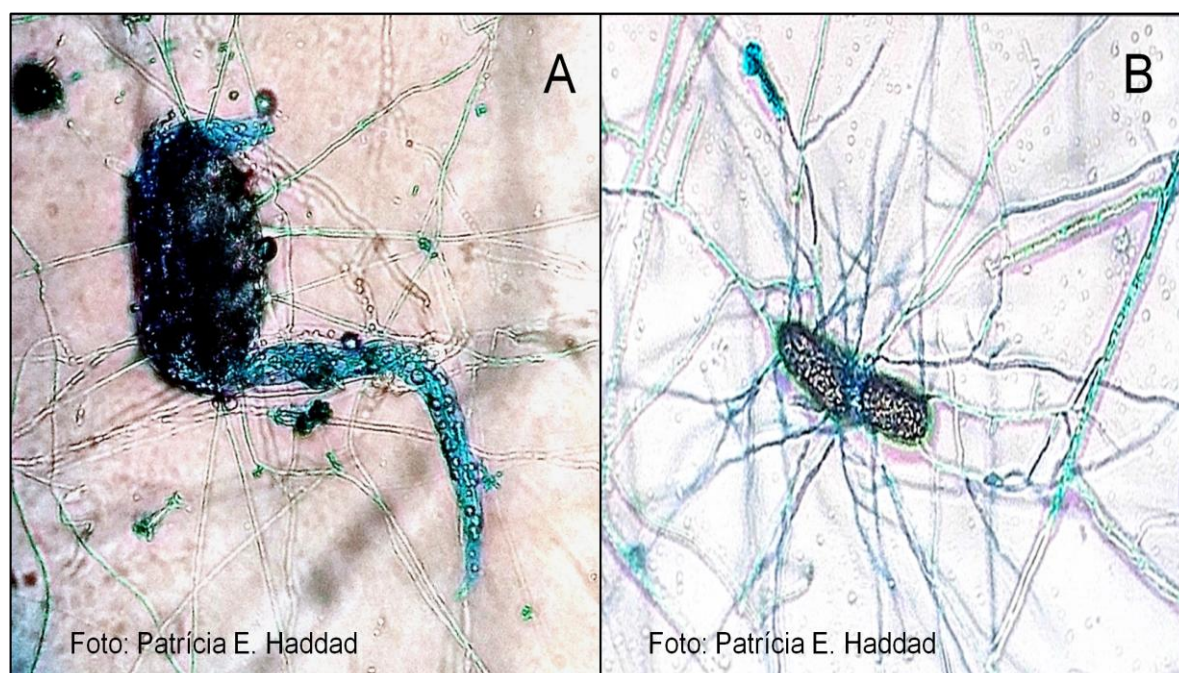


Figura 16. A - Isolado de *Trichoderma* sp. IB 51/07 parasitando recém eclodido de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. B - Isolado de *Trichoderma* sp. IB 49/15 parasitando ovos de *Meloidogyne incognita*.



Figura 17. A – Ovo de *Meloidogyne incognita* enovelado por hifas do isolado de *Trichoderma* sp. IB 18/03. B – Juvenil de *Meloidogyne incognita* parasitado por isolado de *Trichoderma* sp. IB 49/15.

5.2.2. Avaliação de *Trichoderma* spp. no controle de *Meloidogyne incognita* em soja, em casa de vegetação

Em relação a massa fresca de raízes (MFR), todos os isolados de *Trichoderma* spp. diferiram significativamente da testemunha, exceto os isolados IB 18/03 e IB 48/06. Os isolados que apresentaram as maiores massas em relação à testemunha foram IB 07/01, IB 20/02 e IB 51/07 com 229%, 209% e 209%, respectivamente (Tabela 7). Por outro lado, pode-se observar que não houve diferença significativa na MFR entre as plantas do controle e as plantas tratadas com os isolados IB 07/01, IB20/02, IB 29/08, IB 43/14, IB 49/15 e IB 51/07, indicando que de alguma forma os isolados protegeram as plantas da ação do nematoide. Portanto, estes isolados afetaram de alguma forma o desenvolvimento das plantas de soja. Para ilustrar melhor o efeito de *Trichoderma* spp. no crescimento do sistema radicular das plantas de soja, pode-se observar a Figura 18 que permite comparar visualmente os resultados dos tratamentos controle, testemunha e isolado IB 07/01.

Os resultados obtidos corroboram com os encontrados por Santiago et al. (2006) que obtiveram as maiores massas de raízes de tomateiro quando tratados com alguns isolados *P. lilacinus*, na presença de *M. paranaensis*. Os autores observaram aumentos que variaram entre 4,30 e 196,53%.

Segundo Vilas-Boas et al., (2002), os nematoides tendem a reduzir o desenvolvimento das plantas e, portanto, a massa da matéria seca das raízes, principalmente em infestações severas.

Em relação à massa de matéria seca da parte aérea (MMSPA) de plantas, observou-se que seis isolados de *Trichoderma* spp, com exceção dos isolados IB 18/03 e IB 48/06, diferiram estatisticamente em relação à testemunha inoculada com *M. incognita*, evidenciando a ação sobre a atividade do nematoide. Na Tabela 7 pode-se observar que os isolados IB 07/01 e IB 49/15 apresentaram as maiores médias de MMSPA, com ganhos de 139% e 138%, respectivamente, em relação à testemunha. Seguidos pelos isolados IB 51/07, IB 18/03, IB 20/02, IB 29/08 e IB 43/14, com 106%, 93%, 82%, 81% e 71%, respectivamente.

Tabela 7. Valores médios e porcentagem de aumento da massa fresca das raízes (MFR) e da massa seca das partes aéreas (MMSPA) das plantas de soja, cultivadas em solo infestado ou não com *Meloidogyne incognita*, tratadas ou não com isolados de *Trichoderma* spp.

Tratamentos	MFR (g)	% de aumento	MMSPA (g)	% de aumento
Controle	1,367 ± 0,088 a	231,80	0,583 ± 0,096 a	177,62
Testemunha	0,412 ± 0,007 b	-	0,210 ± 0,023 b	-
IB 07/01	1,354 ± 0,232 a	228,24	0,502 ± 0,135 a	139,17
IB 18/03	0,688 ± 0,034 b	66,91	0,406 ± 0,048 a	93,57
IB 20/02	1,275 ± 0,043 a	209,21	0,384 ± 0,033 a	83,10
IB 29/08	1,014 ± 0,128 a	145,94	0,380 ± 0,058 a	80,95
IB 43/14	1,107 ± 0,077 a	168,48	0,361 ± 0,052 a	71,90
IB 48/06	0,433 ± 0,024 b	5,03	0,230 ± 0,040 b	9,52
IB 49/15	1,119 ± 0,024 a	171,21	0,500 ± 0,048 a	138,21
IB 51/07	1,275 ± 0,166 a	209,21	0,432 ± 0,061 a	105,83

CV= 42,34%

CV= 33,71%

*Média da massa fresca das raízes e massa de matéria de seca da parte aérea ± erro padrão seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade (P<0,05).

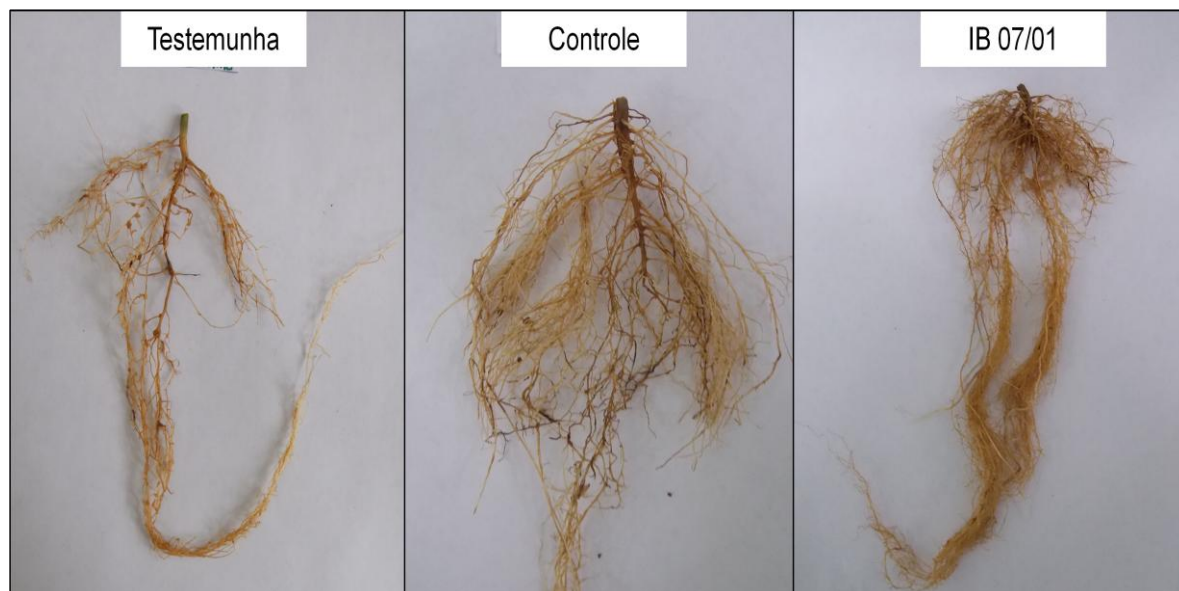


Figura 18. Aspecto visual das raízes das plantas dos tratamentos testemunha só com *Meloidogyne incognita*, do controle branco (sem nenhum tratamento) e do isolado de *Trichoderma* sp. IB 07/01 na presença de *M. incognita*.

O resultado observado no desenvolvimento das plantas, raízes e parte aérea, para alguns dos isolados de *Trichoderma* spp. foi complementar ao que ocorreu em relação ao número de galhas no sistema radicular das plantas (Tabela 8). As reduções constatadas para o isolado IB 07/01 e IB 51/07 no número de galhas foram de 87% e 78% em relação as plantas testemunhas, confirmando novamente o efeito antagonista dos isolados à *M. incognita*. Também foram observadas reduções no número de juvenis, principalmente, no tratamento com o isolado IB 07/01, com 90% menos que nas plantas testemunhas.

