

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**AGENTES MICROBIANOS NO MANEJO DE DOENÇAS E
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS**

JULIANA FERNANDES DOS SANTOS

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
JUNHO - 2017**

AGENTES MICROBIANOS NO MANEJO DE DOENÇAS E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

JULIANA FERNANDES DOS SANTOS

Engenheira agrônoma

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2011

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Fitotecnia).

Orientadora: Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Cristina Fermino Soares

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Lopes Loguercio

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

JUNHO - 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

S237a

Santos, Juliana Fernandes dos.

Agentes microbianos no manejo de doenças e promoção de crescimento de plantas / Juliana Fernandes dos Santos. – Cruz das Almas, BA, 2017. 97f.; il.

Orientador: Jorge Teodoro de Souza.

Coorientadora: Ana Cristina Firmino Soares.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Fitopatologia – Microbiologia. 2.Plantas – Tomate – Feijão – Colza – Trigo. 3.Controle biológico – Avaliação. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Loguercio, Leandro Lopes. III.Título.

CDD: 581.2

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**AGENTES MICROBIANOS NO MANEJO DE DOENÇAS E
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE
JULIANA FERNANDES DOS SANTOS**

Realizada em 29 de junho de 2017

Dra. Ana Cristina Firmino Soares
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Examinador Interno

Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Examinador Interno

Dra. Franceli da Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Examinador Interno

Dr. Carlos Alberto Tuão Gava
Embrapa - Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semi- Árido
Examinador Externo

Dra. Elida Barbosa Corrêa
Universidade Estadual da Paraíba
Examinador Externo

Aos meus pais,
Jurandir Manoel dos Santos
e
Ivone Fernandes dos Santos,

Com todo amor e gratidão, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus. Pela minha existência, por me conduzir sempre no caminho correto. Sinto Sua presença constante em minha vida, fortalecendo-me principalmente nos momentos mais difíceis.

À universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pelos desafios e realizações proporcionados, e a CAPES, pelo apoio financeiro com a concessão da bolsa de estudos.

Aos meus pais, Jurandir e Ivone, pelo amor, educação e confiança. Obrigada!

À minhas irmãs Larissa e Girlene, por todo carinho e amizade.

Ao meu marido Marcos, pelo carinho, apoio, atenção e compreensão.

À minha princesa Júlia, meu pequeno tesouro.

Esses são os alicerces de minha vida.

Aos familiares, principalmente, aos tios Julio e Regina e vovó Maricota, pelo acolhimento, constante ajuda e carinho.

Ao meu orientador, Dr. Jorge Teodoro, e ao co-orientador, Dr. Leandro Loguercio, agradeço pela oportunidade, orientação e confiança na realização desse trabalho.

À co-orientadora Dr^a Ana Cristina Fermino Soares, agradeço pela amizade, ensinamentos, preocupações e conselhos, que contribuíram para meu desenvolvimento pessoal e intelectual.

Aos Pesquisadores Dr. Mark Braithwaite e Dr. Robert Hill e ao pessoal do Laboratório Bioprotection Research centre, pela oportunidade, orientação e confiança na realização desse trabalho. Especialmente, ao grande amigo Ivan Chirino, por todo apoio na realização dos trabalhos e momentos de descontração.

Ao Dr. Dimmy Barbosa, pela disponibilização do Laboratório de Nematologia e Microbiologia do solo da Embrapa para realização das análises nematológicas.

Ao professor Dr. André Azevedo, pela amizade e ensinamentos.

À Dr^a Cecília Ritzinger Prata e Dr. Rogério Ritzinger, sou grata pela amizade, carinho, paciência, ensinamentos e puxões de orelha.

Ao Sr. João Vieira, técnico do Laboratório de nematologia da Embrapa, e as técnicas do Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia, Zozilene e Carolina, agradeço pela amizade, ensinamentos e constante ajuda.

Agradeço aos colegas Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia e do laboratório de Bioquímica, pelo convívio, amizade e ajuda. Especialmente, aos amigos Josilda, Leonardo, Margarida e Jéssica, pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho, pelo acalento nas horas de desespero, pelas piadas e risos nas horas de descontração. Serei eternamente grata.

Às amigas de longas datas Pâmela, Adriane, Jamille, Kátia e Jucimara, pelo companheirismo.

Aos colegas dos cursos de graduação em Engenharia agrônômica e de pós-graduação em Ciências Agrárias e Microbiologia Agrícola da UFRB, pela amizade.

Aos professores e funcionários da UFRB pelos ensinamentos e apoio, em especial, à Deyse, secretária da Pós-Graduação.

À todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para que eu realizasse esse sonho.

A todos, meu sincero agradecimento!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO	1
 CAPÍTULO 1	
 <i>Bacillus</i> spp. COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO E AGENTES DE BIOCONTROLE DE <i>Meloidogyne incognita</i> EM TOMATEIROS.....	18
 CAPÍTULO 2	
 <i>Trichoderma</i> spp. NO CONTROLE DE <i>Meloidogyne incognita</i> E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE TOMATEIROS.....	40
 CAPÍTULO 3	
 POTENCIAL DE <i>Trichoderma</i> spp. NO CONTROLE DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE FEIJOEIRO.....	59
 CAPÍTULO 4	
 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS DE FEIJÃO, DE CANOLA E DE TRIGO TRATADAS COM <i>Trichoderma</i> spp.....	82
 CONSIDERAÇÕES FINAIS	97

AGENTES MICROBIANOS NO MANEJO DE DOENÇAS E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

Autora: MSc. Juliana Fernandes dos Santos

Orientador: Dr. Jorge Teodoro de Souza

RESUMO: Este trabalho teve como objetivos avaliar o efeito de: 1) *Bacillus* spp. no manejo de *Meloidogyne incognita* e na promoção de crescimento de tomateiros; 2) *Trichoderma* spp. no manejo de *M. incognita* e na promoção de crescimento de tomateiros; 3) *Trichoderma* spp. no manejo de *Sclerotinia sclerotiorum* e na promoção de crescimento de feijoeiros; 4) *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento de plantas de feijão, canola e trigo. Doze isolados de *Bacillus* spp. promoveram o crescimento de tomateiros e 19 isolados causaram a redução na infestação de *M. incognita*. *Trichoderma* spp. codificados como ALF225, FA10, ALF68 e ALF26 promoveram o crescimento dos tomateiros. Os isolados ALF85 e ALF225 reduziram a infestação de *M. incognita*. *Trichoderma* spp. proporcionaram incrementos no teor relativo de clorofila e no número de nódulos nas raízes de feijoeiro infectados por *S. sclerotiorum*. Em plantas sadias, *Trichoderma* spp. promoveram aumento no número de sementes germinadas, número de nódulos, altura de plantas e no teor de clorofila dos feijoeiros. Houve efeito diferenciado de *Trichoderma* spp. sobre a promoção de crescimento das plantas de feijão, canola e trigo. Os feijoeiros tratados com *Trichoderma* spp. codificados como FCC340, LU753, FCC207, LU1328, LU668, FCC318, FCC312, FCC714, FCC358 e FCC161 apresentaram incrementos na massa seca da parte aérea e número de vagens. Os isolados LU659, FCC55, FCC320, FCC734, FCC16 e FCC161 promoveram incrementos na massa seca da parte aérea das plantas de canola. As plantas de trigo tratadas com *Trichoderma* spp. tiveram incrementos na massa seca das raízes e no teor de clorofila nas folhas. Isolados de *Bacillus* e de *Trichoderma* controlaram *M. incognita* e promoveram o crescimento de tomateiros. Isolados de *Trichoderma* promoveram o crescimento de feijoeiros, trigo e canola, mas, não controlaram *S. sclerotiorum*.

Palavras-chave: *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp., nematoides, mofo branco, tomate, feijão, trigo, canola.

AGENTES MICROBIANOS NO MANEJO DE DOENÇAS E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

Author: MSc. Juliana Fernandes dos Santos

Adviser: Dr. Jorge Teodoro de Souza

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the effect of: 1) *Bacillus* spp. in the control of *Meloidogyne incognita* and on tomato growth; 2) *Trichoderma* spp. in the control of *M. incognita* and on tomato growth; 3) *Trichoderma* spp. in the control of *Sclerotinia sclerotiorum* and on bean growth; 4) *Trichoderma* spp. in the growth of bean, wheat and oil seed rape plants. Twelve *Bacillus* strains promoted the growth of tomato plants and 19 strains caused a reduction in *M. incognita* infestation. *Trichoderma* spp. isolates ALF225, FA10, ALF68 and ALF26 promoted the growth of tomato plants. *Trichoderma* spp. isolates ALF85 and ALF225 reduced *M. incognita* infestation. *Trichoderma* spp. provided increases in the relative content of chlorophyll and in the number of nodules in bean roots infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. In healthy plants, *Trichoderma* spp. increased number of germinated seeds, the number of nodules, plant height and chlorophyll content of bean plants. There was a differentiated effect of *Trichoderma* spp. on the promotion of growth of bean, oil seed rape and wheat plants. Beans treated with *Trichoderma* spp. isolates FCC340, LU753, FCC207, LU1328, LU668, FCC318, FCC312, FCC714, FCC358 and FCC161 showed increases in shoot dry mass and in the number of pods. Isolates LU659, FCC55, FCC320, FCC734, FCC16 and FCC161 promoted increases in shoot dry mass of oil seed rape plants. Wheat plants treated with *Trichoderma* spp. had increases in the dry mass of the roots and the chlorophyll content of the leaves. *Bacillus* and *Trichoderma* strains controlled *M. incognita* and promoted the growth of tomato plants. *Trichoderma* strains promoted the growth of bean, wheat and oil seed rape plants, but did not control *S. sclerotiorum*.

