

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA**

**USO DE POLÍMEROS EM FORMULAÇÕES PARA
ARMAZENAMENTO DE *Trichoderma harzianum* E
*Trichoderma viride***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Francini Requia Parzianello

Santa Maria, RS, Brasil.

2012

**USO DE POLÍMEROS EM FORMULAÇÕES PARA
ARMAZENAMENTO DE *Trichoderma harzianum* E
*Trichoderma viride***

Francini Requia Parzianello

Dissertação apresentada no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, Área de Concentração em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agrobiologia.**

Orientadora: Prof^a Dr^a Zaida Inês Antonioli

Santa Maria, RS, Brasil.

2012

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Parzianello, Francini Requia

Uso de polímeros em formulações para armazenamento de trichoderma harzianum e trichoderma viride / Francini Requia Parzianello.-2012.

61 p.; 30cm

Orientadora: Zaida Inês Antonioli

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2012

1. Bioformulado 2. Trichoderma spp 3. Polímeros I. Antonioli, Zaida Inês II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia**

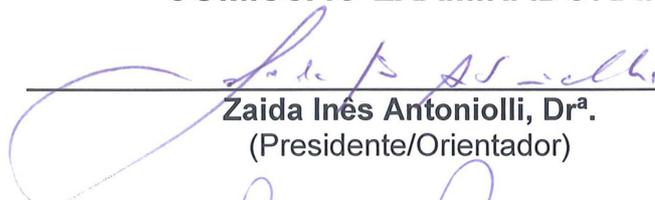
A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação
de Mestrado

**USO DE POLÍMEROS EM FORMULAÇÕES PARA
ARMAZENAMENTO DE *Trichoderma harzianum* E *Trichoderma
viride***

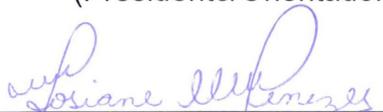
elaborada por
Francini Requia Parzianello

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Agrobiologia

COMISSÃO EXAMINADORA:



Zaida Inês Antonioli, Dr^a.
(Presidente/Orientador)



Josiane Pacheco Menezes, Dr^a. (CTISM - UFSM)



Ricardo Bemfica Steffen, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 27 de julho de 2012.

AGRADECIMENTOS

À UFSM, à Capes e ao Programa de Pós Graduação em Agrobiologia pela possibilidade da realização deste trabalho.

À professora Dr^a Zaida Inês Antonioli pela confiança em mim depositada, pelo seu entusiasmo e otimismo pela pesquisa. Grande incentivadora.

Aos professores Dr. Antônio Carlos Ferreira da Silva e Dr. Rodrigo Josemar Seminoti Jacques pela co-orientação e apoio neste trabalho.

Ao Dr. Ricardo Bemfica Steffen pela amizade, participação neste trabalho e por compor a banca examinadora.

À Dr^a Josiane Pacheco Menezes, componente da banca examinadora.

Aos colegas do laboratório, pela acolhida.

À empresa Bioagro e sua equipe pelo apoio e parceria na execução do trabalho.

Aos meus pais, Jussara e Adir, por formarem meu caráter e acreditarem nele. À minha mãe, pelas palavras, sabedoria e pelo conforto que representa. Ao meu pai, pelo carinho, pela satisfação de sermos colegas de profissão, por ser meu grande professor e exemplo de postura profissional.

Ao meu irmão Fabrício pelo carinho especial e amizade verdadeira.

À minha avó Maria Joana.

Ao meu esposo Maurício, pelo amor, parceria, apoio, carinho, paciência, incentivo, motivação e pela cumplicidade que temos como agrônomos.

À Deus, por colocar pessoas tão especiais no meu caminho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia
Universidade Federal de Santa Maria

USO DE POLÍMEROS EM FORMULAÇÕES PARA ARMAZENAMENTO DE *Trichoderma harzianum* E *Trichoderma viride*

AUTORA: Francini Requia Parzianello
ORIENTADORA: Dr^a Zaida Inês Antonioli
Data e Local da Defesa: Santa Maria 27 de julho de 2012.

Trichoderma spp. é um dos fungos mais pesquisados como agente de biocontrole, sendo antagonista a vários fitopatógenos em diferentes culturas. Este trabalho teve como objetivo a produção de bioformulado líquido de *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride* a base de biopolímeros Goma Xantana (GX) e Carboximetilcelulose (CMC) e o polímero Polivinilpirrolidona (PVP). Os bioformulados foram compostos por glicerol 10,0 gL⁻¹, extrato de levedura 0,5 gL⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,2 gL⁻¹, K₂HPO₄ 0,5 gL⁻¹ e NaCl 0,1 gL⁻¹. As quantidades foram determinadas através da avaliação do menor período de tempo entre a repicagem e a esporulação do fungo em placas de Petri, contendo meio de cultura BDA (batata dextrose ágar) e os bioformulados. A finalidade do uso destes produtos foi disponibilizar uma formulação que apresente 180 dias de validade em prateleira, quanto aos parâmetros sobrevivência (número de esporos), avaliado através de Câmara de Neubauer e infectividade *in vitro* avaliado através de teste de confrontação direta com *Fusarium oxysporum* Schlecht. Os intervalos de avaliações ocorreram aos 30, 60, 90, 120 e 180 dias. Os tratamentos utilizados foram G₁P₁C₂ (1,0gL⁻¹ GX, 1,0 gL⁻¹ PVP, 2,0 gL⁻¹ CMC), G_{0,5}P_{0,5}C₁ (0,5 gL⁻¹ GX, 0,5 gL⁻¹ PVP, 1,0 gL⁻¹ CMC), G₂P₂C (2,0 gL⁻¹ GX, 2,0 gL⁻¹ PVP) e GPC1 (1,0 gL⁻¹ CMC), armazenados em embalagens plásticas e estéreis, em temperatura ambiente. *T. harzianum* apresentou melhor resultado com G_{0,5}P_{0,5}C₁ em todos períodos de avaliação. Para *T. viride* nenhum dos tratamentos foi melhor do que o controle nos períodos avaliados. Os polímeros permitem desenvolver meios eficazes de armazenamento, prolongando a vida útil de bioformulados.

Palavras-chave: Bioformulado. *Trichoderma* spp. Polímeros.

ABSTRACT

Master Degree Dissertation
Graduate Program in Agrobiologia
UFMS - The Federal University of Santa Maria

USE OF BIOPOLYMERS IN FORMULATIONS FOR STORING OF *Trichoderma harzianum* AND *Trichoderma viride*

AUTHOR: Francini Requia Parzianello

Advisor: Dr^a Zaida Ines Antonioli

Date and Location of Defense: Santa Maria. July 27, 2012.

Trichoderma spp. is one of the most studied fungi as a biocontrol agent, being antagonistic to various plant pathogens in different cultures. This work aimed the production of liquid bio formulate of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* based on biopolymer Xanthan Gum (GX) and carboxymethylcellulose (CMC) and the polymer polyvinylpyrrolidone (PVP). The bio formulates were composed of glycerol 10.0 gL⁻¹, yeast extract 0.5 gL⁻¹, MgSO₄ · 7 H₂O 0.2 gL⁻¹, K₂HPO₄ 0.5 gL⁻¹ and NaCl 0.1 gL⁻¹. These amounts were determined by assessing the shortest period of time between the inoculation and sporulation of the fungus in Petri dishes containing PDA culture medium (potato dextrose agar) and bio formulates. The purpose of the use of these products were to make available a formulation that presents 180 days of shelf validity, as regarding the survival parameters (number of spores), evaluated using a Neubauer chamber and infectivity *in vitro* evaluated by testing direct confrontation with *Fusarium oxysporum* Schlecht. The evaluations were performed at intervals of 30, 60, 90, 120 and 180 days. The treatments used were G₁P₁C₂ (GX, 1.0 gL⁻¹; PVP, 1.0 gL⁻¹; CMC, 2.0 gL⁻¹), G_{0.5}P_{0.5}C₁ (GX, 0.5 gL⁻¹; PVP, 0.5 gL⁻¹; CMC, 1.0 gL⁻¹), G₂P₂C (GX, 2.0 gL⁻¹; PVP, 2.0 gL⁻¹) and GPC₁ (CMC, 1.0 gL⁻¹), stored in sterile plastic container at room temperature. *T. harzianum* showed the best result with G_{0.5}P_{0.5}C₁ in all periods of assessment. For *T. viride* none of the treatments was better than the control in the assessed periods. Polymers make possible to develop effective means of storage, extending the life of bio formulates.

Keywords: Bio formulates. *Trichoderma* spp. Polymers.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esquema da execução do trabalho com crescimento em substrato de *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride*, produção de formulados, armazenamento e avaliações da sobrevivência e infectividade do inóculo *in vitro*.14
- Figura 2 – Sorgo sacarino orgânico inoculado com *Trichoderma* em erlemmeyer de 500 mL.30
- Figura 3 – Envase, em câmara de fluxo laminar, do formulado estéril nas embalagens para futura inoculação com trichoderma.....33
- Figura 4 – Lavagem das sementes de sorgo sacarino colonizadas por trichoderma (a); Injeção do inóculo de trichoderma nos formulados de cada um dos tratamentos (b).34
- Figura 5 – Grau atribuído ao número de dias até a esporulação de *T. harzianum* (TH) e *T. viride* (TV) em função da variação da concentração de glicerol. Grau 0: 10 a 12 dias; Grau 1: 8 a10 dias; Grau 2: 6 a 8 dias.....40
- Figura 6 – Grau atribuído ao número de dias até a esporulação de *T. harzianum* (TH) e *T. viride* (TV) em função da variação da concentração de extrato de levedura. Grau 0: 10 a 12 dias; Grau 1: 8 a10 dias; Grau 2: 6 a 8 dias.41
- Figura 7 – Grau atribuído ao número de dias até a esporulação de *T. harzianum* (TH) e *T. viride* (TV) em função da variação da concentração de MgSO₄.7H₂O. Grau 0: 10 a 12 dias; Grau 1: 8 a10 dias; Grau 2: 6 a 8 dias; Grau 3: 4 a 6 dias; Grau 4: 2 a 4 dias.42
- Figura 8 – Grau atribuído ao número de dias até a esporulação de *T. harzianum* (TH) e *T. viride* (TV) em função da variação da concentração de K₂HPO₄. Grau 0: 10 a 12 dias; Grau 1: 8 a10 dias; Grau 2: 6 a 8 dias; Grau 3: 4 a 6 dias; Grau 4: 2 a 4 dias.....43
- Figura 9 – Grau atribuído ao número de dias até a esporulação de *T. harzianum* (TH) e *T. viride* (TV) em função da variação da concentração de NaCl. Grau 0: 10 a 12 dias; Grau 1: 8 a10 dias; Grau 2: 6 a 8 dias; Grau 3: 4 a 6 dias.44

Figura 10 – Testes de confrontação direta com amostras aos 30 dias de armazenamento dos tratamentos $G_1P_1C_2$, $G_{0,5}P_{0,5}C_1$, G_2P_2C e GPC_1 x *F. oxysporum*. As placas foram colocadas em BOD durante 7 dias, a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, a parte superior foi inoculada com *F. oxysporum* e a inferior com bioformulado composto de *T. harzianum* (TH) e *T. viride* (TV) respectivamente. As placas na esquerda da imagem são TV e na direita TH. a) TH: nota 1; TV: nota 3; b) TH: nota 1; TV: nota 2; c) TH: nota 4; TV: nota 2, d) TH: nota 1, TV: nota 2.....45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Substâncias que podem ser sintetizadas por <i>Trichoderma</i> spp.	19
Tabela 2 – Concentrações (gL ⁻¹) testadas para cada componente.....	28
Tabela 3 – Composição (gL ⁻¹) dos tratamentos das formulações a base de <i>Trichoderma harzianum</i> e <i>Trichoderma viride</i>	32
Tabela 4 – Média do número de dias até esporulação dos isolados de <i>T. harzianum</i> (TH) e <i>T. viride</i> (TV) nos componentes e concentrações (gL ⁻¹) no meio de cultura com BDA, mantidos em BOD a 25°C e 12 horas de fotoperíodo.	38
Tabela 5 – Grau atribuído ao número de dias até esporulação dos isolados <i>T. harzianum</i> (TH) e <i>T. viride</i> (TV) quanto aos componentes e concentrações (gL ⁻¹) no meio de cultura. Grau 0: 10 a 12 dias; Grau 1: 8 a 10 dias; Grau 2: 6 a 8 dias; Grau 3: 4 a 6 dias; Grau 4: 2 a 4 dias.....	39
Tabela 6 – Avaliação dos isolados <i>Trichoderma harzianum</i> (TH) e <i>T. viride</i> (TV) quanto ao número de esporos e nota da confrontação direta nos diferentes tratamentos e épocas de avaliação em meio de cultura BDA, em estufa BOD a 25°C, 12 horas de fotoperíodo por 7 dias.	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 O fungo Trichoderma.....	15
2.2.1 Trichoderma: biocontrolador de fitopatógenos.....	16
2.5 Trichoderma harzianum Rifai.....	20
2.6 Trichoderma viride.....	21
2.7 Formulação de produtos biológicos	21
2.7.1 Formulação composta de polímeros.....	23
2.7.1.1 Goma xantana.....	24
2.7.1.2 Carboximetilcelulose.....	25
2.7.1.3 Polivinilpirrolidona.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Componentes nutricionais da formulação.....	28
3.2 Etapas de produção do formulado	29
3.2.1 Repicagem do fungo.....	29
3.2.2 Inoculação e cultivo de Trichoderma em substrato.....	29
3.2.3 Produção do formulado.....	31
3.2.4 Avaliação das formulações – Aplicabilidade in vitro (Confrontação direta)	35
3.2.5 Contagem de esporos.....	35
3.3 Análise estatística.....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Formulação.....	37
4.2 Avaliação das formulações – Aplicabilidade in vitro (Confrontação direta) e contagem de esporos	44
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

A restrição mundial ao uso de produtos químicos para a prevenção de doenças das plantas induz os meios científicos a buscarem novas alternativas ao controle de fitopatógenos, como o controle biológico, a fim de atender as exigências do mercado consumidor (STADNIK & MARASCHIN, 2004; BETTIOL & MORANDI, 2009). Entre os produtos biológicos utilizados para a aplicabilidade do controle biológico têm-se os biofungicidas.

