

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**UTILIZAÇÃO DE *Trichoderma* spp. NO CONTROLE DE
Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary E NO
CRESCIMENTO DE ALFACE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

GERARDA BEATRIZ PINTO DA SILVA

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

**UTILIZAÇÃO DE *Trichoderma* spp. NO CONTROLE DE
Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary E NO CRESCIMENTO
DE ALFACE**

GERARDA BEATRIZ PINTO DA SILVA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM/RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agronomia**.

Orientador: Prof^a. PhD. Elena Blume

Santa Maria, RS, Brasil

2013

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

Pinto da Silva, Gerarda Beatriz
UTILIZAÇÃO DE *Trichoderma* spp. NO CONTROLE DE
Sclerotinia sclerotiorum (Lib) de Bary E NO CRESCIMENTO
DE ALFACE / Gerarda Beatriz Pinto da Silva.-2013.
89 f.; 30cm

Orientadora: Elena Blume
Coorientadora: Marlove Fátima Brião Muniz
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, RS, 2013

1. Controle biológico 2. Mofo-branco 3. *Lactuca sativa*
L 4. Promoção de crescimento I. Blume, Elena II. Brião
Muniz, Marlove Fátima III. Título.

© 2013

Todos os direitos autorais reservados a Gerarda Beatriz Pinto da Silva. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor.

Endereço: Av. Roraima, Depto de Defesa Fitossanitária, prédio 42, sala 3225. Bairro Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900.

Fone: (0xx) 55 3220-8015; (0xx) 88 3421-1904; E-mail: gerardabeatriz@hotmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

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

**UTILIZAÇÃO DE *Trichoderma* spp. NO CONTROLE DE *Sclerotinia
sclerotiorum* (Lib.) de Bary E NO CRESCIMENTO DE ALFACE**

Elaborada por
Gerarda Beatriz Pinto da Silva

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Agronomia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Elena Blume, Ph.D.
(Presidente/Orientador)
UFSM

Luciana Zago Ethur, Dra.
UNIPAMPA

Josiane Pacheco Menezes, Dra.
UFSM

Santa Maria, 25 de fevereiro de 2013.

Dedicatória

Às pessoas mais importantes da minha vida

Pelo que me ensinaram e transmitiram

Pelo apoio incondicional e incessante

Pelo que sou

À minha mãe e ao meu irmão

À minha família

Aos meus amigos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram de uma forma ou de outra para a realização deste trabalho, em especial:

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela formação adquirida e oportunidade de realização do curso de mestrado.

À CAPES, pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de mestrado.

À professora Elena Blume pela oportunidade, orientação e confiança no meu trabalho.

À Profa. Dr^a. Marlove Fátima Brião Muniz, pela coorientação deste trabalho.

À banca examinadora, Dra. Josiane Pacheco Menezes e Dra. Luciana Zago Ethur, pela disposição para contribuir no meu trabalho.

À Leise Inês Heckler e Laura Engroff Scheeren bolsistas do projeto, “meu fiel secretariado”: agradeço pela amizade, apoio, troca de ideias, pela ajuda durante a execução deste trabalho e também pelos bons momentos de aprendizado e descontração que compartilhamos.

À Paulo Gustavo Lins pelo companheirismo, carinho, compreensão, incentivo e auxílio. Muito obrigada!

Aos queridos amigos e funcionários do Departamento de Defesa Fitossanitária, Maria Nevis Deconto Weber, Fernando Saccol Gnocato e Jorge Antônio França por todo o incentivo, auxílio e apoio dados, um agradecimento muito especial.

Ao funcionário Cláudio Correia pela colaboração no experimento realizado na casa de vegetação.

Aos amigos e colegas: Ricardo Feliciano dos Santos, Miria Rosa Durigon, Caciara Gonzatto, Johnathan Rodrigues, Paola Milanesi, Juceli Müller, meu sincero agradecimento.

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia da UFSM: Clair Walker, Patricia Migliorini, Ricardo Mezzomo, Gisele Noal, Cláudia Braga, Graziela Piveta, Bruna Bastos, Daniele Pedroso e Emanuele Junges por tornarem o laboratório um agradável ambiente de trabalho e auxílio, além das rodas de chimarrão.

Muito obrigada.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Descrição das amostras de solo. Santa Maria, RS. 2012	23
Tabela 2 Comparativo entre as escalas de Bell et al. (1982) e Rodrigues (2010) para o teste de pareamento de culturas. Santa Maria, RS. 2012.....	29
Tabela 3 Crescimento micelial (mm) dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>S. sclerotiorum</i> em meio de cultura BDA. Santa Maria, RS. 2012.....	34
Tabela 4 Classificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. quanto ao antagonismo a <i>S. sclerotiorum</i> segundo as escalas de Bell et al. (1982) e Rodrigues (2010) e porcentagem de inibição (%) de <i>S. sclerotiorum</i> . Santa Maria, RS. 2012	38
Tabela 5 Quantificação das UFC.g ⁻¹ presentes no pó de arroz colonizado com <i>Trichoderma</i> spp. obtidos de diferentes origens. Santa Maria, RS. 2012	60
Tabela 6 Emergência (%), plantas sobreviventes (%) e Índice de Velocidade de Emergência - IVE para plântulas de alface cv. Regina, oriundas de sementes tratadas com <i>Trichoderma</i> spp. obtido de diferentes origens, na ausência e presença de <i>S. sclerotiorum</i> . Santa Maria, RS. 2012	62
Tabela 7 Crescimento de parte aérea (CPA), crescimento do sistema radicular (CSR), matéria seca da parte aérea (MSPA) e do sistema radicular (MSSR) e matéria seca total (MST) para plântulas de alface cv. Regina, oriundas de sementes tratadas com <i>Trichoderma</i> spp. obtido de diferentes origens, na ausência e presença de <i>S. sclerotiorum</i> . Santa Maria, RS. 2012.....	64
Tabela 8 Porcentagem de plantas de alface (cv. Regina) sobreviventes, inoculadas com <i>S. sclerotiorum</i> e isolados de <i>Trichoderma</i> spp. armazenados e obtidos de áreas com e sem histórico da doença. Santa Maria, RS. 2012.....	68
Tabela 9 Número de folhas, diâmetro do colo e crescimento do sistema radicular (CSR) para plantas de alface cv. Regina, inoculadas com <i>S. sclerotiorum</i> e isolados de <i>Trichoderma</i> spp. armazenados e obtidos de áreas com e sem histórico da doença. Santa Maria, RS. 2012	73
Tabela 10 Matéria fresca da parte aérea (MFPA) e sistema radicular (MFSR), matéria seca da parte aérea (MSPA) e sistema radicular (MSSR) e matéria seca total (MST) para plantas de alface cv. Regina, inoculadas com <i>S. sclerotiorum</i> e isolados de <i>Trichoderma</i> spp. armazenados e obtidos de áreas com e sem histórico da doença. Santa Maria, RS. 2012	75
Tabela 11 UFC.g ⁻¹ de <i>Trichoderma</i> spp. na ausência e presença de <i>S. sclerotiorum</i> em substrato cultivado com alface cv. Regina. Santa Maria, RS. 2012.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Áreas de produção de hortaliça em Arroio Grande – Santa Maria/RS. A) Propriedade 1; B) Propriedade 2. (Fonte: Google Earth, 2012). Santa Maria, RS. 2012.....	22
Figura 2 A) Localização do campo 1 e 2 na câmara de Neubauer; B) Área dentro dos quadrados vermelhos para contagem de esporos de <i>Trichoderma</i> spp. Santa Maria, RS. 2012	27
Figura 3 Teste de confrontação direta em placas de Petri com discos contendo os isolados de <i>Trichoderma</i> spp. A) SP23 e B) ETSR20 e <i>S. sclerotiorum</i> , em lados opostos, após sete dias de incubação. Santa Maria, RS. 2012	28
Figura 4 Gabarito da Escala de Rodrigues (2010). Santa Maria, RS. 2012	29
Figura 5 População de <i>Trichoderma</i> spp. (UFC.g ⁻¹) em solo CP (com histórico de mofo-branco) e SP (sem histórico de mofo-branco). Barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Santa Maria, RS. 2012.....	31
Figura 6 Taxa de crescimento micelial (mm.h ⁻¹) de <i>S. sclerotiorum</i> e de <i>Trichoderma</i> spp. Barras referidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Santa Maria, RS. 2012	35
Figura 7 Esporulação de <i>Trichoderma</i> spp. (esporos.mL ⁻¹) cultivados em meio de cultura BDA. Barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Santa Maria, RS. 2012.....	37
Figura 8 Formação da zona de inibição de <i>Trichoderma</i> spp. em atividade antagônica a <i>S. sclerotiorum</i> . Santa Maria, RS. 2012	41
Figura 9 A) Vaso contendo, em extremos opostos, pó de arroz inoculado com <i>Trichoderma</i> spp. e grãos de arroz infestados com <i>S. sclerotiorum</i> . B) Muda de alface transplantada no centro do vaso, 24h após a inoculação. Santa Maria, RS. 2012.....	57
Figura 10 Colônias de <i>Trichoderma</i> spp. após o plaqueamento das suspensões feitas com o substrato amostrado, utilizando meio seletivo descrito por Rocha e Oliveira (1998). Santa Maria, RS. 2012	59
Figura 11 A) Crescimento do micélio característico do mofo-branco no substrato infestado apenas com <i>S. sclerotiorum</i> . B) <i>Damping-off</i> em mudas de alface cv. Regina, cultivadas em casa de vegetação. Santa Maria, RS. 2012	67

Figura 12 Notas para a severidade de mofo-branco em plantas de alface infestadas apenas com <i>S. sclerotiorum</i> e biocontrole do patógeno com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. armazenados, baseadas na escala de Cotxarrera (2002). Santa Maria, RS. 2012.....	69
Figura 13 Notas para a severidade de mofo-branco em plantas de alface infestadas apenas com <i>S. sclerotiorum</i> e biocontrole do patógeno com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. obtidos de áreas com histórico da doença, baseadas na escala de Cotxarrera (2002). Santa Maria, RS. 2012	70
Figura 14 Notas para a severidade de mofo-branco em plantas de alface infestadas apenas com <i>S. sclerotiorum</i> e biocontrole do patógeno com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. obtidos de áreas sem histórico da doença, baseadas na escala de Cotxarrera (2002). Santa Maria, RS. 2012	71

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 Identificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	89
---	----

RESUMO GERAL

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

UTILIZAÇÃO DE *Trichoderma* spp. NO CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary E NO CRESCIMENTO DE ALFACE

AUTORA: GERARDA BEATRIZ PINTO DA SILVA

ORIENTADOR: ELENA BLUME

LOCAL E DATA DA DEFESA: SANTA MARIA, 25 DE FEVEREIRO DE 2013.

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é responsável por perdas significativas na produção de alface. Por se tratar de um fungo de solo, seu manejo é dificultado, sendo uma alternativa, o uso do controle biológico utilizando espécies do gênero *Trichoderma*. Dentre os muitos fatores que podem interferir no desempenho desse antagonista, a origem dos isolados e o armazenamento são ainda pouco estudados. Pouco se sabe também a respeito de como isolados de *Trichoderma* spp. obtidos de áreas com e sem histórico da doença mofo-branco e isolados armazenados podem afetar o controle de doenças e o crescimento em alface. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram quantificar populações de espécies do gênero *Trichoderma* em solo adjacente às raízes de alface, em áreas comerciais com e sem histórico de mofo-branco, avaliar a velocidade de crescimento e antagonismo *in vitro* dos isolados de *Trichoderma* spp. e *S. sclerotiorum*, examinar o antagonismo *in vivo* de *S. sclerotiorum* utilizando isolados de *Trichoderma* spp. nativos obtidos em áreas comerciais com e sem histórico de mofo-branco e isolados armazenados, em plântulas e plantas de alface, além de identificar em nível de espécie os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados. Os ensaios foram realizados no laboratório de fitopatologia da UFSM e em casa de vegetação na cidade de Santa Maria, RS, Brasil. Os parâmetros avaliados foram crescimento micelial dos isolados, esporulação de *Trichoderma* spp. e confrontação direta com o patógeno *in vitro*. Já *in vivo* foram avaliados germinação, % de plantas sobreviventes, severidade da doença, número de folhas, crescimento de parte aérea e do sistema radicular, matéria seca da parte aérea e do sistema radicular e matéria seca total no cultivo de alface. Os resultados indicam que a população de *Trichoderma* spp. é diferente entre as áreas amostradas com e sem histórico de mofo-branco e que os isolados de *Trichoderma* spp. oriundos de áreas com histórico da doença, tiveram maior velocidade de crescimento micelial quando comparado aos isolados obtidos de áreas sem histórico e aos armazenados. Resultados *in vitro* apontam que a maior esporulação, medida em esporos.mL⁻¹, foi apresentada por UFSMT15.1, UFSMT17 e CP22, e, que os isolados armazenados apresentaram melhores respostas na confrontação direta contra *S. sclerotiorum*. Para a produção em larga escala, os isolados CP12, CP21, SP13 e SP24 apresentaram-se como boas alternativas. O fornecimento de *Trichoderma* spp. promoveu plântulas de alface de boa qualidade e controle eficiente do patógeno, sendo os isolados CP21 e SP24 capazes de reduzir a severidade dos danos causados por *S. sclerotiorum* em plantas de alface. Atuaram influenciando positivamente o crescimento em plantas de alface os isolados UFSMT15.1, TC1.15, ETSR20 e SP13 na ausência, enquanto UFSMT15.1, CP22 e SP13 apresentaram bons resultados na presença do patógeno. No entanto, os isolados de *Trichoderma* spp. nativos obtiveram maiores populações no substrato cultivado com plantas de alface, do que os isolados armazenados.

Palavras-chave: controle biológico; mofo-branco; *Lactuca sativa* L; promoção de crescimento.

ABSTRACT GENERAL

Master of Science Dissertation
Graduate Program in Agronomy
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

USE OF *Trichoderma* spp. IN THE CONTROL OF *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary AND IN THE GROWTH OF LETTUCE

AUTHOR: GERARDA BEATRIZ PINTO DA SILVA

ADVISOR: ELENA BLUME

LOCATION AND DATE OF PRESENTATION: SANTA MARIA, 25 FEBRUARY 2013.

The fungus *Sclerotinia sclerotiorum* is responsible for significant production losses in lettuce. Because it is a soil fungus, its management is difficult and an alternative, is the use of biological control using species of the genus *Trichoderma*. Among the many factors that can interfere with the performance of this antagonist, the origin of the isolates and storage are still poorly studied. Little is also known about how *Trichoderma* spp. isolates obtained from areas with and without a history of white mold disease and stored isolates can affect disease control and growth in lettuce. Thus, the objectives of this study were to quantify populations of species of the genus *Trichoderma* in soil adjacent to the roots of lettuce in commercial areas with and without a history of white mold, evaluate the growth rate and *in vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. and *S. sclerotiorum*, examine the *in vivo* antagonism of *S. sclerotiorum* using natives *Trichoderma* spp. isolates obtained from commercial areas with and without a history of white mold and stored isolates on seedlings and plants of lettuce, and to identify at the level species the isolates of *Trichoderma* spp. used. Assays were performed in the laboratory of phytopathology at UFSM and in a greenhouse at the town of Santa Maria, RS, Brazil. The parameters evaluated were mycelial growth of the isolates, sporulation of *Trichoderma* spp., and direct confrontation with the pathogen *in vitro*. *In vivo* were evaluated germination, % of surviving plants, disease severity, number of leaves, shoot and root growth dry matter of shoot and root, and total dry matter of lettuce. The results indicate that the population of *Trichoderma* spp. is different between sampling sites with and without a history of white mold and that *Trichoderma* spp. isolates from areas with a history of the disease had higher mycelial growth rates when compared to isolates from areas with no history and to isolates stored. *In vitro* results indicate that highest sporulation, as esporos.mL⁻¹, was presented by UFSMT15.1, UFSMT17 and CP22, and that the isolates stored showed better responses in direct confrontation against *S. sclerotiorum*. For large scale production, the isolates CP12, CP21, SP13 and SP24 were found to be good alternatives. *Trichoderma* spp. promoted lettuce seedlings of good quality and a good control of the pathogen, being the isolates SP24 and CP21 able to reduce the severity of damage caused by *S. sclerotiorum* in lettuce. The isolates UFSMT15.1, TC1.15, ETSR20 and SP13 influencing positively the growth of lettuce in the absence, while UFSMT15.1, SP13 and CP22 showed good results in the presence of the pathogen. However, native isolates of *Trichoderma* spp. had higher populations on the substrate cultivated with lettuce than the stored isolates.

Key words: biological control; white mold; *Lactuca sativa* L; growth promotion.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
BIOCONTROLE DE <i>S. sclerotiorum</i> <i>in vitro</i> UTILIZANDO <i>Trichoderma</i> spp. DE DIFERENTES ORIGENS	18
1. INTRODUÇÃO	18
2. MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1 Coletas de solo	22
2.2 Quantificação da população de <i>Trichoderma</i> spp. presente nas amostras de solo..	23
2.3 Obtenção de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	24
2.4 Obtenção do isolado de <i>S. sclerotiorum</i>	25
2.5 Desenvolvimento de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>S. sclerotiorum</i> em meio de cultura	25
2.5.1 Crescimento micelial	25
2.5.2 Taxa de crescimento micelial	26
2.5.3 Quantificação de esporos de <i>Trichoderma</i> spp. em meio de cultura	26
2.6 Controle <i>in vitro</i> de <i>S. sclerotiorum</i>	27
2.7 Identificação das espécies de <i>Trichoderma</i> spp.	29
2.8 Análise estatística	30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.1 Quantificação da população de <i>Trichoderma</i> spp. presente nas amostras de solo .	30
3.2 Identificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	32
3.3 Desenvolvimento de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>S. sclerotiorum</i> em meio de cultura	33
3.3.1 Crescimento micelial	33
3.3.2 Taxa de crescimento micelial	35
3.3.3 Quantificação de esporos de <i>Trichoderma</i> spp. em meio de cultura	36
3.4 Controle <i>in vitro</i> de <i>S. sclerotiorum</i>	38
4. CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

BIOCONTROLE DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary E CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS E PLANTAS DE ALFACE UTILIZANDO <i>Trichoderma</i> spp. DE DIFERENTES ORIGENS	50
5. INTRODUÇÃO	50
6. MATERIAL E MÉTODOS	53
6.1 Tratamentos e delineamento experimental	53
6.2 Obtenção de inóculos de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>S. sclerotiorum</i>.....	53
6.2.1 Inóculos de <i>Trichoderma</i> spp.	53
6.2.2 Inóculos de <i>S. sclerotiorum</i>	54
6.2.3 Quantificação das UFC.g ⁻¹ do pó de <i>Trichoderma</i> spp.	54
6.3 Biocontrole de <i>S. sclerotiorum</i> e promoção de crescimento em plântulas de alface utilizando <i>Trichoderma</i> spp.	55
6.4 Biocontrole de <i>S. sclerotiorum</i> e promoção de crescimento em plantas de alface utilizando <i>Trichoderma</i> spp.	56
6.5 Quantificação das UFC.g⁻¹ de <i>Trichoderma</i> spp. no substrato inoculado.....	58
6.6 Análise estatística	59
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
7.1 Quantificação das UFC.g⁻¹ do pó de <i>Trichoderma</i> spp.	59
7.2 Biocontrole de <i>S. sclerotiorum</i> e promoção de crescimento em plantas de alface utilizando <i>Trichoderma</i> spp.	61
7.3 Sobrevivência e severidade do mofo-branco, em plantas de alface	67
7.4 Biocontrole de <i>S. sclerotiorum</i> e promoção de crescimento em plantas de alface utilizando <i>Trichoderma</i> spp.	72
7.5 Quantificação das UFC.g⁻¹ de <i>Trichoderma</i> spp. no substrato inoculado.....	78
8. CONCLUSÕES	80
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 81

INTRODUÇÃO

Devido à sua grande capacidade de adaptação às diversas condições climáticas encontradas em solos brasileiros, também considerando a capacidade de cultivos sucessivos em um mesmo ano, a alface (*Lactuca sativa* L.) tem se configurado como uma das hortaliças mais cultivadas no Brasil. Tendo sua comercialização assegurada, torna-se a hortaliça de plantio preferido pelos produtores de agricultura familiar e sua produção é geralmente restrita aos cinturões verdes, situados próximos aos centros urbanos.

No entanto, há uma doença limitante para a cultura conhecida popularmente como mofo-branco, causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, causando perdas de produção de aproximadamente 75% e em casos mais severos podendo chegar a 100%. Esse fungo encontra-se mundialmente distribuído, concentrando-se em regiões de clima temperado e subtropical, causando perdas não só em hortaliças como também em grandes culturas como soja, feijão, amendoim e girassol.

A infecção causada pelo fungo ocorre principalmente devido aos escleródios, estruturas de resistência que apresentam capacidade para permanecerem viáveis no solo por longos períodos de tempo, podendo passar de 10 anos. Isso preocupa muitos produtores, uma vez que *S. sclerotiorum* apresenta uma larga gama de hospedeiros, atingindo mais de 400 espécies, o que dificulta o seu controle através da rotação de culturas. A inexistência de cultivares de alface resistentes ao fungo aumenta os problemas para os agricultores.

Nos estágios iniciais da doença ocorre a murcha das folhas basais, que frequentemente caem no solo desenvolvendo um micélio cotonoso típico, no qual há a formação dos escleródios, tornando-se a principal fonte de inóculo para cultivos subsequentes. Diferentes formas de controle têm sido utilizadas a fim de reduzir a incidência da doença, sendo mais usuais as práticas culturais e a aplicação de fungicidas, tais como, dicloran, iprodione, vinclozolin e, mais recentemente, fludioxinil e fluazinam, que têm sido ineficientes no controle da doença, já existindo relatos de resistência à iprodione e vinclozolin sob condições laboratoriais.

Diante do exposto, os problemas causados por fungicidas encorajam produtores e pesquisadores a buscarem práticas alternativas de controle. Nesse sentido, diversos estudos envolvendo estratégias de controle biológico no manejo de *S. sclerotiorum* têm sido realizados, utilizando fungos micoparasíticos com habilidade para degradar hifas e

escleródios. Os mais comuns pertencem ao gênero *Trichoderma* e são largamente utilizados em nível de campo, devido aos seus diversos mecanismos de ação, incluindo competição por nutrientes, produção de metabólitos voláteis e não voláteis e produção de enzimas hidrolíticas. Na prática, *Trichoderma* spp. apresenta excelente competência rizosférica, fato que se reflete em vantagem no controle de fitopatógenos de solo, visto que um agente de biocontrole não pode competir por espaço e nutrientes se não tiver capacidade para se desenvolver na rizosfera.

A rizosfera das plantas é o local de crescimento de muitos agentes de biocontrole, assim como o local de infecção de vários fitopatógenos, resultando na interação patógeno-antagonista que, por fim, mantém a atividade de espécies do gênero *Trichoderma* presentes no solo. O entendimento do ambiente rizosférico de diferentes espécies vegetais, bem como, de plantas doentes e saudáveis, torna-se um importante aliado para compreender a eficácia dos agentes de biocontrole para que, diante da utilização de um manejo adequado, se alcance uma diversificação do micro-habitat, tornando-o mais favorável aos micro-organismos antagonistas.

A eficácia do uso de *Trichoderma* spp. como agente de biocontrole requer um entendimento aperfeiçoado da ecologia da rizosfera, uma vez que tais fungos são ubíquos e a sua colonização é seriamente afetada pela presença de substratos orgânicos no solo. Com isso, um melhor entendimento da sua dinâmica populacional pode oferecer importante artifício no uso dessas populações em sistemas de produções agrícolas. Mesmo assim, os efeitos positivos dos agentes biológicos não são limitados ao controle de doenças, muitas espécies também atuando como promotoras de crescimento e de desenvolvimento de plantas. No entanto, ainda há deficiência na literatura sobre a caracterização desse fungo antagonista em áreas com cultivo de hortaliças, em especial de alface, na presença e ausência da doença mofo-branco.