Os resultados quanto ao número de galhas demonstram que cinco isolados de *Trichoderma* spp. diferiram estatisticamente da testemunha reduzindo a quantidade de galhas nas raízes das plantas de soja, sendo que o isolado IB 07/01 foi o que apresentou menor número (Tabela 8), com uma redução de 87% em relação às plantas testemunhas. Todos os isolados avaliados apresentaram redução significativa do número de juvenis de segundo estágio em relação à testemunha, com uma variação entre 47% (IB 49/15) e 89% (IB 07/01). Os isolados IB 07/01, IB 29/08 e IB 51/07 foram os que mais diminuíram a quantidade de juvenis, com 89%, 74% e 73%, respectivamente. Já no parâmetro número de ovos, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos.

Tabela 8. Médias de números de galhas, juvenis de segundo estágio e ovos das raízes das plantas de soja, cultivadas por 60 dias em solo infestado com *Meloidogyne incognita*, tratadas ou não com isolados de *Trichoderma* spp.

Tratamentos	Galhas	% redução	Juvenis (J2)	% redução	Ovos	% redução
Testemunha	109,25 ± 25,2 a	-	183,5 ± 20,2 a	-	102,25 ± 33,7 a	-
IB 07/01	14,25 ± 7,1 b	87,0	19,75 ± 6,0 c	89,2	15,25 ± 5,10 a	85,1
IB 18/03	25,75 ± 7,3 b	76,4	75,00 ± 10,8 b	59,1	60,00 ± 42,2 a	41,3
IB 20/02	93,5 ± 25,5 a	14,4	88,75 ± 16,3 b	51,6	38,50 ± 4,1 a	62,3
IB 29/08	40,75 ± 6,9 b	62,7	48,00 ± 4,3 c	73,8	31,00 ± 7,5 a	69,7
IB 43/14	78,25 ± 22,1 a	28,4	38,00 ± 14,3 c	79,3	52,25 ± 11, 5 a	48,9
IB 48/06	59,25 ± 15,6 b	45,8	77,00 ± 34,9 b	58,0	35,25 ± 14,9 a	65,5
IB 49/15	113 ± 17,6 a	3,4	96,75 ± 34,6 b	47,3	56,75 ± 8,8 a	44,5
IB 51/07	24 ± 3,1 b	78,0	49,50 ± 10,5 c	73,0	19,75 ± 1,6 a	80,7

CV= 56,67%

CV= 56,05%

CV= 90,54%

*Média da massa fresca das raízes ± erro padrão seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade (P<0,05).

Campos e Campos (1997) obtiveram redução de número de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne* sp. com aplicação de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinus*. Machado e Campos (1997) também obtiveram redução do número de juvenis de *M. javanica* com *P. lilacinus* e *P. chlamydosporia* cultivados em diferentes substratos, sendo os melhores tratamentos conseguidos com o crescimento dos fungos em esterco bovino e farelo de arroz.

A forma de atuação de *Trichoderma* spp. no ciclo de vida dos nematoides e os mecanismos de ação envolvidos ainda são pouco conhecidos. Presume-se, que envolva a produção de toxinas, modificações dos exsudados radiculares reduzindo a eclosão de ovos, atração e reconhecimento do hospedeiro pelo J2 e a indução de resistência sistêmica (OOSTENDORP; SIKORA, 1990).

Muitos isolados de *Trichoderma* spp. produzem metabólitos tóxicos voláteis e não voláteis que impedem a colonização por micro-organismos antagonistas. Associados a estes metabólitos, podem ser produzidos outros componentes como ácido harzianico, antibióticos, 6-pentil- α -pirona, viridina, gliovirina, glisopreninas e ácido heptelidico (VEY; HOAGLAND; BUTT, 2001). Dessa forma, a grande variedade de compostos produzidos permite que espécies de *Trichoderma* desempenhem antagonismo mais eficiente, abrangendo maior diversidade de espécies de fungos patogênicos e de nematoides quando comparado a outros fungos utilizados em controle biológico (HARMAN et al., 2004).

Apesar de não esclarecida a forma de atuação de espécies de *Trichoderma* sobre os nematoides, várias hipóteses são propostas. Hernández (2003) verificou que a ação parasítica de *Trichoderma* spp. foi unicamente mecânica, pela adesão dos esporos no corpo do nematoide, seguido da germinação e envolvimento do nematoide por uma massa de hifas. Entretanto, a autora verificou que, sob condições *in vitro*, os extratos metabólicos de *Trichoderma* spp. apresentaram efeito nematicida de 100%.

No presente estudo, os isolados de *Trichoderma* spp. IB 07/01 e IB 51/07 demonstraram capacidade de parasitar ovos de *M. incognita in vitro* e reduzir o número de galhas, de juvenis e de ovos nas raízes de soja, além de promover aumento da parte aérea e do sistema radicular e estes fatos podem ter ocorrido devido a mais de um mecanismo de ação dos isolados de *Trichoderma* spp. contra o fitoparasito, portanto são necessários estudos mais específicos para serem elucidados com mais clareza.

5.2.3. Sobrevivência dos isolados de *Trichoderma* spp. em amostras de solo

A sobrevivência dos isolados de *Trichoderma* spp. no solo ao final do experimento realizado para avaliar o potencial dos isolados no controle de *M. incognita*, em plantas de soja, foi feita pela determinação das unidades formadoras de colônias (UFC), cujos resultados podem ser observados na Tabela 9. Os isolados IB 07/01 e IB 48/06 apresentaram os maiores valores de UFC g⁻¹, com 200 x 10⁷ e 50 x 10⁷ respectivamente, embora todos os isolados foram capazes de sobreviver por 60 dias no substrato de crescimento das plantas de soja, na presença do nematoide.

Tabela 9. Número de unidades formadoras de colônia por grama de solo (UFC g⁻¹), quantificado 60 dias após a inoculação de *Trichoderma* spp.

Isolados	UFC g ⁻¹ (10 ⁷)
Controle	---
IB 07/01	200
IB 18/03	2,3
IB 20/02	4,5
IB 29/08	2,3
IB 43/14	12
IB 48/06	50
IB 49/15	2,1
IB 51/07	1,0

A capacidade de espécies de *Trichoderma* em sobreviver no solo foi relatada por Fontenelle et al. (2011), Pedro; Harakava e Lucon (2012) e Silva et al. (2011), que constataram a presença do fungo no solo dos ensaios até 12, 16 e 28 dias após o plantio, respectivamente. Fontenelle et al. relataram até 211 x 10⁹ UFC g⁻¹, enquanto Pedro, Harakava e Lucon observaram até 107 x 10⁹ UFC g⁻¹. A quantidade de UFC observadas no presente trabalho, pode ser devido ao tempo de 60 dias de duração do ensaio. Essa informação procede com os dados encontrados por Jash e Pan (2007) que relataram que populações de *Trichoderma* spp. aumentam ao longo do tempo no solo até 40 dias após a inoculação e depois desse período começam a diminuir. Os autores encontraram no máximo 224,0 x 10⁶ UFC g⁻¹ no solo no 30º dia após o plantio de sementes de grão de bico. Diferentemente do observado no presente estudo, Venâncio, Bueno e Souza (2006), constataram que a microbiota local diminui quando o solo é submetido a solarização, mas a comunidade fúngica aumenta significativamente e recoloniza as camadas do solo, após 56 dias.

5.3. Produção de *Trichoderma* spp. em meios líquidos

5.3.1. Seleção do meio de cultura

O meio de cultivo que proporcionou a maior produção de conídios para todos os isolados de *Trichoderma* spp., foi o meio de levedura inativada (Figura 19), que é obtido a partir da fermentação da cana de açúcar. O número de conídios produzidos por IB 18/03, IB 48/06 e IB 43/14 foi de $1,2 \times 10^8$, $7,0 \times 10^7$ e $1,0 \times 10^8$, respectivamente. A produção de massa micelial também foi maior no meio de levedura inativada para todos os isolados, diferindo significativamente dos demais meios (Figura 20).

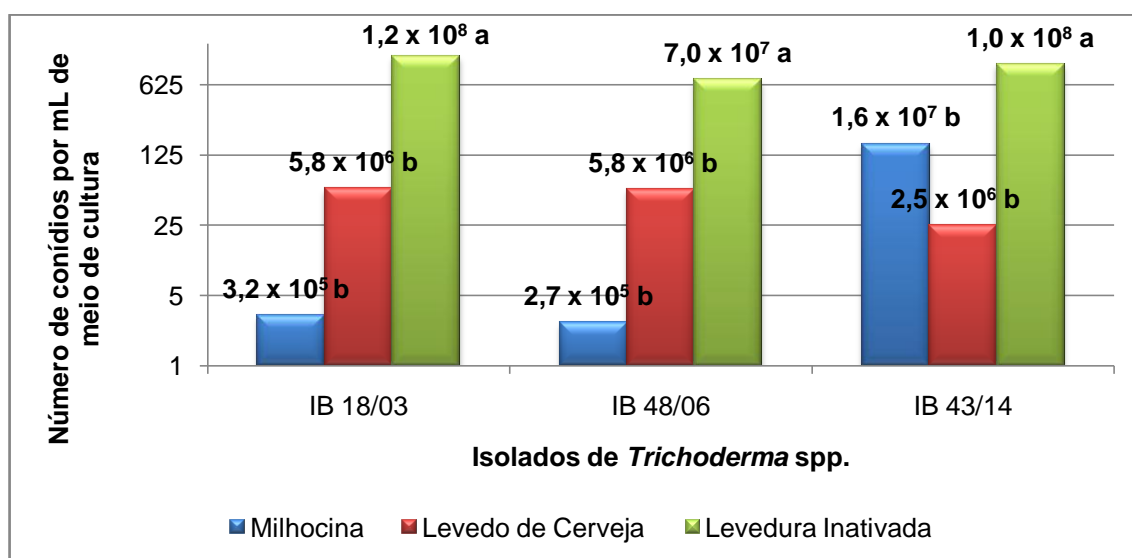


Figura 19. Número de conídios produzidos em diferentes meios de cultura por isolados de *Trichoderma* spp. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