Keywords: *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp., nematodes, white mold, tomato, bean, wheat, oil seed rape.

INTRODUÇÃO

Devido aos exsudados liberados pelas raízes, muitos micro-organismos habitantes do solo têm como nicho ecológico a rizosfera, onde se multiplicam e se protegem da ação antagônica de outros micro-organismos (KLOEPPER, 1996). As associações entre as plantas e os micro-organismos podem resultar em danos às plantas, devido à patogenicidade de alguns micro-organismos, ou proporcionar efeitos positivos, como a promoção de crescimento das plantas e proteção contra patógenos (MENDES et al., 2013). Tais associações compreendem uma das estratégias mais bem sucedidas que as plantas adotaram para adaptação às adversidades (REDMAN et al., 2002).

Micro-organismos fitopatogênicos habitantes do solo

Os exsudatos liberados pelas raízes são constituídos por compostos orgânicos de alto peso molecular (carboidratos, enzimas, etc.) e baixo peso molecular (ácidos orgânicos, aminoácidos, flavonóides, ácidos fenólicos, etc.), prontamente disponíveis como nutrientes aos micro-organismos no solo (MIMMO et al., 2011; PII et al., 2015). As substâncias voláteis e solúveis liberadas pelas raízes podem difundir-se no solo e estimular a germinação de esporos fungicos ou atrair nematóides e bactérias fitoparasitas, sendo a principal causa da elevada populacional de micro-organismos na rizosfera (WILLADINO et al., 2005), e em busca de nutrientes, esses micro-organismos ocasionam as doenças (AGRIOS, 2005).

As doenças são resultados da interação entre a planta hospedeira e o micro-organismo patogênico, influenciados pelo ambiente, e ocasionam modificações morfológicas e fisiológicas na planta (AGRIOS, 2005). Entre os principais micro-organismos habitantes do solo causadores de doenças em plantas encontram-se as bactérias, os fungos e os nematóides (MENDES et al., 2013), por causarem danos em diversas espécies de importância econômica e serem de difícil controle.

Os fungos formam o maior grupo de patógenos habitantes do solo devido à produção de esporos e elevada capacidade de competição saprofítica, que garantem a sobrevivência em condições adversas e/ou na ausência do

hospedeiro (AGRIOS, 2005). Encontrados frequentemente como fungos de vida livre (WILLADINO et al., 2005), na presença do hospedeiro comportam-se como biotróficos, hemibiotróficos, saprofitas facultativos ou parasitas facultativos (AGRIOS, 2005).

Entre os fungos patogênicos habitantes do solo, destaca-se o fungo necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal do mofo branco, que afetam uma ampla gama de hospedeiros, incluindo muitas espécies vegetais de importância econômica, como as plantas de soja (GARCIA et al., 2015), girassol (LIU et al., 2017), canola (JOSHI et al., 2016), feijoeiro (McCREARY et al., 2016) e tomateiro (FINDLING et al., 2013), além de algumas plantas daninhas (DOS SANTOS et al., 2014). Há relatos de que *S. sclerotiorum* coloniza mais de 400 espécies de plantas (PELTIER et al., 2012). No Brasil, *S. sclerotiorum* pode ocasionar perdas anuais superiores à 50% em áreas produtoras de feijão (BIANCHINI, 2005).

A disseminação de *S. sclerotiorum* através de sementes infectadas, desempenha um papel fundamental na disseminação e infestação de áreas anteriormente livres do patógeno (BOTELHO et al., 2013). No entanto, os escleródios e micélio do patógeno também podem ser disseminados por meio de solo, adubo orgânico e água de irrigação contaminados (MEYER & CAMPOS, 2009).

As estruturas de sobrevivência de *S. sclerotiorum*, os escleródios, são compostos por hifas agregadas e revestidas por melanina, responsável pela redução da permeabilidade e proteção contra agentes deletérios (VENTUROSOSO et al., 2014). Quando em condições ambientais desfavoráveis (temperatura, umidade do solo e a intensidade de luz), os escleródios permanecem viáveis até terem acesso ao substrato preferencial, por até três anos (AGRIOS, 2005; REIS et al., 2011).

Sob condições favoráveis e na presença do hospedeiro suscetível, devido ao reconhecimento dos exsudados radiculares, os escleródios germinam e produzem um micélio branco, que infecta os tecidos da base da planta, ou formam apotécios, que emergem na superfície do solo e liberam os ascósporos, infectando, principalmente, órgãos senescentes, como as flores

(LEITE, 2005; VENTUROSOS et al., 2014). Portanto, a liberação de ascósporos e a sobrevivência, são etapas fundamentais do ciclo de vida de *S. sclerotiorum*.

O patógeno ocasiona os danos devido ao estrangulamento do colo das plântulas ou pela seca de ramos em plantas adultas, causando a morte. Práticas de manejo, como a utilização de sementes sadias, a rotação de culturas e o plantio em solos bem drenados contribuem para a redução da severidade de *S. sclerotiorum* em área de cultivo (AGRIOS, 2005). No entanto, devido à vasta gama de hospedeiros e à formação de estruturas de resistência, após o estabelecimento da doença, seu manejo é difícil e demanda gastos elevados (PAULA JÚNIOR et al., 2009), sendo a utilização de fungicidas no solo e nas plantas, a principal forma de controle *S. sclerotiorum* (AGRIOS, 2005). No entanto, o controle químico pode resultar em diversos problemas para a saúde humana e para o meio ambiente (PAULA JÚNIOR et al., 2009).

Alguns micro-organismos benéficos têm proporcionado bons resultados no manejo de *S. sclerotiorum*. Os fungos micoparasitas destroem esclerócios e/ou inibem a formação de novos esclerócios, reduzindo a população do patógeno no solo (AGRIOS, 2005).

Os fitonematóides constituem outro grupo de micro-organismos patogênicos com bastante representatividade nos solos. A maioria deles sobrevive no solo como de vida livre, se alimentando de outros micro-organismos. No entanto, muitas espécies vivem e obtêm seus alimentos em plantas, ocasionando as nematoses (AGRIOS, 2005).

As principais espécies de nematóides que provocam doenças em plantas pertencem ao gênero *Meloidogyne*, por possuírem ampla distribuição geográfica e apresentarem extensa gama de hospedeiros, incluindo mais de 5.000 espécies de plantas (PIO-RIBEIRO & ASSIS FILHO, 2005; ADAM et al., 2014). *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne arenaria* são as espécies mais comuns no Brasil, estando presentes em todos os tipos de solo (GAO et al., 2016).

Os nematóides são facilmente disseminados pelo solo aderido aos implementos agrícolas, por água de chuva ou de irrigação, por animais e por material propagativo infectado (AGRIOS, 2005). Após eclodirem dos ovos, os nematóides migram do solo à superfície das raízes, penetram, alimentam-se do

contéudo citoplasmático das células vegetais e reproduzem-se nas plantas vivas. *Meloidogyne* spp. induzem a formação de células multinucleadas nas raízes, denominadas de 'células gigantes', ao redor das quais são formadas as galhase constitui seu sitio de alimentação (AGRIOS, 2005). A abundante formação de galhas nas raízes reduz a eficiência do sistema radicular em absorver água e nutrientes, com conseqüente redução do crescimento das plantas (GAO et al., 2016). O cultivo em áreas com altas infestações desses patógenos pode levar à morte das mudas (CANTU et al., 2009) e afetar negativamente a produção das plantas sobreviventes, pois plantas infectadas apresentam folhas reduzidas e amareladas, crescimento reduzido e intensa murcha nas horas mais quentes do dia (CHARCHAR & ARAGÃO, 2005). Mundialmente, os nematóides causam consideráveis prejuízos econômicos aos cultivos comerciais, as perdas podem alcançar proporções de até 50%, de acordo com o manejo cultural adotado pelos produtores (BERLITZ et al., 2010).

O controle de nematóides no solo pode ser feito por diferentes métodos, destacando-se o controle químico, a rotação de cultura, o plantio de variedades de plantas resistentes, a solarização do solo e o controle biológico, com graus variados de sucesso na proteção das plantas (GAO et al., 2016). No entanto, os nematicidas, além de apresentarem elevado custo, causam impacto ambiental negativo, devido ao acúmulo de substâncias tóxicas no solo e na água superficial e do lençol freático e ocasiona contaminação de pessoas e animais (BETTIOL et al., 2009; ADAM et al., 2014). A adoção de métodos sustentáveis no manejo de nematóides tem ganhado espaço em todo o mundo (ROMEIRO, 2007; FERRAZ et al., 2010).

Micro-organismos benéficos habitantes do solo

Micro-organismos habitantes do solo podem colonizar a rizosfera e as raízes e, por meio de diversos mecanismos, proporcionarem efeitos benéficos na promoção de crescimento das plantas e proteção contra patógenos (MENDES et al., 2013).

Os mecanismos diretos utilizados pelos micro-organismos para promover o crescimento vegetal incluem a produção de reguladores de crescimento vegetal, como auxinas, citocininas e giberelinas (CHAVES et al.,

2015); a fixação biológica de nitrogênio por bactérias diazotróficas (FERNANDES et al., 2013); a disponibilidade de nitrato realizado por bactérias nitrificantes (MORO et al., 2017); a solubilização de fósforo (MASSENSINI et al., 2016); a oxidação de enxofre ocasionada principalmente por bactérias (REIS et al., 2015) e o aumento da permeabilidade das raízes estimulando a absorção de nutrientes (KOZUSNY-ANDREANI et al., 2014). Os mecanismos indiretos envolvem o aumento da resistência a estresses abióticos, como a presença de metais, salinidade e restrições hídricas (KÖNIG et al., 2014); e o controle biológico de fitopatógenos (BULGARELLI et al., 2013).