Apesar do uso constante de *Trichoderma* spp. no controle de doenças, existem poucas informações sobre a sobrevivência e a manutenção da atividade desses organismos sob condições de armazenamento. Para um eficiente programa de controle de doenças é de suma importância conhecer a viabilidade desses micro-organismos, visto que constantes repicagens podem causar alterações na virulência e decréscimo de sua atividade antagonista. Nesse sentido, isolados de *Trichoderma* spp. nativos têm se mostrado mais eficientes no controle de doenças do que isolados comerciais armazenados. É possível que haja uma diversificação na eficiência desses isolados nativos, no biocontrole de *S. sclerotiorum* e crescimento de alface, utilizando *Trichoderma* spp. obtidos de áreas com e sem histórico de mofo-branco.

Diante do exposto, pondo em questão o patossistema “*S. sclerotiorum* – alface” os objetivos deste trabalho foram:

- Quantificar a população de *Trichoderma* spp. em solo adjacente às raízes de alface, em áreas de cultivo sucessivo, com histórico de mofo-branco;
- quantificar a população de *Trichoderma* spp. em solo adjacente às raízes de alface, em áreas de primeiro cultivo de hortaliças, sem histórico de mofo-branco;
- avaliar em meio de cultura a velocidade de crescimento dos isolados de *Trichoderma* spp. e *S. sclerotiorum*;
- examinar *in vitro* o antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *S. sclerotiorum* utilizando isolados do antagonista nativos, obtidos em áreas comerciais com e sem histórico de mofo-branco e isolados armazenados;
- examinar *in vivo* o antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *S. sclerotiorum* utilizando isolados do antagonista nativos, obtidos em áreas comerciais com e sem histórico de mofo-branco e isolados armazenados, no cultivo de plântulas e plantas de alface;
- identificar, em nível de espécie, os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados nos ensaios.

BIOCONTROLE DE *S. sclerotiorum* in vitro UTILIZANDO *Trichoderma* spp. DE DIFERENTES ORIGENS

1. INTRODUÇÃO

Originária da Ásia, a alface (*Lactuca sativa* L.) chegou ao Brasil através dos portugueses no século XVI (TRANI et al., 2005). Pertencente à família Asteraceae, é considerada a hortaliça folhosa mais importante na alimentação do brasileiro (YURI et al., 2002), além de estar entre as mais consumidas no mundo (GOMES et al., 2008). De grande importância na alimentação humana, a alface, destaca-se principalmente, como fonte de vitaminas e sais minerais (COMETTI et al., 2004) e por seu baixo valor calórico. Sendo bastante utilizada em dietas balanceadas, é frequentemente recomendada por nutricionistas.

De clima temperado, a cultura melhor se adapta às temperaturas baixas, enquanto a máxima tolerável fica em torno de 30 °C a mínima situa-se em 6 °C. A umidade relativa mais adequada ao bom desenvolvimento da alface varia de 60 a 80%, porém quando muito elevada favorece a ocorrência de doenças, que constitui um sério problema para seu cultivo em ambiente protegido (CERMEÑO, 1990). São conhecidos aproximadamente 75 tipos de doenças para a cultura, devendo ser evitado quando possível o uso de agrotóxicos no controle fitossanitário, visto que estes quando usados repetidas vezes, deixam resíduos nas plantas e no solo (FILGUEIRA, 2008). A grande suscetibilidade da alface às doenças torna-se um fator limitante para a produção dessa hortaliça nas principais regiões produtoras do Brasil.

No estado do Rio Grande do Sul, a alface é produzida durante todo o ano, havendo, no entanto, dois períodos com condições climáticas pouco favoráveis: o verão, quando ocorrem elevadas temperatura do ar e radiação solar, beneficiando o florescimento precoce, e o inverno com ocorrência de baixas temperaturas e chuvas prolongadas que podem retardar o seu crescimento (SEGOVIA et al., 1997). Esse último apresenta as condições ideais para o desenvolvimento do fungo *S. sclerotiorum*, causador de uma das principais doenças da cultura, o mofo-branco. No Brasil, a ocorrência dessa doença foi registrada pela primeira vez em 1921, no estado de São Paulo na cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.) e desde então tem sido relatada em diversas regiões do país.

O fungo *S. sclerotiorum* causa uma série de sintomas, que vão das podridões de pré e pós-emergência, *damping-off*, murcha das folhas, podridão do colo, raiz e coroa até necrose total dos tecidos (KIMATI et al., 2005), causando perdas significativas desde os estádios iniciais de desenvolvimento de diversas culturas, caso não haja a prevenção e/ou o controle adequados. Em alface, a infecção normalmente tem início nas folhas próximas à superfície do solo, aparecendo na forma de podridões aquosas, que atingem os pecíolos e causam a morte das folhas, que murcham e prostram-se no solo.

Uma característica típica do ataque desse fungo em alface é o aparecimento de micélio cotonoso (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006) nos tecidos mais velhos da planta, ocorrendo subsequentemente a perda da chamada “saia” da alface, ou seja, as folhas basais colapsam, e frequentemente desenvolvem escleródios de várias formas e tamanhos. Tal processo infectivo impede a translocação de nutrientes para tecidos mais novos, limitando assim o desenvolvimento da planta (SAHARAN; MEHTA, 2008). De modo geral, a infecção por *S. sclerotiorum* também pode viabilizar a ocorrência de bactérias e fungos oportunistas, que apodrecem e rotineiramente matam as plantas.

Em virtude de dificuldades como a falta de resistência varietal de alface a *S. sclerotiorum* (LI; HUANG; ACHARYA, 2003), resistência a fungicidas por populações do patógeno, acúmulo de resíduos deixados por agroquímicos no meio ambiente e com o avanço do sistema de produção orgânica, há o interesse na busca por práticas de controle alternativas. De acordo com Vieira et al. (2001), o controle desse fitopatógeno pode ser realizado por meio de fungicidas, porém, esse método apresenta uma eficácia duvidosa, pois não consegue controlar a doença sob condições de alta infestação. Desse modo, uma alternativa para o manejo da doença é a aplicação de micro-organismos antagonistas, que visam à redução do potencial de inóculo na área, pela capacidade parasítica a escleródios e apotécios.

O gênero *Trichoderma* Pers. (Hypocreales: Hypocreaceae) constitui o grupo de agentes de biocontrole de fitopatógenos mais estudado no mundo. Está entre os fungos mais comuns existentes na natureza, podendo ser encontrado em diversos ecossistemas, desde tundra a ambientes tropicais. Sua capacidade de sobreviver em diferentes regiões pode ser atribuída à diversidade de metabólitos produzidos e pela agressividade natural (LOPES et al., 2012). Dentre as espécies desse gênero, *Trichoderma harzianum* Rifai é a que apresenta o maior número de indivíduos e a maior distribuição (SAMUELS, 2006), tendo capacidade para agir diretamente sobre *S. sclerotiorum*.

O primeiro caso reportado de controle biológico utilizando espécies do gênero *Trichoderma*, data dos anos 30 (WEINDLING, 1932), em que *Trichoderma lignorum* (Tode)

Harz foi descrito micoparasitando *Rhizoctonia solani* J. G. Kühn em mudas de citros. Weindling descobriu que *T. lignorum*, em certas circunstâncias, atuava como competidor por nutrientes e dois anos depois (WEINDLING, 1934) relatou que a espécie produzia um princípio letal. Já nos anos 40, Weindling (1941) chamou esse princípio de gliotoxina e provou sua toxicidade a *R. solani* e *Sclerotinia americana* Norton & Ezekiel. Anos depois, descobriu-se que tal composto não era produzido por *T. lignorum*, mas por *Gliocladium virens* (Miller, Giddens & Foster) von Arx (WEBSTER; LOMAS, 1964) espécie esta, que posteriormente foi renomeada para *Trichoderma virens* (Miller, Giddens & Foster) von Arx (REHNER; SAMUELS, 1994).

Trichoderma spp. também possuem diversos mecanismos de ação contra patógenos que incluem: competição por nutrientes e espaço; secreção de compostos antibióticos tais como trichodermina, tricotecenos, trichorzianinas ou gliotoxinas; efeitos tóxicos indiretos devido aos compostos voláteis, além de apresentarem capacidade micoparasítica (BROZÓVÁ, 2004). O micoparasitismo é baseado na relação que um fungo tem de obter direta ou indiretamente nutrientes pela invasão de outro fungo (GAO, 2005) e a habilidade de um fungo em parasitar outro é parcialmente determinada pelas condições físicas, químicas ou nutricionais (BENÍTEZ et al., 2006). Essa interação inicia-se pelo quimiotropismo, quando substâncias químicas produzidas pelo patógeno estimulam o crescimento das hifas do antagonista em sua direção (CHET; HARMAN; BAKER, 1988).

Em estudos realizados *in vitro*, Viterbo et al. (2002) relatam que isolados de *Trichoderma* spp. nativos são mais agressivos do que os armazenados. Testes *in vivo* mostram que *T. harzianum* nativos são mais efetivos no controle do patógeno do que cepas comerciais armazenadas (ABDULLAH; ALI; SULEMAN, 2008). Em contrapartida estudos anteriores afirmam que esporos de *Trichoderma atroviride* Karst P1 permanecem pelo menos um ano armazenados sem perda de viabilidade (HJELJORD; TRONSMO, 2003). A importância da utilização de estirpes de *Trichoderma* spp. nativas de uma determinada região é evidenciada principalmente pela adaptabilidade às condições ambientais a que são submetidas (RABEENDRAN et al., 2006).

O controle biológico destaca-se não só por sua capacidade de interferir na relação patógeno-hospedeiro, mas também por intervir na comunidade antagonista, na microflora adjacente aos locais de infecção e na sua interação com todo o agroecossistema (SAITO et al., 2009). Adicionalmente, em sistemas orgânicos há grande possibilidade de descoberta de agentes microbianos benéficos com persistência e atividade superiores aos obtidos em sistemas convencionais (SILVA et al., 2009). Informações sobre a influência da comunidade

de fungos antagonistas em áreas de produção orgânica, com e sem histórico de mofo-branco, ainda são pouco frequentes na literatura.

Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo:

- Quantificar a população de *Trichoderma* spp. em solo adjacente às raízes de alface, nas áreas amostradas de cultivo sucessivo, com histórico de mofo-branco;
- quantificar a população de *Trichoderma* spp. em solo adjacente às raízes de alface, nas áreas amostradas de primeiro cultivo de hortaliças, sem histórico de mofo-branco;
- avaliar a taxa de crescimento micelial dos isolados de *S. sclerotiorum* e *Trichoderma* spp. em meio de cultura;
- avaliar *in vitro* o antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *S. sclerotiorum* utilizando isolados do antagonista nativos, obtidos em áreas comerciais com e sem histórico de mofo-branco e isolados armazenados;
- identificar, em nível de espécie, os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados nos ensaios.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia Dra. Elocy Minussi, pertencente ao Centro de Ciências Rurais (CCR) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) – RS, no período de agosto de 2011 a outubro de 2012. As coletas de solo foram realizadas em quatro áreas comerciais de duas propriedades no distrito de Arroio Grande (Figura 1), pertencente ao município de Santa Maria/RS, com as seguintes coordenadas geográficas: Propriedade 1 (29°39'50,31"S; 53°39'2,40"W) e Propriedade 2 (29°39'22,14"S; 53°39'1,24"W).

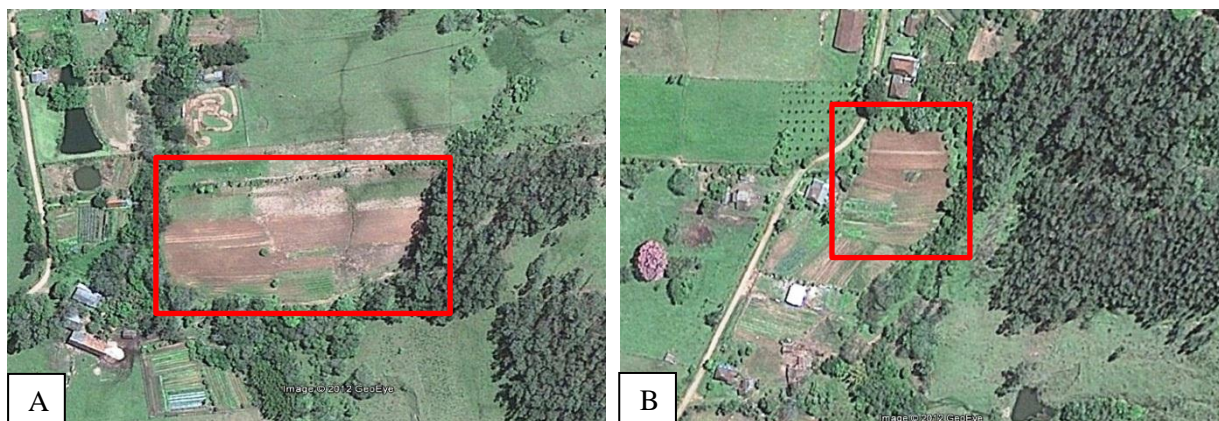


Figura 1 Áreas de produção de hortaliça em Arroio Grande – Santa Maria/RS. A) Propriedade 1; B) Propriedade 2. (Fonte: Google Earth, 2012). Santa Maria, RS. 2012

2.1 Coletas de solo

Oito amostras de solo foram coletadas em quatro áreas comerciais do distrito de Arroio Grande – Santa Maria/RS, cada uma sendo composta por quatro subamostras obtidas em zigue-zague dentro das áreas de cultivo orgânico de alface. Quatro amostras foram coletas de solo em áreas onde foi constatada a presença da doença mofo-branco e quatro amostras em áreas de primeiro cultivo da hortaliça, que antes do plantio estavam em pousio e não apresentavam histórico da doença (Tabela 1). O solo foi retirado com o auxílio de uma pá de corte, coletando-se sempre raízes com o solo aderido. Em seguida, realizou-se a separação desse material, utilizando-se apenas o solo que foi acondicionado em sacos plásticos e levado ao laboratório. As amostras de solo permaneceram sob refrigeração até serem usadas nos ensaios de quantificação e isolamento de *Trichoderma* spp.

Tabela 1 Descrição das amostras de solo. Santa Maria, RS. 2012

Amostra	Áreas	<i>S. sclerotiorum</i>
CP11	1	Com mofo-branco
CP21		
CP12	2	
CP22		
SP13	3	Sem mofo-branco
SP23		
SP14	4	
SP24		

2.2 Quantificação da população de *Trichoderma* spp. presente nas amostras de solo

A partir das oito amostras de solo coletadas, realizou-se a quantificação das Unidades Formadoras de Colônia por grama de solo (UFC.g⁻¹), com o objetivo de verificar e quantificar a presença de *Trichoderma* spp., permitindo a comparação do número de UFC.g⁻¹ presentes nas amostras de solo com e sem histórico da doença mofo-branco.

Para as diluições seriais, 10 g de solo foram diluídos em 90 mL de água destilada esterilizada, acrescido de duas gotas de espalhante adesivo (Tween[®] 80), em frascos que permaneceram em agitador mecânico tipo Fisher – Flexa Mix™ (USA) durante 5 min. Dessa suspensão inicial, uma diluição de 10 vezes foi realizada, ou seja, 1 mL da solução foi acrescentado em um tubo de ensaio contendo 9 mL de água destilada e esterilizada. Dessa solução, uma alíquota de 0,5 mL foi transferida para placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), acrescido de sulfato de estreptomicina (1 mL/100 mL de meio). A suspensão foi espalhada sobre o meio de cultura com o auxílio de uma alça de Drigalski, e as placas incubadas em câmara BOD a 24 °C e fotoperíodo de 12 h, por quatro dias. Após o período de incubação, foi realizada a quantificação das UFC.g⁻¹ de *Trichoderma* spp., com o auxílio do Contador de Colônias CP 600 Plus, através da contagem das UFC presentes no meio de cultura.

2.3 Obtenção de isolados de *Trichoderma* spp.

Foram utilizados 12 isolados de *Trichoderma* spp., dos quais quatro estavam armazenados na micoteca da UFSM e os oito restantes obtidos um de cada amostra de solo coletadas. Dos quatro isolados armazenados, dois foram coletados e identificados por Menezes (2007), sendo eles UFSMT15.1 e UFSMT17, em função das respostas positivas ao biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*, os quais se encontravam armazenados em geladeira com temperatura de 4 °C em frascos de vidro hermeticamente fechados, contendo discos de meio BDA com estruturas dos fungos imersas em água estéril. Para a identificação, foi realizada a caracterização molecular, o isolado UFSMT17 possui 99% de similaridade filogenética com a espécie *Trichoderma aureoviride* Rifai e o isolado UFSMT15.1 com *Trichoderma koningiopsis* Samuels, Suárez & Evans. O isolado ETSR20 foi obtido por Ethur (2006), a partir de coletas em solo rizosférico de tomateiro cultivado em horta e estufa, com excelente potencial antagônico a *Fusarium solani* (Mart.) Hans. A identificação morfológica do isolado confirmou que o mesmo pertence à espécie *T. harzianum*. Já o isolado TC1.15 foi obtido a partir de solo coletado de área comercial com cultivo de crisântemo (OLIVEIRA, 2007) com histórico de mofo-branco, porém o mesmo não havia sido identificado pela autora.

Para a obtenção dos oito isolados nativos de *Trichoderma* spp., sendo quatro de áreas com histórico de mofo-branco e quatro de áreas sem histórico, foi usado o método de iscas (GHINI; KIMATI, 1989). Este método consiste na utilização de trouxas feitas com gaze hidrófila (13 fios.cm²; 7,5 cm x 7,5 cm com quatro dobras) e barbante, contendo cinco escleródios de *S. sclerotiorum* cada uma (ETHUR et al., 2005), enterradas em 400 g de solo, de cada área amostrada, depositados em copos de Becker com capacidade para um litro. O solo foi previamente umedecido com 10 mL de água destilada e esterilizada e os copos de Becker cobertos com papel alumínio, mantidos em temperatura câmara climatizada (com variação de 25 a 28 °C), sem a incidência direta da luz.

Decorrido um período de 30 dias de incubação, as trouxas foram retiradas do solo e os escleródios foram imersos, por um minuto, em álcool (70%) e hipoclorito de sódio (0,5%). Em seguida, foram lavados três vezes em água destilada e esterilizada, deixando secar sobre papel-filtro esterilizado. Depois de secos, foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA e mantidos em câmaras BOD por sete dias.

Os fungos que cresceram com micélio característicos de *Trichoderma* spp., encontrados nos escleródios, foram repicados para placas de Petri com meio BDA. Após o isolamento desses fungos foi confirmada sua identificação, em nível de gênero, feita com o auxílio de microscópio estereoscópico e ótico, conforme literatura (BARNETT; HUNTER, 1999). Foi selecionado um isolado de cada área amostrada, contabilizando assim, quatro isolados obtidos de áreas com histórico de mofo-branco, quatro de áreas sem histórico da doença e quatro isolados que estavam armazenados na coleção da UFSM, totalizando 12 isolados de *Trichoderma* spp.

2.4 Obtenção do isolado de *S. sclerotiorum*

O isolado de *S. sclerotiorum* foi obtido a partir de um escleródio coletado de alface infectada com mofo-branco, o qual foi levado até o laboratório, onde foi realizada sua assepsia (álcool 70% por um minuto, solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por um minuto e água destilada e esterilizada). A estrutura foi transferida para placa de Petri contendo meio BDA, sendo incubada no escuro a 25 °C. Após o crescimento da colônia, que ocorreu aos sete dias, foi verificado o crescimento característico do micélio branco do fungo e formação de escleródios, a partir dessa placa foram feitas repicagens do patógeno, permanecendo em câmaras BOD até serem usadas nos ensaios.

2.5 Desenvolvimento de *Trichoderma* spp. e *S. sclerotiorum* em meio de cultura

2.5.1 Crescimento micelial

Os 12 isolados de *Trichoderma* spp. e um de *S. sclerotiorum* foram multiplicados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e aos cinco dias tiveram discos de 10 mm de diâmetro cortados e depositados no centro de placas contendo BDA, sendo avaliados quanto ao crescimento micelial de ambos os fungos e a esporulação apenas de *Trichoderma* spp. As medições para o crescimento micelial foram realizadas diariamente até o quinto dia de incubação, realizada em câmaras BOD, mensuradas com o auxílio de um paquímetro digital,

em dois sentidos perpendiculares marcados no fundo de cada placa, para que as medidas sempre fossem no mesmo sentido. Para originar os dados de crescimento micelial, utilizaram-se as médias de duas medidas perpendiculares obtidas das placas.

2.5.2 Taxa de crescimento micelial

Com os dados obtidos no crescimento micelial dos isolados de *Trichoderma* spp. e de *S. sclerotiorum* do primeiro e segundo dia, calculou-se a taxa de crescimento micelial aplicando-se a fórmula adaptada de Lilly e Barnett (1951), citada por Jackisch-Matsuura e Menezes (1999):

$$\text{Taxa de crescimento} = \frac{(C2 - C1)}{(T2 - T1)}$$

Na qual:

Taxa de crescimento = mm.h⁻¹;

C2 = crescimento após 48 horas de incubação;

C1 = crescimento após 24 horas de incubação;

T2 = 48 h e T1 = 24 h.

2.5.3 Quantificação de esporos de *Trichoderma* spp. em meio de cultura

Ao final das avaliações de crescimento micelial, no quarto dia de incubação, realizou-se a quantificação da esporulação dos isolados de *Trichoderma* spp., feita pela lavagem de placas contendo estruturas fúngicas, adicionando 3 mL de uma solução composta por 100 mL água destilada e esterilizada acrescida de duas gotas do emulsificante Tween 80[®]. Só então as colônias tiveram a superfície do meio suavemente esfoliada com o auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada, para a liberação de micélio e conídios. A suspensão foi coletada e agitada por três minutos, em agitador do tipo Fisher – Flexa Mix[™] (USA), em seguida, uma pequena alíquota foi pipetada em hemacitômetro ou câmara de Neubauer, onde descansou por dois minutos até ser levada ao microscópio ótico para a contagem do número de conídios.

Para estimar a média de conídios ou esporos por mL, foram contados os campos 1 e 2 da câmara de Neubauer (Figura 2A) e em cada campo foram contados cinco quadrados como os demarcados na Figura 2B, totalizando cinco contagens por campo da câmara de Neubauer. Os dados obtidos na leitura foram inseridos no Sistema para Contagem de Esporos

Microbianos e Calibração de Suspensão - CALIBRA (EMBRAPA, 2011) para estimar o número de esporos.mL⁻¹ presentes na suspensão.