Os fungicidas biológicos são promissores para o consumo na agricultura porque atingem alguns nichos que o controle químico não é capaz de atuar. Pode ocorrer declínio da ação regulatória dos pesticidas químicos devido à resistência das pragas e como consequência serem substituídos ou ter seu uso diminuído em ambientes que se deseja manter as comunidades microbianas do solo, além do interesse da população por produtos orgânicos cada vez maior (HARMAN, 2000).

Diversos antagonistas, como por exemplo, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas putida* (GARCIA & ROMEIRO, 2011), *Stenotrophomonas maltophilia* (LUDWIG et al., 2009), *Clonostachys rosea* (Link: Fr.), (CHAGAS, 2009) vêm sendo utilizados no controle de doenças de plantas. O fungo do gênero *Trichoderma*, chamado de Trichoderma, apresenta características de antagonista: capacidade de produzir enzimas extracelulares e antibióticos, hiperparasitar, competir e apresentar eficiência no biocontrole de fungos fitopatogênicos (MELO & COSTA, 2005), portanto, tornou-se bastante pesquisado em trabalhos de laboratório, casa de vegetação e campo. Atualmente é crescente o interesse de pesquisadores na busca de informações sobre a produção em maior escala desse antagonista. A produção em massa de *Trichoderma* tornou-se um foco de pesquisa e desenvolvimento industrial na busca de alternativas a tratamentos químicos de sementes para o controle de doenças de plantas presentes no solo (HARMAN, 1991). Porém, ainda há falta de formulações adequadas de fungos para o controle de fitopatógenos e isso tem sido uma dificuldade à comercialização de agentes de controle biológico (MELO & COSTA, 2005).

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

como única vantagem a capacidade de serem prontamente biodegradáveis (FORTES et al., 2007).

No Brasil, a produção e a comercialização de *Trichoderma* iniciou em meados de 1990. Mas, na maioria dos casos, são grãos de cereais utilizados como inerte que compõem a formulação. Isso implica em baixa estabilidade do produto final durante o armazenamento. Apresenta baixa capacidade de conservação, conseqüente baixo tempo de prateleira, necessitando, portanto ser substituído, porque dessa forma, o uso deve ser feito em condições de baixa temperatura e exigência de utilização em um limitado espaço de tempo no campo para garantir a sobrevivência do fungo (LOPES, 2009).

Produtos biológicos contendo polímeros naturais, também chamados de biopolímeros (polímeros produzidos por ser vivo) e/ou sintéticos como protetores de esporos podem representar uma evolução para as bioformulações. Os polímeros ou biopolímeros são capazes de propiciar maior estabilidade do ingrediente ativo quando armazenados em temperatura ambiente, facilitando sua comercialização sem perda de qualidade.

A utilização de polímeros nas formulações biológicas objetiva aumentar a manutenção do produto armazenado em temperatura ambiente sem perda de eficiência.

A goma xantana é um polissacarídeo microbiano sintetizado por linhagens da bactéria *Xanthomonas campestris*, em meio fermentativo. Amplamente utilizada como agente suspensivo, espessante, emulsionante e estabilizante na indústria de alimentos, química e farmacêutica. Encontra também aplicação em uma grande variedade de processos industriais (KATZBAUER, 1998), entre eles, de produtos de uso agrícola (LIMA et al., 2001). O Brasil é considerado grande fabricante deste biopolímero em escala industrial, já que dispõe de matéria prima básica para a produção: açúcar, extrato de levedura e álcool do setor sucro-alcooleiro (PADILHA, 2003).

A carboximetilcelulose (CMC) apresenta propriedades, tais como: solubilidade na água fria e quente, aumento da viscosidade na solução, habilidade para formar filme, adesividade, característica de suspensão e retenção da água. Apresenta uma ampla aplicação na formulação de produtos alimentícios e no melhoramento de processamentos industriais (PILIZOTA et al., 1996).

A polivinilpirrolidona (PVP) é utilizada na indústria cosmética e farmacêutica como aditivo para melhorar características físicas destes produtos (WANCHOO & SHARMA, 2003).

Foram selecionados os biopolímeros GX e CMC e o polímero PVP para essa pesquisa porque atendem as qualidades desejadas para ser usado como suporte de uma bioformulação. As quais são: facilidade de obtenção e baixo custo, inerte ao *Trichoderma*, facilmente esterilizável, proporcionar boa adesão às sementes e ainda, se necessário, manter as características de infectividade e efetividade dos isolados durante o período de estocagem (KEISER, 1992).

A hipótese proposta para essa pesquisa foi de que a utilização desses polímeros na formulação de produtos à base de *Trichoderma* mantêm a qualidade durante o período de armazenamento mantendo a capacidade de sobrevivência e infectividade quando avaliados *in vitro*.

Para testar a hipótese, foram propostos os seguintes objetivos:

- 1) Utilizar grãos de sorgo sacarino como substrato para o desenvolvimento dos fungos *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride*.
- 2) Determinar a concentração dos componentes nutricionais da formulação através da observação do período em que os isolados *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride* atingiram a esporulação em placas de Petri;
- 3) Produzir biofungicida a base de *Trichoderma* com polímeros e testar qual a capacidade do mesmo na sobrevivência e na infectividade em relação a *Fusarium oxysporum in vitro* durante o período de armazenamento.

O trabalho foi executado conforme esquema da Figura 1.

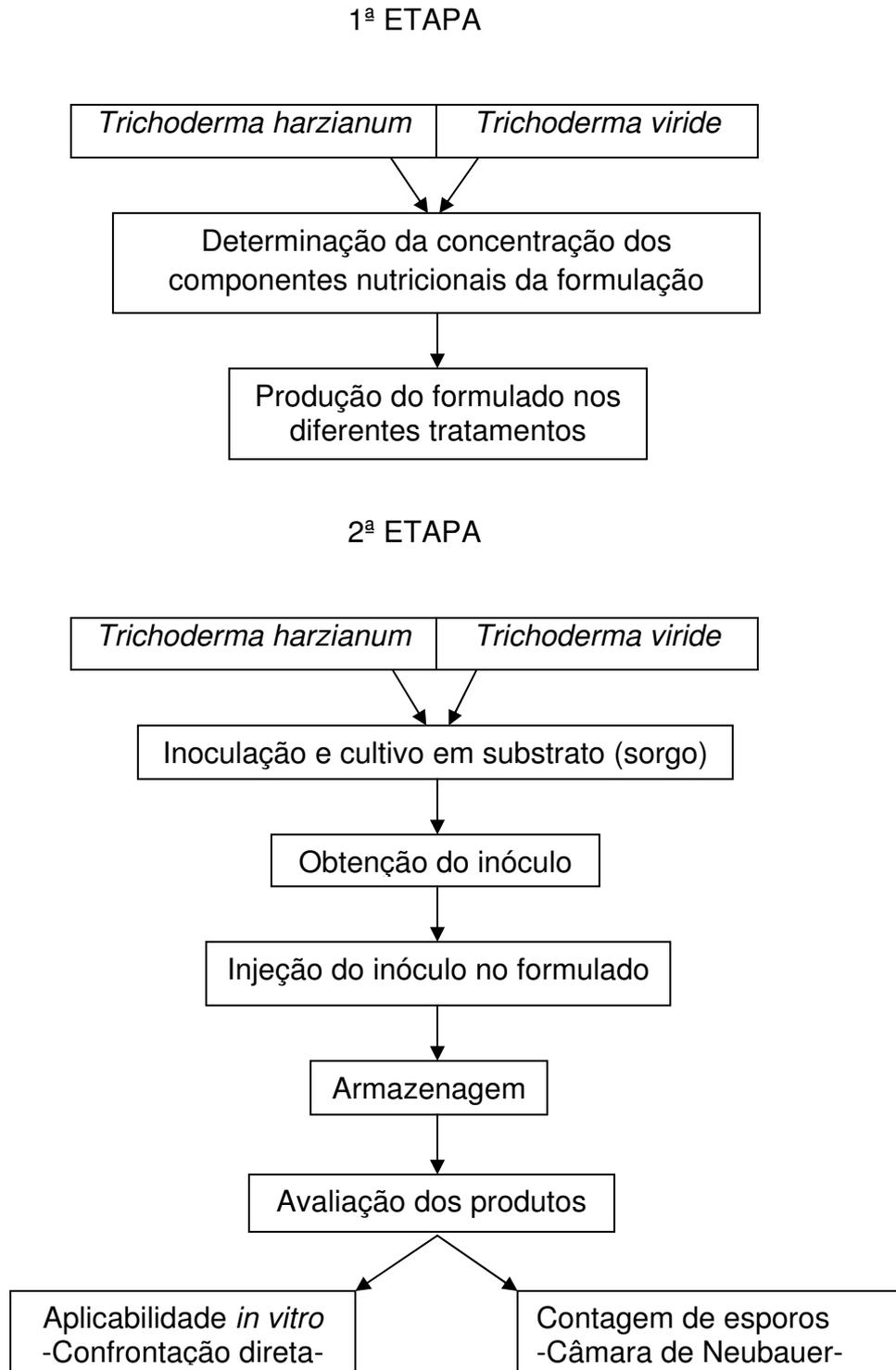


Figura 1 – Esquema da execução do trabalho com crescimento em substrato de *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride*, produção de formulados, armazenamento e avaliações da sobrevivência e infectividade do inóculo *in vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O fungo *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* Persson foi descrito em 1794, para quatro espécies de fungos e, em 1969, foi realizada a primeira revisão taxonômica e reclassificado por Rifai. A partir daí, um maior número de espécies foi agregado ao gênero, chegando à atualidade com cerca de 83 taxons (espécies, formas e variedades), incluindo *Trichoderma* e *Hypocrea* (SAMUELS, 2006). É classificado como imperfeito, possuem características sobrepostas dentro de um mesmo grupo, pertencente à Sub-divisão Deuteromycotina, ordem Hifomicetes e família Moniliaceae (MELO, 1991).

Hypocrea é o gênero que constitui uma das duas fases que *Trichoderma* possui, denominada de teleomórfica. Nesta fase, o gênero *Hypocrea* é classificado como ascomiceto da ordem Hypocreales, onde predomina uma etapa sexual. A segunda fase, denominada anamórfica, prevalece uma etapa assexual, que parece ser independente da fase teleomórfica, seja em nível de indivíduo ou de população (HARMAN et al., 2004).

Muitas linhagens não possuem ciclo sexual conhecido (HARMAN et al., 2004), sendo classificadas na sub-divisão Deuteromycotina. Os deuteromicetos são caracterizados pela produção de conídios formados a partir de células conidiógenas, contidas ou não em estruturas especializadas, ou por fragmentação do talo micelial (KRUGER & BACCHI, 1995) podendo ser encontrado no mundo todo e em praticamente todos os solos (MELO, 1991).

Em meio de cultura, as colônias de *Trichoderma* crescem rapidamente, apresentando, inicialmente, superfície lisa e quase translúcida, tornando-se posteriormente flocosas e compactas. A coloração da colônia em vários tons de verde é, normalmente, devido à pigmentação dos conídios e à quantidade de conídios produzidos, podendo ainda ser influenciada pelo pH (potencial hidrogeniônico) do meio de cultura. O micélio é composto por hifas hialinas, muito ramificadas e de parede lisa. Clamidósporos estão presentes na maioria das

espécies, entremeados nas hifas ou em posição terminal (MELO, 1991; HOWELL, 2003).

2.2 Biocontrole

O biocontrole na agricultura visa o controle de pragas e doenças de lavouras com menor impacto ambiental e com menor risco para a saúde do ser humano e animais, bem como a redução de custos em relação ao emprego de métodos químicos tradicionais (MORAES, 1992).

Um agente de biocontrole ideal é aquele que coloniza e compete no microambiente (MELO, 1998). Dentre os muitos agentes potenciais de biocontrole, o fungo *Trichoderma* sp. tem sido um dos mais estudados, dado as suas características peculiares de antagonismo em condições naturais, principalmente no solo (MELO, 1991).

2.2.1 Trichoderma: biocontrolador de fitopatógenos

O potencial das espécies de *Trichoderma* como bioagente de controle de doenças de plantas foi conhecido em 1930, e, em anos subsequentes, a capacidade para o controle de muitos fitopatógenos foi sendo descoberta (HOWELL, 2003).

Portanto, os fungos de solo que estão entre os agentes de controle biológicos mais estudados e comercialmente vendidos como biopesticidas, biofertilizantes e inoculantes de solo (HARMAN, 2000; HARMAN et al. 2004). Isso é resultado do fato de um grande número de cepas de *Trichoderma* atuarem como agente de controle biológico, cujas propriedades antagônicas se baseiam na ativação de mecanismos muito diversos. As espécies de *Trichoderma* são as mais utilizadas no controle de fitopatógenos devido serem encontradas em uma vasta diversidade de ambientes, à facilidade de cultivo e observação, seu crescimento rápido em um grande número de substratos e, o fato de não serem patógenos de plantas (PAPAVIZAS et al., 1982).

A aplicação do bioagente pode ser feita nas sementes, no substrato, no sulco de plantio ou na matéria orgânica que será incorporada antes do transplante de mudas (LUCON, 2009). Independente da forma de aplicação há necessidade de usar produtos biológicos como uma alternativa aos produtos químicos. Conforme Luz (2001), os bioprotetores apresentam-se como uma tecnologia alternativa para o controle de fitopatógenos, os microrganismos que apresentam esta capacidade, em especial trichoderma, poderão ter um importante impacto na redução do uso excessivo de fungicidas químicos, no alcance da agricultura sustentável e na proteção da natureza.

Trichoderma pode apresentar potencial como agente protetor de doenças em plantas de lavouras de cultivo anual, frutíferas, espécies arbóreas e hortícolas. Comprovou-se a redução significativa de *Fusarium graminearum* Schwabe e *Diplodia maydis* (Berk.) Sacc. em sementes de milho durante dois anos consecutivos de tratamento (615 Kg ha⁻¹ no primeiro ano e 352 Kg ha⁻¹ no segundo ano de avaliação) (LUZ, 2001). Em sementes de soja houve redução significativa de *Sclerotium rolfsii* Sacc. causador de tombamento das plantas ou *damping off* (LOHMANN et al., 2007) e em plantas de citrus ocorreu a inibição do crescimento micelial do fungo *Phytophthora citrophthor* Smith & Smith. causador de gomose (SILVA et al., 2008). Em tratamento de solo, a mistura de *T. viride* Pers. com solo parcialmente esterilizado foi capaz de proteger mudas de macieira, por muitos anos, contra podridões causadas por *Phytophthora* sp. e *Rosellinea* sp. (SANHUEZ, 2001).