Os micro-organismos que atuam como agentes de biocontrole apresentam relações antagônicas aos patógenos e por meio de diversas maneiras podem interferir nos processos vitais dos fitopatógenos. Dentre os principais mecanismos, encontram-se a competição por recursos, a antibiose, o parasitismo, a predação e a indução de resistência do hospedeiro (BULGARELLI et al., 2013).

Competição é a interação entre dois ou mais organismos na disputa pelos mesmos recursos, tais como espaço, oxigênio e nutrientes (KUPPER et al., 2013). O sucesso na competição poderá ser garantido por características como maior velocidade de crescimento e maior capacidade e eficiência de utilização dos substratos disponíveis, o que significa uma maior adaptação às condições predominantes (BETTIOL et al., 2009). Em solos com baixa concentração de ferro, alguns micro-organismos produzem são compostos de baixo peso molecular, quelantes de ferro, os sideróforos (PII et al., 2015).

Embora normalmente o ferro seja abundante em solos aerados, este elemento apresenta baixa solubilidade, tornando-se pouco disponível para plantas e micro-organismos. Pela produção de sideróforos, os micro-organismos antagonistas imobilizam Fe^{3+} , tornando-o menos disponível a outros que não produzem (VIANA et al., 2013). A competição por ferro, mediada pela produção de sideróforos, é considerada como um mecanismo importante no biocontrole de patógenos em solos em que o Fe disponível encontra-se em baixas concentrações (HARMAN, 2006).

A antibiose é a interação na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo inibe ou retarda processos vitais de outro organismo (ZANCAN

et al., 2012). Muitos metabólitos já foram identificados com propriedades antibióticas a fitopatógenos, tais como fenazinas, pioluteorinas, pirrolnitrina, piocianina, 2,4-diacetilfloroglucinol e cianeto de hidrogênio (ALMARIO et al., 2014). Enzimas líticas, tais como quitinases, proteases, lipases e β -1,3-glucanases, atuam na lise de células microbianas e na degradação da quitina e da glucana presentes nas paredes das células e de toxinas produzidas pelos patógenos (RADWAN et al., 2012).

Micro-organismos benéficos também são capazes de controlar patógenos por mecanismos de indução de resistência sistêmica (ISR). Um processo de defesa da planta caracterizado pela ativação de mecanismos de defesa latentes induzido sistemicamente por micro-organismos benéficos ou fatores abióticos, contra futuros ataques de fitopatógenos (PIETERSE et al., 2014). Geralmente, a indução de resistência sistêmica confere níveis de proteção contra amplo número de patógenos (WALTER et al., 2013).

Micro-organismos pertencentes ao gênero *Trichoderma* são conhecidos agentes de controle biológico de doenças de plantas. O sucesso desses micro-organismos se explica devido à sua alta capacidade reprodutiva, habilidade de sobreviver sob condições adversas, eficiência na utilização de nutrientes, agressividade contra fitopatógenos e eficiência em promover o crescimento vegetal (HARMAN, 2006).

Trichoderma spp. geralmente são encontrados no solo vivendo como vida livre, mas possuem a capacidade de se associar em raízes (SABA et al., 2012). Após colonizarem o sistema radicular, *Trichoderma* spp. podem atuar por diversos mecanismos para a promoção de crescimento das plantas, como a produção de compostos semelhantes a hormônios vegetais, decomposição de resíduos vegetais, produção de sideróforos e disponibilização de nutrientes por meio da solubilização de fosfatos e minerais (DRUZHININA et al., 2011). A utilização de isolados de *Trichoderma* spp. no cultivo de espécies vegetais com importância econômica pode diminuir o período de permanência de mudas nos viveiros, aumentar a produtividade e produção das plantas e melhorar o vigor das plantas sob estresses bióticos e/ou abióticos (HAJIEGHRARI, 2010).

Vários são os relatos do uso de *Trichoderma* spp. no controle de importantes doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides. A atividade

antagônica das espécies pertencentes ao gênero *Trichoderma* pode ser atribuída a um ou mais mecanismos de ação, tais como antibiose, competição por sítios de infecção e nutrientes disponíveis, micoparasitismo e indução de resistência (DRUZHININA et al., 2011).

Trichoderma spp. podem promover o controle de nematóides por meio da produção de compostos tóxicos, parasitismo de ovos e juvenis, produção de quitinase e protease e indução dos mecanismos de defesa do hospedeiro (FREITAS et al., 2011). A capacidade quitinolítica e proteolítica de *Trichoderma* spp. permite a sua atuação no controle de nematóides, por esses polímeros serem os constituintes dos ovos (FREITAS et al., 2011).

Quando *Trichoderma* atua no controle de outra espécie fúngica, complexos mecanismos podem ocorrer simultaneamente. A primeira resposta antagonista entre *Trichoderma* e fungos patogênicos, envolve o crescimento de *Trichoderma* em direção às hifas susceptíveis, possivelmente, devido ao quimiotropismo positivo (EZZIYYANI et al., 2004), e após o contato entre as hifas dos micro-organismos, as hifas de *Trichoderma* crescem rapidamente sobre o micélio da espécie fúngica hospedeira (IBARRA-MEDINA et al., 2010), com a secreção de antibióticos e enzimas líticas, ataque às hifas e penetração direta da espécie fúngica hospedeira (EZZIYYANI et al., 2004).

O micoparasitismo é baseado na relação em que um fungo obtém diretamente ou indiretamente os nutrientes por meio da invasão de outro micro-organismo (IBARRA-MEDINA et al., 2010). Em condições de campo, estruturas de sobrevivência, como escleródios, podem ser atacados e degradados por *Trichoderma* spp. (ZANCAN et al., 2012).

A maioria das bactérias que colonizam a rizosfera, as rizobactérias, apresenta potencial para o controle biológico de doenças e a promoção de crescimento das plantas, principalmente as espécies pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* (MACHADO et al., 2012).

As bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* encontram-se abundantes na rizosfera e são conhecidas devido a capacidade em promover o crescimento das plantas e ao antagonista contra fitopatógenos (MANDIC-MULEC et al., 2013). A facilidade de produção massal e a produção de endósporos resistentes ao calor são características desejáveis apresentadas por *Bacillus*

spp. As estruturas de resistência garantem ampla vida de prateleira para agrotóxicos biológicos formulados a partir de isolados com destacada ação antagonista (CHOUDHARY & JOHRI, 2009).

Essas bactérias Gram-positivas utilizam diversos mecanismos para proporcionar o crescimento das plantas, tais como a produção de compostos semelhantes a hormônios vegetais, como a auxina; a solubilização de fosfato; a produção de quelantes de ferro, como os sideróforos; e indiretamente, devido ao controle de patógenos (PII et al., 2015).

B. megaterium promoveu incrementos na germinação de sementes e na massa fresca e seca de tomateiros sob estresse salino (FAN et al., 2016). Sementes de feijoeiros tratadas com *B. subtilis* apresentaram incrementos no comprimento da parte aérea e na massa seca da parte aérea e da raiz primária de plântulas de feijoeiro, beneficiando de forma significativa o feijoeiro em estágio inicial de desenvolvimento (OLIVEIRA et al., 2016). *B. amyloliquefaciens* FZB42 tem sido descrito como uma bactéria promotora de crescimento vegetal devido a produção de substâncias semelhantes a hormônios vegetais, como o ácido indolacético, e alguns metabolitos secundários com atividade antimicrobiana (FAN et al. 2012).

O controle de patógenos constitui um dos mecanismos que competem para que *Bacillus* spp. possibilitem incrementos ao desenvolvimento vegetativo das plantas. Essas bactérias utilizam diversas maneiras para a supressão de fitopatógenos, como a competição por espaço e nutrientes; o hiperparasitismo; o antagonismo por meio da produção de metabólitos voláteis, como os sideróforos quelantes de ferro, os antibióticos e as enzimas líticas; e a elicitação de resistência sistêmica induzida (PIETERSE et al., 2014).

Diversos trabalhos relatam bactérias do gênero *Bacillus* associadas ao controle de patógenos em diversas culturas. *B. subtilis* e *B. firmus* sintetizam vários tipos de antibióticos e substâncias antimicrobianas, especialmente endotoxinas que interferem na formação da película externa do corpo dos nematóides formadores de galhas, inibindo a eclosão e também atuam sobre as formas juvenis (TEREFE et al., 2009). Além disso, a utilização dos exsudatos radiculares, transformando-os em subprodutos, pode desorientar os nematóides, por não reconhecerem o estímulo quimiotrópico, levando-os a

morte (ARAÚJO & MARCHESI, 2009). *B. subtilis* controlou *Hemileia vastatrix* em duas cultivares de cafeeiros, com melhores resultados do que o tratamento controle, no entanto, com resultados inferiores ao tratamento com fungicida (CACEFO et al., 2016).

A utilização de agrotóxicos constitui uma das principais formas de controle de doenças ocasionadas por patógenos habitantes de solo, devido, entre outros fatores, à dificuldade de controle desses patógenos e à facilidade de aquisição e uso desses produtos (BETTIOL et al., 2009). E, devido ao uso indiscriminado, tem ocasionado diversos problemas de ordem ambiental, tais como a contaminação de alimentos, do solo e da água, a intoxicação de agricultores e animais, a resistência de patógenos aos princípios ativos dos agrotóxicos e conseqüentemente o desequilíbrio biológico (BETTIOL et al., 2009). O estudo das interações que ocorrem entre as plantas e os micro-organismos na rizosfera é uma importante ferramenta para o desenvolvimento de práticas de manejo sustentável (SABA et al., 2012).