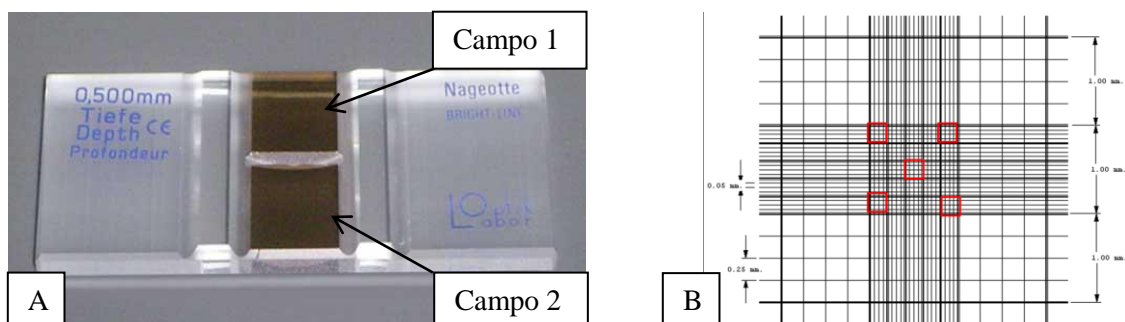


Figura 2 A) Localização dos campos 1 e 2 na câmara de Neubauer; B) Área dentro dos quadrados vermelhos para contagem de esporos de *Trichoderma* spp. Santa Maria, RS. 2012

2.6 Controle *in vitro* de *S. sclerotiorum*

Para a verificação do antagonismo de *Trichoderma* spp. contra o patógeno *S. sclerotiorum*, os isolados até então armazenados foram repicados em meio BDA e utilizados sempre aos cinco dias de idade. Seguiu-se a metodologia de cultura pareada descrita por ETHUR (2006) (Figura 3), em que um disco de meio de cultura BDA (10 mm de diâmetro) contendo micélio do patógeno foi colocado a uma distância de 0,5 cm da borda das placas de Petri, incubadas por 48 h a 20 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 h. Decorrido esse período, um novo disco de meio de cultura (10 mm de diâmetro) contendo micélio de *Trichoderma* spp. foi depositado na extremidade oposta da placa. As placas foram incubadas em câmara de crescimento a 20 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 h, por sete dias.

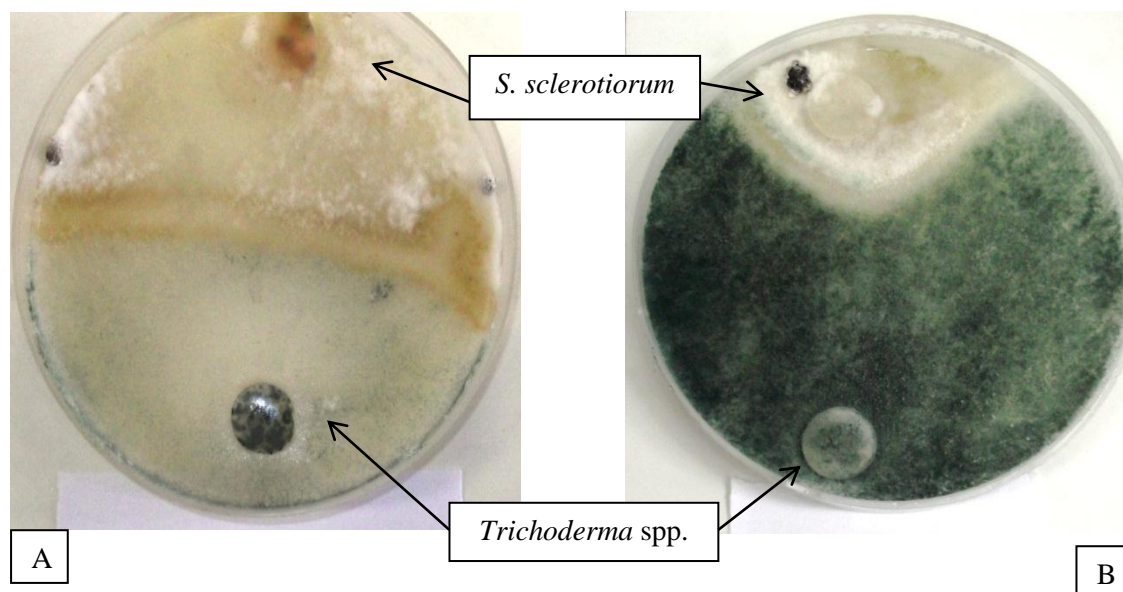


Figura 3 Teste de confrontação direta em placas de Petri com discos contendo os isolados de *Trichoderma* spp. A) SP23 e B) ETSR20 e *S. sclerotiorum*, em lados opostos, após sete dias de incubação. Santa Maria, RS. 2012

As avaliações seguiram dois critérios: um proposto por Bell et al. (1982) de notas de antagonismo com base na análise visual das placas, variando de 1 a 5; e pela escala adaptada por Rodrigues (2010) de notas com base em um gabarito que é posicionado sob as placas (Figura 4), permitindo uma análise mais objetiva, com notas variando de 1 a 7. A tabela 2 apresenta um comparativo entre as duas escalas utilizadas. Para a avaliação da porcentagem de inibição das colônias de *S. sclerotiorum* pelos isolados de *Trichoderma* spp., mediram-se as colônias do patógeno com o auxílio de um paquímetro digital e estimou-se a porcentagem com base no diâmetro total da placa.

Tabela 2 Comparativo entre as escalas de Bell et al. (1982) e Rodrigues (2010) para teste de pareamento de culturas. Santa Maria, RS. 2012

Escala de Bell et al. (1982)	Escala de Rodrigues (2010)
1 - Antagonista cresce e ocupa toda placa	1 - Antagonista cresce por toda a placa de Petri e sobre o disco do patógeno;
2 - Antagonista cresce sobre 2/3 da placa;	2 - Antagonista cresce por toda a placa de Petri, porém não sobrepõe-se sobre o disco do patógeno;
3 - Antagonista e patógeno crescem até a metade da placa;	3 - Antagonista cresce sobre 3/4 da placa;
4 - Patógeno cresce sobre 2/3 da placa;	4 - Antagonista cresce sobre 2/3 da placa;
5 - Patógeno cresce por toda a placa de Petri.	5 - Antagonista e patógeno crescem até a metade da placa;
	6 - Patógeno cresce sobre 2/3 da placa;
	7 - Patógeno cresce por toda a placa de Petri.

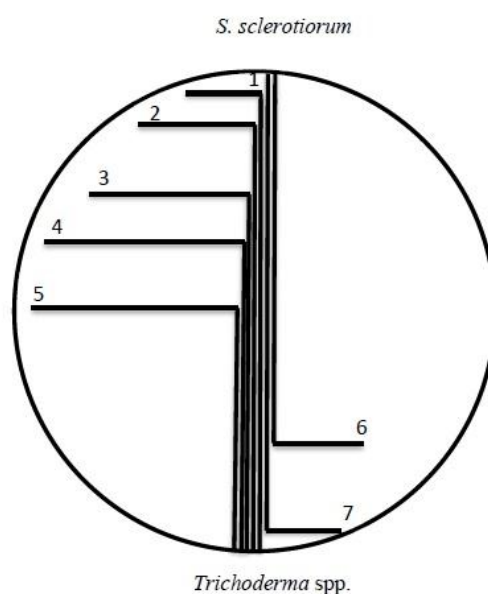


Figura 4 Gabarito da Escala de Rodrigues (2010). Santa Maria, RS. 2012

2.7 Identificação das espécies de *Trichoderma* spp.

Os oito isolados de *Trichoderma* spp. nativos foram divididos em dois grupos CP (oriundo de áreas histórico de mofo-branco) e SP (oriundo de áreas sem histórico de mofo-

branco), que juntamente com TC1.15 foram encaminhados ao Instituto Biológico de São Paulo para identificação molecular em nível de espécie, onde foi realizada a extração de DNA dos isolados, conforme descrito por Doyle e Doyle (1990).

2.8 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado nos testes foi o inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento. Os dados obtidos nos ensaios foram submetidos à análise da variância para verificação da significância e, em caso positivo, foi realizada a comparação de médias utilizando-se o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. Para essas análises, foi utilizado o software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Quantificação da população de *Trichoderma* spp. presente nas amostras de solo

Para utilizar de forma eficiente micro-organismos de controle biológico, o correto monitoramento da população desses agentes naturais é essencial (BEAULIEU et al., 2011) e uma técnica bastante usada é a quantificação de UFC.g⁻¹ de solo seco (LIEVENS et al., 2006). Com relação à caracterização populacional de *Trichoderma* spp., os resultados mostram que houve uma maior quantidade de UFC.g⁻¹ no solo de áreas com histórico de mofo-branco (Figura 5), já que as amostras CP11 e CP21 apresentaram valores estatisticamente superiores aos demais. Já nas áreas sem histórico da doença, juntamente com as amostras CP21 e CP22, não foram verificadas diferenças significativas. A grande variação entre as populações do micro-organismo pode ter ocorrido devido às condições bióticas do solo (EASTBURN; BUTLER, 1988), já que as amostras do grupo CP eram provenientes de áreas com cultivo orgânico sucessivo de hortaliças, enquanto o grupo SP de áreas que anteriormente encontravam-se em pousio e estavam no seu primeiro cultivo de alface.

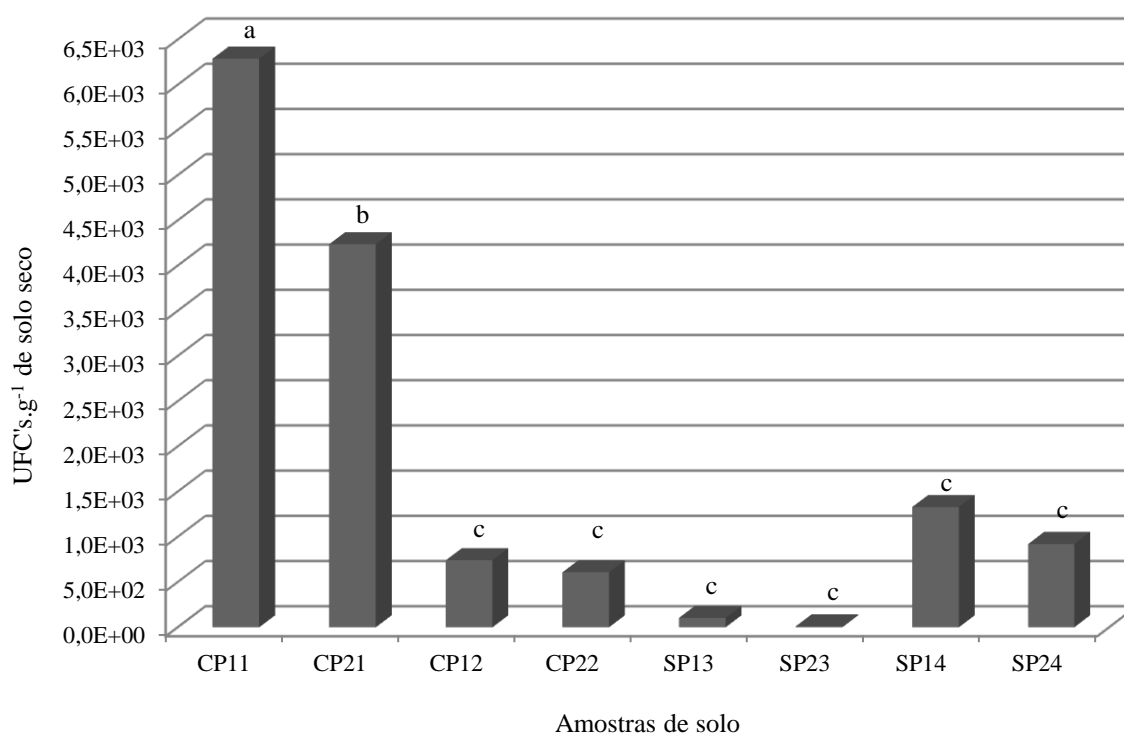


Figura 5 População de *Trichoderma* spp. (UFC.g⁻¹) em solo CP (com histórico de mofo-branco) e SP (sem histórico de mofo-branco). Barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Santa Maria, RS. 2012

Por tratarem-se de áreas de produção orgânica já consolidadas, uma maior população de *Trichoderma* spp. pode ter se desenvolvido nas amostras CP11 e CP21, quando comparado às amostras das áreas de primeiro cultivo, pois o gênero *Trichoderma* é importante na ciclagem de nutrientes (CORABI-ADELL; LUCON; KOIKE, 2002). As práticas de manejo de solo utilizadas em cada área comercial também podem ter interferido na população do antagonista, uma vez que causam impactos na população de micro-organismos no solo (ABAWI; WIDNER, 2000), incluindo *Trichoderma* spp. (MUNNECKE; KOLBEZEN; WILBUR, 1973).

Rai e Saxena (1975) mencionam que a microflora existente no solo representa um controle biológico natural para vários patógenos, o que pode explicar uma maior população de *Trichoderma* spp. nas coletas de solo realizadas em áreas com histórico de mofo-branco. Janvier et al. (2007) dizem ainda que a variação da densidade microbiana pode depender do patossistema e do solo onde a doença ocorre, geralmente existindo uma associação positiva entre a densidade microbiana e a supressividade do solo.

A grande variação populacional das áreas amostradas, com os menores valores para as áreas de primeiro cultivo, pode ser explicada pelo sistema de produção adotado, já que o mesmo está sujeito a frequentes alterações, como tipos de espécies cultivadas, diferentes fontes de adubações orgânicas, frequência e tipo de irrigação. Em sistemas artificiais, isto é, em áreas com cultivos sucessivos, modificações no solo podem afetar drasticamente a comunidade microbiana e levar à perda de micro-organismos benéficos e/ou ingresso de fitopatógenos que podem devastar produções (AVIS et al. 2008).

3.2 Identificação dos isolados de *Trichoderma* spp.

Para a identificação foi realizado o sequenciamento dos isolados, a partir da extração do DNA, amplificação da região ITS e do gene codificador do fator de alongação 1- α . As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no GenBank. Utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 (MENEZES et al., 2010) foi possível realizar a identificação dos isolados em nível de espécie. Conforme o Anexo 1, as espécies encontradas foram divididas em:

- *Trichoderma koningiopsi* (Samuels, Suárez & Evans) - SP13 e SP23.
- *Trichoderma asperellum* (Samuels, Lieckf & Nirenberg) - TC1.15, CP11, CP12, CP21, CP22, SP14 e SP24.

As espécies identificadas são conhecidas e utilizadas no controle biológico de fitopatógenos de solo, de acordo com dados publicados por diversos autores, inclusive para o controle de *S. sclerotiorum* (LOPES et al., 2012.; RODRIGUES, 2010; SAHARAN; MEHTA, 2008; OLIVEIRA, 2007; ETHUR, 2005). Hoyos-Carvajal, Orduz e Bisset (2009) estudando a biodiversidade de 183 isolados de *Trichoderma* spp. em sete países da América do Sul, incluindo o Brasil, observaram que *T. asperellum* foi a espécie mais frequente, com 60 isolados, seguida de *T. harzianum* com 49.

Em estudos anteriores, Lima (2002) identificou 46 isolados de *Trichoderma* spp., nativos do cerrado, e verificou que a espécie mais frequente foi *T. harzianum* (34 isolados), seguida por *T. asperellum* (4 isolados), *Trichoderma koningii* Oudem. (3 isolados) e *Trichoderma spirale* Bissett (2 isolados). As espécies encontradas nesse trabalho estão de acordo com LOPES et al. (2012), que obteve 21 isolados oriundos do Cerrado brasileiro,

sendo nove *T. asperellum* (42,86%), sete *T. harzianum* (33,33%), três *Trichoderma tomentosum* Bissett (14,29%), um *T. koningiopsis* (4,76%) e um *Trichoderma erinaceum* (Bissett, Kubicek & Szakacs) (4,76%). Recentes estudos ainda têm demonstrado alta biodiversidade de *Trichoderma* spp. em regiões neotropicais, mais frequentemente para *T. harzianum* e *T. asperellum* (ANNES et al., 2010).

3.3 Desenvolvimento de *Trichoderma* spp. e *S. sclerotiorum* em meio de cultura

3.3.1 Crescimento micelial

De modo geral, os isolados do antagonista tiveram maior crescimento micelial *in vitro* do que os do fitopatógeno (Tabela 3). Apenas no primeiro dia de avaliação as colônias de *S. sclerotiorum* foram estatisticamente iguais aos isolados do grupo CP e ao isolado SP24, enquanto nos demais dias permaneceram abaixo da média. Esse fato reflete-se em vantagem para o agente biológico, pois um dos mecanismos de ação exibidos pelo *Trichoderma* spp. é a competição por espaço e nutrientes (ABDULLAH; ALI; SULEMAN, 2008) que adicionado à capacidade micoparasítica, incluindo crescimento direcionado ao fungo fitopatogênico, fixação e enrolamento na hifa alvo (CHET; BENHAMOU; HARMAN, 1998), garante eficiente potencial antagonista.

Tabela 3 Crescimento micelial (mm) dos isolados de *Trichoderma* spp. e *S. sclerotiorum* em meio de cultura BDA. Santa Maria, RS. 2012.

Isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	Dias de avaliação			
	1	2	3	4
Isolados da micoteca do DFS¹				
UFSMT15.1	21,71 b	53,92 a	64,14 b	84,00 a
UFSMT17	26,51 a	60,70 a	84,00 a	84,00 a
TC1. 15	26,93 a	41,67 b	84,00 a	84,00 a
ETSR20	30,30 a	59,48 a	84,00 a	84,00 a
Isolados CP²				
CP11	16,14 c	62,43 a	84,00 a	84,00 a
CP12	15,13 c	67,92 a	84,00 a	84,00 a
CP21	16,54 c	63,64 a	84,00 a	84,00 a
CP22	15,32 c	62,67 a	84,00 a	84,00 a
Isolados SP³				
SP13	28,66 a	64,70 a	84,00 a	84,00 a
SP23	26,87 a	62,53 a	84,00 a	84,00 a
SP14	27,70 a	67,43 a	84,00 a	84,00 a
SP24	15,01 c	44,24 b	79,35 a	84,00 a
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>				
	15,26 c	25,66 c	46,78 c	75,39 b
CV (%)	12,81	15,94	13,58	12,89

¹Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade; ²CP: isolados proveniente de áreas com histórico de mofo-branco; ³SP: isolados proveniente de áreas sem histórico de mofo-branco.

No primeiro dia de avaliação destacaram-se os isolados de *Trichoderma* spp. armazenados e os do grupo SP, com exceção a UFSMT15.1 e SP24, respectivamente. No segundo dia, os isolados CP apresentaram um salto de crescimento igualando-se aos demais, enquanto UFSMT1.15 e SP24, permaneceram abaixo da média. Ao terceiro dia de avaliação, mais de 83% dos isolados do antagonista já tinham ocupado toda superfície da placa.

Com exceção ao primeiro dia de avaliação, o isolado de *S. sclerotiorum* apresentou valores para o crescimento micelial abaixo dos isolados de *Trichoderma* spp., os quais ao quarto dia já haviam colonizado por completo a placa. No fitopatógeno, esse comportamento só foi evidenciado ao quinto dia de avaliação. Sanogo e Puppala (2007) e Rodrigues (2010) também observaram esse comportamento para crescimento *in vitro* do fitopatógeno, quando comparado ao do antagonista.

Dados recentes apontam que isolados de *Trichoderma* spp. com cinco dias cultivo, apresentam crescimento micelial variando de 40 mm a 80 mm (BRITO; MILLER; STADNIK, 2010), corroborando com os resultados apresentados neste ensaio, que ao quarto dia todos os isolados já haviam atingido 84 mm de crescimento.

3.3.2 Taxa de crescimento micelial

Com exceção do isolado TC1.15, todos os isolados do antagonista apresentaram velocidade de crescimento estatisticamente superiores ao patógeno (Figura 6). Tais resultados estão de acordo com Bomfim et al. (2010), que estudaram o controle biológico de *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. obtido em fumo e com Jackisch-Matsuura e Menezes (1999) com *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. em maracujazeiro amarelo, que encontraram valores de crescimento micelial de *Trichoderma* spp. superiores aos do fitopatógenos.

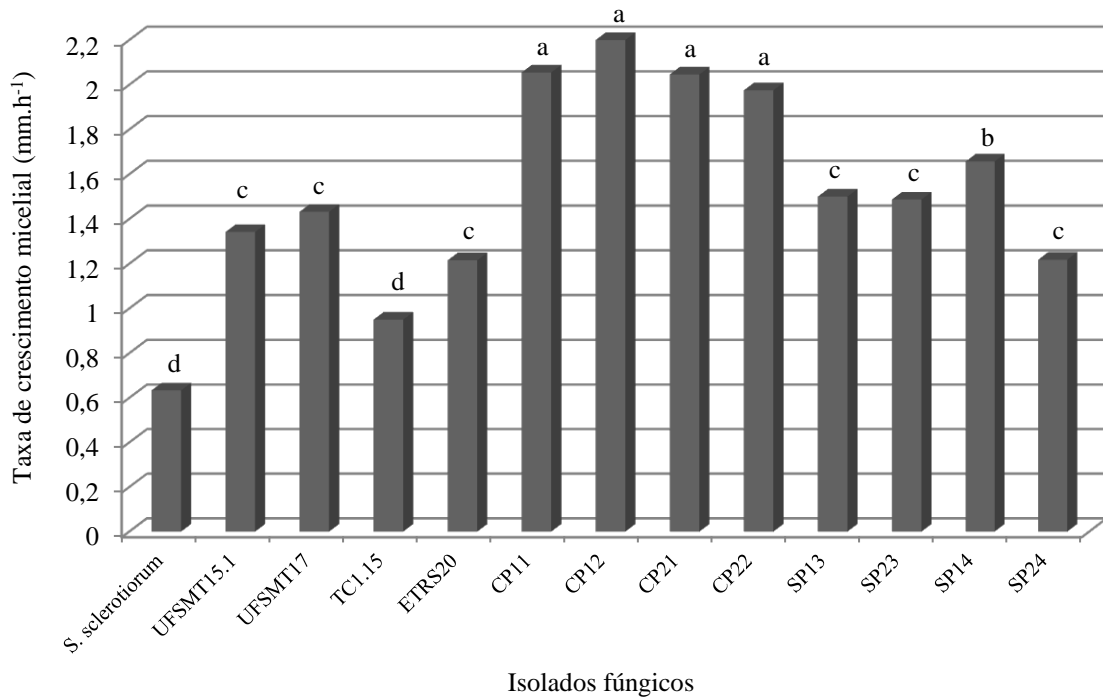


Figura 6 Taxa de crescimento micelial (mm.h⁻¹) de *S. sclerotiorum* e de *Trichoderma* spp. Barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Santa Maria, RS. 2012

Os isolados pertencentes ao grupo CP mostraram-se estatisticamente superiores aos demais, sugerindo que a convivência com o patógeno a campo, acelera a taxa crescimento micelial de *Trichoderma* spp. *in vitro*, e que os mesmos são bons competidores por espaço e pouco exigentes quanto a nutrientes específicos. Brito, Miller e Stadnik (2010) relataram que isolados armazenados apresentaram crescimento inferior quando comparados aos isolados obtidos de compostos orgânicos, corroborando com os dados deste trabalho, no qual os isolados da micoteca apresentaram as menores taxas de crescimento, sugerindo que ocorre perda de viabilidade devido ao armazenamento prolongado.

Os resultados apresentados pelos isolados do grupo SP sugerem que na ausência da doença, a taxa de crescimento de *Trichoderma* spp. é estatisticamente menor do que onde há frequente pressão exercida pelo mofo-branco. Os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram taxas de crescimento variando de aproximadamente 2,2 a 0,9 mm.h⁻¹ e 0,6 mm.h⁻¹ para o patógeno, superando os valores encontrados por Barakat, Al-Mahareeq e Al-Masri (2006), que utilizando isolados de diferentes origens obtiveram taxas variando de 1,125 a 0,5 mm.h⁻¹ para *Trichoderma* spp. e 0,17 mm.h⁻¹ para *Sclerotium rolfsii* Sacc.

3.3.3 Quantificação de esporos de *Trichoderma* spp. em meio de cultura

Constatada a importância do rápido crescimento micelial pelo antagonista, sua capacidade de multiplicação (reprodução) também deve ser levada em consideração, já que é responsável pela perpetuação da espécie, nas diversas condições a que o fungo pode ser exposto. Nesse ensaio verificou-se que houve diferença estatística significativa entre os isolados, assim como aponta Ávila et al. (2005). Os dados obtidos igualam-se aos resultados apresentados por Rodrigues (2010), quando o isolado UFSMT17 apresentou a maior média de esporulação, porém, neste ensaio não diferiu estatisticamente do isolado UFSMT15.1 (Figura 7), seguidos por CP22, que foi superior ao restante. De modo geral, os isolados do grupo CP apresentam comportamento mediano, assim como ETSR20, TC1.15, SP14 e SP24, restando SP13 e SP23 com os piores resultados, sugerindo que o grupo SP apresenta menor capacidade de esporulação em meio de cultura artificial, podendo ser menos agressivo devido a sua não convivência com a doença mofo-branco a campo.