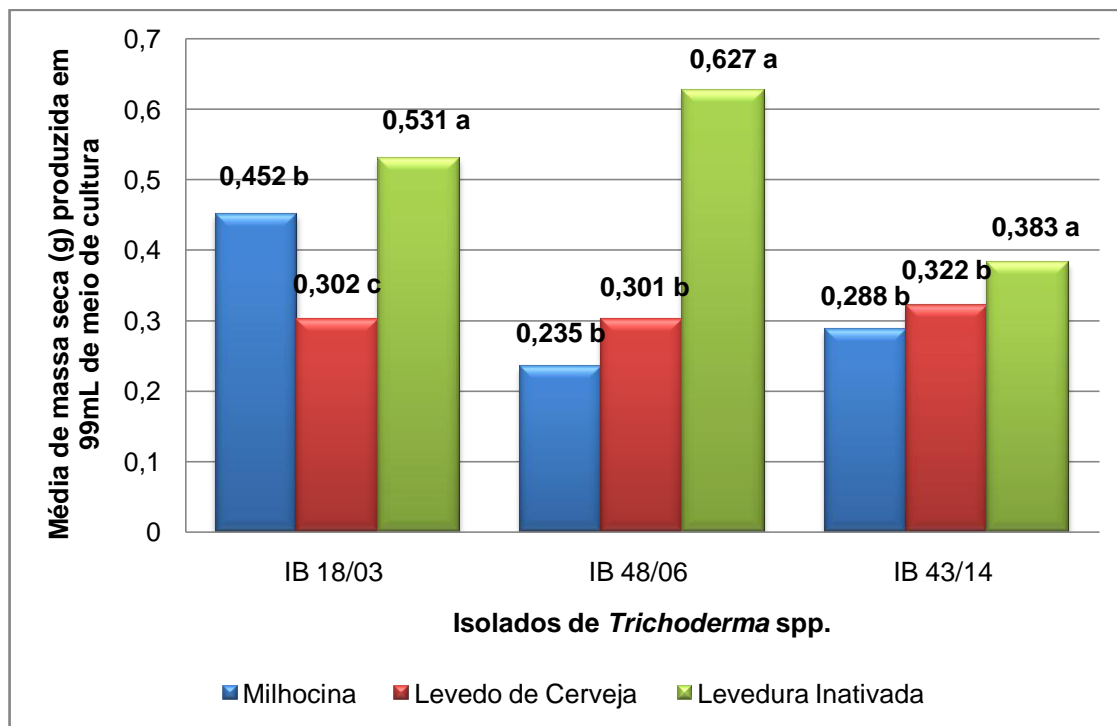


Figura 20. Média de biomassa produzida por isolados de *Trichoderma* em diferentes meios de cultivo.

Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

A produção por fermentação submersa é muito utilizada em várias produções biotecnológicas, e oferece várias vantagens, entre as quais a possibilidade de automatizar muitas operações (JAKUBÍKOVÁ et al., 2006). Este tipo de sistema otimiza o processo de produção e é muito importante principalmente quando o objetivo é produzir em grande escala.

Espécies de *Trichoderma* podem sobreviver a condições anaeróbicas em estado vegetativo, mas esses fungos apresentam uma exigência absoluta de oxigênio para a esporulação (GRESSEL; BAR-LEV; GALUN, 1975; SULOVA; HRMOVÁ; FARKAŠ, 1990). Fato que pôde ser observado nos ensaios realizados, tendo a esporulação ocorrida predominantemente nas paredes dos frascos, acima do meio líquido, onde a concentração de ar é maior e mais favorável a esporulação.

Os dados obtidos corroboram com os de Rossi-Rodrigues et al. (2009), que utilizaram meios líquidos de extrato de levedura e peptona como fontes de nitrogênio e glicose e sacarose como fontes de carbono na produção de quatro espécies de *Trichoderma*. Chegaram a conclusão que ambas as fontes de nitrogênio foram boas para a produção de *T. harzianum* e *T. hamatum*, e a glicose foi a melhor fonte de carbono para todos os isolados.

Em trabalho realizado com substratos naturais para crescimento de *T. harzianum*, os autores Rao, Reddy e Nagesh (1998) utilizaram extrato aquoso de nim, mamona e pongamia no preparo do meio de cultivo, e utilizaram as concentrações de 5 e 10%. Observaram o crescimento do fungo e obtiveram maior produção de conídios e biomassa no meio de extrato de mamona a 10%. Encontraram até $9,7 \times 10^4$ conídios por mL, enquanto que no presente estudo, os isolados apresentaram rendimento de até $1,2 \times 10^8$ conídios por mL em meios com concentração de 1%, evidenciando o quanto a composição do meio influencia na produção dos fungos.

Papavizas (1985) afirmou que as diferentes espécies de *Trichoderma* têm suas próprias preferências ecológicas. O fato desses fungos terem ampla distribuição está relacionado a capacidade de utilizarem uma variedade de fatores nutricionais, bem como tolerar uma ampla gama de pH e temperatura para o seu crescimento e esporulação (HASANZADEH et al., 2012).

5.3.2. Efeito de diferentes concentrações de sacarose na esporulação e produção de biomassa de isolados de *Trichoderma* spp

Na produção de conídios com o meio a base de levedura inativada, não houve diferença significativa entre as concentrações de carbono para o isolado IB 48/06, ocorrendo menor produção na concentração de 0,5% para o isolado IB 18/03 e na concentração de 0% para o isolado IB 43/14. Isso sugere que as duas maiores concentrações (1 e 2%) são mais adequadas, sendo a de 1% a mais econômica (Figura 21). Em relação a biomassa produzida, para todos os isolados a concentração de sacarose que gerou maior massa micelial foi a de 2% (Figura 22), diferindo estatisticamente das outras concentrações.

Os resultados obtidos demonstram que a variação da concentração de sacarose até 2% no meio de cultura, não altera de forma significativa a produção de conídios, no entanto, o acréscimo na concentração de açúcar no meio de cultivo proporcionou um aumento crescente na biomassa gerada por todos os isolados de *Trichoderma* spp. avaliados, conforme a Figura 22.

Os carboidratos são as principais fontes de carbono e energia para os micro-organismos, sendo a glicose a mais fácil e amplamente utilizada, seguida por frutose, manose e galactose (PEREIRA JR., 2008). O carbono, que neste estudo foi representado pela sacarose, serve primariamente como fonte de energia e uma pequena fração é incorporada dentro da célula (MACHADO et al., 2012), sendo um dos componentes

essenciais para o meio de fermentação de micro-organismos, pois exerce grande influência sobre seu metabolismo e crescimento celular (LAXMI et al., 2008).

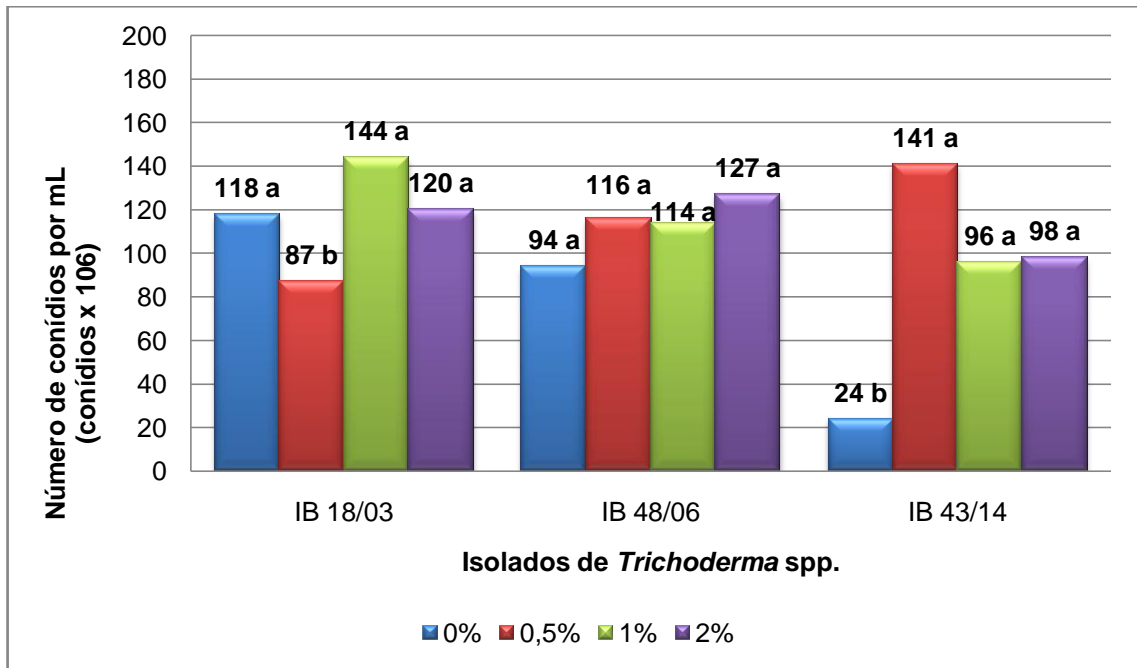


Figura 21. Número de conídios de *Trichoderma* spp. produzidos em diferentes concentrações de sacarose em meio líquido de levedura inativada. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