Este trabalho é apresentado em quatro capítulos. O primeiro capítulo considera a influência de bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* sobre a população de *M.incognita* e a promoção de crescimento de tomateiros. O segundo capítulo avalia a influência de fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* sobre a população de *M.incognita* e a promoção de crescimento de tomateiros. O terceiro capítulo, realizado com feijoeiros, avalia a influência de isolados de *Trichoderma* em controlar o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* e em promover o crescimento dessas plantas. E o quarto capítulo, avalia a influência de isolados de *Trichoderma* sobre o crescimento de feijoeiros e plantas de canola e de trigo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, M.; HEUER, H.; HALLMANN, J. Bacterial antagonists of fungal pathogens also control root-knot nematodes by induced systemic resistance of tomato plants. **PloS one**, v. 9, n. 2, 2014.

AGRIOS, G.N. Plant diseases caused by nematodes. In: GEORGE, N. AGRIOS, F.N. (Ed.). **Plant Pathology**. 5th ed.. San Diego: Academic Press. p.826-874, 2005.

ALMARIO, J.; MULLER, D.; DÉFAGO, G.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Rhizosphere ecology and phytoprotection in soils naturally suppressive to Thielaviopsis black root rot of tobacco. **Environmental microbiology**, v. 16, n. 7, p. 1949-1960, 2014.

ARAÚJO, F. F.; MARCHESI, G. V. P. Uso de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1558-1561, 2009.

BERLITZ, D. L.; RABINOVITCH, L; MACHADO, V.; MATSUMURA, A. T. S.; GUIMARÃES, A. M.; SANTIN, R. C.; CASSAL, M.; FIUZA, L. M. Evaluation of Biocontrol of the *Meloidogyne javanica* with *Bacillus subtilis* and *Purpureocillium lilacinus* in Greenhouse with Lettuce. **International Journal of Research in Engineering, IT and Social Sciences**, v. 6, n. 7, p. 38-45, 2016.

BETTIOL, W.; GHINI, R.; MARIANO, R.R.L.; MICHEREFF, S.J.; MATTOS, L.P.V.; ALVARADO, I.C.M.; PINTO, Z.V. Supressividade de fitopatógenos habitantes do solo. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p.187-208, 2009.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, cap. 37, p. 333-349, 2005.

BOTELHO, L. D. S.; ZANCAN, W. L. A.; MACHADO, J. D. C.; BARROCAS, E. N. Performance of common bean seeds infected by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 2, p. 153-160, 2013.

BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; VAN THEMAAT, E. V. L.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 807-838, 2013.

CACEFO, V.; ARAÚJO, F. F. D.; PACHECO, A. C. Biological control of *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome with *Bacillus subtilis* Cohn and biochemical changes in the coffee. **Coffee Science**, v. 11, n. 4, p. 567 - 574, 2016.

CANTU, R. R.; WILCKEN, S. R. S.; ROSA, J. M. O.; GOTO, R. Reação de porta-enxertos comerciais de tomateiro a *Meloidogyne mayaguensis*. **Summa Phytopathologica**, v. 35, p. 216-218, 2009.

CHARCHAR, J. M.; ARAGÃO, F. A. S. Variação anual da população mista de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *M. javanica* em cultivos de batata ' Bintje' no campo. **Nematologia Brasileira**, v.29, p.225-232, 2005.

CHAVES, V. A.; SANTOS, S. G.; SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; REIS, V. M. Desenvolvimento inicial de duas variedades de Cana-de-Açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 6, 2015.

CHOUDHARY, D. K.; JOHRI, B. N. Interactions of *Bacillus* spp. and plants with special reference to induced systemic resistance (ISR). **Microbiology Research**, v. 164, p. 493–513, 2009.

DOS SANTOS, D. B.; MARQUES, E.; SILVA, J. B. T.; MARTINS, I.; DE MELLO, S. C. M. Avaliação do antagonismo de *Trichoderma* contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* in vitro. **Cadernos de Agroecologia**, v. 9, n. 3, 2014.

DRUZHININA, I. S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M.; MONTE, E.; MUKHERJEE, P. K.; ZEILINGER, S.; GRIGORIEV, I. V.; KUBICEK, C. P. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Review Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 749-759, 2011.

EZZIYYANI, M.; SÁNCHEZ, C. P.; AHMED, A. S.; REQUENA, M. E.; CANDELA, M. E. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). **Anales de Biología**, v.26, p. 35-45, 2004.

FAN, B.; BORRIS, R.; BLEISS, W.; WU, X. Gram-positive rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 colonizes three types of plants in different patterns. **The Journal of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 38-44, 2012.

FAN, P.; CHEN, D.; HE, Y.; ZHOU, Q.; TIAN, Y.; GAO, L. Alleviating salt stress in tomato seedlings using *Arthrobacter* and *Bacillus megaterium* isolated from the rhizosphere of wild plants grown on saline-alkaline lands. **International journal of phytoremediation**, v. 18, n. 11, p. 1113-1121, 2016.

FERNANDES, M. F.; PROCOPIO, S. D. O.; TELES, D. A.; DE SENA FILHO, J. G.; CARGNELUTTI FILHO, A.; ANDRADE, C. **Crescimento e fixação biológica de nitrogênio de *Gluconacetobacter diazotrophicus* na presença de inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar**. Embrapa Tabuleiros Costeiros-Artigo em periódico indexado, 2013.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; DIAS-ARIEIRA, C. R. **Manejo sustentável de fitonematoides**, 1 ed., Viçosa: Editora UFV, 306 p, 2010.

FINDLING, S.; FEKETE, A.; WARZECHA, H.; KRISCHKE, M.; BRANDT, H.; BLUME, E.; MUELLER, M. J.; BERGER, S. Manipulation of methyl jasmonate esterase activity renders tomato more susceptible to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Functional Plant Biology**, v. 41, n. 2, p. 133-143, 2013.

FREITAS, M. A.; PEDROSA, E. M. R.; MARIANO, R. L. R.; GUIMARÃES, L. M. P. Seleção de *Trichoderma* spp. como potenciais agentes de biocontrole para *Meloidogyne incognita* em cana-de-açúcar. **Nematropica**, v. 42, n. 1, p. 115-122, 2012.

GAO, H.; QI, G.; YIN, R.; ZHANG, H.; LI, C.; ZHAO, X. *Bacillus cereus* strain S2 shows high nematocidal activity against *Meloidogyne incognita* by producing sphingosine. **Scientific reports**, v. 6, 2016.

GARCIA, R. A.; MEYER, M. C.; ÁVILA, K. A. G.B; CUNHA, M. G. Métodos de inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* para triagem de cultivares de soja resistentes ao mofo-branco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.50, n.8, p.726-729,2015.

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

HAIJEGHRARI, B. Effects some Iranian *Trichoderma* isolates on maize seed germination and seedling vigor. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 4342-4347, 2010.

IBARRA-MEDINA, V. A.; FERRERA-CERRATO, R.; ALARCÓN, A.; LARA-HERNÁNDEZ, M. E.; VALDEZ-CARRASCO, J. M. Isolation and screening of *Trichoderma* strains antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia minor*. **Revista Mexicana de Micología**, v. 31, p. 53-63, 2010.

JOSHI, R. K.;MEGHA,S.; RAHMAN, M. H.; BASU,U.; KAV, N. N. V. A global study of transcriptome dynamics in canola (*Brassica napus*L.) responsive to *Sclerotinia sclerotiorum*infection using RNA-Seq. **Gene**, v. 590, n. 1, p. 57–67, 2016.

KLOEPPER, J. W. Host specificity in microbe-microbe interactions. **BioScience**, v. 46, p. 406-409, 1996.

KÖNIG, F.; GONÇALVES, C. E. P.; AGUIAR, A. R.; SILVA, A. C. F. Bioma Pampa: Interações entre micro-organismos e espécies vegetais nativas. **Revista de Ciências Agrárias**,v. 37, n. 1, p. 03-09, 2014.

KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; JUNIOR, R. A. Colonização rizosférica e promoção do crescimento por rizóbios em mudas de alface.**Nucleus**,v. 11, n. 2, p. 443-452, 2014.

KUPPER, K. C.; CERVANTES, A. L. L.; KLEIN, M. N.; DA SILVA, A. C. Avaliação de microrganismos antagônicos, *Saccharomyces cerevisiae* e

Bacillus subtilis para o controle de *Penicillium digitatum*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 425-436, 2013.

LIU, J.; ZHANG, Y.; MENG, Q.; SHI, F.; MA, L.; LI, Y. Physiological and biochemical responses in sunflower leaves infected by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 100, p. 41-48, 2017.

LEITE, R. M. V. B. C. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 3p. (Comunicado Técnico, 76).

MACHADO, V.; BERLITZ, D. L.; MATSUMURA, A. T. S.; SANTIN, R. C. M.; GUIMARÃES, A.; SILVA, M. E.; FIUZA, L. M. Bactérias como agentes de controle biológico de fitonematóides. **Oecologia Australis**, v. 16, n. 2, p. 165-182, 2012.

MANDIC-MULEC, I.; STEFANIC, P.; VAN ELSAS, J. D. Ecology of bacillaceae. In: The bacterial spore: from molecules to systems. **American Society of Microbiology**, p. 59-85, 2016.