Devido ao sucesso de Trichoderma como biocontrolador de fitopatógenos, a indústria, basicamente companhias privadas de pequeno porte, vem se estabelecendo de forma pontual em algumas regiões significativas de produção agrícola (CORABI-ADELL, 2004). Desse modo, o Rio Grande do Sul pode representar uma região promissora para a indústria porque a cultura da soja, que apresenta potencial para uso de biocontroladores a base de espécies de Trichoderma (TEDESCO, 2009), detêm uma área plantada ao redor de três milhões de hectares (FAO, 2010).

2.4 Mecanismos de ação do controle biológico

Entre as ações de pesquisas necessárias está o entendimento dos mecanismos de interação entre os agentes de biocontrole, os patógenos, as plantas e o ambiente. Os mecanismos de ação pelos quais *Trichoderma* pode atuar no controle biológico são basicamente: antibiose, competição, parasitismo e predação. O antagonista pode agir por um ou mais mecanismos de interações antagonísticas. Inclusive quando age por mais de um mecanismo, as chances do sucesso da capacidade de biocontrole são aumentadas (BETTIOL, 2001).

A antibiose é definida como a interação na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo têm efeito danoso sobre o outro (STADNIK & BETTIOL, 2000). Dentre os fungos que possuem informação genética para a produção de substâncias inibidoras e/ou antibióticas, destaca-se *Trichoderma*.

Dentre as substâncias que podem ser sintetizadas, muitas espécies já estudadas produzem metabólitos secundários tóxicos, como antibióticos e enzimas líticas capazes de inibir e destruir propágulos de fungos fitopatogênicos. Esses metabólitos podem ser voláteis e não voláteis. Em torno de quarenta substâncias produzidas por *trichoderma* (TABELA 1) possuem atividade antibiótica (HARMAN, 2000).

Tabela 1 – Substâncias que podem ser sintetizadas por *Trichoderma* spp.

Substância	Atividade	Autor
Gliotoxina, trichodermina, suzucacilina, alameticina e dermadina	viridina, Antibiótica	Bastos, 1991
Enzimas extracelulares	hidrolíticas Antagonista	Tharane et al., 2000
Proteases	Degrada enzimas	Harman, 2000
Quitinases, glucanases e peroxidases	Indução de defesa	Romeiro, 2007
Ácido Indolacético	Promoção de crescimento	Gravel et al., 2007 Filho et al., 2008 Hoyos-Cavajal et al., 2009
Sideróforos	Solubilização	Hoyos-Cavajal et al., 2009

A competição é um processo referente à interação entre dois ou mais organismos, empenhados na mesma ação e ocorre por espaço, oxigênio e principalmente por nutrientes. A competição por nutrientes é um mecanismo importante devido a muitos fungos fitopatogênicos serem sensíveis à falta de alguns nutrientes (BENÍTEZ et al., 2004), sendo considerado um dos clássicos mecanismos de biocontrole (HARMAN, 2000).

O parasitismo envolve a interação direta de um fungo com outro. Esse processo reflete a hostilidade química, resultando na inibição de um e no aproveitamento dos restos celulares pelo sobrevivente. Caracteriza-se por ser um processo complexo e compreende várias etapas. Primeiramente ocorre o reconhecimento do alvo pelo antagonista, a transmissão de sinais que resulta na interação entre antagonista e fitopatógeno. Posteriormente, a indução e produção de metabólitos (enzimas) pelo antagonista, e por último, a digestão da célula alvo (LIMA et al., 1999; HARMAN, 2006; ALMEIDA et al., 2007).

Algumas linhagens de trichoderma vêm recebendo grande atenção da pesquisa, devido sua versatilidade de ação. Estas são capazes de produzir enzimas que degradam paredes celulares de outros fungos e apresentam diversidade de estratégias de sobrevivência que as tornam altamente competitivas no ambiente. Além de elevada capacidade de se proliferar na rizosfera (MELO, 1996; RESENDE et al., 2004).

2.5 *Trichoderma harzianum* Rifai

A espécie *T. harzianum* é um eficiente antagonista de fungos e bactérias, além de produzir esporos e clamidósporos, que podem ser utilizados para o preparo de formulações comerciais (CORABI-ADELL, 2004). Apresenta crescimento rápido, sendo vantajosa a sua utilização como agente de biocontrole em larga escala.

Como agente de biocontrole, pode atuar na proteção de plantas contra patógenos de solo (PAPAVIZAS, 1982; MELO, 1991; CARVALHO et al., 2008; BETTIOL & MORANDI, 2009;) além de promover crescimento de plantas (WINDHAM et al., 1986; LUZ, 2001; HARMAN, 2000; CARVALHO et al., 2011) através da sua habilidade de solubilizar nutrientes importantes para a planta (ALTOMARE et al, 1999).

Em solos naturalmente infestados com *S. rolsfii* e *Rhizoctonia solani* Kühn, a introdução de farelo de trigo inoculado com *T. harzianum* diminuiu significativamente a incidência das doenças em cultivo de tomate, algodão e feijão e, aumentou significativamente o rendimento de feijão (ELAD et al., 1980). Com esse mesmo objetivo, controle de infestação de doenças fitopatogênicas, *T. harzianum* estirpe A-34 é formulada em diferentes inertes orgânicos e inorgânicos, armazenada e mantida estável durante um ano, em trabalhos realizados em Cuba (CÁRDENAZ, 2010).

2.6 Trichoderma viride

O antagonismo de *T. viride* sobre fungos fitopatogênicos foi comprovado em testes de culturas pareadas sobre *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.), *Cercospora musae* Zimm e *Asperisporium caricae* (Speg) Maubl. Observou-se o domínio dos extratos e dos metabólitos sobre o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos, havendo inibição no desenvolvimento destes (ALMEIDA, 2009).

A perspectiva é que o uso de biopreparados de *T. viride* poderá diminuir o uso de fungicidas químicos. Segundo Soto et al., 2008, a metodologia de reprodução sólida em casca de arroz deste fungo permite planejar produções de biopreparados para uso em escala industrial.

2.7 Formulação de produtos biológicos

A eficácia, a praticidade e a segurança das estratégias e métodos para a aplicação e manutenção de fungos são fundamentais tanto para o sucesso do biocontrole nos sistemas de cultivo, quanto para a aceitação do biocontrole pelos agricultores e sociedade. Nesse sentido, uma das considerações mais importantes inclui as formulações (MEDUGNO, 1995; DIAS, 2011).

No Brasil, existem aspectos que justificam a baixa aplicabilidade dessas formulações. Uma delas é a limitada disponibilidade de produtos comerciais compostos de Trichoderma, sendo apenas parte desses produtos certificada como produto biológico. Isso ocorre porque a obtenção do registro do produto junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) envolve diversas etapas, passando pelos órgãos Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), além de testes a campo em pelo menos duas safras agrícolas e em quatro regiões edafoclimáticas distintas (<http://www.agricultura.gov.br/vegetallegislação>) tornando o processo oneroso para as empresas e indústrias.

Existem três tipos de componentes principais que constituem o ingrediente ativo em uma formulação biológica: conídios, micélios (URTUBIA & FRANÇA, 2007) ou clamidósporos, no caso do *Trichoderma* (FERNANDEZ-LARREA & ELÓSEGUI, 2006), sendo, a produção de inóculo em condições de laboratório a primeira etapa para o desenvolvimento das formulações.

A fim de utilizar os agentes de controle biológico, é necessário desenvolver meios eficazes de cultivo, armazenamento e aplicação com objetivo de explorar os melhores potenciais para o controle de doenças agrícolas (HOWELL, 2003). Um fator importante na produção massal do fungo é a seleção de um meio padrão para o cultivo de uma espécie ou de um isolado em particular, e no conhecimento das condições adequadas de cultivo que possibilitem a esta espécie, linhagem ou isolado, obter bom crescimento com alta esporulação, para utilização nas formulações biológicas (KHALIL et al., 1985).

Trabalhos sobre o desenvolvimento de formulados a partir de *Trichoderma* são conduzidos em países como Cuba (CÁRDENAS, 2010), Estados Unidos (JIN et al., 1996), Índia (DUBEY et al., 2009), e no Brasil (LOPES, 2009). Dubey et al. (2009) produziram bioformulados à base de *Trichoderma* para o controle de podridão de raízes (*Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butler) visando o aumento de suas vidas de prateleira. A formulação contendo turfa, pó de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e carboximetilcelulose para tratamento de sementes e outra contendo alginato de sódio, silicato de alumínio, pó de mandioca e água para tratamento de solo apresentaram vida de prateleira de 25 meses a temperatura ambiente ($26 \pm 8^\circ \text{C}$). O uso combinado destes dois formulados apresentou a maior germinação de sementes, comprimento da parte aérea e raízes, maior rendimento de grãos além de menor incidência da doença em plantas de feijão da china (*Vigna radiata* L.).

Em ensaio *in vitro* de formulado contendo suspensão de micélios de *T. asperellum*, água destilada, glicerina, óleo de coco e óleo de soja, a formulação inibiu significativamente o crescimento de *Thielaviopsis paradoxa* (de Seynes) Höhn, agente causal da podridão negra do abacaxi, no prazo de seis dias após a inoculação. Até o final do quinto dia, o diâmetro da colônia do patógeno foi reduzido em 92,7% em relação ao controle. No sétimo dia de observação, a eliminação do patógeno foi de 100%. A formulação apresentou uma vida útil de seis meses (WIJESINGHE et al., 2010).

Para desenvolver esses produtos, inicialmente é necessário suprir as necessidades de nutrição dos organismos que o compõem. Microrganismos 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, são fatores decisivos para o crescimento e esporulação dos microrganismos. Muitos fungos utilizam glicose como fonte de C, porém vários outros açúcares podem ser aproveitados pelos isolados (CARLILE & WATKINSON, 1994). Além disso, uma fonte de N prontamente assimilável é indispensável para o desenvolvimento fúngico (GARRAWAY & EVANS, 1984), e um equilíbrio apropriado entre estes nutrientes no meio é um fator importante para o crescimento e esporulação de fungos (LILLY & BARNETT, 1951).

É desejável encontrar para cada microrganismo 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). Alguns artigos evidenciam claramente que sais inorgânicos podem ser muito importantes para o crescimento. Por exemplo, certos sais como os de magnésio, aumentaram o crescimento de *T. viride* (SHUKLA & MISHRA, 1970).

Carbono serve primariamente como fonte de energia sendo uma pequena fração incorporada dentro da célula. Nitrogênio é um elemento crítico para os microrganismos, pois compõe as proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, enzimas e coenzimas necessárias para o crescimento e funcionamento da célula (GOLUEKE, 1991). Representam elementos essenciais para o desenvolvimento de formulações porque o crescimento de fungos diminui em condições deficientes de N e C (SILVA & MELO, 1999). Porém, espécies de *Trichoderma* utilizam uma ampla variedade de compostos como fonte desses nutrientes (CORABI-ADELL, 2004).

2.7.1 Formulação composta de polímeros

Os ingredientes que compõem a formulação, além do inóculo, são o diluente ou veículo, que pode ser sólido ou líquido, e adjuvantes, que são materiais inertes, mas que apresentam a função de proteção, dispersão e aderência, importantes na

composição do produto. Portanto, o objetivo principal do uso de polímeros nas formulações é o fato de serem biodegradáveis, e promoverem o encapsulamento das células e liberá-las após a degradação do material no ambiente prevenindo as células de estresses ambientais, podendo favorecer a multiplicação e sobrevivência das células quando aplicados no solo (DENARDIN & FREIRE, 2000).

As formulações de fungos consistem em adicionar compostos dispersantes, reguladores de viscosidade, agentes de proteção, emulsificantes, geleificantes, além dos nutrientes necessários à sobrevivência do fungo. Os polímeros possuem essas propriedades, sendo materiais que favorecem a longevidade do fungo, melhoram a capacidade de desempenho, facilitam a manipulação, aplicação e condições de armazenamento, reduzindo a perda das qualidades do produto (LECUONA, 1996; URTIBIAY FRANÇA, 2007). Um dos maiores consumidores de biopolímeros é a indústria agropecuária devido a essas propriedades (STREDANSKY et al., 1999; SUTHERLAND, 1999).

A estabilidade das formulações de biopesticidas fúngicos, a seleção de aditivos e o tipo de formulação é um problema crítico porque o ingrediente ativo é constituído de estruturas vivas e devem manter-se estáveis durante pelo menos seis a dezoito meses em condições normais de armazenamento para tornarem possível a comercialização (CARABALLO, 1998), podendo ser aceitável, um período de três a seis meses, apesar de não ser ideal (SANYANG et al., 2000; FERNANDEZ-LARREA, 2006b).

A metodologia mais largamente utilizada para avaliar a qualidade dos biofungicidas é o método da cultura pareada *in vitro* em disco de ágar. Para esse método existem inúmeros relatos de sucesso na seleção de microrganismos, visando ao controle biológico de fitopatógenos (MARIANO, 1993). Permite mensurar o crescimento micelial, bem como os tipos de interação, como hiperparasitismo, formação de clamidosporos, dentre outros (FARIA et al., 2002).

2.7.1.1 Goma xantana

A goma xantana (GX) tem origem microbiana. Descoberta nos anos 50 teve sua produção comercial iniciada em 1964 nos Estados Unidos e comercializada sob

a marca comercial Kelsan[®] (COTTREL & KANG, 1978). Este polissacarídeo é produzido por bactérias do gênero *Xantomonas*, principalmente a espécie *Xantomonas campestris* (CUNHA et al, 2003). A produção industrial se dá em processos de batelada em bioreatores, com utilização de um açúcar, precedido de uma degradação ácida ou enzimática e posterior recuperação do polímero (KIOSSEOGLOU et al., 2003).

Apresenta propriedades espessantes devido à capacidade de formar soluções viscosas, mesmo em baixas concentrações. Além disso, as dispersões de xantana possuem alto grau de plasticidade, tolerância a sais, ácidos e bases, alta estabilidade frente a extremos de pH. As dispersões de xantana são resistentes à degradação enzimática e possuem habilidade de suspender material particulado (PARKER et al., 1995). É usada na agricultura em suspensões, como agente estabilizante para herbicidas, pesticidas, fertilizantes e fungicidas (NUSSINOVITCH, 1997).