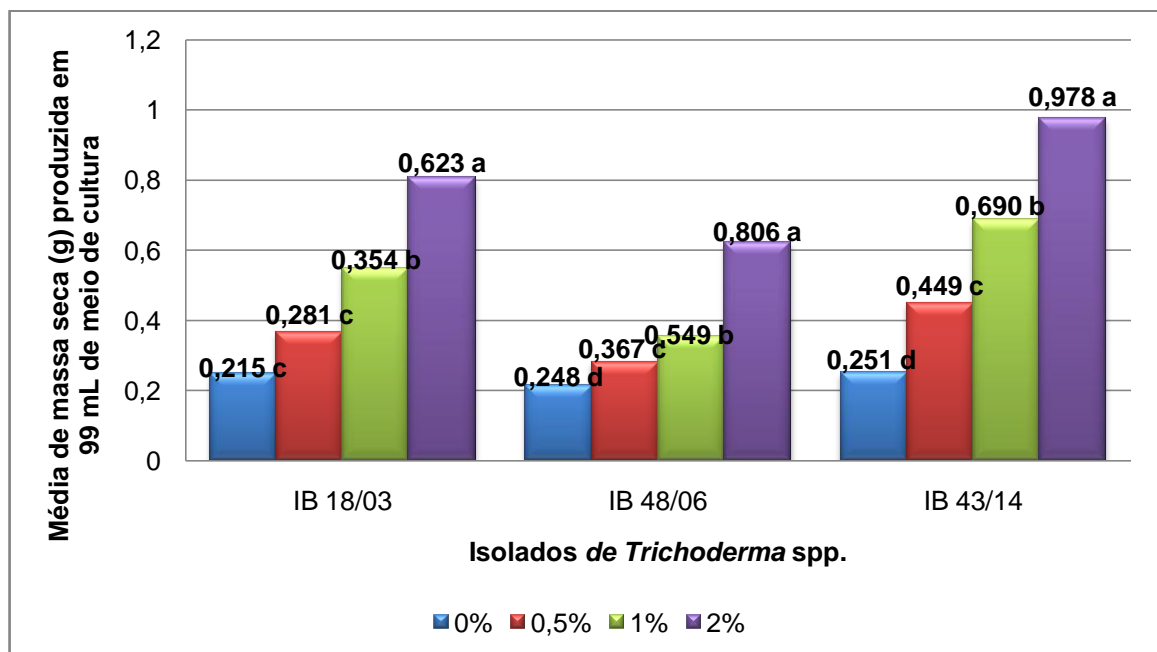


Figura 22. Média de massa seca de isolados de *Trichoderma* spp. produzida em diferentes concentrações de sacarose em meio líquido de levedura inativada. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

Essas observações indicam a importância da realização de pesquisas para a produção de cada um dos fungos de biocontrole, independentemente de pertencerem ao mesmo gênero ou mesma espécie, visando encontrar a condição ideal para o isolado específico selecionado que se deseja produzir, principalmente no que se refere à concentração de carbono e nitrogênio. Isto porque, uma concentração alta ou baixa de nitrogênio reprime a esporulação e está diretamente ligada a concentração de carbono (CUTRIM et al., 2006). A concentração mínima de nutrientes que permite o crescimento micelial é, muitas vezes, insuficiente para produção de esporos, ou seja, geralmente a condição nutricional ótima para se produzir micélio não é necessariamente a melhor condição para se produzir esporos (BRIAN; HEMMING, 1950).

5.4. Identificação molecular dos isolados de *Trichoderma* spp.

A comparação das sequências dos isolados de *Trichoderma* spp. obtidas para a região ITS e para o fragmento do gene do fator de alongação (EF) com as sequências depositadas no ISTH resultou nas identificações contidas na Tabela 10.

Dentre os oito isolados submetidos à identificação molecular, três foram classificados, de acordo com o sequenciamento gênico, como *Trichoderma koningiopsis* e três como *Trichoderma asperelloides*. Além destas espécies foram identificadas, dentre os demais isolados utilizados neste trabalho, as espécies: *Trichoderma atroviride* (2) e *Trichoderma virens* (1).

Todas as espécies identificadas neste trabalho foram relatadas na literatura atuando no controle de nematoides, como é o caso de *T. virens* na redução de ovos e J2 de *M. incognita* (MEYER et al., 2000), *T. atroviride* na mortalidade de J2 de *Xiphinema index* (DARAGÓ et al., 2013), *T. koningiopsis* no controle de *R. reniformis* e *M. javanica* (BOKHARI, 2009) e *T. asperelloides* no controle de fêmeas de *Meloidogyne* (BÍRÓ-STINGLI; TÓTH, 2011). E também já foram relatadas no controle de *S. sclerotiorum* (ETHUR et al., 2005; LOPES et al., 2012; MATROUDI; ZAMANI; MOTALLEBI, 2009; OJAGHIAN, 2011).

A similaridade genética entre os isolados de *Trichoderma* spp. submetidos ao sequenciamento, e as espécies depositadas no banco de dados GenBank variou entre 98,6 e 100% como pode ser observado na Tabela 11.

Tabela 10. Espécies de *Trichoderma* identificadas por seqüenciamento gênico.

Isolados	Espécies
IB 04/05	<i>Trichoderma asperelloides</i>
IB 07/01	<i>Trichoderma atroviride</i>
IB 18/03	<i>Trichoderma atroviride</i>
IB 20/02	<i>Trichoderma asperelloides</i>
IB 29/08	<i>Trichoderma koningiopsis</i>
IB 43/14	<i>Trichoderma asperelloides</i>
IB 48/06	<i>Trichoderma koningiopsis</i>
IB 49/15	<i>Trichoderma koningiopsis</i>
IB 51/07	<i>Trichoderma virens</i>

Tabela 11. Porcentagem de similaridade genética entre os isolados de *Trichoderma* spp. sequenciados e as espécies depositadas no banco de dados GenBank.

Isolados	Valores de identidade das seqüências do gene do fator de alongação
IB 04/05	100% identidade com <i>T. asperelloides</i> CIB T25 (GenBank EU279957)
IB 07/01	99,1% identidade com <i>T. atroviride</i> PPRC S37 (GenBank FJ436193)
IB 18/03	99,5% identidade com <i>T. atroviride</i> DAOM 233966 (GenBank EU280024)
IB 20/02	100% identidade com <i>T. asperelloides</i> CIB T25 (GenBank EU279957)
IB 29/08	99,4% identidade com <i>T. koningiopsis</i> Th003 (GenBank AB568477)
IB 43/14	100% identidade com <i>T. asperelloides</i> CIB T25 (GenBank EU279957)
IB 48/06	99,5% identidade com <i>T. koningiopsis</i> GJS 04-374 (GenBank DQ288995)
IB 49/15	98,6% identidade com <i>T. koningiopsis</i> DAOM 179516 (GenBank EU280012)
IB 51/07	99,6% identidade com <i>T. virens</i> DAOM 237548 (GenBank EU280065)

6. CONCLUSÕES

1. Dentre os vinte e cinco isolados de *Trichoderma* spp. da Coleção de Culturas do Laboratório de Bioquímica Fitopatológica depositados na Micoteca Mário Barreto Figueiredo – IB avaliados, vinte e dois (IB 01/03, IB 01/13, IB 02/05, IB 04/04, IB 04/05, IB 04/08, IB 04/09, IB 08/07, IB 09/02, IB 11/09, IB 12/01, IB 18/03, IB 20/02, IB 26/10, IB 29/08, IB 34/01, IB 43/14, IB 47/02, IB 48/06, IB 48/13, IB 49/15, IB 51/07), são capazes de inibir 100% do

crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum in vitro* quando utilizados no tratamento de escleródios nas concentrações de 1×10^7 e 1×10^9 conídios por mL;

2. Os isolados de *Trichoderma* spp. IB 29/08 e IB 43/14 promovem o crescimento em plantas de soja, na presença de *S. sclerotiorum*, 35 dias após o plantio das sementes em condições de casa de vegetação, quando aplicados a 2% (peso:volume) de substrato no vaso;
3. Nove dos vinte e cinco isolados de *Trichoderma* spp. avaliados são capazes de parasitar ovos de *M. incognita in vitro*;
4. Os isolados IB 07/01, IB 20/02, IB 29/08, IB 43/14, IB 49/15 e IB 51/07 promovem aumento da massa fresca de raízes de plantas de soja na presença de *M. incognita*; Os isolados IB 07/01, IB 18/03, IB 29/08, IB 48/06 e IB 51/07 diminuem o número de galhas formadas no sistema radicular de plantas de soja, em condições de casa de vegetação, quando aplicados a 2% (peso:volume). Todos os isolados de *Trichoderma* spp. avaliados reduzem o número de juvenis de segundo estágio de *M. incognita* em plantas de soja, quando aplicados a 2% (peso:volume) de solo no vaso.
5. O meio de levedura inativada proporcionou a maior produção de conídios e biomassa para os isolados de *Trichoderma* spp. IB 18/03, IB 48/06 e IB 43/14;
6. O aumento gradativo da concentração de sacarose, de 0,5% a 2%, favorece o aumento proporcional na produção de biomassa para os isolados de *Trichoderma* spp. IB 18/03, IB 48/06 e IB 43/14;
7. Técnicas moleculares permitiram a identificação das seguintes espécies: *Trichoderma koningiopsis* (3), *Trichoderma asperelloides* (3), *Trichoderma atroviridae* (2), *Trichoderma virens* (1).

7. REFERÊNCIAS

ABAD, P. et al. Invasion, feeding and development. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (Eds.). **Root-Knot Nematodes**. Oxfordshire: CABI, 2009. p. 163–181.

ADAMS, P. .; LYNCH, J. M. .; DE LEIJ, F. A. A. M. Desorption of zinc by extracellularly produced metabolites of *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma reesei* and *Coriolus versicolor*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2240–2247, 2007.

ADAMS, P. B.; TATE, C. J. Factors affecting lettuce drop caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease Reporter**, v. 59, n. 2, p. 140–143, 1975.

AFFOKPON, A. et al. Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 3, p. 600–608, mar. 2011.

AHMAD, J. S.; BAKER, R. Competitive saprophytic ability and cellulolytic activity of rhizosphere – Competent mutants of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v. 77, n. 2, p. 358–362, 1987.

ALAMBERT, M. R. **Estimação estocástica de parâmetros produtivos da soja: uso do modelo PPDSO em um estudo de caso em Piracicaba/SP**. 108f. Dissertação. Mestrado em Agroenergia. Escola de economia de São Paulo. Fundação Vetúlio Vargas, SP, 2010.

ALMEIDA, Á. M. R. Doenças da soja no Brasil: Epidemiologia e controle. In: PUIGNAU, J. P. (Ed.). **Diálogo XXXIV. Producción de soja**. Montevideo: IICA Biblioteca Venezuela, 1992. p. 165–186.

ALMEIDA, A. M. R. et al. Doenças da soja. In: KIMATI, H. et al. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4.v.2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 663p.

ALMEIDA, A. M. R. et al. Doenças da soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L. . (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 642–664.

ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A. **Controle biológico da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar com o fungo *Metarhizium anisopliae***. São Paulo: Instituto Biológico, 2006. p. 19.