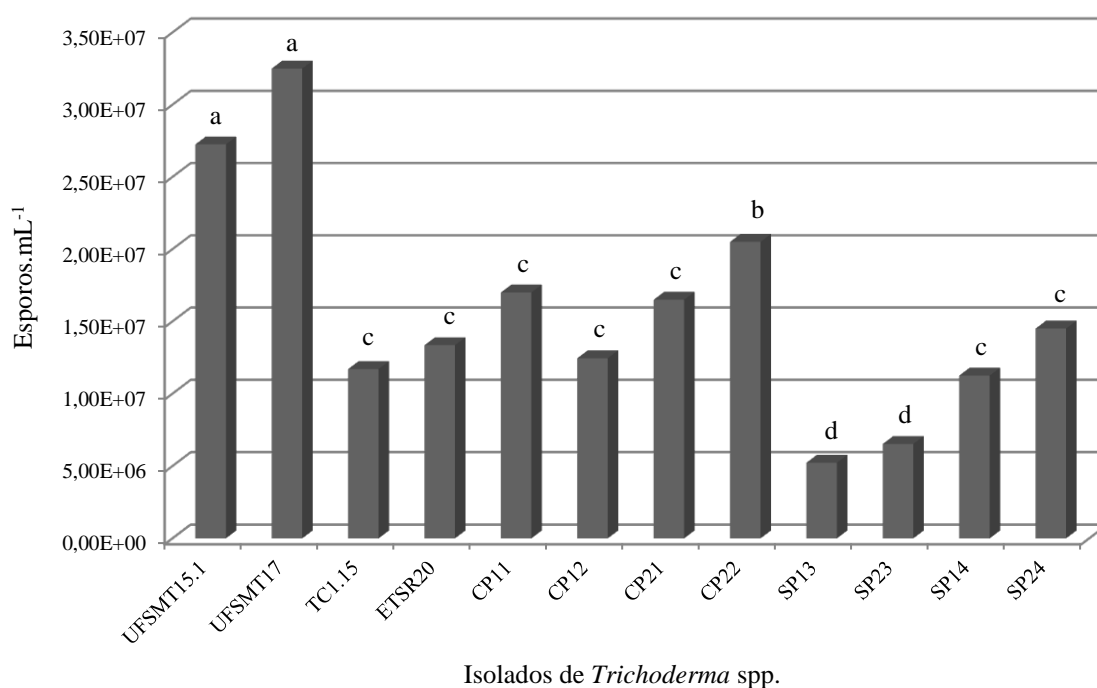


Figura 7 Esporulação de *Trichoderma* spp. (esporos.mL⁻¹) cultivados em meio de cultura BDA. Barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Santa Maria, RS. 2012

A concentração de esporos de *Trichoderma* spp. tem efeito significativo na habilidade dos conídios em inibir o crescimento *in vitro* de fitopatógenos (HJELJORD; TRONSMO, 2003). Em ensaios realizados utilizando isolados de diferentes origens, a concentração de esporos.mL⁻¹ variou de $2,5 \times 10^6$ a $4,5 \times 10^7$ (BRITO; MILLER; STADNIK, 2010) para *T. harzianum* e *T. asperellum*, respectivamente. Esses dados são confirmados por Beaulieu et al. (2011), que para *T. harzianum* considera valores elevados, aqueles situados entre 10^7 e 10^8 esporos.mL⁻¹. Pesquisa abrangendo crescimento e esporulação de *Trichoderma* spp. são de extrema importância, já que fornecem informações úteis para a produção de inóculo em grande escala (MISHRA, et al., 2011; ÁVILA et al., 2005), permitindo selecionar aqueles que possuem maior capacidade e velocidade de se desenvolver em meios artificiais.

3.4 Controle *in vitro* de *S. sclerotiorum*

No teste de confrontação direta (Tabela 4), observou-se que a escala proposta por Rodrigues (2010) foi mais precisa do que a de Bell (1982), já que apresentou um coeficiente de variação menor. Por tratar-se de uma escala de avaliação mais objetiva, a escala de Rodrigues (2010), permite que diversos avaliadores em um mesmo experimento, encontrem médias semelhantes.

Tabela 4 Classificação dos isolados de *Trichoderma* spp. quanto ao antagonismo a *S. sclerotiorum* segundo as escalas de Bell (1982) e Rodrigues (2010) e porcentagem de inibição (%) de *S. sclerotiorum*. Santa Maria, RS. 2012

<i>Trichoderma</i> spp.	Bell, 1982	Rodrigues, 2010	Inibição de <i>S. sclerotiorum</i> (%)
Isolados da micoteca do DFS ¹			
UFSMT15.1	2,0 b	3,2 b	63,03 b
UFSMT17	2,2 b	2,2 b	49,12 c
TC1.15	5,0 a	5,0 a	47,76 c
ETSR20	2,5 b	4,6 a	45,88 c
Isolados CP ²			
CP11	4,6 a	4,8 a	37,70 c
CP12	4,2 a	4,2 a	42,63 c
CP21	2,0 b	2,6 b	72,68 a
CP22	3,6 b	4,2 a	55,99 b
Isolados SP ³			
SP13	4,6 a	5,2 a	47,76 c
SP23	4,4 a	5,8 a	43,26 c
SP14	4,4 a	5,8 a	48,62 c
SP24	4,4 a	5,8 a	48,62 c
CV (%)	26,66	22,90	17,78

¹Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade; ²CP: isolados proveniente de áreas com histórico de mofo-branco; ³SP: isolados proveniente de áreas sem histórico de mofo-branco.

A redução de crescimento micelial de *S. sclerotiorum* apresentou diferenças significativas para os micro-organismos testados, sendo o melhor CP21, reduzindo 72,68% do

crescimento micelial do patógeno, seguido de UFSMT15.1 e CP22, com 63,03 e 55,99%, respectivamente. Os resultados desse ensaio variaram de 37,7 a 72,68%, corroborando com os dados obtidos por Ávila et al. (2005), que conseguiram porcentagem de inibição variando de 30 a 70%. Recentes estudos demonstram que espécies de *Trichoderma* atuam de forma distinta na inibição de *S. sclerotiorum*. Segundo Lopes et al. (2012), *T. asperellum* 11/11 e *T. harzianum* ALL-42 apresentaram mais de 50% de inibição, enquanto, *T. tementosum* 36/02, *T. asperellum* 400/01 e *T. tementosum* 476-02 menos de 10%. Barakat, Al-Mahareeq e Al-Masri (2006) utilizando 69 isolados de *Trichoderma* spp. obtidos de diferentes regiões da Palestina, obtiveram 47 isolados com significativa redução no crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, variando de 20,8 a 66,8%, sendo os mais promissores pertencentes às espécies *T. harzianum*, *T. pseudokoningii* e *T. lactea*.

Para a confrontação direta os melhores resultados foram evidenciados pelos isolados CP21 e os armazenados, com exceção a TC1.15, uma vez que apresentaram nota igual ou inferiores a 4, na escala de Bell (1982) e os piores pelos isolados do grupo SP, sendo considerados como pouco eficientes. Apesar dos isolados CP terem exibido a maior taxa de crescimento micelial, apenas CP21 mostrou destaque na confrontação direta, sugerindo o envolvimento de mais de um mecanismo de ação como liberação de metabólitos ou parasitismo. Vale ressaltar que o isolado TC1.15 apresentou as piores médias tanto para a taxa de crescimento micelial, igualando-se ao patógeno, quanto para a concentração de esporos.mL⁻¹, sugerindo que para esse isolado, o armazenamento prolongado foi mais prejudicial do que aos demais.

Os resultados obtidos para o isolado TC1.15 divergem dos apresentados por Oliveira (2007), que utilizando *S. sclerotiorum* obteve nota 1 para o antagonismo, sendo enquadrado como muito eficiente segundo a escala de Bell (1982), sugerindo que neste trabalho, realizado quatro anos depois, o armazenamento pode ter provocado redução na sua capacidade antagônica. Ethur, Nicolini e Blume (2008) relatam que *T. virens* armazenado sob refrigeração por 18 meses apresentaram o mesmo comportamento na confrontação direta do que antes do armazenamento, porém não existem relatos para períodos superiores a dois anos.

O melhor desempenho na confrontação direta foi apresentado por UFSMT15.1, UFSMT17, ETSR20 e CP21, já que segundo Ethur (2006), aqueles que apresentarem notas variando de 2 a 2,5 podem ser classificados como eficientes. Louzada et al. (2009) considera que um isolado é antagônico ou eficiente, quando sua nota é menor ou igual a 3. O autor, trabalhando com amostras de solo com diferentes cultivos, obteve 230 isolados de *Trichoderma* spp., dos quais 111 apresentaram notas menores do que 3 contra *S. sclerotiorum*,

50 contra *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (Burkholder) Snyder & Hansen e apenas 24 isolados contra os dois patógenos, ou seja, 10% do total. A variação ocorrida entre as notas desse ensaio, em que apenas aproximadamente 42% dos isolados manifestaram expressiva eficiência antagônica, pode acontecer porque o nível de controle varia dependendo das adaptações às condições bióticas e abióticas específicas, as quais os isolados são submetidos, dentro e entre as espécies do gênero *Trichoderma* (DENNIS; WEBSTER, 1971).

Dados de ensaios *in vitro* mostram que isolados de *T. harzianum* obtidos da rizosfera de plantas sintomáticas têm capacidade não só para inibir o desenvolvimento de patógenos através de metabólitos não voláteis, como também de parasitar, penetrar e colonizar as hifas de *S. sclerotiorum* (ABDULLAH; ALI; SULEMAN, 2008). McLaren, Huang e Rimmer (1986) explicam que os efeitos tóxicos causados por esses antagonistas podem ser devido à vacuolização e granulação das células de patógeno atacadas. Isolados de *Trichoderma* spp. provenientes de áreas nativas ou com reduzido impacto antrópico apresentam um maior percentual de atividade contra fitopatógenos *in vitro*, ficando em torno de 80% (CORABI-ADELL, 2004). Louzada et al (2009) ainda ressalta que, não há relatos na literatura que tragam maiores informações sobre a perda da diversidade de *Trichoderma* spp. causado pelo uso agrícola contínuo.

Neste trabalho foi possível observar a formação de uma zona de inibição (Figura 8), quando ocorreu o contato entre os micélios de *Trichoderma* spp. e *S. sclerotiorum*, assim como nos testes *in vitro* conduzidos por Inbar, Menendez e Chet (1996). Isto apoia a hipótese de que, tais isolados, possivelmente produziram metabólitos voláteis (antibiose), os quais impediram o avanço do patógeno. A produção de metabólitos voláteis por isolados de *Trichoderma* spp. foi evidenciada em trabalhos de Lopes et al. (2012), Bomfim et al. (2010) e Ávila et al. (2005).

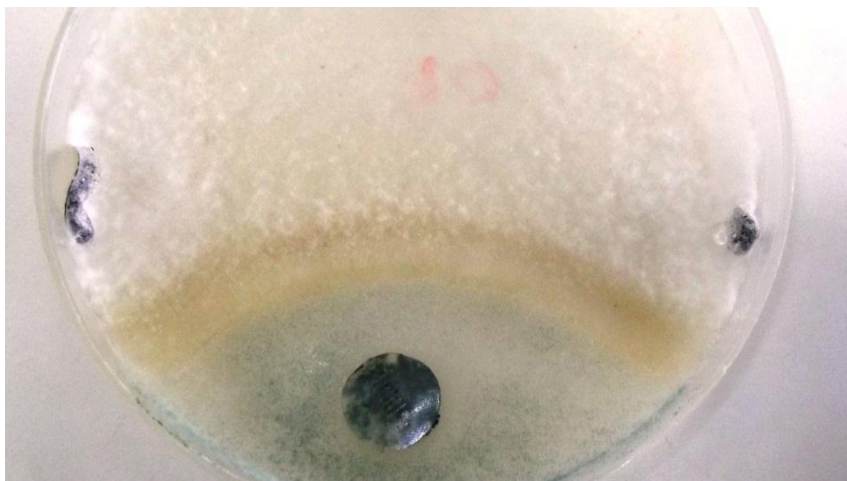


Figura 8 Formação da zona de inibição de *Trichoderma* spp. em atividade antagônica a *S. sclerotiorum*. Santa Maria, RS. 2012

De acordo com Dennis e Webster (1971), espécies de *Trichoderma* spp. são hábeis produtoras de metabólitos em meio de cultura, podendo esses antibióticos atuar sobre os fungos fitopatogênicos através da inibição micelial. Harman (1991) ainda salienta que, os resultados demonstrados pelos isolados antagonistas em condições *in vitro*, podem não ser confirmados quando levados a campo, pois tais organismos estarão sujeitos a comportamentos diferenciados do hospedeiro e ambiente.

4. CONCLUSÕES

1. A população de *Trichoderma* spp. é diferente entre as áreas amostradas com e sem histórico de mofo-branco.
2. Os isolados de *Trichoderma* spp. pertencentes ao grupo CP, oriundos de áreas com histórico de mofo-branco, tiveram maior velocidade de crescimento micelial quando comparado aos isolados dos grupos SP, obtidos de áreas sem histórico de mofo-branco, e aos armazenados.
3. Os isolados de *Trichoderma* spp. testados foram capazes de inibir *S. sclerotiorum* *in vitro*.

4. Os isolados SP13 e SP23 foram identificados como *T. koningiopsi*, enquanto o restante como *T. asperellum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAWI, G.S.; WIDMER, T.L. Impact of soil health management practices on soilborne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops. **Applied Soil Ecology**, New York, v. 15, p. 37-47, 2000.

ABDULLAH, M.T.; ALI, N.Y.; SULEMAN, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, Oxford, v. 27, p. 1354-1359, 2008.

ANNES, M. et al. Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. **Fungal Biology**, Oxford, v. 114, p. 691-701, 2010.

ÁVILA, Z.R. et al. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonísticos a *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. **Embrapa Recursos Genéticos**, Brasília, DF, 2005, 30p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 117).

AVIS, T.J. et al. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. **Soil Biology and Biochemistry**, Missouri, v. 40, p. 1733-1740, 2008.

BARAKAT, R.M.; AL-MAHAREED, F.; AL-MASRI, M.I. Biological control of *Sclerotium rolfsii* by using indigenous *Trichoderma* spp. isolates from Palestine. **Hebron University Research Journal**, Hebron, v. 2, n. 2, p. 27-47, 2006.

BARNETT, H.J.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Fourth edition. Minnesota: American Phytopathology Society, 1999. 218 p.

BEAULIEU, R. et al. qRT-PCR quantification of the biological control agent *Trichoderma harzianum* in peat and compost-based growing media. **Bioresource Technology**, New York, v. 102, p. 2793–2798, 2011.

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

BENÍTEZ, T. et al. Características de levaduras y hongos filamentosos de interés em agroalimentación. ¿Adaptación al ambiente?. **Actualidad**, [S.l.], v. 41, p. 17-27, 2006.

BOLTON, M.D.; THOMMA, B.P.; NELSON, B.D. Pathogen profile: *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 7, p. 1-6, 2006.

BOMFIM, M.P. et al. Avaliação antagonista *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n.1, p. 61-67, 2010.

BRITO, F.S.; MILLER, P.R.M.; STADNIK, M. Presença de *Trichoderma* spp. em composto e suas características para o controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 43-53, 2010.

BROZÓVÁ, J. Mycoparasitic fungi *Trichoderma* spp. in plant protection. **Plant Protection Science**, Prague, v. 2, p. 63-74, 2004.

CERMEÑO, Z.S. **Estufas**: instalações e manejo. Lisboa: Editora Litexa Ltda., 1990. 355 p.

CHET, I.; BENHAMOU, N.; HARMAN, S. **Mycoparasitism and lytic enzymes**. G. E. Harman and C. P. Kubicek, In: *Trichoderma* and *Gliocladium*, eds. Taylor & Francis, London, p. 153-172, v. 2, 1998.

CHET, I.; HARMAN, G.E.; BAKER, R. *Trichoderma hamatum*: its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. **Microbial Ecology**, New York, v. 7, p. 29-38, 1988.

COMETTI, N.N. et al. Compostos nitrogenados e açúcares solúveis em tecidos de alface orgânica, hidropônica e convencional. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 4, p. 748-753, 2004.

CORABI-ADELL, C. **Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (HYPOCREALES – FUNGI) mediante técnicas moleculares e análises ecofisiográfica**. 2004. 220 f. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, Rio Claro, 2004.

CORABI-ADELL, C.; LUCON, C.M.M.; KOIKE, C.M. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* no estado de São Paulo – aspectos enzimáticos e potencial biocontrolador. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69 (supl.), p. 158-191, 2002.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal Interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 57, n. 3, p. 363-369, 1971.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Ithaca, v. 12, p. 13-18, 1990.

EASTBURN, D.M.; BLUTER, E.E. Microhabitat characterization of *Trichoderma harzianum* in natural soil: Evaluation of factors affecting population density. **Soil Biology and Biochemistry**, Missouri, v. 20, p. 541-545, 1988.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. EMBRAPA MEIO AMBIENTE. **Sistema para Contagem de Esporos Microbianos e Calibração de Suspensão – CALIBRA**, Jaguariúna, 2011.

ETHUR, L.Z. NICOLINI, C.; BLUME, E. Viabilidade de formulação em pós de *Trichoderma virens* em diferentes embalagens e tempo. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 14, n. 2, p. 391-394, 2008.

ETHUR, L.Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro**. 2006. 154 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

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

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2008.

GAO, K. Mycoparasitism of *Rhizoctonia solani* by endophytic *Chaetomium spirale* ND35: ultrastructure and cytochemistry of the interaction. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, p. 280-290, 2005.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Método de isca para obtenção de isolados de *Trichoderma* antagonísticos a *Botrytis cinerea***. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, 1989. 13p. (Boletim de Pesquisa 3).

GOMES, L.A.A. et al. Produção de mudas de alface em substrato alternativo com adubação. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 359-363, 2008.

GOOGLE HEARTH, Google™. Acesso em 15 de Setembro de 2012.

HARMAN, G.E. Seed treatment for biological control of plants disease. **Crop Protection**, v. 10, n. 3, p. 166-171, 1991.

HJELJORD, L.D.; TRONSMO, A. Effect of germination initiation on competitive capacity of *Trichoderma atroviride* P1 conidia. **Biological Control**, San Diego, v. 93, n. 12, p. 1593-1598, 2003.

HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S. BISSETT, J. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. **Fungal Genetics and Biology**, [S.l.], v. 46, p. 615-631, 2009.

INBAR, J.; MENENDEZ, A.; CHET, I. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. **Soil Biology and Biochemistry**, Missouri, v. 28, n. 6, p. 757-763, 1996.

JACKISCH-MATSUURA, A., MENEZES, M. Efeito de *Trichoderma* spp. no controle de *Pythium aphanidermatum* em fumo (*Nicotiana tabacum*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, n. 2, p.161-164, 1999.

JANVIER, C. et al. Soil health through disease suppression: Which strategy from descriptors to indicators? **Soil Biology and Biochemistry**, Missouri, v. 39, p. 1-23, 2007.

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas**. 4. ed. Piracicaba: Ceres, v. 2, 2005, 663 p.

KUBICEK, C.P.; KOMON-ZELAZOWSKA, M.; DRUZHINIA, I.S. Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. **Journal of Zhejiang University Science B**, [S.l.], v. 9, p. 753-763, 2008.

LI, G.Q.; HUANG, H.C.; ACHARYA, S.N. Antagonism and biocontrol potential of *Ulocladium atrum* on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, San Diego, v. 28, p. 11-18, 2003.

LIEVENS, B. et al. Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. **Plant Science**, Limerick, v. 171, p. 155-165, 2006.

LILLY, G.V.; BARNETT, H.L. **Physiology of the fungi**. New York: McGraw-Hill Book, 1951. 464p.

LIMA, A.L. **Caracterização morfológica, molecular e bioquímica de *Trichoderma* spp., isolados do solo do Cerrado**. 2002. 74p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2002.

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

LOUZADA, G.A.S. et al. Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotrópica**, Campinas, v. 9, n. 3, p. 145-149, 2009.

MCLAREN D.L.; HUANG H.C.; RIMMER S.R. Hyperparasitism of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Talaromyces flavus*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Québec, v. 8, p. 43-48, 1986.

MENEZES, J.P. et al. Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, 2010.

MENEZES, J.P. **Caracterização populacional e molecular, e seleção de *Trichoderma* spp. para biocontrole de *Fusarium* sp. em crisântemo**. 2007. 112 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

MISHRA, D.S. et al. Combination of fungal and bacterial antagonists for management of root and stem rot disease of soybean. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 43, n. 5, p. 2569-2574, 2011.

MUNNECKE, D.E.; KOLBEZEN, M.J.; WILBUR, W.D. Effect of methyl bromide or carbon disulfide on *Armillaria* and *Trichoderma* growing on agar medium and relation to survival of *Armillaria* in soil following fumigation. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 63, p. 1352-1357, 1973.

OLIVEIRA, G.G. ***Trichoderma* spp. no crescimento vegetal e no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* e de patógenos em sementes de cártamo (*Carthamus tinctorius*)**.

2007. 155 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

RABEENDRAN, N. et al. Biocontrol of *Sclerotinia* lettuce drop by *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma hamatum*. **Biological Control**, San Diego, n. 39, p. 352-362, 2006.

RAI, J.N.; SAXENA, V.C. Sclerotial mycoflora and its role in natural biological control of white rot disease. **Plant and soil**, New York, v. 43, p. 509- 513, 1975.

REHNER, S.A.; SAMUELS, G.J. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analyzed by large subunit ribosomal DNA sequences. **Mycological Research**, Cambridge, v. 98, p. 625-634, 1994.

RODRIGUES, J. *Trichoderma* spp. associado a níveis de adubação NPK no patossistema *Sclerotinia sclerotiorum*-feijoeiro. 2010. 85f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

SAHARAN, G.S.; MEHTA, N. *Sclerotinia* diseases of crop plants: biology, ecology and disease management. New Delhi: Springer, 2008, 486 p.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, n. 2, p. 195-206, 2006.

SANOGO, S.; PAPPULA, N. Characterization of a darkly pigmented mycelial isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* on Valencia peanut in New Mexico. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, p. 1077-1082, 2007.

SEGOVIA, J.F.O. et al. Comparação do crescimento e desenvolvimento da alface (*Lactuca sativa* L.) no interior e no exterior de uma estufa de polietileno em Santa Maria, RS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, n.1, p. 37-41, 1997.

SILVA, K.F.A.S. et al. Dinamica populacional de fungos benéficos em solos nos sistemas de cultivo convencional e orgânico de morangueiro. **Embrapa Hortaliças**, Brasília, DF, 2009, 25p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 60).

TRANI, P.E. et al. **Alface**. Campinas: Instituto Agronômico – IAC. Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Horticultura, p. 241- 242, 2005. (Boletim 200).

VIEIRA, R.F. et al. Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo-branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, p. 770-773, 2001.

VITERBO, A. et al. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plants pathogens. **Antonie van Leeuwenhoek**, [S.l.], v. 81, p. 549-556, 2002.

WEBSTER, J.; LOMAS, N. Does *Trichoderma viride* produce gliotoxin and viridin? **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 47, p. 535-540, 1964.

WEINDLING, R. Experimental consideration of the mold toxin of *Gliocladium* and *Trichoderma*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 31, p. 991-1003, 1941.

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

WEINDLING, R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 22, p. 837-845, 1932.