A goma xantana pode ser usada para encapsular células e seu efeito protetor é atribuído a sua capacidade de aumentar as tolerâncias de calor, boas propriedades reológicas e alta atividade de água (MUGNIER & JUNG, 1985).

2.7.1.2 Carboximetilcelulose

A carboximetilcelulose (CMC) apresenta propriedades de solubilidade na água fria e quente, aumento da viscosidade na solução, habilidade para formar filme, adesividade, características para suspensão, retenção de água, resistência a óleos, gorduras e solventes orgânicos, por isso, tem uma ampla aplicação, tanto na formulação de produtos alimentícios, quanto no melhoramento de seus processamentos. Pode ser usada pura ou em misturas com outras gomas. Quando em soluções mantêm a viscosidade normal na faixa de pH entre 4 e 10 (ALHAMDAN & SASTRY, 1990; PILIZOTA et al.,1996).

2.7.1.3 Polivinilpirrolidona

O polivinilpirrolidona (PVP), é conhecido comercialmente por Povidone, é um polímero sintético, formulado a partir de formaldeído e acetileno (LITTER, 1964). É utilizado na indústria de cosméticos, têxtil, farmacêutica e como aditivo para melhorar características de determinados produtos.

2.8 O fitopatógeno *Fusarium oxysporum*

As espécies que formam o gênero *Fusarium* são agentes causais de muitas doenças de importância econômica em plantas cultivadas, como, por exemplo, videira no Rio Grande do Sul.

No Brasil, a videira vem sendo explorada comercialmente a mais de um século e se firmou como atividade sócio-econômica de importância relevante, no Rio Grande do Sul (KUHN et al., 2007). Quando cultivada em condições climáticas favoráveis (umidade elevada e temperaturas amenas) ao desenvolvimento de fungos, está sujeita a uma série de doenças, as quais acarretam graves prejuízos. A fusariose provocada por *Fusarium oxysporum* f. sp. herbemontis causa redução drástica da produtividade da videira por provocar mortalidade de plantas, sendo considerada uma doença de difícil controle (SÔNEGO e GARRIDO, 2003).

Algumas espécies de *Fusarium* são organismos que causam decomposição e estão associadas com podridões em órgãos de reserva de vários vegetais. Outras espécies são invasoras do tecido cortical, causando “*damping off*” ou tombamento, e também, podem causar, podridões de raízes e da coroa, além de cancro em caule, podendo ser parasitas vasculares altamente específicos (BEDENDO, 1995a; BEDENDO, 1995b), de ocorrência em lavouras de soja.

As espécies de *Fusarium* que causam murchas vasculares são todas classificadas como *F. oxysporum*, respondendo por mais de vinte doenças de importância econômica. O patógeno infecta a planta principalmente pelo sistema vascular e coloniza o xilema (vasos condutores de água). Os sintomas incluem murcha, descoloração vascular, clorose, nanismo e morte prematura de plantas.

Sendo que, cada grupo de *formae speciales* é patogênico a uma espécie ou a um grupo de plantas em particular, demonstrando o alto grau de especificidade do hospedeiro (NELSON et al., 1993).

Entre algumas doenças de importância econômica podem ser citadas murcha do algodoeiro (*F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*), murcha de fusarium do tomateiro (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*), murcha da bananeira (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*) e murcha de fusarium do feijoeiro (*F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*) (BEDENDO, 1995b).

Em avaliações realizadas com o objetivo de comprovar a efetividade de *Trichoderma* no controle de *F. oxysporum* os resultados são positivos. Como exemplos, trabalhos mostraram que três isolados de *Trichoderma* (*Trichoderma* sp.) apresentam-se efetivos no controle de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *in vitro* quando inoculados 48 horas antes e simultaneamente com o fitopatógeno, e *in vivo*, um isolado foi efetivo no controle do fitopatógeno (PANDOLFO, 2007).

Dentre dez isolados de *Trichoderma* avaliados quanto ao antagonismo em relação à *F. oxysporum*, três (CEN 289, CEN 288 e CEN290) apresentaram forte inibição do patógeno *in vitro* (CARVALHO et al., 2008). Em sementes de feijoeiro comum, os isolados CEN202, CEN234, CEN238, CEN240 foram superiores à testemunha, reduzindo entre 35 e 51% da incidência do patógeno (CARVALHO et al., 2011).

Devido à agricultura, em sua maior parte, caracterizar-se pela utilização massiva e indiscriminada de agroquímicos, é importante a intensificação das pesquisas relacionadas ao biocontrole. Considerando-se a eficácia de *Trichoderma* no controle biológico de doenças de plantas e conhecendo seu efeito de parasita e capacidade de estabelecer competição com outros microrganismos, infere-se sobre a possibilidade de desenvolver uma formulação capaz de manter sua sobrevivência e infectividade durante o período de armazenamento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Componentes nutricionais da formulação

Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Biologia e Microbiologia do Solo Prof^o Marcos Rubens Fries do Departamento de Solos do Centro de Ciências Rurais (CCR) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

A primeira etapa teve como objetivo determinar a concentração de cada um dos componentes nutricionais em que o *Trichoderma* esporulou mais precocemente, portanto, encontrar o meio de cultura que apresenta melhores concentrações dos ingredientes para adaptação e desenvolvimento do fungo.

O experimento foi realizado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata dextrose ágar) conforme EMBRAPA (2007), no qual se utilizou 200 gL⁻¹ de batata fatiada e colocada em infusão de água destilada fervente durante 15 minutos, após peneirada para retirar o sólido e misturada a 20 gL⁻¹ de dextrose e 15 gL⁻¹ de ágar. O meio foi enriquecido com diferentes doses dos componentes: glicerol, extrato de levedura, MgSO₄.7H₂O (sulfato de magnésio), K₂HPO₄ (fosfato de potássio dibásico), e NaCl (cloreto de sódio).

Para cada um dos componentes foram testadas as seguintes concentrações, conforme a Tabela 2.

Tabela 2 – Concentrações (gL⁻¹) testadas para cada componente

Componente	Concentração (gL ⁻¹)		
Glicerol	0,00	10,00	20,00
Extrato de levedura	0,00	0,50	1,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,00	0,20	0,40
K ₂ HPO ₄	0,00	0,50	1,00
NaCl	0,00	0,10	0,20

As placas de Petri, em quatro repetições, receberam um disco de 12mm de micélios de *Trichoderma* e foram incubados em BOD (Biochemical Oxygen

Demand), com fotoperíodo de 12 horas a 25°C durante um período necessário para atingirem a esporulação. Diariamente as placas foram observadas e sempre que atingiram a esporulação era registrado o dia da ocorrência.

Foram atribuídos graus de esporulação de 1 a 5 para uma faixa de números de dias da repicagem até a esporulação do fungo em placas de Petri. Dessa forma, de 1 a 2 dias, grau 5; de 2 a 4 dias, grau 4; de 4 a 6 dias, grau 3; de 6 a 8 dias, grau 2; de 8 a 10 dias, grau 1 e de 10 a 12 dias, grau 0.

O experimento foi realizado separadamente para os isolados *T. harzianum* e *T. viride*.

3.2 Etapas de produção do formulado

3.2.1 Repicagem do fungo

Os isolados *T. harzianum* e *T. viride* foram adquiridos da Coleção de Culturas Tropical Fundação André Tosello (acessado em: <http://www.fat.org.br>). A repicagem do material foi feita mensalmente cortando-se 2 cm² do meio de cultura colonizado com bisturi esterilizado em autoclave a 121°C durante 20 minutos, e inoculado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, com pH 5,6 ($\pm 0,2$). As placas foram incubadas em BOD a 25°C e 12 horas de fotoperíodo. As placas com fungo esporulado foram armazenadas em geladeira.

3.2.2 Inoculação e cultivo de Trichoderma em substrato

O substrato utilizado para o desenvolvimento do fungo foi sementes de sorgo sacarino orgânico. Foram pesados 220 g de sementes em erlenmeyers de 500 g, adicionados 100 mL de água destilada e esterilizados a 100°C durante 30 minutos. Este processo foi repetido por três dias consecutivos, através da adaptação do processo tinalização. Este método consiste na manutenção do material a 100°C por

vários minutos, resfriamento em temperatura ambiente e incubação por cerca de 24 horas, repetindo o procedimento várias vezes. Durante a incubação, os esporos passam à forma vegetativa, onde são susceptíveis à destruição durante o aquecimento seguinte (URENHA et al., 2001).

Após, foram inoculadas com as duas espécies de *Trichoderma* separadamente através do mesmo processo de repicagem nas placas de Petri, porém contendo três cortes de 2 cm² cada um (FIGURA 2).

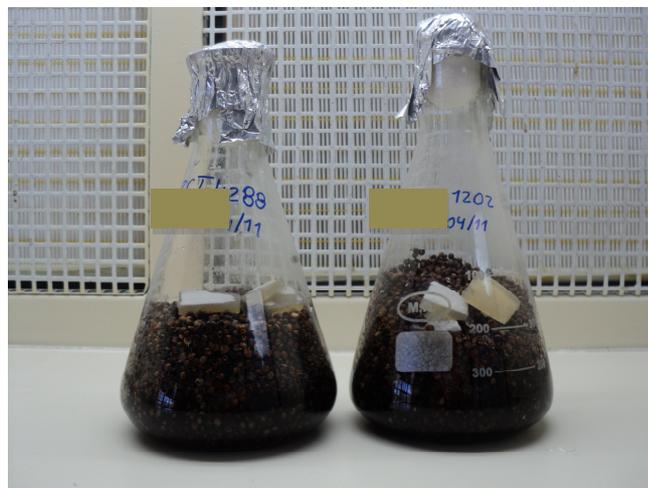


Figura 2 – Sorgo sacarino orgânico inoculado com *Trichoderma* em erlenmeyer de 500 mL.

Fonte: Francini Requia Parzianello

Os erlenmeyrs contendo sorgo inoculado com *Trichoderma* foram incubados em BOD a 25°C, 12 horas de fotoperíodo, durante 25 dias até que fosse colonizado grande parte do substrato e o fungo esporulado. Durante esse período, a cada três dias os erlenmeyrs foram agitados manualmente para haver troca gasosa, quebra de micélio e aumento da superfície de contato do fungo com o substrato para a produção mais elevada de esporos (JACKSON, 1997).

3.2.3 Produção do formulado

Os produtos foram compostos de 10 gL^{-1} de glicerol, $0,5 \text{ gL}^{-1}$ de extrato de levedura, $0,2 \text{ gL}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de magnésio), $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de K_2HPO_4 (fosfato de potássio dibásico), e $0,1 \text{ gL}^{-1}$ de NaCl (cloreto de sódio).

Os tratamentos diferenciaram quanto à concentração dos polímeros GX, PVP e CMC acrescentados na formulação, na concentração (gL^{-1}) (TABELA 3).

Tabela 3 – Composição (gL⁻¹) dos tratamentos das formulações a base de *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride*

Tratamento	Glicerol	Extrato de levedura	MgSO ₄ .7H ₂ O	K ₂ HPO ₄	NaCl	Goma xantana	PVP*	CMC**	Água (mL)
Controle			Água da lavagem dos grãos de sorgo sacarino inoculados com o isolado						
G ₁ P ₁ C ₂ ***	10,0	0,5	0,2	0,5	0,1	1,0	1,0	2,0	1.000
G _{0,5} P _{0,5} C ₁	10,0	0,5	0,2	0,5	0,1	0,5	0,5	1,0	1.000
G ₂ P ₂ C	10,0	0,5	0,2	0,5	0,1	2,0	2,0	-	1.000
GPC ₁	10,0	0,5	0,2	0,5	0,1	-	-	1,0	1.000

* Polivinilpirrolidona

** Carboximetilcelulose

*** G=Goma xantana, P=Polivinilpirrolidona, C=Carboximetilcelulose

**** MgSO₄.7H₂O=sulfato de magnésio, K₂HPO₄=fosfato de potássio dibásico, NaCl=cloro de sódio

Para cada tratamento foram produzidos dez litros da formulação e autoclavado a 121°C durante 45 minutos em garrafa de vidro (capacidade 15 litros), e bocal fechado com bucha de algodão.

Após, em câmara de fluxo laminar, foram envasados 200 mL em cada embalagem. As embalagens utilizadas foram bolsas tipo dupla camada em PEBD (polietileno de baixa densidade), com bocal de 32mm, com tampa de pressão, esterilizados com irradiação Gama 20 KGy (Cobalto-60) (FIGURA 3).



Figura 3 – Envase, em câmara de fluxo laminar, do formulado estéril nas embalagens para futura inoculação com trichoderma.

Fonte: Francini Requia Parzianello

O controle da esterilidade da formulação foi realizado segundo a técnica de diluições decimais descrita por EMBRAPA (2007) e não se observou a presença de contaminantes.

Com o objetivo de obter o inóculo que foi injetado nas embalagens, foram selecionados dois erlenmeyers de cada isolado. Os grãos de sorgo sacarino foram lavadas com dois litros de água destilada esterilizada através de agitação manual. A água destilada estéril é um método de preservação que apresenta elevada viabilidade em fungos filamentosos (NAKASONE et al., 2004; ALVES & FARIA, 2010), sendo uma forma simples de garantir a sobrevivência de fungos por longos períodos.

Em cada embalagem, a inoculação foi realizada assepticamente em câmara de fluxo laminar, através de injeção com seringas hipodérmicas de vidro esterilizadas com 10% de inóculo, correspondendo a 20 mL (FIGURA 4). Após, o orifício feito pela agulha na embalagem foi fechado com adesivos de papel, também esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos acondicionados em envelopes de papel pardo para facilitar o processo de esterilização.

Após a impregnação do substrato com o inóculo, as embalagens foram manuseadas, buscando-se homogeneizar a mistura. Os produtos, assim formulados totalizaram 24 unidades de cada tratamento com 220 mL cada, as quais foram armazenadas a temperatura ambiente em caixas de papelão nas dependências do laboratório.



Figura 4 – Lavagem das sementes de sorgo sacarino colonizadas por trichoderma (a); Injeção do inóculo de trichoderma nos formulados de cada um dos tratamentos (b).