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

ALVES, S. B.; LOPES, R. B. **Controle microbiano de pragas na América Latina: Avanços e desafios**. 14. ed. Piracicaba: Fealq, 2008. p. 414

ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Produção do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em bandejas. **Ecossistema**, v. 14, p. 188–192, 1989.

AMAZONAS, L. **Conjuntura Soja**, 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Soja/18RO/App_Conab_conjuntura.pdf>. Acesso em: 23 Set. 2013.

ARANTES, N. E.; SOUZA, P. I. DE M. DE. **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: Potafos, 1993. p. 535.

ARAUJO, F. F. DE; BRAGANTE, R. J.; BRAGANTE, C. E. Controle genético , químico e biológico de meloidoginose na cultura da soja. **Pesq. Agropec. Trop.**, v. 42, n. 2, p. 220–224, 2012.

ÁVILA, Z. R. DE et al. **Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum***. Brasília: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. p. 30.

AYOUBI, N.; ZAFARI, D.; MIRABOLFATHY, M. Combination of *Trichoderma* species and *Bradyrhizobium japonicum* in control of *Phytophthora sojae* and soybean growth. **J. Crop Prot.**, v. 1, n. 1, p. 67–79, 2012.

BAHARULLAH, S. K.; STEPHEN, M. Effect of some indigenous isolates of *Trichoderma harzianum* on root knot nematode, *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. **Sarhad J. Agric.**, v. 24, n. 2, p. 0–3, 2008.

BAKER, R.; GRIFFIN, G. J. Molecular strategies for biological control of fungal plant pathogens. In: REUVENI, R. (Ed.). **Novel approaches to integrated pest management**. FL, USA,: Boca Raton, 1995. p. 153–182.

BATTA, Y. A. Postharvest biological control of apple gray mold by *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in an invert emulsion. **Crop Protection**, v. 23, p. 19–26, 2004.

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

BERGAMIN, M.; CANCIAN, M. A. E.; CASTRO, P. R. C. Soja *Glycine max* (L.) Merrill. In: CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A. (Eds.). **Ecofisiologia de cultivos anuais**. São Paulo: NBL Editora, 1999. p. 73–90.

BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 3–5.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 919.

BÍRÓ-STINGLI, T.; TÓTH, F. The effect of trifender (*Trichoderma Asperellum*) and the nematode-trapping fungus (*Arthrobotrys Oligospora* Fresenius) on the number of the northern root-knot nematode (*Meloidogyne Hapla* Chitwood) in green pepper. **Journal of Plant Protection Research**, v. 51, n. 4, 1 jan. 2011.

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 2357–2372, 1991a.

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 2373–2417, 1991b.

- BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 2418–2420, 1991c.
- BOKHARI, F. M. Efficacy of some *Trichoderma* species in the control of *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 42, n. 4, p. 361–369, abr. 2009.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, p. 93–108, 1994.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2006.
- BONATO, E. R.; BONATO, A. L. V. **A soja no Brasil: História e Estatística**. Londrina: Embrapa-CNPSo, 1987. p. 61.
- BORÉM, A. ESCAPE GÊNICO: Os riscos do escape gênico da soja no Brasil. **Biotecnol. Cien. e Desenvol.**, v. 5, n. 10, p. 101–107, 1999.
- BOTELHO, L. DA S. **Detecção, transmissão e efeitos de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja**. 156f. Tese (Doutorado em Patologia de Sementes). Universidade Federal de Lavras, 2011.
- BRAÚNA, L. M. **Controle Biológico do Mofo Branco por Isolados de *Trichoderma* nas Culturas de Soja e Feijão Comum**. 82f. Dissertação. Mestrado em Fitopatologia. Universidade de Brasília, Brasília, 2011.
- BRIAN, P. W.; HEMMING, H. G. Some nutritional conditions affecting spore production by *Trichoderma viride* Pers. ex Fries. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 33, n. 1-2, p. 132–141, jan. 1950.
- BROTMAN, Y. et al. *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 3, p. e1003221, mar. 2013.
- BROTMAN, Y.; KAPUGANTI, J. G.; VITERBO, A. *Trichoderma*. **Current Biology**, v. 20, n. 9, p. 390–391, 2010.
- CABI. **Crop Protection Compendium**. Wallingford: CAB International, 2007.
- CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P. Efeito da época e forma de aplicação dos fungos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium* no controle de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 261–265, 1997.
- CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. Fungal cells and vegetative growth. In: CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. **The Fungi**. London: Academic Press, 1994. p.125-128.

- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas de nematoides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 35–44, 2001.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; GOMES, C. B. Metodologia e testes de patogenicidade de *Paecilomyces lilacinus* e *P. fumosoroseus* em ovos de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 66–75, 1993.
- CARVALHO FILHO, M. R. DE. ***Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole de *Cylindrocladium scoparium* e como promotores de crescimento em mudas de eucalipto**. 74f. Dissertação. Mestrado em Fitopatologia. Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
- CARVALHO-FILHO, M. R. et al. **Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético *in vitro* e colonização endofítica de mudas de eucaliptos**. Boletim Técnico. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília: 2008. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=2012/BR/BR2012101100011.xml;BR20081191226>>. Acesso em: 29 ago. 2013.
- CASTILLO, F. D. H. et al. In vitro antagonist action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 6, n. 3, p. 410–417, 2011.
- CHAVES, G. M. Estudos sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary. **Experimentae**, v. 4, p. 69–133, 1964.
- CHEN, S.; DICKINSON, D. W. Biological control of nematodes by fungal antagonists. In: CHEN, Z. X.; CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W. (Eds.). **Nematology: Advances and Perspectives, Volume 2**. Beijing e Wallingford: Tsinghua University Press, 2004. p. 979–1039.
- CHEN, Z. X. et al. Suppression of *Meloidogyne arenaria* race 1 by soil application of endospores of *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology**, v. 28, n. 2, p. 159–168, 1996.
- CHET, I.; INBAR, J.; HADAR, I. Fungal antagonists and mycoparasites. In: WICKLOW, D.T.; SÖDERSTRÖM, B.(Eds.). **The Mycota IV**. Berlin: Springer-Verlag, 1997. p. 165–184.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, décimo segundo levantamento, setembro 2013**. Brasília: 2013.
- 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**, v. 149, n. 3, p. 1579–92, mar. 2009.
- COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1983. p. 539
- COPPING, L. G.; MENN, J. J. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Manage. Sci.**, v. 56, p. 651–676, 2000.

CORABI-ADELL, C.; LUCON, C. M. M. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* no estado de São Paulo – Aspectos enzimáticos e potencial biocontrolador. **Arq. Inst. Biol.**, v. 69 (supl.), p. 1–306, 2002.

COSTA, J. A. **Cultura da soja**. Porto Alegre: I. Manica e J.A. Costa, 1996. p. 233.

COSTA, M. J. N. et al. Patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne incognita* em tomateiros (*Lycopersicon esculentum*) com aplicação de filtrados fúngicos ou extratos de plantas e de esterco animais. **Nematologia Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 219–226, 2000.

CRISPINO, C. C. et al. **Adubação Nitrogenada na Cultura da Soja**. Londrina: Comunicado Técnico 75. Embrapa, 2001. p. 6.

CÚNDOM, M. A.; MAZZA, S. M.; GUTIÉRREZ, S. A. Short communication - selection of *Trichoderma* spp. isolates against *Rhizoctonia solani*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 1, p. 79–81, 2003.

CUNHA, W. G. DA. **Resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de soja modificadas para expressar o gene da oxalato descaboxilase de *Flammulina velutipes***. Tese. Doutorado em Biologia Molecular. Universidade de Brasília-Brasília., 2010.

CUTRIM, F. DE A. et al. Influência de meios de cultura e da interação carbono-nitrogênio no crescimento e esporulação de *Penicillium sclerotigenum*. **Summa Phitopathol.**, v. 32, n. 1, p. 85–88, 2006.

DANIELSON, G. A.; NELSON, B. D.; HELMS, T. C. Effect of *Sclerotinia* stem rot on yield of soybean inoculated at different growth stages. **Plant Disease**, v. 88, p. 297–300, 2004.

DARAGÓ, Á. et al. In vitro investigations on the biological control of *Xiphinema index* with *Trichoderma* species. **Helminthologia**, v. 50, n. 2, p. 132–137, 31 ago. 2013.

DE LEIJ, F. A. A. M.; KERRY, B. R. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. **Revue de Nématologie**, v. 14, n. 1, p. 157–164, 1991.

DE LEY, P.; BLAXTER, M. Systematic position and phylogeny. In: LEE, D. L. (Ed.). **The Biology of Nematodes**. London: CRC Press, 2002. p. 1–49.

DHINGRA, O. D.; MENDONÇA, H. L.; MACEDO, D. M. Doenças e seu controle. In: SEDIYAMA, T. (Ed.). **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina: Mecenas, 2009. p. 133–155.

DIAS, W. P. et al. **Nematoides em soja: identificação e controle**. Londrina: Circular Técnica 76. Embrapa, 2010b. p. 1–8.

DIAS, W. P. et al. Nematoides. In: ALMEIDA, Á. M. R.; SEIXAS, C. D. S. (Eds.). **Soja: doenças radiculares e de hastes e inter-relações com o manejo do solo e da cultura**. Londrina: Embrapa Soja, 2010a. p. 173–206.