YURI, J.E. et al. Comportamento de cultivares de alface tipo americana em Boa Esperança. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 20, n. 2, p. 229-232, 2002.

BIOCONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary E CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS E PLANTAS DE ALFACE UTILIZANDO *Trichoderma* spp. DE DIFERENTES ORIGENS

5. INTRODUÇÃO

A alface é um alimento bastante consumido pela população brasileira, em média 36 g por dia (IBGE, 2011), principalmente *in natura* na forma de saladas (SALA; COSTA, 2012). É uma planta herbácea muito delicada, de caule diminuto, no qual se prendem as folhas, que são amplas e crescem em roseta em volta do caule, podendo ser crespas ou lisas e desenvolver ou não cabeça. Além de exibir coloração variada, em tons de verde ou roxo conforme a cultivar, características estas, que determinam a preferência do consumidor. Seu período de cultivo pode variar de 40 a 70 dias, dependendo do sistema de produção (semeadura direta ou transplante de mudas), época de plantio (verão ou inverno) e cultivar.

O Brasil tem uma área de alface cultivada de 35.000 ha (FILGUEIRA, 2008), que normalmente encontra-se nos cinturões verdes próximos aos grandes centros consumidores (OHSE et al., 2001), devido à sua alta perecibilidade, decorrente do seu alto teor de água e grande área foliar (SANTOS et al., 2001).

Dentre as doenças que infectam a alface, o mofo-branco vem preocupando os produtores, sendo causada pelo fungo *S. sclerotiorum*, que pertence à ordem Helotiales e à família Sclerotiniaceae, é um ascomiceto não específico e sua ocorrência já foi relatada em praticamente todos os países do mundo, infectando mais de 500 espécies (SAHARAN; MEHTA, 2008). Sob condições de elevada umidade, a doença caracteriza-se pela formação de um micélio branco de aspecto cotonoso (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006), plantios caracterizados por pouco arejamento e penetração de luz, tornam o mofo-branco ainda mais agressivo. Sua ocorrência abrange principalmente períodos nos quais as temperaturas são mais amenas, ou seja, de outono a inverno.

S. sclerotiorum é um fungo polífago e altamente destrutivo, podendo ser encontrado colonizando até plantas infestantes como *Amaranthus* spp. (caruru) e *Portulacca oleracea* (beldroega). Com exceção a uma espécie de Pteridófitas, todos os hospedeiros ocorrem nas classes Gimnospermae e Angiospermae da divisão Espermatófitas. Sua colonização

geralmente está associada à liberação de enzimas, com habilidade para destruir a parede celular das células hospedeiras. Há indícios que a falta de especificidade desse fungo esteja associada à enorme variedade de celulases, hemicelulases e pectinases produzidas por eles (RIOU; FREYSSINET; FEVRE, 1991).

O fungo sobrevive no solo e nos restos culturais por meio dos escleródios, estrutura micelial compacta, escura, dormente e resistente à dessecação. Essas estruturas podem medir de 2 a 20 mm de comprimento (STEADMAN, 1983), podendo conservar-se viáveis no solo por até 10 anos (LOPES, 2010) e permanecendo infectivas por um longo período de tempo, dependendo das condições climáticas que estão expostos. Em alguns casos a infecção pode começar pelas folhas e então expandir-se para o interior da planta, indicando que os escleródios podem ser formados tanto internamente, quanto externamente, onde são bastante aparentes. A germinação dos escleródios pode ocorrer de duas formas:

a) Miceliogênica – os escleródios presentes no solo germinam e colonizam o colo e raízes das plantas, caracterizando a fase assexual do fungo.

b) Carpogênica – os escleródios dão origem aos apotécios, os quais produzem ascósporos e que podem atingir a parte aérea das plantas. Ao alcançarem suas células, o micélio do fungo as invade, bem como os espaços intercelulares, podendo alcançar o sistema vascular. Cada apotécio pode liberar mais de dois milhões de ascósporos (PAULA JÚNIOR et al., 2006), constituindo uma importante fonte de inóculo, pois esses podem ser levados pelo vento a longas distâncias.

O manejo dessa doença utilizando rotação de cultura é praticamente impossível, devido à persistência das estruturas de resistência do fungo por longo períodos (LI et al., 2003) e a sua larga gama de hospedeiros. Por isso, o controle biológico tem sido empregado com sucesso em alface, utilizando fungos do gênero *Trichoderma* como agente de controle, que reduziram a incidência do mofo-branco em 50%, sob condições controladas de casa de vegetação (CHITRAMPALAM, 2008).

A habilidade de *Trichoderma* spp. em habitar solos cultivados é comprovada (ETHUR et al., 2008), bem como, sua relação inversa com a incidência de doenças de solo (MENEZES, 2007). Estudos recentes apontam que isolados obtidos de amostras de solo com diferentes usos, apresentaram comportamentos diferentes no controle de *S. sclerotiorum* e *S. minor* (IBARRA-MEDINA et al., 2010).

Como características principais, espécies do gênero *Trichoderma* apresentam rápida reprodução e crescimento, que garantem sua sobrevivência sob condições desfavoráveis, capacidade para modificar a rizosfera pela indução de mudanças no pH e/ou na população

microbiológica. Além de agressividade a fungos fitopatogênicos, atividade como agente promotor de crescimento e indutor de mecanismos de defesa em plantas (GARCIA; SANTAMARINA; ROSELLÓ, 2005). Durante a interação patógeno-antagonista diversos mecanismos, tais como, liberação de compostos antibióticos e enzimas hidrolíticas, como quitinase e glucanase (KUBUCEK, et al. 2001), liberação da hifa acessória e penetração direta no hospedeiro, podem ocorrer simultaneamente. Em geral, tais compostos possuem alguma capacidade para promover a supressão de doenças em hortaliças, no entanto Alabouvette, Olivain, e Steinberg (2006) relatam que a sua eficiência é variável, dependendo de características bióticas e abióticas específicas.

No Brasil, o primeiro registro do uso de fungos pertencentes a este gênero foi em 1950, quando Forster (1950) descreveu a inativação do vírus do mosaico do fumo (TMV) por filtrados de *Trichoderma* spp. Mais recentemente, Lobo Júnior (2006) verificou que *T. harzianum* '1306' reduziu em torno de 65% dos escleródios viáveis de *S. sclerotiorum* no solo, nível este que não elimina completamente a doença, mas diminui significativamente a severidade, dando uma maior eficiência do controle químico e de outras práticas de manejo integrado para controle do mofo-branco. Estudando a diversidade de *Trichoderma* spp. em solos com sistemas de produção diferentes, Liu et al. (2008) verificaram que solos submetidos a práticas orgânicas foram mais eficazes na supressão de *S. rolfsii*, do que os submetidos a práticas convencionais.

Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram:

- Estimar a quantidade de esporos presentes nos pós de arroz inoculados com os diferentes isolados de *Trichoderma* spp.;
- avaliar a severidade de mofo-branco em plantas de alface tratadas com diferentes isolados de *Trichoderma* spp.;
- verificar o efeito antagônico dos isolados de *Trichoderma* spp. obtidos de áreas com e sem histórico de mofo-branco e isolados armazenados, no biocontrole de *S. sclerotiorum* e promoção de crescimento em plântulas e plantas de alface;
- quantificar as populações *Trichoderma* spp. presentes no substrato antes e após a interação do patógeno-antagonista.

6. MATERIAL E MÉTODOS

Para obtenção dos inóculos de *Trichoderma* spp. e *S. sclerotiorum*, quantificação de UFC.g⁻¹ e ensaio em bandejas utilizou-se o Laboratório de Fitopatologia Dra. Eloicy Minussi pertencente ao Centro de Ciências Rurais (CCR), e para os ensaios em vasos, utilizaram-se as instalações da estufa do Departamento de Defesa Fitossanitária, no período de junho a novembro de 2012, ambos pertencentes à da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) – RS.

6.1 Tratamentos e delineamento experimental

Foram utilizados 12 isolados de *Trichoderma* spp., dos quais quatro encontravam-se armazenados na micoteca da UFSM e oito obtidos em ensaios anteriores, sendo destes, quatro oriundo de áreas com histórico de mofo-branco e quatro de áreas sem histórico da doença. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, no esquema fatorial 12 x 2 (isolados de *Trichoderma* spp. x inoculação ou não do substrato com *S. sclerotiorum*) mais uma testemunha absoluta sem tratamento algum.

6.2 Obtenção de inóculos de *Trichoderma* spp. e *S. sclerotiorum*

6.2.1 Inóculos de *Trichoderma* spp.

Foi realizado seguindo a metodologia descrita por Ethur (2006), em que grãos de arroz previamente umedecidos com água destilada, foram depositados em frascos de Erlenmeyer e autoclavados por 40 min duas vezes. Em cada frasco foram acrescentados cinco discos (10 mm) contendo micélio de um dos 12 isolados de *Trichoderma* spp., os quais permaneceram em câmara climatizada a 22 °C, com fotoperíodo de 12 h, por 15 dias, para a colonização completa dos grãos de arroz. Para serem armazenados, os grãos já colonizados foram secos

em estufa por 48 h, a temperatura constante de 37 °C. Em seguida foram triturados em liquidificador até a obtenção de um pó, que foi passado em uma peneira de 40 meshes, sendo armazenados em caixas gerbox, sob refrigeração até serem usados nos ensaios de biocontrole.

6.2.2 Inóculos de *S. sclerotiorum*

Para uso no ensaio em plântulas de alface, utilizou-se uma suspensão contendo micélio de *S. sclerotiorum*. Para compor a suspensão, utilizaram-se 100 mL de água destilada por placa de Petri contendo BDA colonizado com o fungo, aos cinco dias de cultivo, os quais foram processados em liquidificador até uniformização da suspensão.

Para a utilização no ensaio em plantas de alface, a obtenção do inóculo de *S. sclerotiorum* em grãos de arroz também seguiu a metodologia de Ethur (2006), porém tal procedimento só foi realizado uma semana antes da instalação do experimento para a padronização do inóculo, já que períodos superiores a uma semana favorecem a formação de escleródios. Devido à termossensibilidade do fungo, não foi realizada a secagem dos grãos de arroz colonizados pelo patógeno, pois o mesmo não sobrevive em temperaturas superiores a 30 °C (SAHARAN; MEHTA, 2008).

6.2.3 Quantificação das UFC.g⁻¹ do pó de *Trichoderma* spp.

Para a quantificação das UFC.g⁻¹ presentes no pó de arroz colonizado com o fungo antagonista, seguiu-se a metodologia do Sistema para Contagem de Esporos Microbianos e Calibração de Suspensão - Calibra (EMBRAPA, 2011). Pesaram-se 10 g do inóculo em um frasco estéril, no qual se acrescentaram 90 mL de água destilada e autoclavada e uma gota de espalhante adesivo (Tween[®] 80). A suspensão foi agitada por cinco minutos, em agitador do tipo Fisher – Flexa Mix™ (USA), em seguida, 1 mL da suspensão foi adicionada em tubo de ensaio com 9 mL de água estéril, com auxílio de micropipeta e novamente foi agitada. Uma pequena alíquota foi pipetada no hemacitômetro ou câmara de Neubauer, onde permaneceu por dois minutos até ser levada ao microscópio ótico para a contagem do número de conídios, que ocorreu conforme descrito no capítulo 1. Os dados obtidos foram inseridos no Calibra, que gerou a quantidade de UFC.g⁻¹ presente no pó colonizado por *Trichoderma* spp.

6.3 Biocontrole de *S. sclerotiorum* e promoção de crescimento em plântulas de alface utilizando *Trichoderma* spp.

Para a avaliação do potencial de biocontrole de *S. sclerotiorum* em plântulas de alface foi realizado um ensaio utilizando-se bandejas de isopor com 200 células cada, e substrato comercial Mec Plant[®]. As bandejas permaneceram por 21 dias em câmara climatizada com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h, sendo irrigadas diariamente e realizando-se um rodízio a cada três dias dentro da câmara, objetivando-se obter maior uniformidade das unidades experimentais.

Para o teste, utilizaram-se sementes de alface cv. Regina, que se caracteriza por ter folhas lisas, ciclo precoce de 60 a 65 dias, alta produtividade, resistência ao *tip burn* e ao florescimento precoce (DUARTE et al., 2012). As sementes foram tratadas, 24 h antes da semeadura, com os pós colonizados obtidos a partir dos 12 isolados de *Trichoderma* spp., semeando-se uma semente por célula. Devido à falta de padronização para aplicações de *Trichoderma* spp. em formulações em pó, em sementes de alface, adotou-se a proporção de 1 g de pó para cada 1 g sementes de alface. Os mesmos foram pesados separadamente e, em seguida, colocados em placas de Petri, onde foram agitados por três minutos, permanecendo até serem utilizadas no ensaio. As bandejas utilizadas continham substrato previamente infestado, 48 h antes, com uma suspensão de micélio do patógeno, na proporção de uma placa de Petri contendo *S. sclerotiorum* com cinco dias de idade, para cada bandeja. Foram utilizadas quatro repetições com 25 sementes cada, totalizando 100 sementes por tratamento.

Para determinar o Índice de Velocidade de Emergência (IVE), realizaram-se contagens diárias do número de sementes emergidas e seu valor calculado conforme a fórmula proposta por Brasil (1992). Quando a emissão de novas plântulas se estabilizou, determinou-se a porcentagem de germinação e ao final do experimento determinou-se a porcentagem de plantas sobreviventes. As avaliações finais somente foram realizadas 21 dias após a semeadura, período em que as mudas encontram-se aptas para serem transplantadas. As plântulas então foram separadas em parte aérea e sistema radicular, com auxílio de um estilete e, posteriormente, medidas em cm com o auxílio de uma régua milimétrica. Para determinação da matéria seca da parte aérea e do sistema radicular (MSPA e MSSR), as partes separadas foram colocadas em sacos de papel previamente identificados e postos para secar em estufa de circulação de ar forçado a 65 °C, até obtenção de peso constante. As

pesagens foram realizadas com o auxílio de uma balança digital. A matéria seca total foi determinada pelo somatório da parte aérea e sistema radicular.

6.4 Biocontrole de *S. sclerotiorum* e promoção de crescimento em plantas de alface utilizando *Trichoderma* spp.

Para a avaliação do biocontrole de *S. sclerotiorum* e crescimento de plantas de alface destinadas ao consumo, foi realizado um ensaio que teve o objetivo de avaliar a alface no ponto de colheita. Foram testados os pós biológicos obtidos a partir dos 12 isolados de *Trichoderma* spp.

Inicialmente, as sementes de alface cv. Regina foram semeadas em bandejas de isopor com 128 células, contendo substrato comercial Mec Plant[®]. Em cada célula foram depositadas de três a cinco sementes de alface e aos sete dias realizou-se um desbaste deixando apenas uma plântula por célula. As bandejas receberam irrigação diária e aos 30 dias, quando as plântulas apresentavam três pares de folhas definitivas, foi realizado o transplante para os vasos de polietileno.

Os vasos que receberam as mudas tinham capacidade para 2 kg e foram preenchidos com o substrato comercial. Porém, com antecedência de 24 h, os vasos receberam grãos de arroz infestados com *S. sclerotiorum* e pós colonizados com os isolados de *Trichoderma* spp., na proporção de 5 g para cada kg de substrato (ÁVILA et al., 2005), em extremos opostos do vaso (Figura 9A). As mudas de alface foram transplantadas no centro do vaso, entre as duas porções dos inóculos (Figura 9B). Foi utilizado um sistema de irrigação por gotejamento, que diariamente era ligado, uma ou mais vezes dependendo da necessidade. Objetivando-se maior confiabilidade nos dados utilizaram-se, 8 plantas de alface por tratamento.

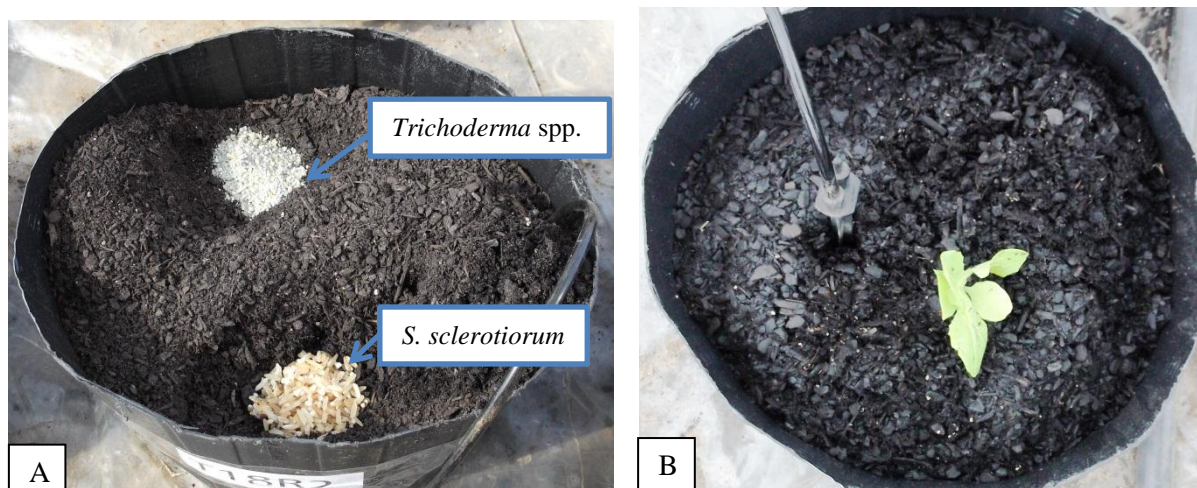


Figura 9 A) Vaso contendo, em extremos opostos, pó de arroz inoculado com *Trichoderma* spp. e grãos de arroz infestado com *S. sclerotiorum*. B) Muda de alface transplantada no centro do vaso, 24 h após as aplicações. Santa Maria, RS. 2012

Semanalmente, após o transplante, foram realizadas avaliações de severidade da doença, seguindo a escala de notas de Cotxarrera et. al. (2002), que se baseia em sintomas externos: na qual a nota zero (0), significa plantas sem sintomas; nota 1, menos de 50% das folhas amareladas (cloróticas) ou murchas; nota 2, mais de 50% das folhas amareladas (cloróticas) ou murchas (plantas vivas); e nota 3, plantas tombadas ou mortas.

Aos 35 dias após o transplante, constatando-se que a testemunha absoluta, ou seja, sem a adição de tratamento algum, encontrava-se no ponto de colheita, realizou-se uma avaliação final, objetivando observar a eficiência do controle de *S. sclerotiorum* por *Trichoderma* spp. As seguintes variáveis foram analisadas:

- Porcentagem de plantas sobreviventes (%);
- número de folhas, obtido pela contagem total do número de folhas totalmente expandidas;
- diâmetro do colo, obtido com o auxílio de um paquímetro digital;
- comprimento do sistema radicular (CSR), obtido com auxílio de uma régua graduada, medindo-se do colo da planta até a extremidade radicular;
- matéria fresca da parte aérea e do sistema radicular (MFPA e MFSR) determinadas com o auxílio de uma balança digital, realizadas no momento da colheita;
- matéria seca da parte aérea e do sistema radicular (MSPA e MSSR), sendo o material separado e posto para secar em estufa de circulação de ar forçado a 65 °C, até a obtenção de peso constante;

- matéria seca total (MST), obtida através do somatório da matéria seca da parte aérea e do sistema radicular.

6.5 Quantificação das UFC.g⁻¹ de *Trichoderma* spp. no substrato inoculado

Antes da instalação do ensaio em vasos quantificou-se a população inicial de *Trichoderma* spp. presente no substrato comercial Mec Plant[®], assim como ao final do mesmo. Após a retirada das plantas foram coletadas amostras de 400 g de substrato, ainda úmido, da região central de cada vaso, tomando-se cuidado para não coletar as porções de arroz infestados com *S. sclerotiorum* e pós colonizados com *Trichoderma* spp. As amostras de substrato coletados foram acondicionadas em sacos plásticos e permaneceram sob refrigeração até serem usadas no ensaio.

Para quantificar o número de UFC.g⁻¹ de *Trichoderma* spp. no substrato, a fim de se verificar o comportamento de sua população na presença e ausência do patógeno, realizaram-se suspensões utilizando-se o substrato amostrado, constituídas por 10 g de substrato diluídos em 90 mL de água destilada esterilizada, acrescido de 2 gotas de espalhante adesivo (Tween[®] 80), depositados em frascos que permaneceram em agitador mecânico tipo Fisher – Flexa Mix[™] (USA) durante cinco minutos. Dessa suspensão inicial, uma diluição de 10 vezes foi realizada, ou seja, 1 mL da solução foi acrescentado em um tubo de ensaio contendo 9 mL de água destilada e esterilizada. Dessa solução, uma alíquota de 0,5 mL foi transferida para cinco placas de Petri contendo meio de cultura seletivo para *Trichoderma* spp. (ROCHA; OLIVEIRA, 1998), cuja composição é: 0,2g MgSO₄ . 7H₂O, 0,9g K₂HPO₄, 0,15g KCl, 1,0g NH₄NO₃, 3,0g Glicose, 0,2g Pentacloronitrobenzeno (PCNB), 40,0g ágar, água destilada esterilizada q.s.p. 1.000 mL e sulfato de estreptomicina 100 mg.L⁻¹. A suspensão foi espalhada nas placas com o auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada, sendo incubadas em BOD a 24 °C e fotoperíodo de 12 h durante quatro dias. Após o período de incubação, foi realizada a quantificação de UFC.g⁻¹, mostrada na figura 10, com o auxílio do Contador de Colônias CP 600 Plus.

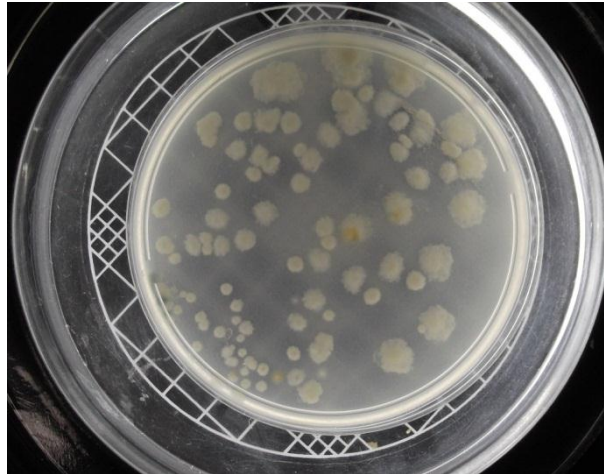


Figura 10 Colônias de *Trichoderma* spp. após o plaqueamento das suspensões feitas com o substrato amostrado, utilizando meio seletivo descrito por Rocha e Oliveira (1998). Santa Maria, RS. 2012

6.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e quando constatado efeito significativo, realizou-se análise de regressão ou comparação das médias através do teste de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade. As análises foram realizadas pelo programa computacional Sistema para Análise de Variância – SISVAR (FERREIRA, 2011).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Quantificação das UFC.g⁻¹ do pó de *Trichoderma* spp.

Segundo Marques et al. (2007), o tipo de substrato mais utilizado até hoje para crescimento e esporulação de *Trichoderma* spp. são grãos de arroz esterilizados. Os isolados que tiveram melhor capacidade para colonizar os grãos de arroz em um período de 15 dias foram SP13 e SP24 (Tabela 5), indicando que essas cepas têm excelente viabilidade para produção em larga escala, uma vez que apresentaram boa capacidade de colonização em

substrato inerte. Os isolados utilizados nesse trabalho obtiveram valores para UFC.g⁻¹, que de acordo com McLean et al. (2012), não influenciam no biocontrole da doença, visto que, de 1,8x10⁶ a 1,9x10⁸ o autor não obteve alterações significativas no biocontrole de *Sclerotinia* spp.