MASSESSINI, A. M.; TÓTOLA, M. R.; BORGES, A. C.; COSTA, M. D. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from *Eucalyptus* sp. rhizosphere. **Revista Árvore**, v. 40, n. 1, p. 125-134, 2016.

McCREARY, C. M.; DEPUYDT, D.; VYN, R. J.; GILLARD, C. L. Fungicide efficacy of dry bean white mold [*Sclerotinia sclerotiorum*(Lib.) de Bary, causal organism] and economic analysis at moderate to high disease pressure. **Crop Protection**, v. 82, p. 75-81, 2016.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J. M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiol Review**, v. 37, n. 5, p. 634-663, 2013.

MEYER, M.; CAMPOS, H. D. Guerra do mofo. **Revista cultivar**, n. 120, p. 16-18, 2009.

MIMMO, T.; HANN, S.; JAITS, L.; CESCO, S.; GESSA, C. E.; PUSCHENREITER, M. Time and substrate dependent exudation of carboxylates by *Lupinus albus* L. and *Brassica napus* L. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 49, p. 1272–1278, 2011.

MORO, E.; CRUSCIOL, C. A. C.; NASCENTE, A. S.; CANTARELLA, H.; LAMBAIS, M. R. Bactérias amonificantes e nitrificantes e teores de amônio e nitrato afetados por plantas de cobertura e fertilizantes nitrogenados. **Agrarian**, v. 9, n. 33, p. 210-218, 2017.

OLIVEIRA, G. R. F.; SILVA, M. S.; MARCIANO, T. Y. F.; PROENÇA, S. L.; SÁ, M. E. Crescimento inicial do feijoeiro em função do vigor de sementes e inoculação com *Bacillus subtilis*. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 10, n. 4, p. 439-448, 2016.

PAULA JÚNIOR, T. J.; VIEIRA, R. F.; ROCHA, P. R. R.; BERNARDES, A.; COSTA, E. L.; CARNEIRO, J. E. S.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. White mold intensity on common bean in response to plant density, irrigation frequency, grass mulching, *Trichoderma* spp., and fungicide. **Summa Phytopathologica**, v.35, p.44-48, 2009.

PELTIER, A. J.; BRADLEY, C. A.; CHILVERS, M. I.; MALVICK, D. K.; MUELLER, D. S.; WISE, K. A.; ESKER, P. D. Biology, yield loss and control of *Sclerotinia* stem rot of soybean. **Journal Integrated Pest Manage**, v. 2, n. 3, p. 1-7, 2012.

PIETERSE, C. M.; ZAMIOUDIS, C.; BERENDSEN, R. L.; WELLER, D. M.; VAN WEES, S. C.; BAKKER, P. A. Induced systemic resistance by beneficial microbes. **Annual review of phytopathology**, v. 52, p. 347-375, 2014.

PII, Y.; MIMMO, T.; TOMASI, N.; TERZANO, R.; CESCO, S.; CRECCHIO, C. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. **Biology and fertility of soils**, v. 51, n. 4, p. 403-415, 2015.

PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, F. M. Doenças do caupi (*Vigna unguiculata* L.) Walp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; FILHO, A.B.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p.215-222, 2005.

RADWAN, M. A.; FARRAG, S. A. A.; ABU-ELAMAYEM, M. M.; AHMED, N. S. Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using bioproducts of microbial origin. **Applied Soil Ecology**, v. 56, p. 58– 62, 2012.

REDMAN, R. S.; SHEEHAN, K. B.; STOUT, R. G.; RODRIGUEZ, R. J.; HENSON, J. M. Thermotolerance conferred to plant host an fungal endophyte during mutualistic symbiosis. **Science**, v. 298, p. 1581, 2002.

REIS, P. R.; REBELLES, P. P. R.; PEREIRA, M. C.; LISKA, G. R.; MORAIS, A. R. Eficácia do enxofre aplicado via solo no controle da cigarra *Quesada gigas* (Olivier) em cafeeiro. **Coffee Science**, v. 10, n. 4, p. 527-536, 2015.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; GAVA, F.; MOREIRA, É. N.; SACHS, C. Indução da germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes substratos. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 10, n. 2, p. 145-150, 2011.

ROMEIRO, S. R. **Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos**. Viçosa: Ed. UFV, 2007.

SABA, H.; VIBHASH, D.; MANISHA, M.; PRASHANT, K. S.; FARHAN, H.; TAUSEEF, A. Trichoderma – a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. **Mycosphere**, v. 3, n. 4, p. 524–531, 2012.

TEREFE, M.; TEFERA, T.; SAKHUJA, P. K. Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of tomato plants in the greenhouse and nursery. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 100, p. 94-99, 2009.

VENTUROSOS, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; CONUS, L. A.; PONTIM, B. C. A. Relação de massa e localização do escleródio no solo com germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Summa Phytopathologic**, v. 40, n. 1, 2014.

VIANA, F.; LIMA, J.; FEITOZA, E. D. A.; MEDEIROS, R. **Produção de sideróforos por leveduras antagônicas**. Embrapa Agroindústria Tropical- Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2013.

WALTERS, D. R.; RATSEP, J.; HAVIS, N. D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 5, p. 1263-1280, 2013.

WILLADINO, L.; CÂMARA, T. J.; GALINDO, R. M.; GUEDES, R. M.; MICHEREFF, S. J. Sistema vascular e exsudatos radiculares. In: Michereff, S. J.; Andrade, G. T.; Menezes, M. (Eds.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: Imprensa Universitária, p. 19-40, 2005.

ZANCAN, W. L. A.; MACHADO, J. C.; SOUSA, B. F. M.; MATOS, C. S. M. Crescimento micelial, produção e germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* na presença de fungicidas químicos e *Trichoderma harzianum*. **Bioscience Journal**, v.28, n.5, p.782-789, 2012.

CAPÍTULO 1

***Bacillus* spp. COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO E AGENTES DE BIOCONTROLE DE *Meloidogyne incognita* EM TOMATEIROS¹**

¹Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico Nematropica, em versão na língua inglesa.

***Bacillus* spp. como promotores de crescimento e agentes de biocontrole de *Meloidogyne incognita* em tomateiros**

Resumo: Os nematóides fitoparasitas pertencentes ao gênero *Meloidogyne* estão distribuídos mundialmente e ocasionam perdas às culturas vegetais de importância econômica, sendo necessária a adoção de formas de manejo eficazes e sustentáveis. Neste trabalho avaliou-se o efeito de isolados de *Bacillus* spp. sobre a promoção de crescimento de tomateiros e o controle de *Meloidogyne incognita*. As plantas foram tratadas com suspensões bacterianas e após 55 dias de cultivo foram avaliadas quanto aos parâmetros de crescimento vegetativo e ao controle de *M. incognita*. Os isolados de *Bacillus* spp. codificados como B31, B89, B129, B235, B236, B259, B262, B528, B564, B727, B818 e B1218 promoveram o crescimento vegetativo de tomateiros em condições de casa de vegetação. Os isolados de *Bacillus* spp. codificados como B4, B7, B20, B117, B179, B349, B390, B457, B479, B496, B665, B677, B790, B809, B924, B1041, B1120, B1123 e B1042, reduziram o número de galhas e de massa de ovos de *M. incognita* nas raízes dos tomateiros. Isolados de *Bacillus* spp. apresentaram a capacidade de promover o crescimento e o controle de *M. incognita* em tomateiros.

Palavras-chave: *Meloidogyne* spp., *Solanum lycopersicum*, rizobactérias, controle biológico.

***Bacillus* spp. as growth promoters and biocontrol agents of *Meloidogyne incognita* in tomato**

Abstract: The phytoparasitic nematodes in the genus *Meloidogyne* are distributed worldwide and cause losses to crops of economic importance, requiring the adoption of effective and sustainable management practices. In this work the effects of *Bacillus* strains on tomato growth promotion and on the control of *Meloidogyne incognita* were evaluated. The plants were treated with bacterial suspensions and after 55 days of cultivation were evaluated for growth and control of *M. incognita*. The *Bacillus* spp. strains B31, B89, B129, B235, B236, B259, B262, B528, B564, B727, B818 and B1218 promoted vegetative growth of tomato plants under greenhouse conditions. The *Bacillus* spp. strains B4, B7, B20, B117, B179, B349, B390, B457, B479, B496, B665, B677, B790, B809, B924, B1041, B1120, B1123 and B1042, reduced the number of galls and egg mass of *M. incognita* on tomato roots. *Bacillus* strains showed the capacity to promote the growth and *M. incognita* control in tomato plants.

Keywords: *Meloidogyne* spp., *Solanum lycopersicum*, rhizobacteria, biological control.

INTRODUÇÃO

No Brasil, já foram relatadas 43 espécies de nematoides associados à cultura do tomateiro (KUROZAWA & PAVAN, 2005), com destaque para as espécies pertencentes ao gênero *Meloidogyne*, devido aos danos causados e pela dificuldade de controle (FERRAZ et al., 2010). Além disso, este gênero possui ampla distribuição geográfica e apresenta extensa gama de hospedeiros, incluindo mais de 2.000 espécies de plantas (PIO-RIBEIRO & ASSIS FILHO, 2005).

A abundante formação de galhas nas raízes, devido à colonização por esses nematóides, reduz a eficiência do sistema radicular em absorver água e nutrientes, com conseqüente redução do crescimento das plantas (GAO et al., 2016). Os danos causados pela ação dos nematóides também favorecem a incidência de doenças causadas por outros patógenos (AGRIOS, 2004).