- DICKSON, D. W. et al. Control of plant-parasitic nematodes by biological antagonists. In: ROSEN, D.; BENNETT, F. D.; CAPINERA, J. L. (Eds.). **Pest management in the subtropics. Biological control - A Florida perspective**. London: Intercept, 1994. p. 575–601.
- DORRELL, D. G.; HUANG, H. C. Influence of *Sclerotinia wilt* on seed yield and quality of sunflower wilted at different stages of development. **Crop Science**, v. 18, n. 1, p. 974–976, 1978.
- DOS SANTOS, A. F.; DHINGRA, O. D. Pathogenicity of *Trichoderma* spp. on the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Can. J. Bot.**, v. 60, p. 472–475, 1982.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, n. 1, p. 11–15, 1987.
- DRUZHININA, I.; KUBICEK, C. P. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? **Journal of Zhejiang University Science**, v. 6, p. 100–112, 2005.
- EAPEN, S. J.; BEENA, B.; RAMANA, K. V. Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. **Journal of invertebrate pathology**, v. 88, n. 3, p. 218–25, mar. 2005.
- EISENBACK, J. D. et al. **A guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* Spp.), with a pictorial key**. Raleigh: The Departments of Plant Pathology and Genetics North Carolina State University and The United States Agency for International Development, 1981. p. 48.
- EISENBACK, J. D.; TRIANTAPHYLLOU, H. H. Root-knot nematode: *Meloidogyne* spp. and races. In: NICKLE, W. R. (Ed.). **Manual of Agricultural Nematology**. New York: M. Dekker, 1991. p. 191–274.
- ELAD, Y. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. **Crop Protection**, v. 19, p. 709–714, 2000.
- ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 28, p. 719–725, 1982.
- EL-HASAN, A. et al. Detection of viridifungin A and other antifungal metabolites excreted by *Trichoderma harzianum* active against different plant pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, v. 124, p. 457–470, 2009.
- EL-HASAN, A.; WALKER, F.; BUCHENAUER, H. *Trichoderma harzianum* and its metabolite 6-pentyl- α -pyrone suppress fumaric acid produced by *Fusarium moniliforme*. **J. Phytopathol.**, n. 156, p. 79–87, 2008.
- EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2004**. Londrina: Embrapa Soja, 2003, 237 p.

EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2012 e 2013**. Londrina: Embrapa Soja, 2011, 261 p.

ESBENSHADE, P. R.; TRIANTAPHYLLOU, A. C. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. **Journal of nematology**, v. 22, n. 1, p. 10–5, jan. 1990.

ETHUR, L. Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomate e pepineiro**. 135f. Tese. Doutorado em Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Santa Maria - Santa Maria, RS., 2006.

ETHUR, L. Z. et al. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 127–133, 2005.

ETHUR, L. Z. et al. Micobiota parasitária de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* isolada de solos da fronteira oeste do Rio Grande do Sul. **Arq. Inst. Biol.**, v.81, n.1, p. 62-67, 2014.

ETHUR, L. Z.; CEMBRANEL, C. Z.; SILVA, A. C. F. DA. Seleção de *Trichoderma* spp. visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 885–887, 2001.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1977. p. 11.

FERRAZ, L. C. C. B. Métodos alternativos de controle de fitonematoides. **Informe Agropecuário**, v. 16, p. 23–26, 1992.

FERRAZ, L. C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Nematoides. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. AL. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. p. 277–305.

FERREIRA, P. A. et al. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. **Rev. Trópica - Cien. Agr. e Biol.**, v. 2, n. 3, p. 15–21, 2008.

FIGUEIRÊDO, G. S. DE et al. Biological and chemical control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma* spp. and *Ulocladium atrum* and pathogenicity to bean plants. **Braz. Arq. Biology and Technology**, v. 53, n. 1, p. 1–9, 2010.

FISCHER, I. H. et al. Reação de maracujazeiro-amarelo ao complexo fusariose-nematoide de galha. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 2, p. 223–227, 29 abr. 2010.

FONTENELLE, A. D. B. et al. Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. **Crop Protection**, v. Volume 30, n. 11, p. 1492–1500, 2011.

FORTES, F. DE O. et al. Promoção e enraizamento de microestacas de um clone de Eucalyptus sp. por *Trichoderma* spp. **R. Árvore**, v. 31, n. 2, p. 221–228, 2007.

FREITAS, L. G. DE et al. Supressividade de Solo a *Meloidogyne* por *Pasteuria penetrans* nos Estados do Maranhão e Santa Catarina. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 153–172.

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L.; FERRAZ, S. **Introdução à Nematologia**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2006. p. 84

FREITAS, M. A. et al. Seleção de *Trichoderma* spp. como potenciais agentes para biocontrole de *Meloidogyne incognita* em cana-de-açúcar. **Nematropica**, v. 42, n. 1, p. 115–122, 2012.

FREITAS, S. S. **Rizobactérias e suas interações com plantas e micro-organismos**. 112f. Tese. Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 1994.

FURLAN, S. H. **Manejo do mofo branco na cultura da soja**. São Paulo: Comunicado Técnico 111. Instituto Biológico, 2009.

GAMS, W.; BISSET, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: HARMAN, G.; KUBICET, C. P. (Eds.). **Trichoderma and Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics**. London: Taylor & Francis, 1998. p. 3–34.

GARCIA, R. A.; JULIATTI, F. C. Avaliação da resistência da soja a *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes estádios fenológicos e períodos de exposição ao inóculo. **Trop. plant pathol.**, v. 37, n. June, p. 196–203, 2012.

GOLUEKE, C. G. Compost as a micronutrient supplier. In: **Principles of Composting. The staff of Biocycle Journal of Waste Recycling**. Emmaus: The JG Press Inc., 1991. p. 161–162.

GÖRGEN, C. A. et al. Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. **Pesq. Agropec. bras.**, v. 44, n. 12, p. 1583–1590, 2009.

GRACIA-GARZA, J. A.; REELEDER, R. D.; PAULITZ, T. C. Degradation of sclerotina of *Sclerotinia* by fungus Gnats (*Brasysia coprophila*) and the biocontrol fungi *Trichoderma* spp. **Soil Biol. Biochem.**, v. 29, n. 2, p. 123–129, 1997.

GRESSEL, J.; BAR-LEV, S.; GALUN, E. Blue light induced response in the absence of free oxygen. **Plant and Cell Physiology**, v. 16, n. 2, p. 367–370, 1975.

GUARESCHI, R. F. et al. Emprego de *Trichoderma* spp. no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e na promoção de crescimento vegetativo nas culturas de girassol e soja. **Gl. Sci. Technol.**, v. 5, n. 2, p. 1–8, 2012.

HARMAN, G. E. et al. Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control. **Biological Control**, v. 1, p. 23–28, 1991.

HARMAN, G. E. et al. Special issue: *Trichoderma* - from basic Biology to Biotechnology. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 1–2, jan. 2012.

HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43–56, jan. 2004.

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

HARMAN, G. E. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, p. 190–194, 2006.

HARTMAN, G. L.; HILL, C. B. Diseases of Soybean and Their Management. In: SINGH, G. (Ed.). **The Soybean: Botany, Production and Uses**. Oxfordshire: CABI, 2010. p. 276–299.

HARTMAN, R. M.; SASSER, J. N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: BARKER, K. R.; CARTER, C. C.; SASSER, J. N. (Eds.). **An advanced treatise on Meloidogyne**. 2 Methodol ed. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1985. p. 69–77.

HASANZADEH, M. et al. Effect of cultural condition on biomass production of some nematophagous fungi as biological control agent. **Egypt. Acad. J. Biolog. Sci.**, v. 5, n. 1, p. 115–126, 2012.

HENNEBERG, L. et al. Incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja e sensibilidade dos testes de detecção. **Pesq. Agropec. bras.**, v. 47, n. 6, p. 763–768, 2012.

HERAUX, F. M. G.; HALLETT, S. G.; WELLER, S. C. Combining *Trichoderma virens* inoculated compost and a rye cover crop for weed control in transplanted vegetables. **Biological Control**, v. 34, p. 21–26, 2005.

HERMOSA, R. et al. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v. 158, n. Pt 1, p. 17–25, jan. 2012.

HERNÁNDEZ, A. M. **Utilización de hongos endofíticos provenientes de banano orgánico para el control biológico del nemátodo barrenador *Radopholus similis* Cobb, Thorne**. 67f. Dissertação. Mestrado em Educação para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica, 2003.

HJELJORD, L. G.; TRONSMO, A. Effect of germination initiation on competitive capacity of *Trichoderma atroviride* P1 conidia. **Phytopathology**, v. 93, p. 1593–1598, 2003.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175–86, abr. 2004.

HOWEL, C. H. Effect of seed quality and combination fungicide *Trichoderma* spp. seed treatments on pre- and postemergence damping-off in cotton. **Phytopathology**, v. 97, n. 1, p. 66–71, 2007.

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. **Plant Disease**, v. 87, n. 1, p. 4–10, 2003.

HUANG, H. C.; HOES, J. A. Importance of plant spacing and sclerotial position to development of *Sclerotinia wilt* of sunflower. **Plant Disease (formerly Plant Disease Reporter)**, v. 64, n. 1, p. 81–84, 1980.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v. 57, p. 1025–1028, 1973.

IAG/USP. **Boletim Climatológico Anual da Estação Meteorológica do IAG/USP**. 16. ed. São Paulo: IAG/USP, 2013. p. 71.

INBAR, J.; MENENDEZ, A. N. A.; CHET, I. Hyphal interaction between *Trichoderma* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. **Soil Biol. Biochem.**, v. 28, n. 6, p. 757–763, 1996.

INCH, S. et al. The development of a model to predict the potential efficacy of *Trichoderma harzianum* isolates on perithecial production of *Gibberella zeae* based on secondary metabolite production. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 33, n. 3, p. 337–346, jul. 2011.

IRVING, F.; KERRY, B. R. Variation between strains of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamidosporium* Goddard. Factors affecting parasitism of cyst nematode eggs. **Nematologica**, v. 32, p. 474–485, 1986.

ISTH. **International subcommission on Trichoderma and Hypocrea taxonomy**. 2011. Disponível em: <<http://www.isth.info/biodiversity/index.php>>. Acesso em: 14 Abr. 2014.

JACKSON, M. A. et al. Fermentation strategies for improving the fitness of a bioherbicide. **Weed Technology**, v. 10, p. 645–650, 1996.

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

JAKUBÍKOVÁ, L. et al. Conidiation of *Trichoderma atroviride* isolate during submerged cultivation in a laboratory stirred-tank fermenter. **Folia microbiologica**, v. 51, n. 3, p. 209–13, jan. 2006.

JASH, S.; PAN, S. Variability in antagonistic activity and root colonizing behaviour of *Trichoderma* isolates. **Journal of Tropical Agriculture**, v. 45, n. 1-2, p. 29–35, 2007.