Tabela 5 Quantificação das UFC.g⁻¹ presentes no pó de arroz colonizado com *Trichoderma* spp. obtidos de diferentes origens. Santa Maria, RS. 2012

Isolados	UFC.g⁻¹
UFSMT15.1	1,90 x 10 ⁶ e ¹
UFSMT17	7,14 x 10 ⁶ c
TC1.15	4,65 x 10 ⁶ d
ETSR20	1,60 x 10 ⁶ e
CP11 ²	5,10 x 10 ⁶ d
CP12	1,60 x 10 ⁷ b
CP21	1,30 x 10 ⁷ b
CP22	9,55 x 10 ⁶ c
SP13 ³	7,57 x 10 ⁷ a
SP23	2,45 x 10 ⁶ e
SP14	1,98 x 10 ⁶ e
SP24	2,75 x 10 ⁷ a
CV(%)	23,26

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott (P≤0,05). ²CP: isolados proveniente de áreas com histórico de mofo-branco; ³SP: isolados proveniente de áreas sem histórico de mofo-branco.

Os isolados pertencentes à micoteca da UFSM, ou seja, aqueles que estavam armazenados, apresentaram menor capacidade de colonização quando comparados aos demais grupos de isolados, sugerindo que o armazenamento pode influenciar negativamente no desenvolvimento em substrato, enquanto os isolados do grupo SP obtiveram melhores médias, com SP13 e SP24 apresentando os melhores valores.

Os valores encontrados nesse ensaio variam de 1,6x10⁶ a 7,57x10⁷ UFC.g⁻¹, estando dentro do limiar proposto por McLean et al. (2012), nos quais são requeridas concentrações de pelo menos 10⁵ UFC.g⁻¹ de *T. atroviride* para promover controle de *S. cerviporum* em cebola. Paulitz (2000) e Ousley, Lynch e Whipps et al. (1994) ainda sugerem que a atividade de biocontrole desempenhada por *Trichoderma* spp. tem efeito principalmente em concentrações de aproximadamente 10⁵ UFC.g⁻¹, enquanto valores maiores não promovem

ganhos significativos. A densidade de inóculo do patógeno é um fator importante no biocontrole, entretanto a eficiência de isolados de *T. koningii* no controle de *S. cepivorum* em plantas de cebola não sofreu alteração, independente da quantidade de escleródio/grama de solo e da quantidade do antagonista aplicada (METCALF et al., 2004). Dados recentes apontam que a performance de *Trichoderma* spp. pode ser muito mais influenciada pelo tempo que permanece em contato com o patógeno, do que pela pressão de doença propriamente dita (McLEAN et al., 2012).

7.2 Biocontrole de *S. sclerotiorum* e crescimento em plântulas de alface utilizando *Trichoderma* spp.

Uma alternativa para o fornecimento de *Trichoderma* spp. é o tratamento de sementes (LOBO JÚNIOR, 2005), pois esses agentes têm habilidade de se estabelecerem na rizosfera, colonizando o sistema radicular e controlando diversos patógenos de solo (SCHMIDT, 1979). O controle do *damping-off* pelo tratamento de sementes com agentes biológicos, tem sido relatado com sucesso em diversas culturas (HOWEL, 2006), assim como sua utilização como promotor de crescimento.

Nesse ensaio, constatou-se que a presença de *S. sclerotiorum* no substrato diminuiu estatisticamente a porcentagem de emergência em alface, porém a utilização de *Trichoderma* spp., reduziu esse efeito, exceto para os isolados UFSMT15.1, CP12, CP21 e SP13 (Tabela 6). Estudos confirmam que a aplicação direta de *Trichoderma* spp. permite o aumento significativo na porcentagem e precocidade de emergência em sementes de tomate, porém quando armazenados por pelo menos dois meses, alguns isolados podem promover decréscimo no *stand* final das plantas (TSAHOURIDOU; THANASSOULOPOULOS, 2002). Diante disso, na presença apenas do biocontrolador, os isolados armazenados UFSMT15.1, TC1.15, ETSR20 e os nativos CP21 e SP13 manifestaram-se negativamente, diminuindo estatisticamente a porcentagem de germinação. Um dos problemas ao tratar sementes com agentes de biocontrole é que estes eventualmente afetam negativamente a germinação (LUCON, 2009), já que podem utilizar a semente com substrato, colonizando-a. Mesmo assim, alguns ainda destacaram-se numericamente, apesar de igualarem-se à testemunha absoluta, sendo eles, CP11 e SP23.

Tabela 6 Emergência (%), plântulas sobreviventes (%) e Índice de Velocidade de Emergência - IVE para plântulas de alface cv. Regina, oriundas de sementes tratadas com *Trichoderma* spp. obtidos de diferentes origens, na ausência e presença de *S. sclerotiorum*. Santa Maria, RS. 2012

<i>Trichoderma</i> spp.	Emergência %		Sobreviventes %		IVE	
	Sem <i>S. sclerotiorum</i>	Com <i>S. sclerotiorum</i>	Sem <i>S. sclerotiorum</i>	Com <i>S. sclerotiorum</i>	Sem <i>S. sclerotiorum</i>	Com <i>S. sclerotiorum</i>
Sem <i>Trichoderma</i> spp.	73 aA	53 bB	50 bA	52 bA	1,44 aA	0,80 bB
UFSMT15.1	51 bA ¹	53 bA	39 bA	47 bA	0,81 bA	0,99 bA
UFSMT17	74 aA	77 aA	69 aA	71 aA	1,50 aA	1,82 aA
TC1.15	42 bB	66 aA	36 bB	56 aA	0,80 bA	1,16 bA
ETSR20	60 bA	74 aA	47 bA	64 aA	1,56 aA	1,91 aA
CP11 ²	80 aA	73 aA	76 aA	66 aA	1,62 aA	1,46 aA
CP12	76 aA	41 bB	54 bA	40 bA	1,74 aA	1,44 aA
CP21	62 bA	47 bA	56 bA	40 bA	1,43 aA	0,82 bA
CP22	70 aA	70 aA	62 aA	63 aA	2,02 aA	1,03 bB
SP13 ³	62 bA	58 bA	51 bA	56 aA	1,75 aA	1,01 bB
SP23	78 aA	65 aA	67 aA	60 aA	2,26 aA	1,51 aB
SP14	65 aA	76 aA	51 bA	59 aA	1,60 aA	1,87 aA
SP24	67 aA	65 aA	60 aA	64 aA	1,65 aA	1,26 bA
CV (%)	19,73		24,66		31,25	

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$); ²CP: isolados proveniente de áreas com histórico de mofo-branco; ³SP: isolados proveniente de áreas sem histórico de mofo-branco.

Ainda para os dados de porcentagem de emergência, observou-se que o isolado TC1.15 promoveu decréscimo na ausência de *S. sclerotiorum* quando comparado à testemunha absoluta, sendo estatisticamente superior na presença do patógeno. Comportamento contrário foi demonstrado por CP12, que foi significativamente maior na ausência do patógeno.

Contrariando os resultados anteriores, a porcentagem de sobrevivência não diferiu entre as testemunhas absoluta e a infestada apenas com *S. sclerotiorum*. Os isolados de *Trichoderma* spp. UFSMT17, CP11, CP22, SP23 e SP24 superaram estatisticamente a testemunha absoluta, promovendo ganhos de sobrevivência. O isolado TC1.15, no entanto, atuou negativamente, na ausência do patógeno, já que foi estatisticamente maior na presença

dele, assim como ocorreu para os dados de germinação. Dos isolados aplicados, 75% apresentaram capacidade de aumentar a sobrevivência das plântulas na presença do patógeno.

Estudos anteriores revelam que isolados de *T. koningii* foram agressivos contra *S. sclerotiorum*, colonizando 100% dos escleródios em sete dias (*in vitro*) e aos 60 dias em solo infestado (*in vivo*) (DOS SANTOS; DHINGRA, 1982). Além disso, cerca de 51% de plântulas de alface utilizadas na testemunha contendo apenas o patógeno, sobreviveram 21 dias após a semeadura, comparado com 82% quando se utilizou o tratamento com *T. harzianum*, obtendo plântulas mais saudáveis e vigorosas (INBAR; MENENDEZ; CHET, 1996). Estes resultados são confirmados por Abdullah, Ali e Suleman (2008), que aplicando *T. harzianum* nativo, em plântulas de tomate, comprovaram sua eficácia em mais de 80% no controle de *S. sclerotiorum*.

Os resultados do IVE confirmam que a presença do patógeno é prejudicial no desenvolvimento inicial de mudas de alface, visto que as testemunhas diferiram estatisticamente entre si, bem como, CP22, SP13 e SP23, que também foram significativamente menores, quando comparados aos mesmos tratamentos na ausência do patógeno. Com exceção aos isolados UFSMT15.1 e TC1.15, que foram significativamente menores do que a testemunha absoluta, na ausência do patógeno, os demais apresentaram capacidade de promover ganhos na velocidade de germinação. Sementes de tomate cv. Jubilee tratadas com T22 (*T. harzianum*) também tiveram aumento na velocidade de germinação (MASTOURI; BJÖRMAN; HARMAN, 2010).

O tratamento com *Trichoderma* spp. promoveu ganhos de comprimento de parte aérea em plântulas de alface de até 1,16 cm ou 34%, em relação à testemunha absoluta, sugerindo que o mesmo atua como promotor de crescimento (Tabela 7). Na presença de *S. sclerotiorum*, não apresentaram bons resultados os isolados: UFSMT15.1, TC1.15, CP21, CP22, SP13, SP23 e SP24. Em solo inoculado com *T. harzianum*, pepineiro e pimenteiro apresentaram aumento significativo quanto à altura de plantas de 24 e 17% e para peso de matéria seca de 25 e 20%, respectivamente (INBAR et al., 1994). Tsahouridou e Thanassouloupoulos (2002) ainda reforçam que o tamanho de plântulas infestadas com *S. rolfsii* e tratadas com *Trichoderma* spp., foram maiores em todos os tratamentos utilizados e com maior matéria seca do que nos tratamentos controle.

Tabela 7 Crescimento de parte aérea (CPA), crescimento do sistema radicular (CSR), matéria seca da parte aérea (MSPA) e do sistema radicular (MSSR) e matéria seca total (MST) para plântulas de alface cv. Regina, oriunda de sementes tratadas com *Trichoderma* spp. obtidos de diferentes origens, na ausência e presença de *S. sclerotiorum*. Santa Maria, RS. 2012

	CPA cm		CSR cm		MSPA ² g		MSSR ² g		MST ² g	
	Sem <i>S. sclerotiorum</i>	Com <i>S. sclerotiorum</i>	Sem <i>S. sclerotiorum</i>	Com <i>S. sclerotiorum</i>	Sem <i>S. sclerotiorum</i>	Com <i>S. sclerotiorum</i>	Sem <i>S. sclerotiorum</i>	Com <i>S. sclerotiorum</i>	Sem <i>S. sclerotiorum</i>	Com <i>S. sclerotiorum</i>
<i>Trichoderma</i> spp.										
Sem <i>Trichoderma</i> spp.	3,44 bA ¹	3,70 aA	2,70 bB	4,68 aA	0,025 cA	0,072 aA	0,007 aA	0,017 cA	0,032 cA	0,089 bA
UFSMT15.1	3,04 bA	3,01 bA	2,35 bA	1,84 bA	0,025 cA	0,012 bA	0,007 aA	0,002 cA	0,032 cA	0,014 cA
UFSMT17	3,82 aA	3,70 aA	2,36 bB	4,39 aA	0,045 cB	0,102 aA	0,010 aB	0,067 aA	0,055 cB	0,169 aA
TC1.15	3,28 bA	2,96 bA	2,40 bA	2,01 bA	0,040 cA	0,020 bA	0,007 aA	0,002 cA	0,047 cA	0,022 cA
ETSR20	3,68 bA	3,95 aA	2,68 bB	4,85 aA	0,077 bA	0,085 aA	0,007 aA	0,020 cA	0,084 cA	0,097 bA
CP11³	4,60 aA	3,70 aB	2,53 bA	2,51 bA	0,057 cA	0,092 aA	0,002 aA	0,010 cA	0,059 cA	0,104 bA
CP12	4,29 aA	3,68 aA	4,28 aA	2,97 bA	0,157 aA	0,037 bB	0,030 aA	0,002 cA	0,187 aA	0,038 cB
CP21	3,48 bA	3,08 bA	2,44 bA	2,54 bA	0,062 cA	0,027 bA	0,012 aA	0,005 cA	0,074 cA	0,032 cA
CP22	3,90 aA	3,15 bB	3,32 aA	2,40 bA	0,082 bA	0,027 bA	0,005 aA	0,007 cA	0,089 bA	0,034 cA
SP13⁴	3,86 aA	3,20 bA	3,73 aA	4,13 aA	0,087 bA	0,140 aA	0,022 aA	0,032 bA	0,109 bA	0,172 aA
SP23	4,06 aA	3,03 bB	2,90 bA	3,69 aA	0,085 bA	0,090 aA	0,025 aA	0,045 bA	0,110 bA	0,135 bA
SP14	3,06 bA	3,76 aA	2,09 bB	3,72 aA	0,035 cA	0,062 aA	0,003 aA	0,017 cA	0,038 cA	0,079 bA
SP24	3,45 bA	3,31 bA	2,37 bB	3,91 aA	0,057 cA	0,077 aA	0,007 aA	0,010 cA	0,064 cA	0,087 bA
CV (%)	14,36		29,38		2,93		1,55		3,64	

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

²Dados transformados em $\sqrt[2]{x + 0,5}$.

³CP: isolados proveniente de áreas com histórico de mofo-branco.

⁴SP: isolados proveniente de áreas sem histórico de mofo-branco.

Para a variável crescimento do sistema radicular, observou-se que as plântulas tratadas apenas com *S. sclerotiorum* foram superiores à testemunha absoluta, o que pode ter permitido às plântulas desencadear uma resposta contra o patógeno, forçando o crescimento das raízes em busca de nutrientes para fugir do ataque fúngico. Nas plântulas tratadas apenas com *Trichoderma* spp., os isolados CP12, CP22 e SP13 destacaram-se com médias superiores estatisticamente a testemunha absoluta, sugerindo que os mesmos, atuam como promotores de crescimento do sistema radicular, já que permitiram ganhos de até 1,58 cm ou 58,52%. O tratamento de sementes ou de plântulas com produtos biológicos pode, simultaneamente, conferir resistência a estresses bióticos (doenças) e estresses abióticos (MASTOURI; BJÖRMAN; HATMAN, 2010).

Nas plântulas tratadas com o biocontrolador na ausência do patógeno, verificou-se que UFSMT17, ETSR20, SP14 e SP24 tiveram valores para o sistema radicular estatisticamente iguais à testemunha absoluta, porém estatisticamente menores do que os seus correspondentes cultivados em substrato infestado com *S. sclerotiorum*, dando indícios que tais cepas agiram mais ativamente na presença, do que na ausência do patógeno no substrato. Pinto et al. (2011) sugerem, que pode ser uma característica específica da alface cv. Regina, já que também relatou maiores resultados para plantas cultivadas na presença de fitopatógenos, sugerindo que esta cultivar em especial, pode ter moderada resistência a infecções fúngicas.

Todos os isolados do grupo CP, UFSMT15.1 e TC1.15 foram estatisticamente inferiores à testemunha na presença de *S. sclerotiorum*, os dois últimos em especial, repetindo-se como ineficientes controladores do patógeno, assim como na variável crescimento de parte aérea. Tsahouridou e Thanassoulopoulos (2002) reforçam que o tempo de armazenamento influencia a taxa de crescimento de plantas de tomate, sugerindo que a ineficiência de UFSMT15.1 e TC1.15 pode estar relacionada ao tempo de armazenamento. Segundo Mastouri, Björman e Harman (2010), *Trichoderma* spp. são favorecidas pela presença de raízes, as quais colonizam facilmente, e aquelas que colonizam melhor a rizosfera podem ser adicionadas ao solo ou em sementes por qualquer método.

A promoção de crescimento desempenhada por *Trichoderma* spp. é confirmada pelos resultados obtidos para o peso de matéria seca da parte aérea, em plantas cultivadas na ausência do patógeno. Dentre os isolados utilizados neste trabalho, destaca-se CP12, com ganhos significativos em relação à testemunha absoluta, seguido de ETSR20, CP22, SP13 e SP23. Assim como observou Pinto et al. (2011), neste trabalho as plantas de alface não infestadas com patógeno, apresentaram menores médias para matéria seca da parte aérea do que as infestadas. Já na presença do patógeno, os isolados do grupo SP, UFSMT17, ETRS20

e CP22 mostraram-se estatisticamente iguais a testemunha, porém apenas SP14 não foi numericamente superior. Segundo Gomes e Paiva (2004), a massa seca da parte aérea indica a rusticidade das mudas e a massa seca das raízes, determina a sobrevivência e crescimento inicial das mudas a campo.

Para os dados de matéria seca do sistema radicular, na ausência do patógeno, os isolados de *Trichoderma* spp. não mostraram diferenças significativas em relação à testemunha absoluta, porém UFSMT17 foi estatisticamente menor do que o seu correspondente na presença de *S. sclerotiorum*. Na presença do patógeno, o mesmo isolado UFSMT17, foi o melhor, seguido por SP13 e SP23, com os demais se igualando estatisticamente a testemunha. Em solo infestado por *Pythium* spp. ocorreu redução da matéria seca do sistema radicular em mudas de tomate, enquanto em sementes tratadas com *T. harzianum* as plântulas tiveram aumento de 46% quando comparadas à testemunha absoluta (MASTOURI; BJÖRMAN; HARMAN, 2010).

Confirmando o potencial de biocontrole exercido pelos isolados de *Trichoderma* spp., CP12 obteve maior média para a matéria seca total em plântulas de alface cultivadas apenas com o biocontrolador, seguido por CP22, SP13 e SP23. Já para as plântulas semeadas em substrato infestado com *S. sclerotiorum*, as cepas UFSMT17 e SP13 foram as melhores, com SP13 superando estatisticamente o seu correspondente na ausência do patógeno. Os isolados UFSMT15.1, TC1.15, CP21 e CP22 apresentaram os piores resultados, sendo estatisticamente menores do que a testemunha infestada com o patógeno, sugerindo que os mesmos não são bons controladores de *damping-off* causado por *S. sclerotiorum* em plântulas de alface.

Diante do exposto, as concentrações das UFC.g⁻¹ presentes no pó de *Trichoderma* spp. aplicado nas sementes, não influenciaram significativamente o controle e o crescimento de alface. Confirmando os resultados obtidos por diversos autores (McLEAN et al., 2012; PAULITZ, 2000; OUSLEY; LYNCH; WHIPPS, 1994), os quais citam que, formulações com concentrações superiores a 10⁵ UFC.g⁻¹ não promovem ganhos no biocontrole de *Sclerotinia* spp., sendo portanto mais influenciado pelo tempo de armazenamento e diversidade fisiológica apresentada pelos isolados de *Trichoderma* spp.

7.3 Sobrevivência e severidade do mofo-branco, em plantas de alface

Diversos fatores são conhecidos influenciando a severidade de *Sclerotinia* spp. em alface, os quais incluem estágio de desenvolvimento da cultura, temperatura do ar e umidade do solo (SAHARAN; MEHTA, 2008). Devido às condições ambientais altamente favoráveis, o aparecimento da doença, em campo, foi evidenciado ainda na primeira semana após o transplante, com o desenvolvimento do micélio branco, característico do fungo, no substrato infestado (Figura 11A), causando *damping-off* nas mudas recém transplantadas (Figura 11B).

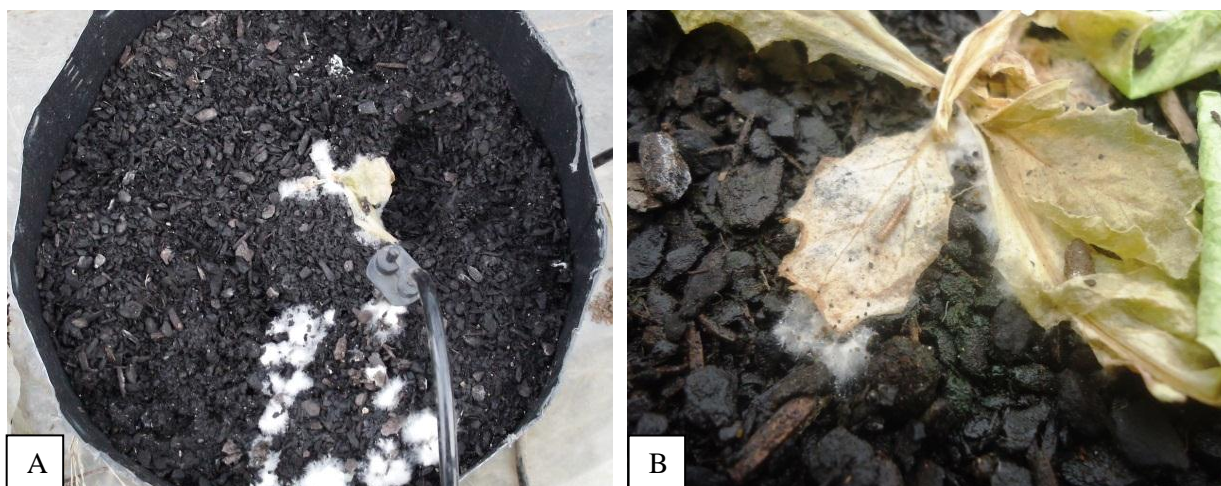


Figura 11 A) Crescimento do micélio característico do mofo-branco no substrato infestado apenas com *S. sclerotiorum*. B) *Damping-off* em mudas de alface cv. Regina, cultivadas em casa de vegetação. Santa Maria, RS. 2012

Em substrato infestado apenas com *S. sclerotiorum*, a testemunha apresentou porcentagem de plantas de alface sobreviventes de 50%, sendo estatisticamente menor que a testemunha absoluta e do que as plantas em que foram aplicados os isolados de *Trichoderma* spp., conforme a Tabela 8. Tais resultados são contrários aos encontrados por Chitrampalam et al. (2008), em que o número de plantas sobreviventes nos tratamentos inoculados apenas com *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. e *Bacillus* spp. em geral foram menores do que a testemunha absoluta. Na testemunha infestada apenas com *S. sclerotiorum*, obteve-se o maior número de plantas mortas e as maiores notas para a severidade da doença, sugerindo que os

grãos de arroz colonizados com *S. sclerotiorum* foram capazes de manifestar sintomas na cultura. Segundo Brighenti (2010), o mofo-branco ocorre quando as folhas permanecem em contato direto com o substrato contaminado, o que pode ser observado claramente na Figura 11B. O micélio produzido pelo fungo infecta folhas baixas e tecidos do caule, podendo causar declínio de plantas de alface em uma semana (SAHARAN; MEHTA, 2008).

Tabela 8 Porcentagem de plantas de alface (cv. Regina) sobreviventes, inoculadas com *S. sclerotiorum* e isolados de *Trichoderma* spp. armazenados e obtidos de áreas com e sem histórico da doença. Santa Maria, RS. 2012

<i>Trichoderma</i> spp.	Sobreviventes (%)	
	Sem <i>S. sclerotiorum</i>	Com <i>S. sclerotiorum</i>
Sem <i>Trichoderma</i> spp.	100 aA ¹	50,0 bB
UFSMT15.1	100 aA	100 aA
UFSMT17	100 aA	87,5 aA
TC1.15	100 aA	87,5 aA
ETSR20	100 aA	87,5 aA
CP11 ²	100 aA	87,5 aA
CP12	100 aA	100 aA
CP21	100 aA	100 aA
CP22	100 aA	87,5 aA
SP13 ³	100 aA	87,5 aA
SP23	100 aA	87,5 aA
SP14	100 aA	100 aA
SP24	100 aA	100 aA
CV (%)	22,59	

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$); ²CP: isolados proveniente de áreas com histórico de mofo-branco; ³SP: isolados proveniente de áreas sem histórico de mofo-branco.