As estratégias de manejo dos nematóides incluem principalmente o controle químico, práticas culturais e uso de cultivares resistentes (HIGAKI & ARAUJO, 2012). Métodos de controle alternativo ao uso de nematicidas vêm sendo cada vez mais estudados e dentre eles, o controle biológico, caracterizado pela utilização de micro-organismos benéficos objetivando proteger as plantas de agentes patogênicos por meio de parasitismo, predação, competição, antibiose e/ou indução de respostas de defesa nas plantas (AGRIOS, 2004).

Os metabólitos liberados por rizobactérias podem influenciar negativamente a reprodução de nematóides, a postura de ovos, a eclosão e a mobilidade dos juvenis, a sobrevivência nos estágios iniciais de desenvolvimento e indivíduos adultos, inibir o processo pelo qual eles penetram as raízes, além disso podem modificar os exsudatos radiculares, fazendo com que os mesmos não sejam reconhecidos pelos nematóides (SIDDIQUI et al., 2003).

Algumas espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* já foram relatada como antagonista aos nematóides formadores de galhas, podendo ser utilizadas no manejo de culturas econômicas visando reduzir os efeitos deletérios desses patógenos. A inoculação de *B. subtilis* em tomates,

proporcionou incrementos na biomassa da parte aérea e reduziu a reprodução de *Meloidogyne* spp. nas raízes (ARAÚJO & MARCHESI, 2009). BioNem WP, um produto formulado à base de *B. firmus*, inibiu a eclosão de ovos de *M. incognita* e reduziu em 91% a formação de galhas em raízes de tomateiro (TEREFE et al., 2009). *B. subtilis* reduziu a massa de ovos e o número de juvenis devido a indução de resistência sistêmica em tomateiros (ADAM et al., 2014). Da mesma maneira, há vários relatos de bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* controlando meloidoginose em outras culturas de importância econômica, tais como beterraba (KAVITHA et al., 2007), feijoeiros (DAWAR et al., 2008), cana de açúcar (CORDOZO & ARAUJO, 2011) e alface (BERLITZ et al., 2016).

Bacillus spp. também favorecem o crescimento das plantas por meio da fixação de N₂, produção de sideróforos, solubilização de fósforo, produção de fitohormônios e ácidos orgânicos fitoestimuladores (ALI et al., 2014; HANIF et al., 2015).

A seleção de rizobactérias com habilidades para o controle de patógenos e a promoção de crescimento de espécies vegetais é de grande importância para incrementos na produção agrícola, manejo do solo e aplicações biotecnológicas com enfoque sustentável. O presente trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito do tratamento de tomateiros com isolados de *Bacillus* spp. na promoção de crescimento e controle do nematóide *M. incognita*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de inóculo de *Meloidogyne incognita*

O inóculo de *M. incognita* consistiu de indivíduos obtidos de uma população pura, coletados de raízes de tomateiros mantidos em casa de vegetação. Os nematóides foram extraídos de acordo com a metodologia proposta por Hussey e Barker (1973) modificada por Boneti e Ferraz (1981). As raízes foram cortadas em pedaços e trituradas em liquidificador por 1 minuto. Após a trituração, a suspensão foi vertida em um conjunto de peneiras (0,5 mm sobre

0,18 mm sobre 0,025 mm) e o material retido na última peneira foi coletado e observado em câmara de Peters em microscópio estereoscópio.

Obtenção dos isolados de *Bacillus* spp. e das suspensões bacterianas

Foram utilizados 134 isolados de *Bacillus* spp. pertencentes à coleção de micro-organismos do Laboratório de Genética Microbiana (LabGem) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), preservados em peptona-glicerol e mantidos em freezer a - 80 °C. Esses micro-organismos foram isolados de raízes de plantas de bananeira.

As bactérias foram multiplicadas em meio de cultura agar nutriente (AN) com incubação em câmara de crescimento tipo Biological Oxygen Demand (B.O.D.) a 25°C. Após 24 horas, as colônias foram transferidas para o meio de cultura AN líquido e incubadas por 24 h a 25°C em agitador orbital a 120 rpm. Após esse período, 2,0 mL da cultura bacteriana foram centrifugadas a 10000 × g por 3 min e o precipitado foi ressuspensão em solução salina (NaCl 0,85%). As concentrações das suspensões de células bacterianas foram ajustadas para densidade ótica de $A_{600} = 0,4$ em espectrofotômetro UV.

Seleção de isolados de *Bacillus* spp. para a promoção de crescimento de tomateiro

Para avaliar o crescimento de tomateiros em condições de casa-de-vegetação, sementes de tomateiro cultivar Santa Clara (Feltrin Sementes) foram desinfestadas superficialmente por meio de imersão em hipoclorito de sódio a 1% por 2 minutos, seguido de álcool a 70% por 1 minuto e três banhos em água destilada esterilizada (YEGORENKOVA et al., 2001). Após desinfestação, as sementes de tomateiro foram microbiolizadas por meio de imersão durante 5 minutos em suspensões bacterianas de igual concentração (DO de $A_{600} = 0,4$). Em seguida, as sementes foram dispostas em sacos de mudas contendo 1L de substrato composto por solo e areia na proporção 1:1 (v:v, caracterização química apresentada na Tabela 1) esterilizado em autoclave a 120°C, durante 1 hora e 30 minutos em dois dias consecutivos. Para garantir que os isolados bacterianos estariam presentes na rizosfera, quinze dias após a germinação, as plantas foram reinoculadas com 5 ml da

suspensão de células bacterianas de igual concentração (DO de $A_{600} = 0,4$). Quarenta dias após a segunda inoculação, as plantas foram avaliadas, quanto a altura de planta, diâmetro de caule, massas fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular.

Tabela 1. Caracterização química do substrato utilizado nos experimentos.⁽¹⁾

Característica	pH (em água)	SB	CTC	K	Ca	Mg	V	MO ⁽²⁾	P
		cmol/dm ³				%	g/ kg	mg/dm ³	
Valor	5,1	2,23	5,09	0,08	1,3	0,8	44	4,86	10

⁽¹⁾ Substrato utilizado em todos os experimentos realizados em casa-de-vegetação. ⁽²⁾ Matéria orgânica.

Os tratamentos foram constituídos por 134 isolados de *Bacillus* spp., um produto formulado à base de *Bacillus subtilis* (Rizos, Laboratório Farroupilha) e o tratamento controle (água destilada esterilizada).

O experimento foi instalado em delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Scott-Knott à 5% de significância utilizando-se o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2000).

Seleção de isolados de *Bacillus* spp. para o controle de *M. incognita*

A seleção de isolados de *Bacillus* spp. para o controle de *M. incognita* foi realizada em dois experimentos, sendo que no primeiro experimento os tratamentos foram constituídos por 134 isolados de *Bacillus* spp. e no segundo, foram testados os 50 isolados que proporcionaram os melhores resultados no experimento anterior. Adicionalmente, em ambos experimentos foi testado um produto formulado à base de *Bacillus subtilis* (Rizos, Laboratório Farroupilha) e o tratamento controle foi constituído pela imersão das sementes em água destilada esterilizada.

No primeiro experimento, sementes de tomateiro foram desinfestadas e tratadas, como descrito anteriormente, e semeadas em tubetes de polietileno com capacidade para 50 cm³, contendo substrato composto por solo e areia autoclavados na proporção 1:1 (v: v). Foram colocadas quatro sementes por

célula, sendo feito o desbaste sete dias após a semeadura, deixando-se uma plântula por célula.

Quinze dias após a germinação, as plantas foram reinoculadas com 5 ml da suspensão de células bacterianas. No dia posterior à inoculação com as bactérias foram inoculados 1.000 indivíduos de *M. incognita* por planta, sendo o inoculo composto por juvenis e ovos. Quarenta dias após a inoculação dos nematóides, as plantas foram avaliadas quanto ao número de ovos e juvenis por grama de raízes, de acordo com a metodologia proposta por Hussey e Barker (1973) modificada por Boneti e Ferraz (1981). A partir destes dados, calculou-se o fator de reprodução (FR), obtido pela razão entre a população final (número de ovos e juvenis coletados após 40 dias de inoculação) e a população inicial (1.000 indivíduos). O FR mede o incremento da população de nematóides no período estudado.

No segundo experimento, quando foram testados os 50 isolados que apresentaram melhores resultados no ensaio anterior, sementes de tomateiros foram desinfestadas e tratadas, como descrito anteriormente, e dispostas em sacos de mudas contendo 1L de substrato composto por solo e areia autoclavados na proporção 1:1 (v: v).

Quinze dias após a germinação, as plantas foram reinoculadas com 5 ml da suspensão de células bacterianas. No dia posterior a essa inoculação, fez-se a inoculação com 1.000 indivíduos de *M. incognita* por planta, sendo o inoculo composto por juvenis e ovos. Quarenta dias após a inoculação dos nematóides, realizou-se a coleta das plantas e foram avaliados o número de massa de ovos e o número de galhas por grama de raízes.

Os experimentos foram instalados em delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Scott-Knott à 5% de significância utilizando-se o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2000). Os dados de contagem de nematóides foram transformados em $\text{Log}(x+1)$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção de isolados de *Bacillus* spp. para a promoção de crescimento de tomateiro

No presente estudo o tratamento dos tomateiros com o nematicida microbiológico formulado a partir de *Bacillus subtilis* não apresentou efeito benéfico à promoção do crescimento das plantas. Resultados semelhantes foram encontrados por Santos et al. (2016), ao estudar o efeito do tratamento de videiras com isolados de *Trichoderma* e *Bacillus subtilis* na promoção de crescimento e controle de *Dactylonectria macrodidyma*. No entanto, Clemente et al. (2016) observaram que *Bacillus subtilis* incrementou a produção de cenouras. Possivelmente, as condições do substrato e/ou clima não foram favoráveis para o crescimento de *Bacillus subtilis*.