JENKINS, N. E.; GOETTEL, M. S. Methods for mass-production of microbial control agents for grasshoppers and locusts. In: GOETTEL, M. S.; JOHNSON, D. L. (Eds.). **Microbial control of grasshoppers and locusts**. Ottawa: Entomological Society of Canada, 1997. p. 37–49.

KARSSSEN, G.; MOENS, M. Root-knot nematodes. In: PERRY, R. N.; MOENS, M. (Eds.). **Plant nematology**. Wallingford, UK: CAB International, 2006. p. 59-90.

KARSSSEN, G.; MOENS, M.; PERRY, R. N. **Plant nematology**. Wallingford: CABI, 2006. p. 59–90

KHALIL, S. K.; SHAH, M. A.; NAEEM, M. Laboratory studies on the compatibility of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* with certain pesticides. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 13, p. 329–334, 1985.

KHAN, S. et al. Mass multiplication and shelf life of liquid fermented final product of *Trichoderma viride* in different formulations. **Adv. Biores.**, v. 2, n. June, p. 178–182, 2011.

KIM, T. G.; KNUDSEN, G. R. Quantitative real-time PCR effectively detects and quantifies colonization of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Trichoderma* spp. **Applied Soil Ecology**, v. 40, n. 1, p. 100–108, set. 2008.

KIMATI, H. et al. (EDS.). **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997.

KIMPINSKI, J.; STURZ, A. V. Managing crop root zone ecosystems for prevention of harmful and encouragement of beneficial nematodes. **Soil and Tillage Research**, v. 72, n. 2, p. 213–221, 2003.

KLAHOLD, C. A. et al. Resposta da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) à ação de bioestimulante. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 28, n. 2, p. 179–185, 13 jan. 2006.

KOROLEV, N. .; RAV DAVID, D. .; ELAD, Y. The role of phytohormones in basal resistance and *Trichoderma* induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. **Bio Control**, v. 53, p. 667–687, 2008.

LAXMI, G. S. et al. Palm fiber as novel substrate for enhanced xylanase production by isolated *Aspergillus* sp . RSP-6. **Current Trends in Biotechnol. and Pharmacy**, v. 2, n. 3, p. 447–455, 2008.

LE TOURNEAU, D. Morphology, cytology, and physiology of *Sclerotinia* species in culture. **Phytopathol.**, v. 69, p. 887–889, 1979.

LEITE, L. G. et al. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: Alexandre de Sene Pinto, 2003. p. 92.

LEITE, R. M. V. B. et al. Incidência de podridão branca causada por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol semeado após a colheita da safra de verão, no Estado do Paraná. **Summa Phytopathologica**, v. 26, n. 2, p. 81–84, 2000.

LEITE, R. M. V. B. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. **Comunicado Técnico. Embrapa soja**, n. 76, 2005.

LOBO JUNIOR, M. et al. **Uso de Braquiárias para o manejo de doenças causadas por patógenos habitantes do solo**. Santo Antônio de Goiás: Comunicado técnico, 183. Embrapa Arroz e Feijão, 2009. p. 8.

LOPES, E. A. et al. Potencial de Isolados de Fungos Nematófagos no Controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 78–84, 2007.

LOPES, F. A. C. et al. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal biology**, v. 116, n. 7, p. 815–824, 2012.

LOPES, R. B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microorganismos no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 15–28.

LORDELLO, L. G. E. **Nematoides das plantas cultivadas**. 8. ed. São Paulo: Nobel, 1984. p. 314.

LORITO, M. et al. Biolistic transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA. **Curr Genet**, v. 24, p. 349–35, 1993.

LOUZADA, G. A. S. et al. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. **Biota Neotrop.**, v. 9, n. 3, p. 145–149, 2009.

LUCON, C. M. M. **Trichoderma no controle de doenças de plantas causadas por patógenos de solo**. São Paulo: Comunicado Técnico 77. Instituto Biológico, 2008.

MACHADO, D. F. M. et al. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Rev. Cien. Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 274–288, 2012.

MACHADO, J. C. et al. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos, utilizando solução de manitol. **Rev. bras. Sementes**, v. 23, n. 2, p. 95-101, 2001.

MACHADO, V. O. F.; CAMPOS, V. P. Cultivo de fungos antagonistas em diferentes substratos e avaliação da eficiência no controle de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 387-391, 1997.

MAPA. **Soja**, 2013. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>>. Acesso em 12 Ago. 2013.

MASCARENHAS, H. A. A. et al. Nitrogênio: a soja aduba a lavoura da cana. **O agrônomo**, v. 57, n. 1, p. 12–13, 2005.

MASCARIN, G. M.; BONFIM JUNIOR, M. F.; ARAÚJO FILHO, J. V. DE. *Trichoderma harzianum* reduces population of *Meloidogyne incognita*, in cucumber plants under greenhouse conditions. **J. Entomology and Nematology**, v. 3, n. 1, p. 1999–2002, 2012.

MASSOLA, N. S.; KRUGNER, T. L. Fungos fitopatogênicos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. p. 149–206.

MASTOURI, F.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G. E. Seed treatment with *Trichoderma harzianum*, alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. **Phytopathology**, v. 100, n. 11, p. 1213–21, nov. 2010.

MATROUDI, S.; ZAMANI, M. R.; MOTALLEBI, M. Antagonistic effects of three species of *Trichoderma* sp. on *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of canola stem rot. **Egyptian Journal of Biology**, v. 11, p. 37–44, 2009.

MELO, I. S. DE. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa, 1998. p. 17–66.

MELO, I. S. DE. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1991. p. 135–156.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* com bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 4, p. 261–295, 1996.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-DNPMA, 1998. p. 393–419.

MENDES, M. DE L.; RODRIGUEZ, P. B. N. Reação de cultivares de soja aos nematoides de galhas *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* raças 1, 2, 3 e 4. **Nematologia Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 211–217, 2000.

MESSINA, M. J. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. **The American journal of clinical nutrition**, v. 70, n. 3 Suppl, p. 439S–450S, set. 1999.

MEYER, S. L. F. et al. Evaluation of *Trichoderma virens* and *Burkholderia cepacia* for antagonistic activity against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Nematology**, v. 2, n. 8, p. 871–879, 2000.

MICHEREFF, S. J. et al. Importância dos Patógenos e das Doenças Radiculares em Solos Tropicais. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds.). **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. p. 1–18.

- MITCHELL, R. L.; RUSSELL, W. J. Root Development and Rooting Patterns of Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) Evaluated Under Field Conditions. **Agronomy Journal**, v. 63, n. 2, p. 313, 1971.
- MOENS, M.; PERRY, R. N.; STARR, J. L. *Meloidogyne* species: a diverse group of novel and important plants parasites. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (Eds.). **Root-Knot Nematodes**. Oxfordshire: CABI, 2009. p. 1–17.
- MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F.; MORAES, R. O. Multiplicação de agentes de controle biológico. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. [s.l.] EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 7–23.
- MORALES, A. M. R. **Análise da expressão de genes relacionados à resistência a *Meloidogyne javanica* em soja, através da técnica de PCR em tempo real**. 85f. Dissertação. Mestrado em Agronomia. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Unesp-Jaboticabal., 2007.
- MORETINI, A.; MELO, I. S. DE. Formulação do fungo *Coniothyrium minitans* para controle do mofo-branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 2, p. 155–161, 2007.
- MÜLLER, L. Morfologia, anatomia e desenvolvimento. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. (Eds.). **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p. 65–104.
- NASEBY, D. C.; PASCUAL, J. A.; LYNCH, J. M. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 161–189, 2000.
- NEVES, S. S. et al. **Avaliação do parasitismo de ovos de *Meloidogyne javanica* por *Paecilomyces lilacinus* e cinco isolados de *Trichoderma* spp.** Jaboticabal: 2010. Disponível em: <prope.unesp.br/xxii_cic/ver_resumo.php?area=100043...30>. Acesso em 25 Jul. 2013.
- NUNES, H. T.; MONTEIRO, A. C.; POMELA, A. W. V. Uso de agentes microbianos e químico para o controle de *Meloidogyne incognita* em soja. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 403–409, 27 ago. 2010.
- OJAGHIAN, M. R. Potential of *Trichoderma* spp. and *Talaromyces flavus* for biological control of potato stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytoparasitica**, v. 39, n. 2, p. 185–193, 2011.
- OLIVEIRA, C. M. G. Panorama das doenças e pragas em horticultura: doenças causadas por nematoides. **O Biológico**, v. 69, n. 2, p. 85–86, 2007.
- OOSTENDORP, M.; SIKORA, R. A. In vitro interrelationships between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. **Revue de Nématologie**, v. 14, p. 269–274, 1990.
- OYEKANMI, E. O.; FAWOLE, B. Nematodes of soybean and their management. In: SINGH, G. (Ed.). **The Soybean: Botany, Production and Uses**. Oxfordshire: CABI, 2010. p. 325–344.

PAIVA, B. M. DE; ALVES, R. M.; HELENO, N. M. Aspecto socioeconômico da soja. **Informe Agropecuário**, v. 27, n. 230, p. 7–14, 2006.

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

PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potencial for biocontrol. **Annual Review Phytopathology**, v. 53, 1985.

PARISI, J. J. D.; PATRICIO, F. R. A.; OLIVEIRA, S. H. F. DE. Método do rolo de papel toalha modificado para a detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão. **Summa phytopathol.**, v. 32, n. 3, p. 288–290, 2006.

PEDRO, E. A. DE S.; HAKAKAVA, R.; LUCON, C. M. M. Promoção do crescimento do feijoeiro e controle da antracnose por *Trichoderma* spp. **Pesq. Agropec. bras.**, v. 47, n. 11, p. 1589–1595, 2012.

PEREIRA JR., N. **Tecnologia de Bioprocessos**. Rio de Janeiro: Escola de química/UFRJ, 2008. v. 1p. 62.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 13. ed. Piracicaba: Nobel, 1990. p. 468.

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, diseases and symptomatology, host ranges, geographic distribution and impact. **Phytopathol.**, v. 69, n. 8, p. 875–880, 1979.

QIU, L.-J.; CHANG, R.-Z. The origin and history of soybean. In: SINGH, G. (Ed.). **The Soybean: Botany, Production and Uses**. Oxfordshire: CABI, 2010. p. 14–23.