Todos os isolados de *Trichoderma* spp. testados providenciaram redução na severidade da doença quando comparados com a testemunha infestada apenas com *S. sclerotiorum*. No grupo dos isolados armazenados, ETSR20 apresentou as maiores notas para severidade da doença desde a primeira semana de avaliação, indicando não ser um bom inibidor dos danos causados por *S. sclerotiorum*, enquanto os demais isolados ao final da 5ª

semana apresentaram notas semelhantes entre si, sugerindo que os mesmos desempenham atividades similares na redução dos sintomas (Figura 12).

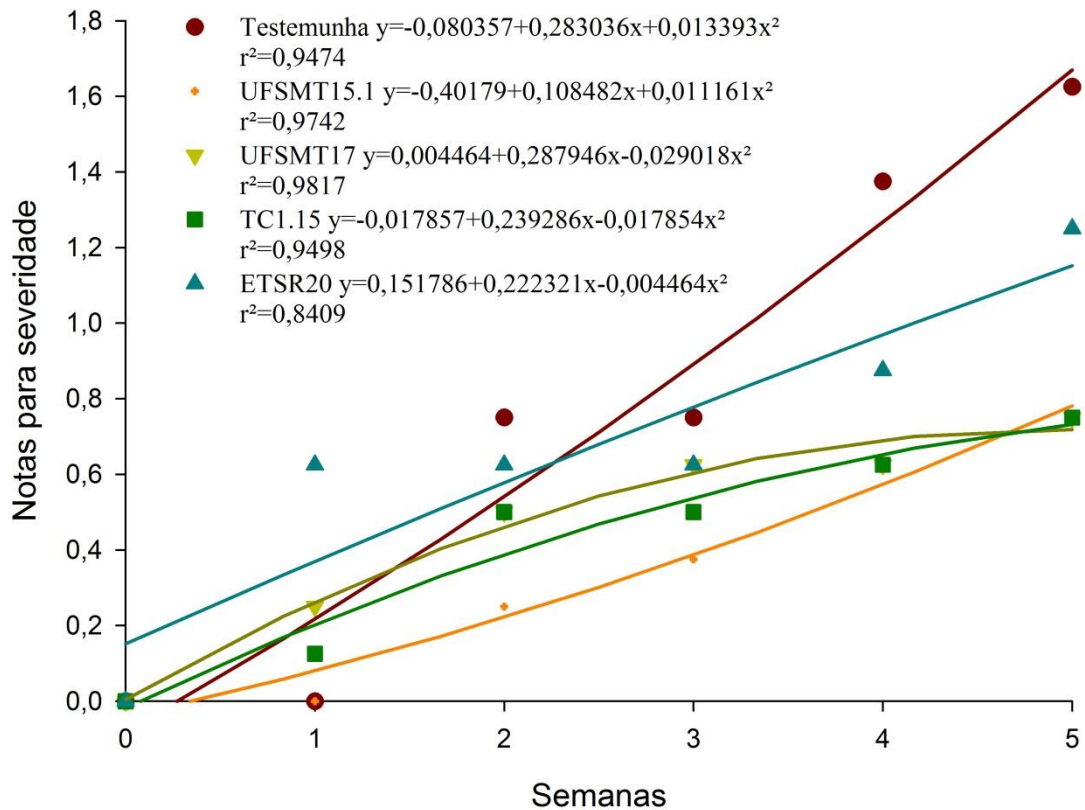


Figura 12 Notas para a severidade de mofo-branco em plantas de alface infestadas apenas com *S. sclerotiorum* e biocontrole do patógeno com isolados de *Trichoderma* spp. armazenados, baseadas na escala de Cotxarrera (2002). Santa Maria, RS. 2012

Utilizando os isolados do grupo CP, apenas CP21 foi capaz de atuar de forma eficiente no biocontrole da doença (Figura 13), já que manteve até o final do ciclo da cultura notas baixas para severidade, não permitindo o avanço dos sintomas. CP12 exibiu os piores resultados desse grupo, proporcionando o avanço linear da doença, apesar de todas as cepas pertencerem à espécie *T. asperellum*, ficando evidente que atuam de formas distintas no controle de *S. sclerotiorum*. O mesmo também foi observado por Hoyos-Carvajal, Orduz e

Bissett (2009), indicando uma alta diversidade metabólica em isolados de *T. asperellum* obtidos de regiões Tropicais.

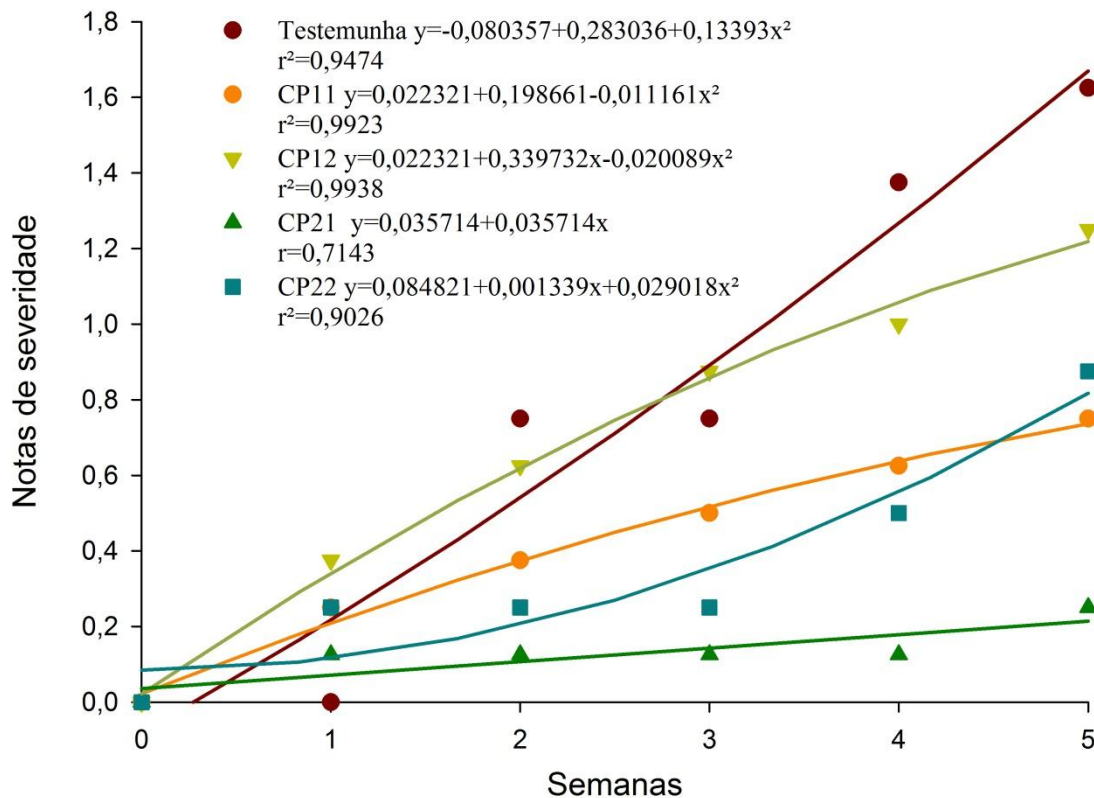


Figura 13 Notas para a severidade de mofo-branco em plantas de alface infestadas apenas com *S. sclerotiorum* e biocontrole do patógeno com isolados de *Trichoderma* spp. obtidos de áreas com histórico da doença, baseadas na escala de Cotxarrera (2002). Santa Maria, RS. 2012

Dentre os isolados do grupo SP (Figura 14), SP24 foi o melhor, obtendo notas semelhantes ao melhor isolado do grupo anterior, o CP21, sendo ambos considerados os melhores no controle da severidade de *S. sclerotiorum* utilizados nesse ensaio. Contrariando os resultados anteriores, em que cepas da mesma espécie apresentaram comportamentos distintos, entre os isolados SP foi observado um comportamento semelhante em espécies diferentes, ou seja, SP23 (*T. koningiopsi*) obteve as mesmas notas do que SP14 (*T. asperellum*). De acordo com Dennis e Webster (1971), os isolados de uma mesma espécie,

embora sejam morfológicamente semelhantes, podem diferir fisiologicamente e atuarem de maneira diferente no controle de fitopatógenos, dependendo, portanto, mais das características fisiológicas dos isolados que da espécie propriamente dita.

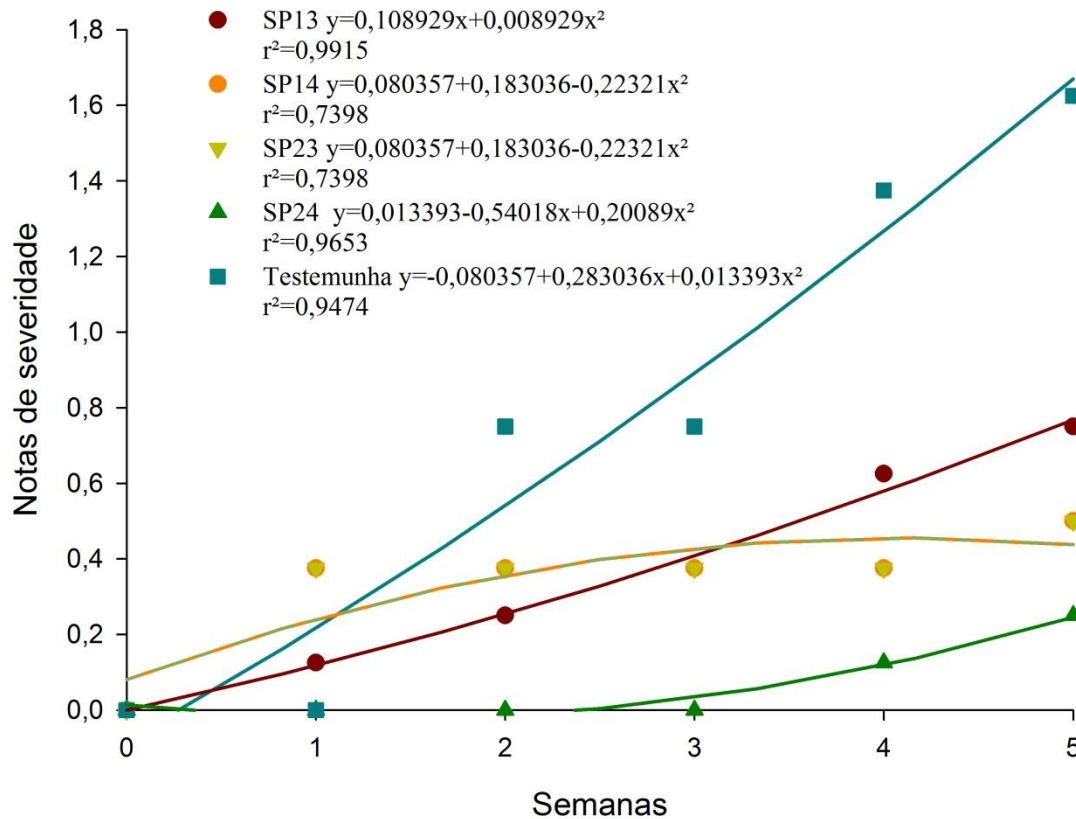


Figura 14 Notas para a severidade de mofo-branco em plantas de alface infestadas apenas com *S. sclerotiorum* e biocontrole do patógeno com isolados de *Trichoderma* spp. obtidos de áreas sem histórico da doença, baseadas na escala de Cotxarrera (2002). Santa Maria, RS. 2012

A severidade da doença mofo-branco no ensaio em casa de vegetação, não apresentou diferenças marcantes no que diz respeito à origem dos isolados, visto que CP21 e SP24, obtidos, respectivamente, de áreas com e sem histórico da doença, foram aqueles que desempenharam melhores resultados para a redução da severidade quando comparados à testemunha. O mesmo se aplica à quantidade de UFC.g⁻¹ de *Trichoderma* spp. aplicadas nos vasos cultivados com alface, já que, enquanto as melhores respostas continham 1,3 e 3,75x10⁷

UFC.g⁻¹, para CP21 e SP24, respectivamente, as piores representadas por CP12 e SP13, tinham 1,6 e 7,57x10⁷ UFC.g⁻¹, respectivamente. Confirmando que a população do antagonista não é um fator decisivo na redução da severidade de *S. sclerotiorum*, para alface cultivada em casa de vegetação.

7.4 Biocontrole de *S. sclerotiorum* e promoção de crescimento em plantas de alface utilizando *Trichoderma* spp.

Os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados no ensaio foram capazes de promover ganhos de crescimento tanto na presença, quanto na ausência de *S. sclerotiorum*, em plantas de alface cv. Regina. Para a variável número de folhas (Tabela 9), os melhores isolados testados na ausência de *S. sclerotiorum* foram UFSMT15.1, ETSR20 e SP13, enquanto os demais apresentaram-se estatisticamente iguais à testemunha, apesar de serem numericamente superiores. Na presença do patógeno, os isolados não apresentaram diferença significativa, ainda que TC1.15 e SP13 tenham se destacado numericamente. Os valores apresentados superam os encontrados por Duarte et al. (2012), que obteve 25 folhas no tratamento controle e estão de acordo com Santos et al. (2001) que avaliando crescimento de alface encontrou valor máximo de 35 folhas/planta.

Tabela 9 Número de folhas, diâmetro do colo e crescimento do sistema radicular (CSR) para plantas de alface cv. Regina, inoculadas com *S. sclerotiorum* e isolados de *Trichoderma* spp. armazenados e obtidos de áreas com e sem histórico da doença. Santa Maria, RS. 2012

	Nº de folhas		Diâmetro do colo mm		CSR cm	
	Sem <i>S. sclerotiorum</i>	Com <i>S. sclerotiorum</i>	Sem <i>S. sclerotiorum</i>	Com <i>S. sclerotiorum</i>	Sem <i>S. sclerotiorum</i>	Com <i>S. sclerotiorum</i>
<i>Trichoderma</i> spp.						
Sem <i>Trichoderma</i> spp.	27,57 bA ¹	30,50 aA	10,20 aB	13,10 aA	20,87 bA	19,25 bA
UFSMT15.1	32,83 aA	32,28 aA	12,88 aA	12,48 aA	24,67 aA	22,61 aA
UFSMT17	30,85 bA	31,33 aA	11,21 aA	11,67 aA	24,01 aA	22,60 aA
TC1.15	30,62 bB	34,50 aA	11,81 aA	12,28 aA	19,08 bA	19,73 bA
ETSR20	32,28 aA	31,50 aA	11,87 aA	11,12 aA	20,25 bA	22,66 aA
CP11 ²	30,71 bA	32,37 aA	11,43 aA	12,44 aA	20,20 bB	24,80 aA
CP12	28,28 bB	33,14 aA	11,34 aA	12,66 aA	22,87 aA	20,64 bA
CP21	29,43 bB	33,71 aA	11,71 aA	12,90 aA	22,18 aA	21,63 aA
CP22	30,85 bA	30,33 aA	10,79 aA	10,77 aA	22,02 aA	19,20 bA
SP13 ³	33,86 aA	35,50 aA	12,83 aA	13,21 aA	23,64 aA	20,88 bA
SP23	29,57 bA	30,67 aA	11,21 aA	11,73 aA	22,54 aA	20,53 bA
SP14	30,87 bA	31,43 aA	11,46 aA	12,05 aA	20,87 bA	19,15 bA
SP24	30,43 bA	32,71 aA	11,03 aA	12,74 aA	22,71 aA	19,38 bA
CV (%)	9,97		14,52		14,48	

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$); ²CP: isolados proveniente de áreas com histórico de mofo-branco; ³SP: isolados proveniente de áreas sem histórico de mofo-branco.

Os dados para diâmetro do colo mostraram que a testemunha absoluta foi estatisticamente menor do que a testemunha cultivada em substrato infestado com *S. sclerotiorum*. Na ausência de *S. sclerotiorum*, os isolados do antagonista foram estatisticamente iguais à testemunha absoluta, mesmo com todos os isolados numericamente superiores a ela. Já, na presença do patógeno, apenas SP13 foi numericamente superior à sua testemunha, mesmo com todos os isolados testados estatisticamente iguais.

Na ausência do patógeno, aproximadamente, 64% dos isolados atuaram auxiliando no desenvolvimento do sistema radicular, com incrementos de até 17,5% ou 3,64 cm, no comprimento em relação à testemunha absoluta, sendo TC1.15, ETSR20, CP11 e SP14 os menos promissores. Porém, nas plantas cultivadas em substrato infestado com *S. sclerotiorum*, todos os isolados do grupo SP apresentaram-se estatisticamente iguais a testemunha, sendo superados por UFSMT15.1, UFSMT17, ETSR20, CP11 e CP21.

Yedidia et al. (2001) sugerem que o efeito na promoção de crescimento causado por *T. harzianum* presente na rizosfera do solo é devido ao aumento proporcionado a área radicular, que permite à planta explorar um volume maior de solo e conseqüentemente mais fontes de nutrientes. Isso pode ter permitido ao isolado ETSR20, um dos melhores resultados quando utilizado na presença de *S. sclerotiorum*, visto que, na presença do patógeno há maior liberação de exsudatos radiculares deixando que agentes antagônicos usufruam deles para seu desenvolvimento, que segundo Ousley, Lynch e Whipps et al. (1994), são decorrentes da sua atividade saprofítica no solo. Bal e Altintas (2008) ainda ressaltam que, enquanto exsudatos de raízes de cebola causam inibição, em alface eles são levemente favoráveis a *T. harzianum*. O isolado UFSMT15.1, pertencente a espécie *T. koningiopsis*, também proporcionou bom desenvolvimento do sistema radicular da planta na presença do patógeno, tal espécie tem desempenhado significativos resultados contra *S. sclerotiorum* (ESCANDE; LAICH; PEDRAZA, 2002).

Assim como a variável número de folhas, a matéria fresca da parte aérea somente apresentou resultados estatisticamente significativos na ausência do patógeno (Tabela 10), quando todos os isolados tiveram médias numericamente superiores à testemunha absoluta. Mais uma vez destacam-se, auxiliando no crescimento da parte aérea, os isolados UFSMT15.1, TC1.15, ETSR20, CP21 e ainda SP13, que foi inferior ao seu equivalente na presença do patógeno, assim como o isolado CP12.

Tabela 10 Matéria fresca da parte aérea (MFPA) e sistema radicular (MFSR), matéria seca da parte aérea (MSPA) e sistema radicular (MSSR) e matéria seca total (MST) para plantas de alface cv. Regina, inoculados com *S. sclerotiorum* e isolados de *Trichoderma* spp. armazenados e obtidos de áreas com e sem histórico da doença. Santa Maria, RS. 2012

	MFPA		MFSR		MSPA		MSSR		MST	
	g		g		g		g		g	
	Sem <i>S. sclerotiorum</i>	Com <i>S. sclerotiorum</i>	Sem <i>S. sclerotiorum</i>	Com <i>S. sclerotiorum</i>	Sem <i>S. sclerotiorum</i>	Com <i>S. sclerotiorum</i>	Sem <i>S. sclerotiorum</i>	Com <i>S. sclerotiorum</i>	Sem <i>S. sclerotiorum</i>	Com <i>S. sclerotiorum</i>
<i>Trichoderma</i> spp.										
Sem <i>Trichoderma</i> spp.	60,47 bA ¹	84,45 aA	4,34 aB	10,06 aA	4,23 bB	7,42 aA	0,32 aB	0,62 aA	4,55 bB	8,05 aA
UFSMT15.1	95,01 aA	71,93 aA	7,85 aA	7,04 bA	6,46 aA	5,30 aA	0,51 aA	0,46 aA	6,97 aA	5,77 bA
UFSMT17	75,66 bA	82,15 aA	7,28 aA	6,67 bA	4,57 bA	4,86 aA	0,44 aA	0,45 aA	5,01 bA	5,32 bA
TC1.15	81,75 aA	94,46 aA	5,10 aA	7,83 bA	5,70 aA	6,78 aA	0,41 aA	0,59 aA	6,11 aA	7,37 aA
ETSR20	84,56 aA	73,50 aA	5,92 aA	6,78 bA	5,68 aA	5,79 aA	0,42 aA	0,35 aA	6,10 aA	6,14 bA
CP11 ²	77,02 bA	85,95 aA	5,48 aB	9,31 aA	4,64 bA	5,53 aA	0,34 aB	0,69 aA	4,99 bA	6,22 bA
CP12	60,44 bB	97,90 aA	6,83 aA	7,43 bA	4,23 bA	5,62 aA	0,41 aA	0,51 aA	4,64 bA	6,13 bA
CP21	88,52 aA	97,75 aA	6,52 aA	7,95 bA	4,65 bA	5,55 aA	0,36 aA	0,49 aA	5,01 bA	6,05 bA
CP22	67,10 bA	71,81 aA	5,34 aA	5,24 bA	5,01 bA	4,68 aA	0,56 aA	0,29 aB	5,58 bA	4,97 bA
SP13 ³	97,42 aB	109,40 aA	8,50 aA	9,70 aA	5,59 aA	6,27 aA	0,62 aA	0,62 aA	6,21 aA	6,89 aA
SP23	69,05 bA	79,01 aA	7,41 aA	5,99 bA	4,26 bA	4,67 aA	0,49 aA	0,41 aA	4,75 bA	5,09 bA
SP14	77,60 bA	92,72 aA	4,96 aA	6,94 bA	4,73 bA	5,98 aA	0,32 aA	0,45 aA	5,05 bA	6,43 bA
SP24	70,81 bA	91,35 aA	6,48 aA	6,34 bA	4,78 bA	6,03 aA	0,43 aA	0,49 aA	5,21 bA	6,52 bA
CV (%)	26,68		37,59		25,62		48,94		25,13	

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$); ²CP: isolados proveniente de áreas com histórico de mofo-branco; ³SP: isolados proveniente de áreas sem histórico de mofo-branco.

De forma semelhante ao experimento realizado em plântulas de alface, no tratamento infestado apenas com *S. sclerotiorum*, para o ensaio em vasos, foi possível observar que a alface cv. Regina manteve um comportamento padrão, superando a testemunha absoluta, confirmando a sua capacidade de resposta frente ao ataque fúngico, que neste caso, apresentou mortalidade de 50%.

Os dados de matéria fresca da parte aérea corroboram com os apresentados por Duarte et al. (2012), que encontraram máximo de 90,3 g.planta⁻¹ utilizando-se adubação orgânica em alface cv. Regina, visto que SP13 e UFSMT15.1, exibiram 97,42 e 91,01 g.planta⁻¹, respectivamente, na ausência do patógeno. Na presença de *S. sclerotiorum*, o isolado SP13 também foi capaz de promover aumento de massa fresca, quando comparado a testemunha, mesmo que não tenha diferido da mesma.

Possivelmente devido à colheita das plantas, que não permitiu a coleta total das raízes secundárias, as quais ficaram fortemente aderidas ao substrato, provavelmente originando um erro experimental, os resultados para matéria fresca e seca do sistema radicular apresentaram altos coeficientes de variação. Na presença do patógeno, a testemunha apresentou os melhores resultados para matéria fresca do sistema radicular, com apenas dois isolados igualando-se a ela, sendo CP11, que também foi o melhor para crescimento radicular, e SP13. Enquanto nos tratamentos sem *S. sclerotiorum*, todos os isolados testados foram numericamente superiores a testemunha absoluta, podendo dar indícios que indivíduos do gênero *Trichoderma* atuam promovendo ganhos de matéria fresca no sistema radicular de alface. Louzada et al. (2009) acrescentam que o antagonista desenvolve ação direta no controle dos patógenos, apresentando ação indireta sobre a produtividade das plantas e maior exploração do solo através do sistema radicular.