Houve efeito significativo do tratamento com alguns isolados de *Bacillus* spp. para altura das plantas, diâmetro caulinar, massa fresca da parte aérea e das raízes, massa seca da parte aérea e das raízes. Esses dados suportam a hipótese de que é necessário o trabalho de seleção de micro-organismos com melhor potencial biotecnológico.

Dos 134 isolados de *Bacillus* spp. testados, 64 isolados promoveram o desenvolvimento do comprimento da parte aérea dos tomateiros, com valores superiores ao tratamento controle (46,3 cm). Os isolados de *Bacillus* codificados como B407, B724, B1120, B564, B969, B418, B291, B259, B727, B319, B766, B880, B89, B206, B457, B117, B235, B107, B1068, B978, B964, B1143, B236, B640, B351, B645, B456, B106, B528, B262, B676, B132 e B1218 proporcionaram os melhores resultados, com incrementos variando entre 24,0% (B880) a 34,5% (B645), em relação às plantas não tratadas. No entanto, 24 isolados inibiram o desenvolvimento do comprimento da parte aérea dos tomateiros, com decréscimo em até 20 cm (B71), e os demais tratamentos não apresentaram nenhum efeito (Figuras 1 e 2A).

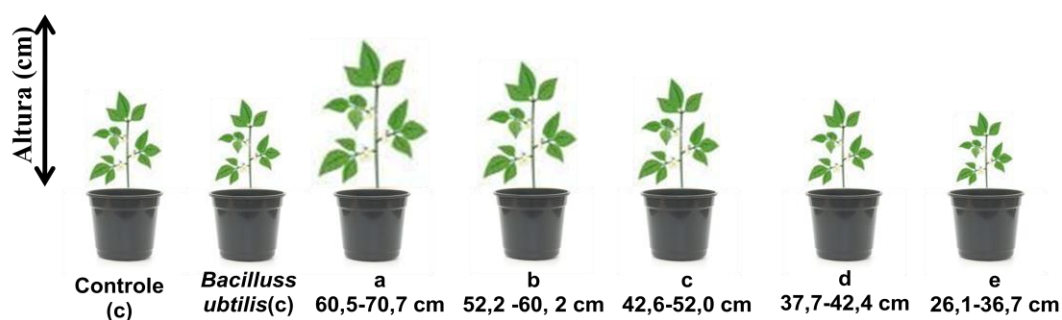


Figura 1. Ilustração da altura de tomateiros tratados com isolados de *Bacillus*, um produto formulado a base de *Bacillus subtilis* e tratamento controle (água) após 55 dias de cultivo. Letras diferentes significam que os tratamentos diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

Setenta e oito isolados promoveram incremento no diâmetro do caule, com destaque para os tratamentos com os isolados B1218, B132 e B676, que proporcionaram incrementos de 25%, em relação às plantas não tratadas (0,45 cm). Os demais isolados não apresentaram nenhum efeito sobre o diâmetro do caule dos tomateiros (Figura 2B).

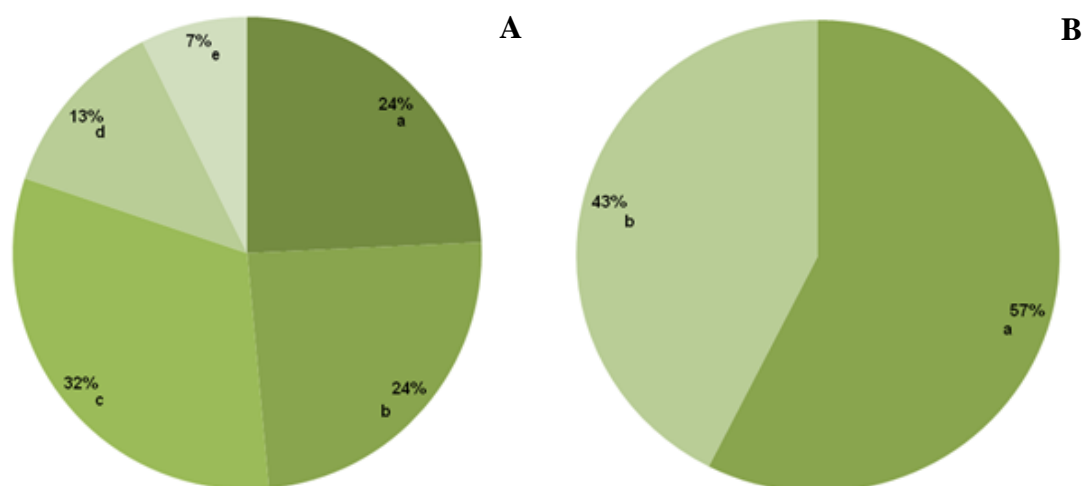


Figura 2. Percentagem de isolados bacterianos avaliados quanto à promoção do desenvolvimento da parte aérea (A) e diâmetro caulinar (B) de tomateiros após 55 dias de cultivo. Letras diferentes significam que os tratamentos diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade. Diâmetro: a= 0,46-0,60 cm, b= 0,27-0,45 cm.

Setenta e quatro 74 isolados incrementaram a biomassa fresca da parte aérea dos tomateiros. O tratamento com o isolado B1218 foi superior aos demais tratamentos para a biomassa fresca da parte aérea das plantas, proporcionando incrementos de 54%, quando comparado às plantas não

tratadas (12,5 g). Dezesete isolados decresceram a massa fresca da parte aérea, e os demais tratamentos não tiveram efeito sobre essa variável (Figura 3A).

Quarenta e quatro isolados de *Bacillus* spp. promoveram incrementos na massa seca da parte aérea, com destaque para os isolados B31, B89, B129, B818 e B1218 que promoveram aumento de 21,5%, 24,2%, 22,2%, 26,7% e 29,6%, respectivamente, em relação às plantas não tratadas (5,8 g). Enquanto 42 isolados tiveram efeito negativo na massa seca da parte aérea, com decréscimo de até 2,8 g (B644) (Figura 3B).

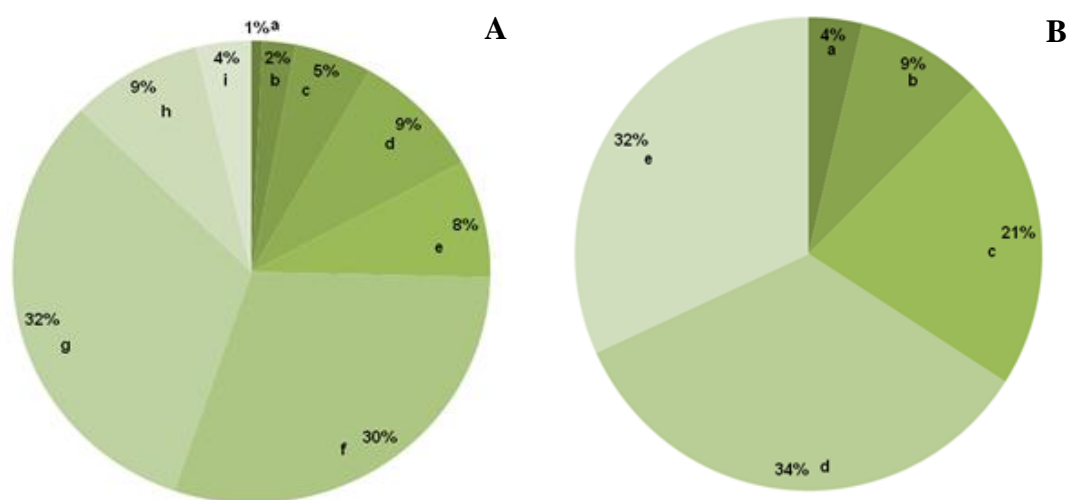


Figura 3. Percentagem de isolados bacterianos avaliados quanto à produção de massa fresca (A) e seca (B) da parte aérea de tomateiros após 55 dias de cultivo. Letras diferentes significam que os tratamentos diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade. Massa fresca da parte aérea: a= 27,5 g, b= 22,4-23,1 g, c= 19,7-21,18 g, d= 17,6-19,4 g, e= 15,5-17,3 g, f= 12,9-15,3 g, g= 10,2-12,7 g, h= 6,9-10,0 g, i= 4,0-5,9 g. Massa seca da parte aérea: a= 8,2-9,5 g, b= 7,3-8,0 g, c= 5,9-7,1 g, d= 4,9-5,8 g, e= 2,5-3,8 g.

Quarenta e seis isolados proporcionaram maior produção de massa fresca das raízes dos tomateiros, com destaque para os isolados B488 (17,1 g) e B89 (16,0 g) que proporcionaram incrementos de 45% e 41% em relação ao tratamento controle (9,4 g). Enquanto 33 isolados decresceram a produção de massa fresca das raízes dos tomateiros em até 8,9 g (B1224) (Figura 4A).

Os tratamentos com os isolados B259, B349, B89, B462 e B488 se destacaram entre os 46 isolados que proporcionaram maior produção massa seca das raízes, com incrementos variando de 46% a 51,4%, em relação às

plantas não tratadas (3,4 g). Oitenta e dois isolados decresceram a produção de massa seca das raízes dos tomateiros em até 0,8 g (B1224) (Figura 4B).