RAO, M. S.; REDDY, P. P.; NAGESH, M. M. S. Rao et al. Evaluation of plant based formulations of *Trichoderma harzianum* for the management of *Meloidogyne incognita* og egg plant.pdf. **Nematol. mediterr.**, v. 26, p. 59–62, 1998.

RAPER, C. D.; BARBER, S. A. Rooting Systems of Soybeans. I Differences in Root Morphology among Varieties1. **Agronomy Journal**, v. 62, n. 5, p. 581, 1970.

REIS ALMEIDA, F. B. et al. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnol. Lett.**, v. 29, p. 1189–1193, 2007.

RIFAI, R.W. A revision of the genus *Trichoderma*. C.M.I. - **Mycological Papers**, 116, p.1-56. 1969.

RITZINGER, C. H. S. P.; COSTA, D. DA C. **Capítulo X – Nematoides e Alternativas de Manejo**, 2006. Disponível em: <www.agencia.cnptia>. Acesso em 18 Set. 2013.

ROSSI, C. E. Nematoides da bananeira. **Anais - VI Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico**, p. 21–23, mar. 2002.

- ROSSI-RODRIGUES, B. C. et al. Comparative growth of *Trichoderma* strains in different nutritional sources, using Bioscreen C automated system. **Braz. J. Microbiology**, v. 40, p. 404–410, 2009.
- RYDER, L. S. et al. Saprotrophic competitiveness and biocontrol fitness of a genetically modified strain of the plant-growth-promoting fungus *Trichoderma hamatum* GD12. **Microbiology (Reading, England)**, v. 158, n. Pt 1, p. 84–97, jan. 2012.
- SÁ, M. E. L. DE. Alternativas da soja na prevenção de doenças. **Informe Agropecuário**, v. 27, n. 230, p. 19–21, 2006.
- SAHEBANI, N.; HADAVI, N. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2016–2020, ago. 2008.
- SAMOLSKI, I. et al. The qid74 gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. **Microbiology (Reading, England)**, v. 158, n. Pt 1, p. 129–38, jan. 2012.
- SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. **Mycological Research**, v. 100, p. 923–935, 1996.
- SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 195–20, mar. 2006.
- SANTIAGO, D. C. et al. Seleção de isolados de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson para controle de *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1055–1064, 2006.
- SANTIN, R. DE C. M. **Potencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* em *Phaseolus vulgaris***. 82f. Tese. Doutorado em Fitotecnia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2008.
- SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, v. 354, p. 311–313, 2006.
- SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 787–99, jul. 2010.
- SEDIYAMA, T. (ED.). **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina: Mecenias, 2009. p. 314
- SEDIYAMA, T. et al. **Cultura da soja - I parte**. 3 Reimpres ed. Viçosa: UFV, 1996. p. 96
- SHARON, E. et al. Biological Control of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v. 91, n. 7, p. 687–93, jul. 2001.

SHARON, E. et al. Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. **European Journal of Plant Pathology**, v. 118, n. 3, p. 247–258, 8 maio 2007.

SHORESH, M.; YEDIDIA, I.; CHET, I. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum*. **Phytopathology**, n. 95, p. 76–84, 2005.

SHOUKOUHI, P.; BISSETT, J. **Preferred primers for sequencing the 5' end of the translation elongation factor 1-alpha gene (eEF1a1)**. 2008, ISTH Available from: <http://www.isth.info/methods>.

SIKORA, R. A.; FERNÁNDEZ, E. Nematode parasites of vegetable. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. (Eds.). **Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture**. [s.l.] CABI, 2005. p. 319–392.

SILVA, C. M. M. DE S.; MELO, I. S. DE. Requisitos nutricionais para o fungo *Alternaria Alternata*. **Pesq. Agropec. bras.**, v. 34, n. 3, p. 499–503, 1999.

SILVA, J. F. V. Resistência genética de soja a nematoides do genero *Meloidogyne*. In: SILVA, J. F. V. et al. (Eds.). **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginose da soja**. Londrina: Embrapa Soja: Sociedade de Nematologia, 2001. p. 127.

SILVA, V. N. DA et al. Promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose por *Trichoderma* spp. em pepineiro. **Pesq. Agropec. bras.**, v. 46, n. 12, p. 1609–1617, 2011.

SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A. **Compendium of soybean diseases**. 3. ed. St. Paul: American Phytopathological Society and University of Illinois, 1982. p. 106.

SINGH, A.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, H. B. Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases. **Bioresource technology**, v. 98, n. 2, p. 470–3, jan. 2007.

SINGH, G. **The soybean: Botany, production and uses**. Oxfordshire: CABI, 2010. p. 494

SIVAN, A.; CHET, I. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. **Phytopathology**, v. 79, p. 198–203, 1989.

SMITH, A.; BELTRA, C. A. Diversity of soil-dwelling *Trichoderma* in Colombia and their potential as biocontrol agents against the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **J Gen Plant Pathol**, v. 79, p. 74–85, 2013.

SOARES, P. L. M; SANTOS, J. M. Fungos contra nematoides. Rev. Cultivar Hortaliças e Frutas, v. 27, p. 6-8, Ago. 2004.

SOUZA, P. I. DE M. DE. Cultura da soja: Aspectos de manejo. In: PUIGNAU, J. P. (Ed.). **Diálogo XXXIV Producción de soja**. Montevideo: IICA - Procisur, 1992. p. 131–144.

SPIEGEL, Y.; CHET, I. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. **Integrated Pest Management Reviews**, v. 3, n. 3, p. 169–175, 1998.

STIRLING, G. R. **Biological control of plant parasitic nematodes**. Wallingford: CAB International, 1991. p. 282

SUAREZ, B. M. et al. Isolation and characterization of PRA1, a trypsinlike protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 46–55, 2004.

SULOVÁ, Z.; HRMOVÁ, M.; FARKAŠ, V. Photostimulated oxygen uptake in *Trichoderma viride*. **Journal of General Microbiology**, v. 136, n. 11, p. 2287–2290, 1990.

SUMIDA, C. H. **Controle químico e biológico do mofo branco**. 81f. Tese. Pós graduação em Agronomia. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2012.

TANCIC, S. et al. Impact of *Trichoderma* spp. on soybean seed germination and potential antagonistic effect on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesticidi i fitomedicina**, v. 28, n. 3, p. 181–185, 2013.

TAVARES, G. M. **Podridão do pé do mamoeiro: infestação em solos de cultivo, controle alternativo com indutores de resistência e *Trichoderma* e avaliação dos mecanismos de defesa**. 113f. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009.

TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. **Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz (especies de *Meloidogyne*)**. Raleigh: Universidad del Estado de Carolina del Norte, 1983. p. 111.

TAYLOR, D. P.; NETSCHER, C. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. **Nematologica**, v. 20, n. 2, p. 268–269, 1974.

TEMPLETON, E. G.; HEINY, D. K. Improvement of fungi to enhance mycoherbicide potential. In: WHIPPS, J. M.; LUMSDEN, R. D. (Eds.). **Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth**. [s.l.] Cambridge University Press, 1989. p. 127–151.

TOPOLOVEC-PINTARIĆ, S.; ŽUTIĆ, I.; ĐERMIĆ, E. Enhanced growth of cabbage and red beet by *Trichoderma viride*. **Acta agriculturae Slovenica**, v. 101, n. 1, p. 87–92, 1 jan. 2013.

TRUTMANN, P.; KEANE, P. J. *Trichoderma Koningii* as a biological control agent for *Sclerotinia sclerotiorum* in Soutjern Australia. **Soil Biol. Biochem.**, v. 22, n. 1, p. 43–50, 1990.

VENÂNCIO, W. S.; BUENO, C. J.; SOUZA, N. L. de. Efeito da solarização e do brometo de metila sobre a comunidade de fungos do solo. **Summa Phytopathol.**, v. 32, n. 2, p. 183–185, 2006.

VENETTE, J. *Sclerotinia* spore formation, transport and infection. In: **Proceedings of the Sclerotinia Workshop**. Fargo, North Dakota, USA: 1998.

VENTUROSOS, L. DOS R. et al. Produção de soja e germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes coberturas de solo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 615–626, 17 maio 2013.

VEY, A.; HOAGLAND, R. E.; BUTT, T. M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (Eds.). **Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential**. Bristol: CAB International, 2001. p. 311–346.

VILAS-BOAS, L. C. et al. Reação de clones de bananeira (*Musa* spp.) ao nematoide *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, Raça 2. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 690–693, 2002.

VINALE, F. et al. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 1–10, jan. 2008.

VOS, C. et al. Mycorrhiza-induced resistance against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* involves priming of defense gene responses in tomato. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 60, p. 45–54, maio 2013.

WEEDEN, C. R.; SHELTON, A. M.; HOFFMAN, M. P. **Biological Control: A guide to natural enemies in North America**. Geneva: Cornell University, 2008.

WEINDLING, R. Studies on lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. **Phytopathology**, v. 24, p. 1153–1179, 1934.

WEISCHER, B.; BROWN, D. J. F. **An Introduction to Nematodes: General Nematology: a Student's Textbook**. Sofia: Pensoft Publishers, 2000. p. 187.

WHIPPS, J. M.; LUMSDEN, R. D. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. In: T., B.; C., J.; N., M. (Eds.). **Fungal Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential**. Wallingford: CABI Publishing, 2001. p. 9.

WIJESINGHE, C. J. et al. Development of a formulation of *Trichoderma asperellum* to control black rot disease on pineapple caused by (*Thielaviopsis paradoxa*). **Crop Protection**, v. 30, n. 3, p. 300–306, mar. 2011.

WINDHAM, M. T. .; ELAD, Y. .; BAKER, R. . A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 76, p. 518–521, 1986.

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

YORINORI, J. T. Doenças da soja no Brasil. In: PUIGNAU, J. P. (Ed.). **Diálogo XXXIV Producción de soja**. Montevideo: IICA Biblioteca Venezuela, 1992. p. 187–194.

ZANCAN, W. L. A. et al. Crescimento micelial, produção e germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* na presença de fungicidas químicos e *Trichoderma harzianum*. **Biosci. J.**, v. 28, n. 5, p. 782–789, 2012.