Assim como na variável matéria fresca, os resultados para matéria seca da parte aérea apresentaram diferenças estatísticas em relação à testemunha absoluta, porém apenas na ausência de *S. sclerotiorum*. Os melhores resultados foram exibidos por UFSMT15.1, TC1.15, ETSR20 e SP13, que apresentaram 6,46; 5,70; 5,68; e 5,59 g respectivamente, superando os valores máximos encontrados por Duarte et al. (2012), que ficaram em torno de 4,86 g.planta⁻¹, para a cv. Regina. No entanto, na presença do patógeno, todos os isolados de *Trichoderma* spp. foram numericamente inferiores a testemunha.

Não foram encontradas diferenças significativas entre a testemunha absoluta e as plantas de alface tratadas com o antagonista na ausência do patógeno para a variável matéria seca do sistema radicular. Mesmo assim, verifica-se que as plantas tratadas com *Trichoderma* spp. foram numericamente superiores a testemunha absoluta. Tais resultados estão de acordo

com Resende et al. (2004) e Cassiolato (1995), que relatam acúmulo de matéria seca nas raízes beneficiadas com aplicação do fungo antagonista. Ainda na ausência do patógeno, verificou-se que o isolado CP11 e a testemunha absoluta foram estatisticamente inferiores aos seus correspondentes na presença de *S. sclerotiorum*.

Assim como na ausência do patógeno, os dados para matéria seca do sistema radicular na presença do mesmo não mostram diferenças significativas, porém CP22 foi estatisticamente inferior ao seu correspondente na presença de *S. sclerotiorum*. Pinto et al. (2011), utilizando diferentes cultivares de alface em sistema hidropônico, constataram que a cv. Regina se desenvolveu melhor na presença de *P. aphanidermatum*, exibindo maiores médias para massa do sistema radicular. Fato semelhante foi observado neste ensaio, com a testemunha infestada apenas com *S. sclerotiorum* sendo estatisticamente superior a testemunha absoluta, mesmo assim, não se pode concluir que tal cultivar seja mais resistente ao mofo-branco.

Utilizando UFSMT17 (*T. aureoviride*) no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*, Menezes (2007) obteve bons resultados, mas o mesmo não se observou no presente ensaio. Portanto, Hoyos-Carvajal et al. (2008) sugerem que a capacidade micoparasítica desempenhada por *Trichoderma* spp. varia de acordo com o patógeno utilizado. Craver, Pitt e Rhodes (1996) ainda ressaltam que *T. aureoviride* tem seu máximo potencial antagonista a 28 °C, tornando-o uma excelente escolha no controle biológico em plantas cultivadas em estufas e casas de vegetação. Devido ao período climático em que este ensaio foi instalado, ou seja, no inverno, raramente as temperaturas dentro da casa de vegetação atingiram tal patamar, no entanto, para *T. harzianum* as temperaturas amenas são mais favoráveis (EASTBURN; BUTLER, 1988).

Para matéria seca total, os resultados foram significativos tanto na ausência, quanto na presença do fungo fitopatogênico, verificando-se que apenas os isolados UFSMT15.1, TC1.15, ETSR20 e SP13 promoveram ganhos reais de matéria seca, variando de 34,06 a 53,18%, e superando estatisticamente a testemunha absoluta. Porém, na presença do patógeno, a testemunha obteve os maiores valores e apenas TC1.15 e SP13 foram capazes de se igualar estatisticamente a ela. Esses resultados estão de acordo com diversos autores, entre eles, Lynck (1992) que relatou o potencial de *Trichoderma* spp. como agente biológico na agricultura, devido à sua habilidade em estimular o crescimento de plantas, já que proporcionou aumento de 54 a 100% na produção de alface. Já Ousley, Lynch e Whipps et al. (1994) observaram que apenas um dos isolados de *T. harzianum* testados apresentou resultado superior (5%) à testemunha absoluta quanto ao crescimento (massa seca total) em alface.

Diante desses resultados, os melhores isolados no biocontrole de *S. sclerotiorum* foram TC1.15 e SP13, confirmando o que foi sugerido por Harman (1991), em que o comportamento dos isolados *in vitro*, pode não se manifestar da mesma forma sob condições de campo, já que nos testes de confrontação direta, os isolados citados apresentaram-se como pouco eficientes no controle do fungo. Entretanto, para a promoção crescimento, os melhores isolados foram UFSMT15.1 e SP13, sugerindo que SP13 apresenta as características desejáveis para um biocontrolador, como excelente viabilidade para produção em larga escala, boa atividade antagônica a *S. sclerotiorum* e capacidade de estimular a promoção de crescimento em plantas de alface.

7.5 Quantificação das UFC.g⁻¹ de *Trichoderma* spp. no substrato inoculado

A rizosfera é a área que proporciona efeitos diretos sobre as plantas (SALGADO et al., 1999), pois nela encontram-se os micro-organismos que podem promover crescimento vegetal e proteger o sistema radicular de possíveis infecções por patógenos (PANDOLFO, 2007). Já a competência rizosférica é a habilidade que alguns micro-organismos têm de penetrar nas raízes, estimular o crescimento e ativar mecanismos de defesas das plantas (VERMA et al., 2007). Com base nisso, estipulou-se a coleta de substrato na região adjacente as raízes, que segundo estudos de Tsahouridou e Thanassouloupoulos (2002), tem correlação com a habilidade antagônica de *Trichoderma* spp. contra *Sclerotinia* spp., promovendo ganhos em plantas de tomate. Os dados deste ensaio revelam que em substrato infestado com *S. sclerotiorum*, as plantas testemunhas tiveram um maior desenvolvimento da população de *Trichoderma* spp., com $3,48 \times 10^6$ UFC.g⁻¹, supondo que *S. sclerotiorum* estimula a população do biocontrolador no substrato (Tabela 11), já que populações de *Trichoderma* spp. obtidas de solo rizosférico nativo, variam de 10^4 a 10^5 UFC.g⁻¹ (HOHMANN et al., 2011), valores similares aos encontrados no substrato antes do ensaio e na testemunha absoluta.

Tabela 11 UFC.g⁻¹ de *Trichoderma* spp. na ausência e presença de *S. sclerotiorum* em substrato cultivado com alface cv. Regina. Santa Maria, RS. 2012

<i>Trichoderma</i> spp.	Sem	Com
	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>S. sclerotiorum</i>
Antes do ensaio	4,5x10 ⁴ cA ^{1,2}	4,5x10 ⁴ cA
Sem		
<i>Trichoderma</i> spp.	5,90x10 ⁵ bA	3,48x10 ⁶ bA
UFSMT15.1	2,52x10 ⁶ bA	7,69x10 ⁵ bA
UFSMT17	1,81x10 ⁶ bA	1,29x10 ⁶ bA
TC1.15	5,64x10 ⁶ bA	3,55x10 ⁶ bA
ETSR20	2,28x10 ⁶ bA	3,12x10 ⁶ bA
CP11 ³	4,80x10 ⁷ aA	2,46x10 ⁷ aA
CP12	3,62x10 ⁷ aA	5,77x10 ⁵ bB
CP21	3,49x10 ⁷ aA	1,65x10 ⁷ aA
CP22	2,12x10 ⁷ aA	3,97x10 ⁷ aA
SP13 ⁴	1,13x10 ⁷ aA	3,11x10 ⁶ bA
SP23	8,08x10 ⁶ aA	1,15x10 ⁶ bB
SP14	2,05x10 ⁷ aA	3,83x10 ⁶ bA
SP24	5,65x10 ⁶ bB	3,84x10 ⁷ aA
CV (%)	8,64	

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$); ²Dados transformados $\log_{10} x$; ³CP: isolados proveniente de áreas com histórico de mofo-branco; ⁴SP: isolados proveniente de áreas sem histórico de mofo-branco.

Os isolados de *Trichoderma* spp. aplicados provaram ser bons colonizadores de substrato, uma vez que as populações foram capazes de aumentar na presença de alface, quando comparadas com as UFC.g⁻¹ aplicadas, excetuando-se os isolados UFSMT17, CP12 (com *S. sclerotiorum*) e SP24 (sem *S. sclerotiorum*). Na ausência do patógeno, as maiores populações foram apresentadas pelos isolados nativos, com exceção a SP24, que apesar de ter apresentado maior quantidade UFC.g⁻¹ aplicada foi estatisticamente menor do que seu correspondente na presença de *S. sclerotiorum*, e apresentando um dos melhores resultados para redução da severidade de mofo-branco. Os isolados CP11, CP21, CP22 e SP24 foram significativamente maiores do que a testemunha infestada com *S. sclerotiorum*, e CP12 e SP23 estatisticamente menores que seus equivalentes na presença do patógeno.

De modo geral, foi possível verificar, que a quantidade de UFC.g⁻¹ aplicada não apresentou um padrão bem definido, visto que na ausência do patógeno a maior população foi de 4,8x10⁷ UFC.g⁻¹, para CP11, e a menor de 1,81x10⁶ UFC.g⁻¹, para UFSMT17. Já no

substrato infestado com *S. sclerotiorum*, a maior população foi de $3,97 \times 10^7$ UFC.g⁻¹, para CP22, e a menor de $5,77 \times 10^5$ UFC.g⁻¹, para CP11, sendo menor do que a sua testemunha. Fahima e Henis (1990) reportaram incrementos em populações de *Trichoderma hamatum* Bain em solo rizosférico de berinjela infestado com *Rhizoctonia* spp., quando comparado ao não infestado. Isto é explicado pelo aumento da exsudação das raízes infectadas, promovendo a base alimentar para o antagonista, ou conforme sugerido por Chet e Backer (1981), pelo possível ataque dos propágulos do patógeno pelo antagonista. Pouco ainda se sabe a respeito de como as populações de *Trichoderma* spp. presentes na rizosfera influenciam o modo de ação das plantas (HOHMANN et al., 2011), porém estudos apontam que os isolados que melhor colonizam o solo rizosférico, frequentemente colonizam a superfície e o córtex das raízes.

8. CONCLUSÕES

1. Os isolados de *Trichoderma* spp., obtidos de diferentes origens, apresentaram população de UFC.g⁻¹ divergentes no pó inoculado.
2. O fornecimento de *Trichoderma* spp. promoveu plântulas de alface de boa qualidade e um bom controle do patógeno.
3. Os isolados *Trichoderma* spp. foram capazes de reduzir a severidade dos danos causados por *S. sclerotiorum* em plantas de alface.
4. Auxiliaram positivamente no crescimento das plantas de alface os isolados UFSMT15.1, ETSR20, CP21 e SP13, enquanto, TC1.15, CP22 e SP13 foram bons controladores do patógeno.
5. Os isolados de *Trichoderma* spp. nativos obtiveram maiores populações no substrato cultivado com plantas de alface, do que os isolados armazenados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, M.T.; ALI, N.Y.; SULEMAN, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, Oxford, v. 27, p. 1354-1359, 2008.

ALABOUVETTE, C.; OLIVAIN, C.; STEINBERG, C. Biological control of plant diseases: the European situation. **European Journal Plant Pathology**, London, v. 114, p. 329-341, 2006.

ÁVILA, Z.R. et al. Seleção de isolados de *Trichoderma spp.* antagônicos a *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. **Embrapa Recursos Genéticos**, Brasília, DF, 2005, 30p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 117).

BAL, U.; ALTINTAS, S. Effects of *Trichoderma harzianum* on lettuce in protected cultivation. **Journal of Central European of Agriculture**, [S.l.], v. 9, n. 1, p. 63-70, 2008.

BOLTON, M.D.; THOMMA, B.P.; NELSON, B.D. Pathogen profile: *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 7, p. 1-6, 2006.

BRASIL. **Ministério da Agricultura e Reforma Agrária**. Regras para análise de sementes. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992.

BRIGHENTI, J. **Desinfecção de bandejas e uso de substratos agrícolas na produção de mudas de alface (*Lactuca sativa* L.) na região oeste catarinense**. 2010. 52 f. Relatório de Trabalho de Conclusão de Curso. UNOCHAPECÓ, 2010.

CASSIOLATO, A.M.R. **Parasitismo de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary por mutantes de *Trichoderma harzianum rifai***. 1995. 133 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 1995.

CHET, I.; BACKER, R. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, p. 286-290, 1981.

CHITRAMPALAM, P. Biocontrol of Lettuce Drop Caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor* in Desert Agroecosystems. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, n. 12, p. 1625-1634, 2008.

COTXARRERA, L. et. al. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium wilt* of tomato. **Soil Biology and Biochemistry**, Missouri, v. 34, n. 4, p. 467-476, 2002.

CRAVER, C.E.; PITT, D.; RHODES, D.J. Aetiology and biological control of *Fusarium wilt* of pinks (*Dianthus caryophyllus*) using *Trichoderma aureoviride*. **Plant Pathology**, Saint Paul, v. 45, p. 618-630, 1996.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal Interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 57, n. 3, p. 363-369, 1971.

DOS SANTOS, A.F.; DHINGRA, O.D. Pathogenicity of *Trichoderma* spp. on the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal Botany**, [S.l.], v. 60, p. 472-475, 1982.

DUARTE, A.S. et al. Uso de diferentes doses de manipueria na cultura da alface em substituição à adubação mineral. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 16, n. 3, p. 262-267, 2012.

EASTBURN, D.M.; BLUTER, E.E. Microhabitat characterization of *Trichoderma harzianum* in natural soil: Evaluation of factors affecting population density. **Soil Biology and Biochemistry**, Missouri, v. 20, p. 541-545, 1988.

EMBRAPA MEIO AMBIENTE. **Sistema para Contagem de Esporos Microbianos e Calibração de Suspensão** – CALIBRA, Jaguariúna, 2011.

ESCANDE, A.; LAICH, F.; PEDRAZA, M. Field testing of honey-bee-dispersed *Trichoderma* spp. to manage sunflower head rot (*Sclerotinia sclerotiorum*). **Plant Pathology**, Saint Paul, v. 51, p. 346-351, 2002.

ETHUR, L. Z. et al. Presença dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* em solo rizosférico e não-rizosférico cultivado com tomateiro e pepineiro, em horta e estufa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, p. 19-26, 2008.

ETHUR, L.Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro**. 2006. 154 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

FAHIMA, T.; HENIS, Y. Interaction between pathogens, host and biocontrol agent: multiplication of *Trichoderma hamatum* and *Talaromuces flavus* on root of diseased and healthy host. In: Hornby, D. (Ed.). **Biological control of soilborne plant pathogens**. **CAB International**, London, p. 165-180, 1990.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2008.

FORSTER, R. Inativação do vírus do mosaico comum do fumo pelo filtrado de culturas de *Trichoderma* sp.. **Bragantia**, Campinas, v. 10, n. 5, p. 139-148, 1950.

GARCÍA, B.F.J.; SANTAMARINA, M.P; ROSELLÓ, J. *Trichoderma*: mecanismos de control. **Phytoma**, Valencia, v. 172, p. 106-107, 2005.

GOMES, J. M.; PAIVA, H. P. **Viveiros florestais (propagação sexuada)**. 3. ed, Viçosa: UFV, 2004. 116 p. (Caderno didático, 72).

HOHMANN, P. et al. Understanding *Trichoderma* in the root system of *Pinus radiata* associations between rhizosphere colonization and growth promotion for commercially grown seedlings. **Fungal Biology**, Oxford, v. 115, p. 759-767, 2011.

HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S. BISSETT, J. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. **Fungal Genetics and Biology**, [S.l.], v. 46, p. 615-631, 2009.

HOWELL, C.R. Effect of seed quality and fungicide/*Trichoderma* spp. seed treatments on pre- and post-emergence damping-off in cotton. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, p. 66-71, 2006.

IBARRA-MEDINA, V.A. et al. Isolation and screening of *Trichoderma* strain antagonistic to *Sclerotinia*. **Revista Mexicana de Micologia**, Veracruz, v. 31, p.53-63, 2010.

INBAR, J.; MENENDEZ, A.; CHET, I. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia Sclerotiorum* and its role in biological control. **Soil Biological and Biochemistry**, Missouri, v. 28, n. 6, p. 757-763, 1996.

INBAR, J. et al. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grow under commercial conditions. **European Journal of Plant Pathology**, [S.l.], v. 100, p. 337-346, 1994.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBEGE). **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009**: Análise do consumo pessoal no Brasil. Rio de Janeiro. 150p. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_analise_consumo/pofanalise_2008_2009.pdf. Acesso: em 01 de set. 2012.

KUBICEK, C.P. et al. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. **Journal Plant Pathology**, Bari, v. 83, p. 11–24, 2001.

LI, G.Q.; HUANG, H.C.; ACHARYA, S.N. Antagonism and biocontrol potential of *Ulocladium atrum* on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, San Diego, v. 28, p. 11-18, 2003.

LIU, B. et al. *Trichoderma* communities in soils from organic, sustainable, and conventional farms, and their relation with Southern blight of tomato. **Soil Biology and Biochemistry**, Missouri, v. 40, p. 1124-1136, 2008.

LOBO JÚNIOR, M.; PIMENTA, G.; GONTIJO, G. H. Controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma harzianum* em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, p. 341, ago. 2006. Suplemento, ref. 0877. Edição dos resumos do XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Salvador, 2006.

LOBO JÚNIOR, M.; PIMENTA, G.; BALLAROTTI, A. Controle de *Rhizoctonia* e *Fusarium solani* em campo com *Trichoderma harzianum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília-DF, v. 30, 2005, 95p.

LOPES, C.A.; QUEZADO-DUVAL, A.M.; REIS, A. **Doenças de Alface**. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2010, 68p.

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

LOUZADA, G.A.S. et al. Potencial antagonico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotrópica**, Campinas, v. 9, n. 3, p. 145-149, 2009.

LYNCK, J. Pesquisa inglesa com agentes biológicos. **Jornal Agroceres**, São Paulo, v. 212, p. 2, 1992.

MARQUES, G.A. et al. Cultivo de *Trichoderma* spp. e *Dicyma pulvinata* em substratos sólidos. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, DF, Comunicado Técnico, n. 168, 2007, 5p.

MASTOURI, F.; BJÖRMAN, T.; HARMAN, G.E. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 100, n.11, p. 1213-1221, 2010.

McLEAN et al. Viability in control of anion white rot by *Trichoderma atroviride* under different disease pressures. **Australian Plant Pathology**, [S.l.], v. 41, p. 341-346, 2012.

MENEZES, J. P. **Caracterização populacional e molecular, e seleção de *Trichoderma* spp. para biocontrole de *Fusarium* sp. em crisântemo.** 2007. 112 f. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

METCALF, D.A.; DENNIS, J.J.C.; WILSON, C.R. Effects of inoculum density of *Sclerotium cepivorum* on the ability of *Trichoderma koningi* to suppress white rot of onion. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 3, p. 287-291, 2004.

OHSE, S. et al. Qualidade de cultivares de alface produzidas em hidroponia. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 181-185, 2001.

OUSLEY, M.A.; LYNCH, J.M.; WHIPPS, J.M. Potential of *Trichoderma* spp. as consistent plant growth stimulators. **Biology Fertility of Soils**, v. 17, p. 85-90, 1994.

PANDOLFO, J.D. **Associação de *Trichoderma* sp. e fungicidas no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.** 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

PAULA JÚNIOR, T. J. et al. **Manejo Integrado do Mofo-Branco do Feijoeiro - Guia Técnico.** 1. ed. Viçosa: EPAMIG, 2006. 48 p.

PAULITZ, T.C. Population dynamics of biocontrol agents and pathogens in soils and rhizosphere. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 106, p. 401-413, 2000.

PINTO, Z.V. et al. Podridão de raízes causadas por *Pythium aphanidermatum*, em cultivares de alface produzidas em sistema hidropônico. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 37, n. 4, p. 180-186, 2011.

RESENDE, M.L. et al. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 793-798, 2004.

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

RIOU, C.; FREYSSINET, G.; FEVRE, M. Production of cell wall-degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 57, n. 5, p. 1478-1484, 1991.

SAHARAN, G.S.; MEHTA, N. **Sclerotinia diseases of crop plants: biology, ecology and disease management**. New Delhi: Springer, 2008, 486 p.

SALA, F.C.; COSTA, C.P. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF v. 30, n. 2, p. 187-194, 2012.

SALGADO, C.H.G. et al. Efecto de la aplicacion de *Trichoderma harzianum* R. sobre la composicion cuantativa de bacterias, hongos y actinomicetos de la rizosfera de solanaceaea y su influencia em el crecimiento vegetativo. **Investigaciones Agropecuarias: Produccion Producto Vegetal**, Bayamo, v. 14, n. 1-12, 1999.

SANTOS, R.H.S. et al. Efeito residual da adubação com composto orgânico sobre o crescimento e produção de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n. 11, p. 1395-1398, 2001.

SCHMIDT, E.L. Initiation of plant-microbe interactions. **Annual Review Microbiological**, v. 33, p. 198-203, 1979.

STEADMAN, J.R. White mold. A serious yield limiting disease of bean. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, p. 346-350, 1983.

TSAHOURIDOU, P.C.; THANASSOULOPOULOS, C.C. Proliferation of *Trichoderma koningii* in the tomato rhizosphere and the suppression of damping-off by *Sclerotium rolfsii*. **Soil Biology and Biochemistry**, Missouri, v. 37, p. 767-776, 2002.

VERMA, M. et al. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, [S.l.], v. 37, p. 1-20, 2007.

YEDIDIA, I. et al. Effects of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increase growth of cucumber plants. **Plant and Soil**, New York, v. 235, p. 235-242, 2001.

Anexo 1

Identificação dos isolados de *Trichoderma* spp.



SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
 Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
 Instituto Biológico
 Unidade Laboratorial de Referência em Fitossanidade

**RESULTADO
 DE DIAGNÓSTICO
 FITOSSANITÁRIO
 03924/2012**

IDENTIFICAÇÃO DO REQUERENTE

Requerente: Gerarda beatriz Pinto da Silva
Endereço: Avenida Roraima, 1000
CEP: 97105-900 **Cidade:** Santa Maria **Estado:** RS

IDENTIFICAÇÃO DO INTERESSADO

Interessado: Gerarda beatriz Pinto da Silva
Endereço: Avenida Roraima, 1000
CEP: 97105-900 **Cidade:** Santa Maria **Estado:** RS

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA

Amostrador: SI **Identificação do fiscal:** SI
Espécie: FUNGOS **Cultivar:** SI
Lote: SI **Representatividade:** 10 **Lacre:** SI **Safra:** SI
Termo de coleta de amostra: SI **Procedência:** Santa Maria
Ofício: SI **Requerimento:** SI
Data da amostragem: 13/11/2012 **Tipo de material:** cultura in vitro
Dt. entrada: 13/11/2012 **Dt. conclusão:** 14/11/2012
Natureza da análise: fungos

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA NO LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA FITOPATOLÓGICA

Nº de triagem: IBSV 02661-01/01-12 **Nº da amostra:**
Qt. recebida: **Qt. analisada:**

MÉTODOS DE ANÁLISE

Extração de DNA, amplificação da região ITS (internal transcribed spacer) e do gene codificador do fator de elongação 1-alfa, sequenciamento e comparação com sequências depositadas no GenBank.

RESULTADO DA ANÁLISE

Trichoderma asperellum = 1.15, C12CP3, C14SP1, C21CP4, C22CP1, C22CP4 E C24SP1
Trichoderma koningii = C13SP1 e C23SP5
Rhizoctonia bataticola (*Macrophomina phaseolina*) = isolado de Rhizoctonia

Responsável pela análise **São Paulo, 14/11/2012** **Ciente**


RICARDO HARAKAVA
 Pesquisador Científico
 Laboratório de Bioquímica Fitopatológica


JOSIANE TAKASSAKI FERRARI
 Responsável Técnico
 CREA 5060145850


RICARDO JOSÉ DOMINGUES
 Diretor Técnico de Serviço
 Substituto
 ULK em Fitossanidade

NOTAS

- 1-A identificação da amostra é de exclusiva responsabilidade do remetente.
 2-A presente análise tem seu valor restrito à amostra entregue no laboratório.
 3-O laboratório não se responsabiliza pela coleta da amostra.
 4-SI: sem informação.