Fonte: Francini Requia Parzianello

3.2.4 Avaliação das formulações – Aplicabilidade *in vitro* (Confrontação direta)

Um disco de meio de cultura BDA de 12 mm de diâmetro contendo micélio/esporos de *Fusarium oxysporum* foi transferido para as placas de Petri (de 9,0 cm) posicionado a 0,5 cm da borda, contendo meio BDA. O material foi incubado durante 48 horas a 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) e fotoperíodo de 12 horas. Em seguida, uma alíquota (40 μL) de cada um dos tratamentos dos produtos formulados foi transferida para as placas em posição oposta ao disco de micélio do patógeno. As placas foram mantidas a 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) e fotoperíodo de 12 horas.

Após sete dias, foi realizada a avaliação das placas, baseada no critério de Bell et al. (1982), no qual se utiliza uma escala de notas variando de 1 a 5, onde:

- 1- Antagonista cresce e ocupa toda placa;
- 2- Antagonista cresce e ocupa uma parte do patógeno (2/3 da placa);
- 3- Antagonista e o patógeno crescem até a metade da placa, (nenhum organismo domina o outro):
- 4- Patógeno cresce e ocupa uma parte do antagonista (2/3 da placa);
- 5- Patógeno cresce e ocupa toda a placa.
- 6-

Os testes de confrontação direta foram realizados aos 30, 60, 90, 120 e 180 dias.

3.2.5 Contagem de esporos

Para a contagem de esporos utilizou-se a câmara de Neubauer. Trata-se de um equipamento de leitura observada em microscópio que possui vinte e cinco campos de contagem, sendo cada um, dividido em dezesseis partes.

A Câmara de Neubauer, formada por vinte e cinco campos de contagem, corresponde a uma área total de 1mm^2 (1 mm de cada lado). A lamínula fica a 0,1 mm acima da câmara, portanto, esta área comporta o volume de $0,1\text{ mm}^3$ (1mm x

1mm x 0,1mm). No entanto, como as contagens são anotadas em cm^3 , o volume é de $0,0001 \text{ cm}^3$ ($1/1000 \text{ cm}^3$) (MORAES & ALVES, 1986).

A equação para determinar o número de células mL^{-1} é:

Equação 1:

$$\text{n}^\circ \text{ cel mL}^{-1} = (\text{n}^\circ \text{ de cel camp}16 \times 25) 0,0001^{-1}$$

Considerando:

$\text{n}^\circ \text{ cel mL}^{-1}$ = número de células em 1 mL da amostra;

$\text{n}^\circ \text{ de cel camp}16$ = números de células contadas em um campo contendo 16 divisões;

25 = total de campos de contagem,

$0,0001^{-1} = \text{cm}^3 = \text{mL}$ = volume da alíquota utilizada para contagem.

Procede-se da seguinte forma: com uma alça de platina, com volume conhecido de 1mL, coleta-se a alíquota da suspensão preparada, sob agitação constante, e deposita-se em um dos canais laterais ao campo central, todos canais interligados devem estar completos. Aguarda-se um minuto até que haja sedimentação dos esporos e procede-se a contagem ao microscópio em objetiva 40 x.

Os testes de contagem de esporos foram realizados aos 30, 60, 90, 120 e 180 dias.

3.3 Análise estatística

Para a determinação dos tratamentos mais eficientes quanto à esporulação, os dados obtidos nos tratamentos foram transformados para raiz quadrada de $x + 0,1$ e submetidos à análise de variância e ao teste de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro pelo software SISVAR (FERREIRA, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Formulação

O meio de cultivo extrato de levedura-glicerol é utilizado para crescimento de estirpes de *Rhizobium* spp. e *Bradyrhizobium* spp. recomendado para fabricação de inoculantes na indústria e na pesquisa (LORDA & BALATTI, 1996). Este meio é composto basicamente de 10,0 gL⁻¹ de glicerol, 0,5 gL⁻¹ de extrato de levedura, 0,2 gL⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,5 gL⁻¹ de K₂HPO₄ e 0,1 gL⁻¹ de NaCl (LORDA & BALATTI, 1996)

Esses componentes, também são utilizados em meio de cultura para *Trichoderma*, porém em concentrações variáveis. Na literatura encontram-se variações quanto à metodologia em relação aos componentes e suas concentrações. Neste trabalho utilizou-se como referência meio de cultura levedura-glicerol para determinar quais as concentrações de componentes seriam fundamentais para o enriquecimento do meio para o melhor desenvolvimento do fungo *Trichoderma* (TABELA 4).

Existem vários meios de cultura utilizados para conservação ou isolamento de *Trichoderma*. Corabi-Adell (2004) utilizou cinco meios de cultura para isolamento de *Trichoderma* do solo, com variação nos componentes como MgSO₄.7H₂O de 0,2, 0,25, 0,26, 0,5 (gL⁻¹) e de KH₂PO₄ de 0 ou 0,9 (gL⁻¹). Este autor utilizou solução de glicerol 20% para avaliações periódicas quanto a viabilidade do fungo. Em outros trabalhos, para avaliar a atividade celulase de fungos, dentre eles *T. harzianum* e *T. viride*, utilizou-se no meio de cultura MgSO₄.7H₂O, 0,5 gL⁻¹, KH₂PO₄, 0,2 gL⁻¹ (RUGGER & TAUKE-TORNISIELO, 2004), e para isolamento de trichoderma com objetivo de controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, utilizaram MgSO₄.7H₂O, 1,0 gL⁻¹ e KH₂PO₄, 0,9 gL⁻¹ (ROCHA & OLIVEIRA, 1998).

Os meios nutritivos utilizados para crescimento de fungos contendo substâncias, como extrato de levedura, são denominados meios complexos (MELO, 1991). Desse modo, Souza et al (2004) acrescentaram extrato de levedura, 0,2 gL⁻¹ em BD (batata dextrose) para fermentação de trichoderma com objetivo de manter a

antibiose em relação aos microrganismos-teste utilizados no experimento. Ulhoa e Peberdy (1992) utilizaram o meio MYG com extrato de levedura, 0,25% para manutenção de *Trichoderma*. Em experimento de controle antimicrobiano realizado com *T. atroviride* utilizou-se extrato de levedura como fonte de nitrogênio no meio de cultura líquido (TANAKA et al, 2009) e extrato de levedura, 0,5 gL⁻¹ para meio de crescimento (PAZZINI et al, 2011), favorecendo a produção de celulases.

Tabela 4 – Média do número de dias até esporulação dos isolados de *T. harzianum* (TH) e *T. viride* (TV) nos componentes e concentrações (gL⁻¹) no meio de cultura com BDA, mantidos em BOD a 25°C e 12 horas de fotoperíodo.

Isolado	Glicerol		
	0,0	10,0	20,0
TH	6,75	6,00	6,00
TV	7,00	8,50	10,75
	Extrato de levedura		
	0,0	0,50	1,0
TH	7,00	7,00	7,25
TV	7,00	9,25	12,00
	MgSO ₄ .7H ₂ O		
	0,0	0,2	0,4
TH	6,50	3,00	3,00
TV	6,50	6,50	9,00
	K ₂ HPO ₄		
	0,0	0,5	1,0
TH	6,25	3,00	3,75
TV	7,00	3,25	4,74
	NaCl		
	0,0	0,1	0,2
TH	7,00	4,00	4,00
TV	7,00	10,00	10,75

O meio de cultura BDA é utilizado como fonte de nutrientes (C e N) e energia (açúcar) para o fungo (SANTORO et al, 2005). Porém, o formulado utilizado não possui em sua composição BDA, sendo necessário o enriquecimento do meio com outras fontes nutricionais.

Desse modo, todos componentes do meio de cultura levedura-glicerol foram utilizados na formulação e avaliados quanto à concentração a ser utilizada. Por isso, nos casos em que as notas atribuídas ao controle foram melhores em relação às

outras concentrações (TABELA 5), o tratamento controle não foi usado para avaliar a eficiência dos produtos estudados.

Tabela 5 – Grau atribuído ao número de dias até esporulação dos isolados *T. harzianum* (TH) e *T. viride* (TV) quanto aos componentes e concentrações (gL⁻¹) no meio de cultura. Grau 0: 10 a 12 dias; Grau 1: 8 a 10 dias; Grau 2: 6 a 8 dias; Grau 3: 4 a 6 dias; Grau 4: 2 a 4 dias.

Isolado	Glicerol			CV**
	0,0	10,0	20,0	
TH	2 a A*	2 a A	2 a A	0,0
TV	2 a A	1 b AB	0 b B	11,24
	Extrato de levedura			
	0,0	0,50	1,0	CV
TH	2 a A	2 a A	2 a A	28,70
TV	2 a A	1 a B	0 b B	24,67
	MgSO ₄ .7H ₂ O			
	0,0	0,2	0,4	CV
TH	2 a B	4 a A	4 a A	0,0
TV	2 a A	2 b A	1 b AB	17,12
	K ₂ HPO ₄			
	0,0	0,5	1,0	CV
TH	2 a B	4 a A	4 a A	16,50
TV	2 a B	4 a A	3 a A	10,00
	NaCl			
	0,0	0,1	0,2	CV
TH	2 a B	3 a A	3 a A	0,0
TV	2 a A	0 b B	0 b B	9,48

* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**CV=Coefficiente de variação.

O glicerol é utilizado como fonte de carbono para os microrganismos (BENETAZZO & ETCHEGARAY JUNIOR, 2010; IMANDI et al, 2006). O isolado *T. viride* apresentou a tendência de aumentar o período entre a repicagem e a esporulação quando houve aumento do fornecimento de C através de glicerol. Já o isolado *T. harzianum*, manteve seu desenvolvimento estável com o aumento da concentração de glicerol. É provável que a necessidade de carbono dos isolados seja diferente uma vez que quando submetidos às mesmas concentrações de

glicerol (10,0 e 20,0 gL⁻¹) apresentaram diferenças entre os períodos de esporulação (FIGURA 5).

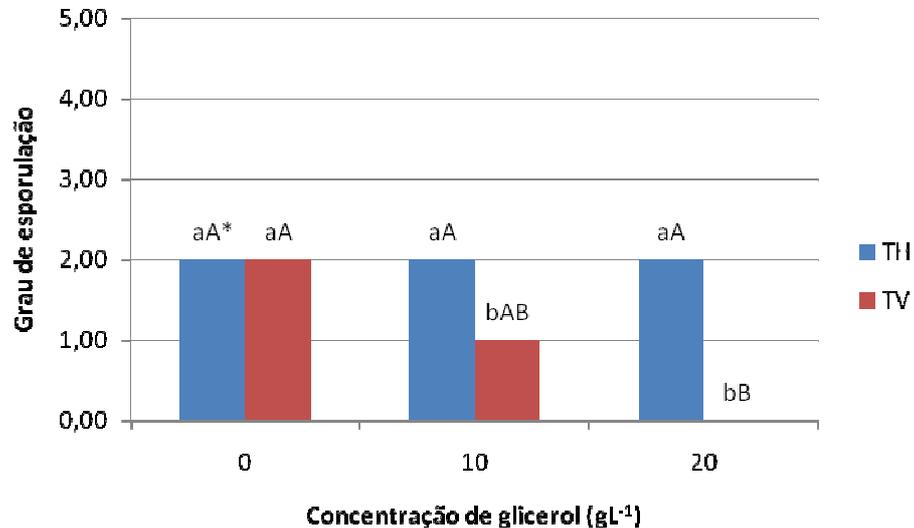


Figura 5 – Grau atribuído ao número de dias até a esporulação de *T. harzianum* (TH) e *T. viride* (TV) em função da variação da concentração de glicerol. Grau 0: 10 a 12 dias; Grau 1: 8 a 10 dias; Grau 2: 6 a 8 dias.

* Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem quanto a concentração de glicerol e minúscula quanto ao grau de esporulação pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O extrato de levedura também é utilizado como fonte de nitrogênio em meio de cultura (CARVALHO et al, 2005). Extratos de levedura são excelentes substratos para muitos microrganismos, contêm aminoácidos, peptídeos, proteínas, vitaminas solúveis em água e carboidratos (CRUEGER & CRUEGER, 1993).

A mesma tendência ocorrida com a concentração de C ocorreu com o fornecimento de N. Quanto mais elevada a concentração de extrato de levedura no meio de cultura, maior o período entre a repicagem e a esporulação do isolado *T. viride*. O isolado *T. harzianum* se manteve estável quando do aumento da concentração de extrato de levedura (FIGURA 6).

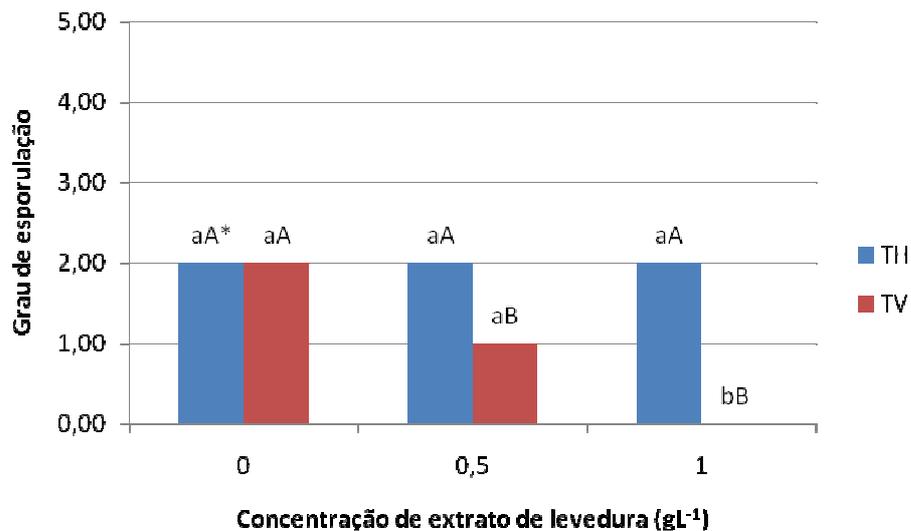


Figura 6 – Grau atribuído ao número de dias até a esporulação de *T. harzianum* (TH) e *T. viride* (TV) em função da variação da concentração de extrato de levedura. Grau 0: 10 a 12 dias; Grau 1: 8 a 10 dias; Grau 2: 6 a 8 dias.

* Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem quanto à concentração de extrato de levedura e minúscula quanto ao grau de esporulação pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o bom desenvolvimento do fungo é importante que suas necessidades nutricionais sejam satisfeitas (SANTORO et al, 2005). O carbono constitui aproximadamente 50% e nitrogênio de 8 a 14% do peso seco de fungos (MOO-YOUNG, 1985). Por isso, a concentração de glicerol utilizada na formulação foi de 10 gL⁻¹ para suprir o carbono e 0,5 gL⁻¹ de extrato de levedura para suprir o nitrogênio (TABELA 5).

Cerca de 40 elementos químicos da tabela periódica são essenciais para o desenvolvimento dos microrganismos. Destes, os mais importantes são os não metais C, H, O, N, P, S e os metais K e Mg, compreendendo aproximadamente 98% do peso seco de fungos. Estes nutrientes são denominados de macronutrientes, pois são requeridos em maior quantidade para o crescimento desses microrganismos. A água é também um importante fator por constituir a maior parte das células dos fungos (80-90%) (MOO-YOUNG, 1985).

Sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O) foi utilizado na concentração de 0,2 gL⁻¹. O isolado *T. viride* novamente apresentou a tendência de aumentar o número de dias até a esporulação com o aumento desse nutriente (FIGURA 7), que é responsável pelo suprimento de enxofre (S) e magnésio (Mg) para o

desenvolvimento do fungo. O enxofre também é constituinte de proteínas e de algumas coenzimas e o Mg atua como cofator para muitas enzimas e clorofila, e também está presente na parede de células e membranas (MOO-YOUNG, 1985).

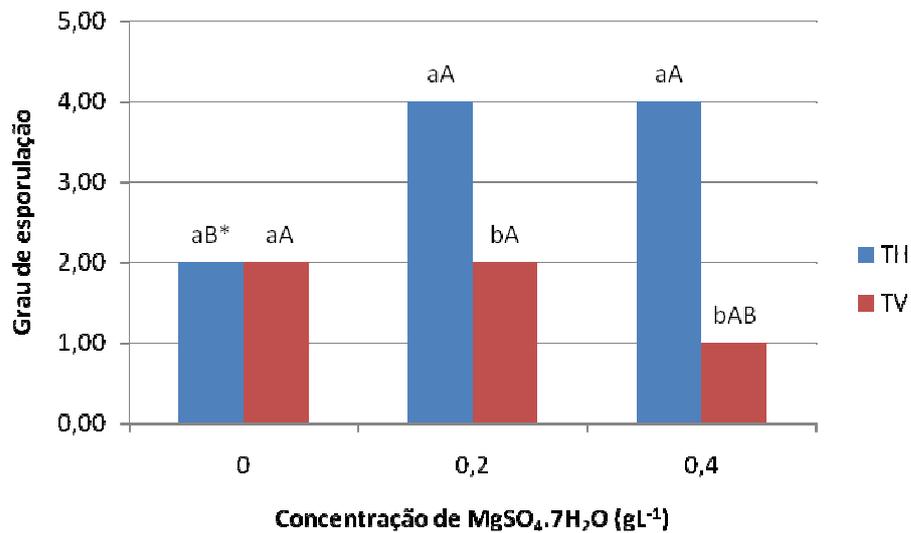


Figura 7 – Grau atribuído ao número de dias até a esporulação de *T. harzianum* (TH) e *T. viride* (TV) em função da variação da concentração de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Grau 0: 10 a 12 dias; Grau 1: 8 a 10 dias; Grau 2: 6 a 8 dias; Grau 3: 4 a 6 dias; Grau 4: 2 a 4 dias.

* Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem quanto a concentração de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e minúscula quanto ao grau de esporulação pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A utilização de fosfato de dipotássio (K_2HPO_4), $0,5 g L^{-1}$ (FIGURA 8) supre as necessidades de fósforo (P) e de potássio (K). O fósforo é constituinte de ácidos nucléicos, fosfolipídios, nucleotídeos e certas coenzimas. O potássio é o principal cátion inorgânico na célula e cofator para algumas enzimas (MOO-YOUNG, 1985).

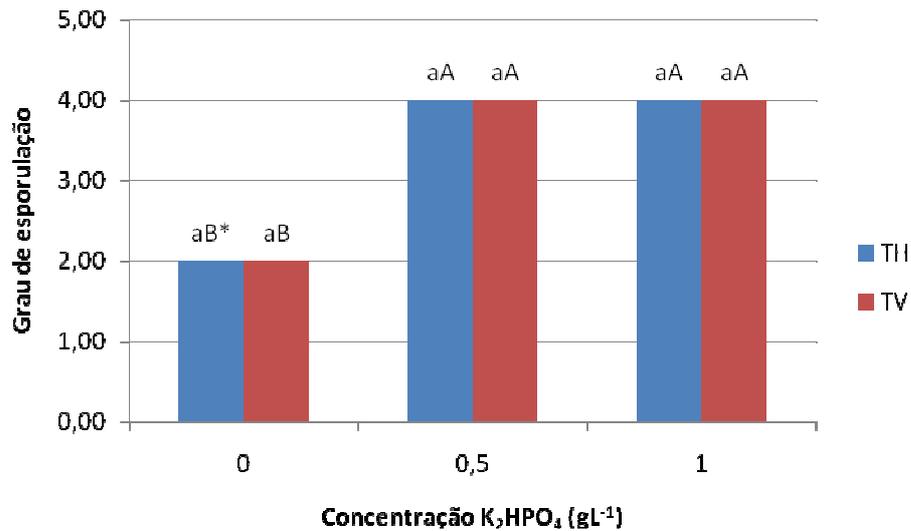


Figura 8 – Grau atribuído ao número de dias até a esporulação de *T. harzianum* (TH) e *T. viride* (TV) em função da variação da concentração de K₂HPO₄. Grau 0: 10 a 12 dias; Grau 1: 8 a 10 dias; Grau 2: 6 a 8 dias; Grau 3: 4 a 6 dias; Grau 4: 2 a 4 dias.

* Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem quanto a concentração de K₂HPO₄ e minúscula quanto ao grau de esporulação pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O cloreto de sódio (NaCl) é responsável pela manutenção da viabilidade de micélio fúngico ectomicorrízico (isolado UFSC-Rh90, *Rhizopogon nigrescens*), (OLIVEIRA et al., 2006) e de mutantes de Trichoderma que apresentaram-se eficientes quando em solução salina em relação a *F. oxysporum* (MOHAMED & HAGGAG, 2006). Também é utilizado para produção de meio nutritivo para *Alternaria alternata* (SILVA & MELO, 1999). Nesse trabalho, a concentração utilizada foi de 0,1 g L⁻¹ (FIGURA 9).

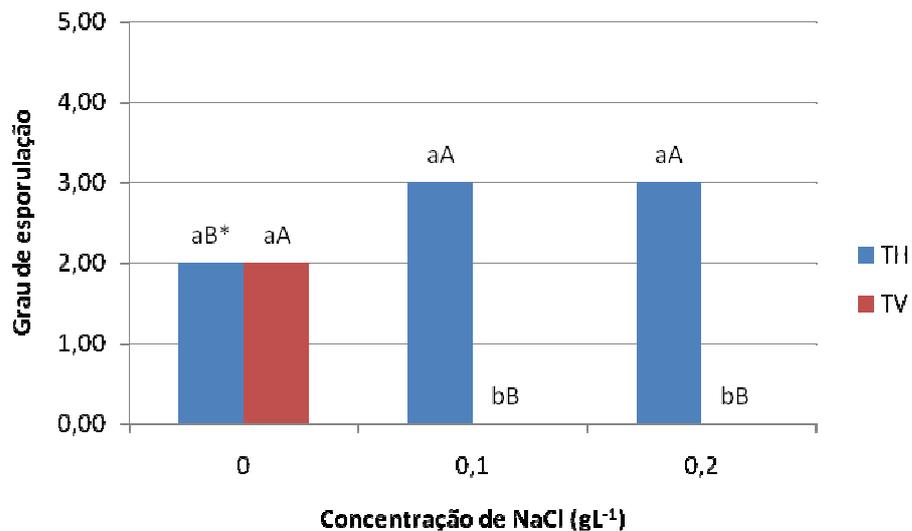


Figura 9 – Grau atribuído ao número de dias até a esporulação de *T. harzianum* (TH) e *T. viride* (TV) em função da variação da concentração de NaCl. Grau 0: 10 a 12 dias; Grau 1: 8 a 10 dias; Grau 2: 6 a 8 dias; Grau 3: 4 a 6 dias.

* Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem quanto a concentração de NaCl e minúscula quanto ao grau de esporulação pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.2 Avaliação das formulações – Aplicabilidade *in vitro* (Confrontação direta) e contagem de esporos

O levantamento dos resultados do teste de confrontação direta foi realizado através da avaliação das placas de Petri e da distribuição de notas conforme o critério de Bell et al. (1982), no qual utiliza uma escala de notas variando de 1 a 5 (FIGURA 10).

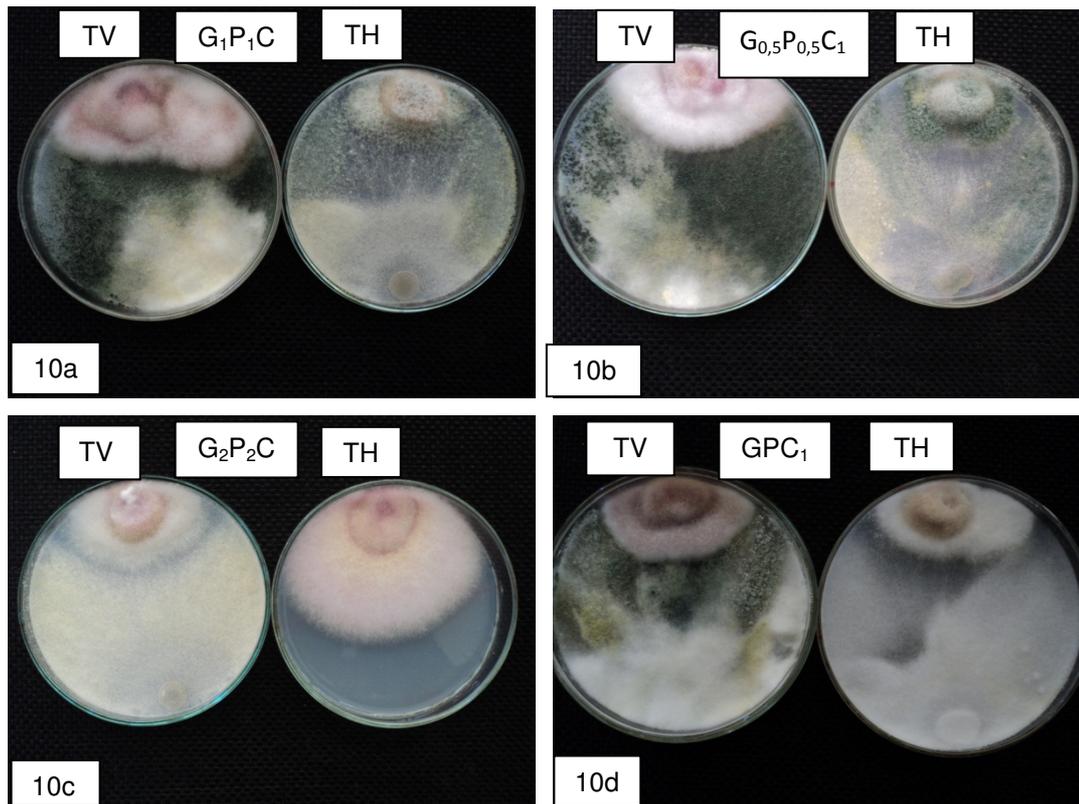


Figura 10 – Testes de confrontação direta com amostras aos 30 dias de armazenamento dos tratamentos $G_1P_1C_2$, $G_{0,5}P_{0,5}C_1$, G_2P_2C e GPC_1 x *F. oxysporum*. As placas foram colocadas em BOD durante 7 dias, a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, a parte superior foi inoculada com *F. oxysporum* e a inferior com bioformulado composto de *T. harzianum* (TH) e *T. viride* (TV) respectivamente. As placas na esquerda da imagem são TV e na direita TH. a) TH: nota 1; TV: nota 3; b) TH: nota 1; TV: nota 2; c) TH: nota 4; TV: nota 2, d) TH: nota 1, TV: nota 2.

Fonte: Francini Requia Parzianello

O teste de confrontação direta foi realizado entre o inóculo dos dois isolados de Trichoderma e *F. oxysporum*. Os isolados *T. harzianum* e *T. viride* apresentaram a mesma nota 1, esse resultado correspondeu a primeira avaliação.

Através deste teste, foi observada a uniformidade de resultados nas diferentes épocas de avaliação quando analisado o isolado *T. harzianum*. Em todas as épocas de avaliação, o formulado G_2P_2C demonstrou-se o menos eficiente quanto ao controle de *F. oxysporum* (TABELA 6).

O isolado *T. viride*, nas mesmas condições experimentais, não apresentou resultados constantes durante o período de avaliação. O tratamento G_2P_2C mostrou ser pouco eficiente aos 30 e 60 dias. Nas avaliações dos 90, 120 e 180 dias o

tratamento G₁P₁C₂ apresentou o menor desempenho para controle de *F. oxysporum*. O tratamento controle apresentou as melhores notas no controle de *F. oxysporum*. Portanto, para o isolado *T. viride*, o substrato composto de polímeros não foi favorável quanto à confrontação com *F. oxysporum* aos 30, 60 e 90 dias. Aos 120 dias o controle não apresentou diferença significativa dos tratamentos G_{0,5}P_{0,5}C₁ e GPC₁ e aos 180 dias não houve diferença em relação ao tratamento GPC₁ (TABELA 6).

Esses resultados demonstram que a quantidade de polímeros utilizados nos tratamentos G₁P₁C₂ e G₂P₂C podem ter sido em quantidade excessiva, prejudicando, provavelmente, a troca gasosa e regulação osmótica das células (esporos) de *Trichoderma* levando ao declínio da sobrevivência do fungo. Isso se deve às propriedades da goma xantana, a qual tem capacidade de encapsular células (MUGNIER & JUNG, 1995) e de PVP que forma um filme protetor, impedindo as perdas de água (BUSHBY & MARSHALL, 1977).

A relevância dessas informações é que no confronto direto do agente de biocontrole com o fitopatógeno podem ocorrer ações antagônicas, como antibiose, hiperparasitismo e competição (ETHUR et al., 2005) sendo essas características favoráveis que visam à seleção de isolados de *Trichoderma* spp. como um indicativo a capacidade de antagonismo *ex vitro* com fitopatógenos.

Tabela 6 – Avaliação dos isolados *Trichoderma harzianum* (TH) e *T. viride* (TV) quanto ao número de esporos e nota da confrontação direta nos diferentes tratamentos e épocas de avaliação em meio de cultura BDA, em estufa BOD a 25°C, 12 horas de fotoperíodo por 7 dias.

Época de avaliação/dias	Tratamento	Isolado			
		TH		TV	
		Nota	Nº esporos	Nota	Nº esporos
30	Controle	1,0 a	2,05 x 10 ⁷ b	1,0 a	2,01 x 10 ⁷ a
	G ₁ P ₁ C ₂	1,0 a	1,72 x 10 ⁷ c	1,8 b	1,42 x 10 ⁷ b
	G _{0,5} P _{0,5} C ₁	1,0 a	3,05 x 10 ⁷ a	1,8 b	1,43 x 10 ⁷ b
	G ₂ P ₂ C	2,4 b	0,47 x 10 ⁷ d	3,0 c	0,21 x 10 ⁷ c
	GPC ₁	1,0 a	1,85 x 10 ⁷ b	2,0 b	1,44 x 10 ⁷ b
60	Controle	1,0 a	2,06 x 10 ⁷ b	1,0 a	2,02 x 10 ⁷ a
	G ₁ P ₁ C ₂	1,0 a	1,58 x 10 ⁷ c	2,0 b	1,34 x 10 ⁷ b
	G _{0,5} P _{0,5} C ₁	1,0 a	2,76 x 10 ⁷ a	2,0 b	1,47 x 10 ⁷ b
	G ₂ P ₂ C	2,2 b	0,40 x 10 ⁷ d	2,8 c	0,27 x 10 ⁷ d
	GPC ₁	1,0 a	1,93 x 10 ⁷ b	2,0 b	0,68 x 10 ⁷ c
90	Controle	1,0 a	2,08 x 10 ⁷ a	1,0 a	2,01 x 10 ⁷ a
	G ₁ P ₁ C ₂	1,0 a	1,60 x 10 ⁷ b	2,0 b	0,49 x 10 ⁷ d
	G _{0,5} P _{0,5} C ₁	1,0 a	2,47 x 10 ⁷ a	2,0 b	0,58 x 10 ⁷ c
	G ₂ P ₂ C	2,0 b	0,25 x 10 ⁷ c	2,2 b	0,66 x 10 ⁷ b
	GPC ₁	1,0 a	1,93 x 10 ⁷ a	2,0 b	0,61 x 10 ⁷ b
120	Controle	1,0 a	2,04 x 10 ⁷ b	1,0 a	2,02 x 10 ⁷ a
	G ₁ P ₁ C ₂	1,0 a	1,55 x 10 ⁷ c	2,0 b	0,46 x 10 ⁷ c
	G _{0,5} P _{0,5} C ₁	1,0 a	2,46 x 10 ⁷ a	1,0 a	1,97 x 10 ⁷ a
	G ₂ P ₂ C	2,0 b	0,30 x 10 ⁷ d	2,0 b	0,64 x 10 ⁷ b
	GPC ₁	1,0 a	1,94 x 10 ⁷ b	1,0 a	1,91 x 10 ⁷ a
180	Controle	1,0 a	2,04 x 10 ⁷ b	1,0 a	1,99 x 10 ⁷ a
	G ₁ P ₁ C ₂	1,0 a	1,51 x 10 ⁷ c	2,0 b	0,40 x 10 ⁷ c
	G _{0,5} P _{0,5} C ₁	1,0 a	2,45 x 10 ⁷ a	2,0 b	0,63 x 10 ⁷ b
	G ₂ P ₂ C	2,0 b	0,30 x 10 ⁷ d	2,0 b	0,62 x 10 ⁷ b
	GPC ₁	1,0 a	1,97 x 10 ⁷ b	1,0 a	1,99 x 10 ⁷ a

* Médias seguidas de mesma letra nas colunas, para cada época de avaliação, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A contagem de esporos existentes no inóculo foi feita através de câmara de Neubauer. Os isolados de *T. harzianum* e *T. viride* apresentaram as respectivas concentrações: 2,05 x 10⁷ esporos mL⁻¹ e 2,01 x 10⁷ esporos mL⁻¹, correspondentes à primeira avaliação, na ocasião da inoculação dos tratamentos.

Para o isolado *T. harzianum*, o número de esporos é proporcional à nota do teste de confrontação. Portanto, quanto pior a nota, menor o número de esporos.

Sendo G₂P₂C, o tratamento com menos esporulação, também correspondendo as menores notas e ao menor número de esporos.

O melhor tratamento para o isolado *T. harzianum*, em todas as épocas de avaliação, foi G_{0,5}P_{0,5}C₁. Demonstrou ser o melhor para o controle de *F. oxysporum in vitro* porque quando analisado conjuntamente os dois fatores de avaliação apresentou melhor desempenho devido aos resultados estatísticos e à estabilidade da formulação durante todo o período de armazenamento.

O número de esporos decresceu de forma constante. Esse comportamento indica uma tendência de que se as avaliações continuassem sendo realizadas, o produto apresentaria um longo período de validade (TABELA 6).

O isolado *T. viride* não apresentou o mesmo comportamento, provavelmente não se adaptou ao meio, já que os melhores resultados correspondem ao controle. Para esse isolado, aos 120 e 180 dias, é provável que houve superestimação dos resultados nos tratamentos G_{0,5}P_{0,5}C₁ e GPC₁. Não foi encontrado, na literatura pesquisada, nenhum caso em que o número de esporos e a nota da confrontação apresentassem um melhor desempenho com o passar do tempo quando na forma de produto final.

O tratamento que apresentou melhor resultado foi G_{0,5}P_{0,5}C₁ para *T. harzianum* em todos períodos de avaliação, porém para *T. viride* nenhum dos tratamentos foi melhor do que o controle em todos períodos de avaliação.

A melhor sobrevivência de *T. harzianum* quando comparado a *T. viride* em formulações também foi evidenciado por Dubey et al., 2009. Aos 5 meses de armazenamento em prateleira a temperatura ambiente (26 ± 8°C), a formulação em pó composta de turfa (47,5%), pó de mandioca (47,5%) e CMC (5%) apresentou maior sobrevivência de propágulos para *T. harzianum* (7,5x10⁸ ufc g⁻¹) do que de *T. viride* (7,0x10⁸ ufc g⁻¹).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os dados obtidos na presente pesquisa, conclui-se que:

- O uso de polímeros na formulação de biofungicidas à base de *T. harzianum* é recomendado, mantendo o fungo viável por no mínimo 180 dias e controla *F. oxysporum in vitro*.
- Os compostos glicerol ($10,0 \text{ gL}^{-1}$), extrato de levedura ($0,5 \text{ gL}^{-1}$), sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ($0,2 \text{ g L}^{-1}$), fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) ($0,5 \text{ gL}^{-1}$) e cloreto de sódio (NaCl) ($0,1 \text{ gL}^{-1}$) podem ser utilizados no meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) para crescimento de *T. harzianum* e *T. viride*.
- O uso de grãos de sorgo sacarino orgânico como substrato para crescimento de *T. harzianum* e *T. viride* apresentou-se eficiente.
- Para o uso de polímeros em formulações compostas de fungos com objetivo de aumentar a vida útil desses produtos em prateleira são necessários mais estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHAMDAN, A., SASTRY, S. K, Natural convection heat transfer between non-Newtonian fluids and an irregular shaped particle. **Journal of Food Process Engineering**. v. 13, p. 113-124, 1990.

ALMEIDA, F. B. R.; CERQUEIRA, F. M.; SILVA, R. N.; ULHOA, C. J.; LIMA, A.L. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic production. **Biotechnol Lett**. v. 29, p.1189-1193, 2007.

ALMEIDA, W. K. D. S. Antagonismo de *Trichoderma viride* sobre fungos fitopatogênicos, *Colletotrichum spp.*, *Cercospora musae* e *Asperisporium caricae* em Fruteiras Tropicais. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v. 4, n. 2, p.1374-1378, 2009.

ALTOMARE, C.; NORVELL, W. A.; BJORKMAN, T.; HARMAN, G. E. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plantgrowth- promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai. **Appl Environ Microbiology**. v. 65. p. 2926–293, 1999.

ALVES, R. T.; FARIA, M. **Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos**. Documento 286. EMBRAPA CERRADOS. Planaltina, DF, 2010.

BASTOS, C. N. Possibilidade do controle biológico da vassoura-da-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacauzeiro. In: BETTIOL, W. (Org). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna. EMBRAPA-CNPDA, 1991.

BEDENDO, I. P. Podridões de raiz e colo. In.: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia**: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo. Agronômica Ceres. v. 1, p. 829-837. 1995a.

BEDENDO, I. P. Podridões de raiz e colo. In.: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia**: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo. Agronômica Ceres. v. 1, p. 838-847. 1995b.

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

BENETAZZO, N. K.; ETCHEGARAY JÚNIOR, A. Produção de lipopetídeos de *Bacillus subtilis* em Meio de Landy modificado: isolamento e caracterização de metabólitos induzidos. **Anais do XV Encontro de Iniciação Científica da PUC-Campinas** . São Paulo, 2010.

BENÍTEZ, T. RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**. v. 7, n. 4, p. 249-260, 2004.

BETTIOL W. Métodos Alternativos para o Controle de Doenças de Plantas. In.: **Proteção de Plantas na Agricultura Sustentável**. Editores: S. J. MICHEREFF e R. BARROS. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2001.

BETTIOL W., MORANDI M. A. B. **Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil**. In: BETTIOL W., MORANDI M. A. B. Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas (Eds). Jaguariúna SP. EMBRAPA MEIO AMBIENTE, 2009.

BUSHBY, H. V. A.; MARSHALL, K. C. Some factors affecting the survival of root-nodule bacteria on dissection. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 9, p. 143-147, 1977.

CARABALLO, M. Formulación de hongos entomopatógenos. **Manejo Integrado de Plagas**. v. 47. p. 1-4, 1998.

CÁRDENAS, Y. G. Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai. **Fitosanidad**. v. 14, n. 3, p. 189-195, 2010.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. **The fungi**. 1994.

CARVALHO, D. D. C.; OLIVEIRA, T. A. S.; BRAÚNA, L. M., MELLO, S. C. M. **Isolados de *Trichoderma* sp. antagônicos a *Fusarium oxysporum***. COMUNICADO TÉCNICO 178. EMBRAPA. 2008

CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M., SILVA, M. C. Controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**. v. 36, n. 1, 2011.

CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M.; CONTESINE, F. J., BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lípases microbianas. **Química Nova**. v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.

CHAGAS, H. A. **Controle de Mofo-cinzeno (*Amphobotrys ricini*) da mamoneira (*Ricinus communis* L.) por métodos químico, biológico e com óleos essenciais.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp. Programa de Pós Graduação em Agronomia. Botucatu, 2009.

CORABI-ADELL, C. **Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (Hypocreales-Fungi) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica.** Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista. Programa de pós graduação em Ciência Biológicas. Rio Claro-SP, 2004.

COTTREL, I. W.; KANG, K. S. Xanthan gum, a unique bacterial polysaccharide for food applications. **Developments in Industrial Microbiology.** v. 19, p. 117-131, 1978.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotecnologia – Manual de microbiologia industrial.** Editorial ACRIBIA, Zaragoza. 1993.

CUNHA, M. A. A. D.; GÓMEZ, R. J. H. C.; AMORIM, E. S. Goma curdlana: um importante hidrocolóide microbiano. **Semina: Ciências Agrárias.** v. 24, n. 2, p. 5, 2003.

DENARDIN, N. D.; FREIRE, J. R. J. Assessment of polymers for the formulation of legume inoculants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology.** v. 16, n. 3, p. 215-217, 2000.

DIAS, S. C. J. **Avaliação do potencial biotecnológico de fungos isolados de solos do cerrado da região de Unaí, Minas Gerais.** Dissertação de Mestrado. Programa de pós-graduação Stricto Sensu em Ciências Genômicas e Biotecnologia. Universidade Católica de Brasília, Brasília-DF, 2011.

DUBEY, S. C.; BHAVANI, R.; SINGH, B. Development of Pusa 5SD for seed dressing and Pusa Biopellet 10G for soil application formulations of *Trichoderma harzianum* and their evaluation for integrated management of dry root rot of mungbean (*Vigna radiata*). **Biological Control,** v. 50, p. 231-242, 2009.

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

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.

FAO. Previsão da safra 2010/2011. Disponível em:
<https://www.fao.org.br/download/ps2010/11.pdf> Acessado em: 15 out. 2010.

FARIA, A. Y. K.; CASSETARI NETO, D.; ALBUQUERQUE, M. C. A. Atividade antagônica *in vitro* de *Trichoderma harzianum* a patógenos de sementes de algodoeiro. **Revista Agricultura Tropical**. v. 6, n. 1, p. 59-68, 2002.

FERNÁNDEZ-LARREA, O.; ELÓSEGUI, O. Alternativas de producción de *Trichoderma* en Cuba. **Fitosanidad**. v.10. n. 2. p. 147, 2006.

FERREIRA, D. F. **Sistemas de análise estatística para dados balanceados**. Lavras: UFLA/DEX/SISVAR. p. 145, 2000.

FILHO, M.R.C.; MELLO, S.C.M.; SANTOS, R.P. e MENÊZES, J.E. Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético *in vitro* e colonização endofítica de mudas de eucalipto. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento 226**. Brasília, DF: EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 2008.

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

GARCIA, F. A. O.; ROMEIRO, R. S. **Biocontrole de mancha angular do feijoeiro por antagonistas bacterianos**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 46, n. 12, p. 1603-1608. 2011.

GARRAWAY, M. O.; EVANS, R. C. **Fungal nutrition and physiology**. p. 401, 1984.

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

GRAVEL, V; ANTOUN, H.; TWEDDELLI, R.J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, p. 1968–1977, 2007.

HARMAN, G. E. Seed treatments for biological control of plant disease. **Crop Protection**. v. 10. p. 166-171, 1991.

HARMAN, G. E. Myths and Dogmas of Biocontrol: Changes and Perceptions derived from Research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**. p. 377-393, 2000.

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

HARMAN, G. E. Overview of Mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phitopathology**, v. 96., n. 2, p. 190-194, 2006.

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.

HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S. e BISSET, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological Control**. v. 51. p. 409-416, 2009.

IMANDI S. B.; BANDARU V. V. R.; SOMALANKA S. R.; GARAPATI H. R. In.: Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, p. 1367-1372, 2006.

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.

JIN, X.; TAYLOR, A. G.; HARMAN, G. E. Development of media and automated liquid fermentation methods to produce desiccation-tolerant propagules of *Trichoderma harzianum*. **Biological Control**. p. 267-274. 1996.

KATZBAUER, B. Properties and applications of xanthan gum. **Polymer degradation and stability**. v 59, p 81-84, 1998.

KEISER, H. H. Rhizobial ecology and technology. In.: METTING, F. B. **Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management**. p. 205-226. 1992.

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.

KIOSSEOGLOU, A.; PAPALAMPROU, E.; MAKRI, E.; DAXASTAKIS, G.; KIOSSEOGLOU, V. Functionalaty of médium weight xanthan gum produced by xantomonas campestris ATCC 1395 in batch culture. **Food Tecnology**, v. 36, p. 425-430. 2003.

KRUGER, T.L.; BACCHI, L. M. A. Fungos. *In*: Filho, A. B.; Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J. A. M., Camargo, L. E. A. **Manual de Fitopatologia**. 3 ed. São Paulo, Agronômica Ceres. p. 46–95. 1995.

KUHN, G. C.; REGLA, R. A.; MAZZAROLLO, A. Produção de mudas de videira (*Vitis* spp.) por enxertia de mesa. **Circular Técnica 74**. EMBRAPA UVA E VINHO. 2007.

LECUONA, R. E. Ed. **Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga**. p. 338. 1996.

LILLY, V. G.; BARNETT, H. L. **Physiology of the fungi**. p. 464, 1951.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCMIDELLI, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda., v. 3, p. 125-154, 2001.

LIMA L. H. C.; DE MARCO J. L., FÉLIX C. R. **Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo**. *In*.: Controle Biológico. Editores: I. S. MELO, J. L. AZEVEDO. EMBRAPA MEIO AMBIENTE. v. 2. p. 263-304, 2009.

LITTER, M. **Farmacologia**. 3ª Ed. Buenos Aires: Al Ateneo. 1964.

LOHMANN R.T.; PAZUCH D.; STANGARLIN J. R.; SELZLEIN C., NACKE H.. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para controle de *Sclerotium rolfsii* em soja. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v. 2, n. 2, p. 1665-1668, 2007.

LOPES, R. B. A indústria no Controle Biológico: Produção e Comercialização de Microrganismos no Brasil. *In*: Bettiol W., Morandi M. A. B. **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas**, 2009.

LORDA, G. S., BALATTI, A.P. Designing media. *In*.: BALATTI, A. P.; FREIRE, J. R.J. **Legume inoculants. Selection and characterization of strains. Production, use and management**. 1996.

LUCON, C. M. M. **Promoção de crescimento de plantas com o uso de *Trichoderma* spp.** 2009. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_1/trichoderma/index.htm>. Acesso em 31 mai 2010.

LUDWIG, J.; MOURA, A. B.; SANTOS, A. S., RIBEIRO, A. S. Microbiolização de sementes para o controle da mancha-parda e da escaudadura em arroz irrigado. **Tropical Plant Pathology**, v. 34. n. 5. p. 322-328. 2009.

LUZ, W. C. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**. v. 26. 2001.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção “**in vitro**” para controle microbiológico. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 1, p. 369-409. 1993.

MARK, H. F.; BIKALES, N. M.; OVERBERGER, C. G.; MENGES, G. **Encyclopedia of Polymer Science and Engineering**. p. 198-239. 1985.

MEDUGNO, C. Formulação de agents microbianos para o controle de fitopatógenos. In: MELO, I. S.; SANHUEZA, R. M. V. (Coord.). Métodos de seleção de microrganismos antagonicos e fitopatógenos: manual técnico. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA. **Comunicado Técnico 1**. p. 135-156. 1991.

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

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

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna. EMBRAPA. 1998.

MELO, I. S.; COSTA, F. G. Desenvolvimento de uma formulação granulada a base de *Trichoderma harzianum* para controle de fitopatógenos. Jaguariúna: EMBRAPA MEIO AMBIENTE, **Comunicado Técnico 31**, 2005.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. IN DAS 13 de 25/03/2011. Disponível: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/legislação>>. Acessado em: 22 jan. 2012.

- MOHAMED, H. A-L. A.; HAGGAG, W. M. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. **Brazilian Journal Microbiology**. v. 37, n. 2, 2006.
- MOO-YOUNG, M. Comprehensive Biotechnology: The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry. **Agriculture and Medicine**, 1985.
- MORAES, S.A.; ALVES, S. B. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In.: **Controle Microbiano de Insetos**. ALVES, S. B. Ed. Manole Ltda., 1986.
- MOREIRA, A. S. **Produção, caracterização e aplicação de biopolímero sintetizado por cepas de *Xanthomonas campestris* pv. pruni**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pelotas, 2002.
- MUGNIER, J.; JUNG, G. Survival of bacteria and fungi in relation to water activity and the solvent properties of water in biopolymer. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, p. 108-114, 1995.
- NAKASONE, K.; PETERSON, S.; JONG. S. Preservation and Distribution of Fungal Cultures. **Biodiversity of Fungi Inventory and Monitoring Methods**. p. 37-47, 2004.
- NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. ***Fusarium* species: an illustrated manual for identification**. Pennsylvania/London: Trh Pennsylvania State University/ University Park and London. p. 193, 1993.
- NUSSINOVITCH, A. Hydrocolloid application – Gum technology in the food and other industries. Londres, **Blackie Academic e Professional**. p. 155-169,1997.
- OLIVEIRA L. P.; ROSSI, M. J.; FURIGO JÚNIOR, A.; SILVA FILHO, G. N., OLIVEIRA, V. L. Viability and infectivity of an ectomycorrhizal inoculum produced in an *airlift* bioreactor and immobilized in calcium alginate. **Environmental Microbiology**, v.37, n.3, 2006.
- PACE, G. W. Plímeros Microbianos. In: BULLOCK, J.; KRISTIANSEN, B. **Biotecnologia Básica**. 1991.
- PADILHA, F. F. **Produção de biopolímeros sintetizados por microorganismos**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

PANDOLFO, J. D. Dissertação de Mestrado: **Associação de *Trichoderma* sp. a fungicidas no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli***, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

PAPAVIZAS, G. C.; LEWIS, J. A.; ABD-ELMOITY, T. H. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to Benomyl and enhanced biocontrol capabilities. **Phytopathology**, v. 72. p. 126-132, 1982.

PARKER, A.; GUNNING, P. A.; ROBINS, M.M. **How does xanthan stabilize salad dressing?** Food Hydrocolloids, Oxford, v. 9, n. 4, p. 33-342.1995.

PAZZINI, S. S.; SILVA, C. G.; ARAÚJO, J. C.G. Avaliação da atividade de celulose de fungos isolados de solos da região de Tangará da Serra- MT. **II BIOTA. II Ciclo de Estudos em Biologia de Tangará da Serra I Ciclo Nacional de Estudos de Biologia**. Universidade do Estado de Mato Grosso. 2011.

PILIZOTA, V.; SUBARIC, D.; LOVRIC, T. Rheological properties of CMC dispersions at low temperatures. **Food technology and Biotechnology**. v. 34 . p. 87-90, 1996.

RELARE – Protocolo para análise da qualidade e da eficiência agrônômica de inoculantes, estirpes e outras tecnologias relacionadas ao processo de fixação biológica do nitrogênio em plantas leguminosas. In: XII REUNIÃO DA REDE DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO, PADRONIZAÇÃO E DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DE INOCULANTES MICROBIANOS DE INTERESSE AGRÍCOLA. **Anais**. 2007. Londrina, PR. EMBRAPA SOJA. 2007.

RESENDE, M. L.; OLIVEIRA, J. A.; GUIMARÃES, R. M.; VON, R. G. P., VIEIRA, A. R. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Cienc. Agrotec**. v. 28. p. 793-798. 2004.

ROCHA, J. R. S.; OLIVEIRA, N. T. Método de isolamento do solo de *Trichoderma antagônico a Colletotrichum gloeosporioides* agente da antracnose em maracujá (*Passiflora*). **Summa Phytopathologica**. v. 24. p. 180-183. 1998.

ROMEIRO, R.S. **Controle biológico de doenças de plantas–procedimentos**. Viçosa: Editora UFV. p. 172, 2007.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira Botânica**, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.

SAMUELS, G. J. **Trichoderma: A guide to identification and biology**. Beltsville: USDA/ARS, p. 54, 2006.

SANHUEZA, R. M. V. Controle biológico de doenças de fruteiras de clima temperado. In.: **VII Reunião de Controle Biológico de Fitopatógenos**. Bento Gonçalves. Anais. Bento Gonçalves: UFSM e EMBRAPA UVA E VINHO. p. 61-68, 2001.

SANTORO, P. H.; NEVES, P. M. O. J.; SILVA, R. Z.; AKIMI, S.; ZORZETTI, J. Produção de esporos de *Beauveria bassiana* (Bals). Vuill. num processo bifásico utilizando diferentes meios líquidos. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v. 26, n. 3, p. 313-320, 2005.

SANYANG, S.; VAN ENDEN, H. F.; MOORE, D. Laboratory Shelf-Life of Oil-Formulated Conidia of the Locust y Grasshopper Fungal Pathogen *Metarhizium flavoviridae* Gams & Rozsypal, in Mixtures with the Pyrethroid Insecticide Lambda-Cyhalothrin. **International Journal of Pest Management**. v. 46. p. 165-168, 2000.

SHUKLA, D. D.; MISHRA, A. Effect of salts on growth of *Trichoderma viride*. *Friesia*. v. 9, p. 299-301, 1970.

SILVA, C. M. M. S.; MELO, I. S. **Requisitos nutricionais para o fungo *Alternaria Alternata***. Notas Científicas. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 34, n. 3, p. 499-503. 1999.

SILVA K. S.; REBOUÇAS T. N. H.; BOMFIM M. P.; SILVA D. S.; SÃO JOSÉ A. R., BENETT C. G. S.. Atividade antagonica in vitro de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora*. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v. 29, n. 4, p. 749-754, 2008.

SIONKOWSKA, A. Interacion of collagen and poly (vinyl pyrrolidone) in blends. **European Polymer Journal**. p. 2135-2140. 2003.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. R. Doenças fúngicas e medidas de controle. EMBRAPA UVA E VINHO. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeprodução.cnptia.embrapa.br>>. Acessado em: 03 de agosto de 2012.

SOTO, L. J.; PÉREZ, M. A.; PERERA, E.; CASTAÑEDA, R.; RODRÍGUEZ, N.; GONZALES, J.; GONZÁLES, L. A.; VIZA, R.; MACÍAS, D., GONZÁLES N. Desarrollo y utilización de *Trichoderma viride* y *Glicocadium virens* como antagonistas de hongos fitopatogénicos. **Revista Agrotecnica de Cuba**. 2008

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M., PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens bentham*. **Acta Amazonia**. v. 34(2). p. 185-195. 2004.

STADNIK, M.J.; BETTIOL, W. Controle biológico de oídeos. In: MELO, I.S. de. AZEVEDO, J.L. (editores). **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA MEIO AMBIENTE. v. 3. p. 95-112. 2000.

STADNIK M.J., MARASCHIN M. Manejo ecológico de doenças de plantas. In: STADNIK M. J., TALAMINI V. (Eds.) **Indução de resistência de plantas a fitopatógenos**. Florianópolis, SC. Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. p. 221-244. 2004.

STREDANSKY, M.; CONTI, E.; NAVARINI, L.; BERTOCCHI, C. Production of bacterial exopolysaccharides by solid substrat fermentation. *Process Biochemistry*. v. 34, n. 1. p. 11-16. 1999.

SUTHERLAND, I. W. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*. v. 38, n. 4, p. 319-328. 1999.

TANAKA, C. A.; UENO, C. T.; GÓMEZ, R. J. H. C. **Estabilização de 6 Pentil Alfa Pirona com adição de adjuvantes tecnológicos**. XIV SICITE-UTFPR-VOLUME I-SEÇÃO ALIMENTOS. Londrina-PR. Disponível em: <http://www.nacamura.com.br/sicite/sicite2009/artigos_sicite2009/178.pdf>Acessado em: 28 nov. 2011.

TEDESCO, V. **Panorama e perspectivas de uso de Trichoderma spp. no manejo de patógenos radiculares com ênfase na cultura da soja**. Monografia no curso de Pós Graduação *Latu Sensu* "Tecnologias Inovadoras no Manejo Integrado de Pragas e Doenças de Plantas". UFRGS. Porto Alegre, RS. 2009.

THARANE, C.; JENSEN, D.F. e TRONSMO, A. Substrate colonization, strain competition, enzyme production in vitro, and biocontrol of *Pythium ultimum* by *Trichoderma* spp. isolates P1 and T3. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, p. 215 – 225, 2000.

ULHOA, C. J.; PEBERDY, J. F. Effect of carbon sources on chitobiase production by *Trichoderma harzianum*. **Mycology**. Res. v. 97, p. 45-48, 1992.

URENHA, L. C.; PRADELLA, J. G. C., RODRIGUES, M. F. A. **Esterilização de Equipamento**. In.: Engenharia Bioquímica. Editores: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCMIDELLI, W. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda. v. 2. p. 19-38, 2001.

URTUBIA, I.; FRANCE, A. **Formulaciones de hongos entomopatógenos para el control de plagas en la agricultura**. 2007. Disponível em: <<http://www.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR34779.pdf> > Acessado em: 12 set. 2011.

WANCHOO, R. K.; SHARMA, P. K. Viscometric study on the compatibility of some water-soluble polymer-polymer mixtures. **European Polymer Journal**, Coventry, v. 39, p. 1481-1490, 2003.

WIJESINGLE, C. J.; WIJERATNAM, R. S. W.; SAMARASEKARA, J.; WIJESUNDERA, R. Biological control of *Thielaviopsis paradoxa* on pineapple by an isolate of *Trichoderma asperellum*. **Biol. Control**. v. 53, n. 3. p. 285-290. 2010.

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