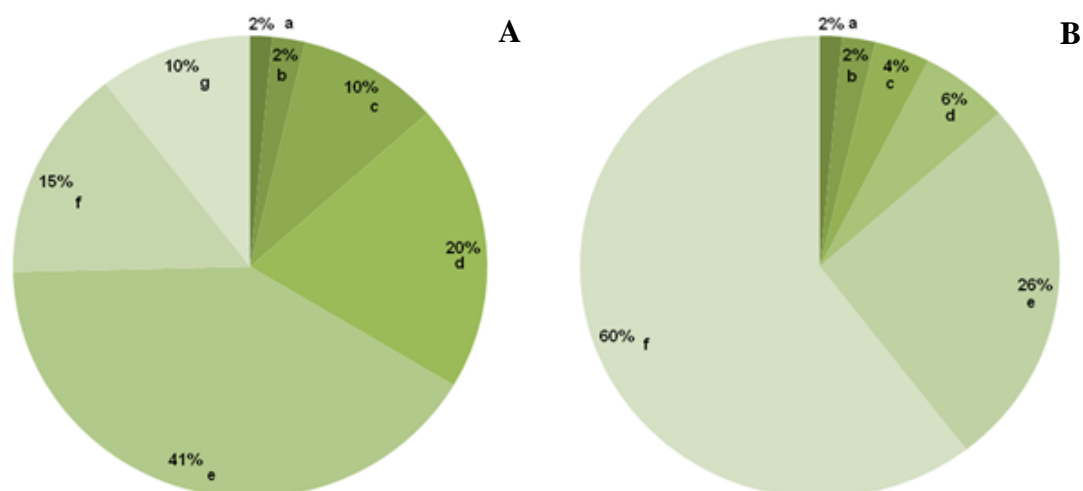


Figura 4. Percentagem de isolados bacterianos avaliados quanto à produção da massa fresca (A) e seca (B) das raízes de tomateiros tratados com isolados de *Bacillus* após 55 dias de cultivo. Letras diferentes significam que os tratamentos diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade. Massa fresca das raízes: a= 16,0-17,1 g, b= 14,3-15,1 g, c= 12,2-14,1 g, d= 9,5-11,4 g, e= 7,1-9,4 g, f= 5,6-6,9 g, g= 3,7-5,5 g. Massa seca das raízes: a= 4,0-4,5 g, b= 3,3-3,7 g, c= 2,1-2,8 g, d= 1,4-1,7 g, e= 0,4-1,3 g, f= 0,6-1,3 g.

De forma geral, os isolados de *Bacillus* spp. codificados como B31, B564, B259, B727, B89, B235, B129, B236, B818, B528, B262 e B1218 se destacaram em promover o crescimento vegetativo dos tomateiros. Estudos em todo o mundo mostram resultados promissores pela aplicação de *Bacillus* na promoção de crescimento de espécies vegetais devido à produção de fitohormônios, de siderofóros, de ácidos orgânicos envolvidos na solubilização de fósforo, fixação de nitrogênio, produção de substâncias tóxicas e indução de resistência contra patógenos (QIAO et al., 2017). *Bacillus* sp. combinado com *Enterobacter cloacae* aumentaram o crescimento do girassol sob estresse hídrico devido ao ajustamento osmótico pelo maior acúmulo de solutos orgânicos compatíveis (SANTOS et al., 2014). *B. subtilis* promoveu o crescimento de tomateiros devido à produção de ácidos orgânicos e de enzimas envolvidos na indução resistência sistêmica (CHOWDAPPA et al., 2013). *B. circulans* incrementou a germinação de tomateiros, o desenvolvimento

da parte aérea e raízes e o teor de nitrogênio, fósforo e potássio em tomateiros devido a solubilização de fósforo, produção de auxina e siderofóros e atividade antagônica contra patógenos (MEHTA et al., 2015).

Seleção de isolados de *Bacillus* para o controle de *M. incognita*

No presente estudo o tratamento das plantas com o nematicida microbiológico formulado a partir de *B. subtilis* não apresentou efeito no controle de *M. incognita*. Esse nematicida é indicado para o controle de *M. javanica* e *Pratylenchus brachyurus* em diversas culturas, incluindo o tomateiro, e afeta a ovoposição e eclosão de juvenis de nematóides (Laboratório Farroupilha, 2017). Bontempo et al. (2014) observaram que *B. subtilis* reduziu em 50% o número de cenouras mal formadas devido a presença das galhas formadas por *M. incognita*.

Verificou-se que dos 134 isolados de *Bacillus* spp. testados, 39 isolados causaram redução no número de juvenis por grama de raiz e 85 isolados causaram redução no número de ovos por grama de raiz do tomateiro, quando comparados ao tratamento controle (Figura 5).

As raízes de tomateiros tratados com o isolado B179, apresentaram, em média, um juvenil de *M. incognita* por grama de raiz, equivalendo a 99% de redução de infecção desses nematoides nas raízes, em relação às plantas não tratadas. Não foram encontrados ovos de *M. incognita* nas raízes de tomateiros tratados com os isolados B20, B924, B1123, B1041, B30, B457, B117 e B179 (Figura 5).

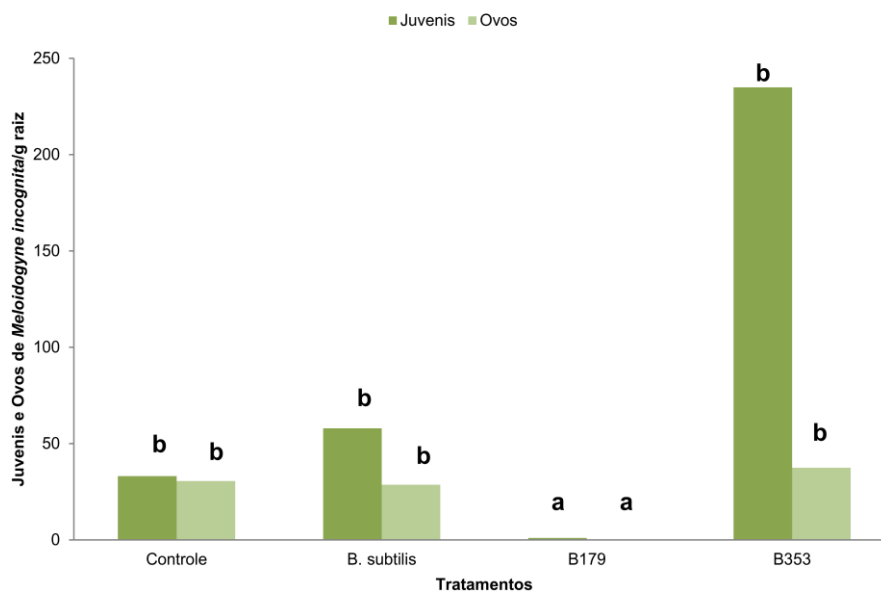


Figura 5. Número de juvenis e ovos de *M. incognita* em raízes de tomateiros tratados com *Bacillus* spp. Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

Para melhor compreensão do efeito do tratamento dos tomateiros sobre o fator de reprodução (FR) de *M. incognita*, os isolados foram divididos em 5 grupos, de acordo com as médias de FR obtidas. As plantas não tratadas apresentaram FR= 0,02 e 7,7 % dos isolados (B129, B179, B7, B165, B20, B665, B1041, B190 e B4, B105) proporcionaram decréscimo no FR de *M. incognita* com valores variando entre 0,001-0,009. Enquanto as plantas tratadas com o produto formulado á base de *B. subtilis* apresentou FR=0,06 (Figura 6).

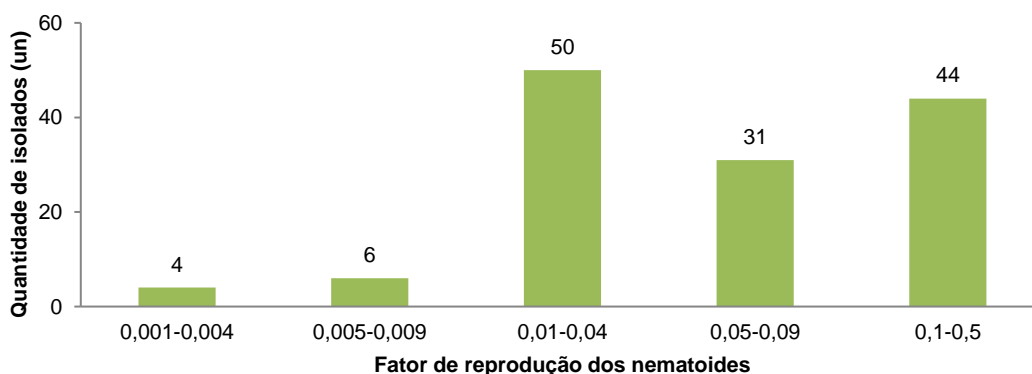


Figura 6. Fator de reprodução de *M. incognita* em tomateiros.

O ciclo de vida dos nematóides pertencentes ao gênero *Meloidogyne* se inicia à partir de ovos envoltos em uma massa gelatinosa, que garante a sobrevivência dessas espécies em condições ambientais adversas ou na ausência do hospedeiro (AGRIOS, 2004). A umidade do solo, a umidade relativa e a temperatura afetam diretamente o ciclo de vida dos nematóides e a dormência constitui importante fator para a sobrevivência (RITZINGER et al., 2010). Na presença do hospedeiro susceptível e em condições ambientais adequadas, juvenis eclodem dos ovos e quando se encontram em segundo estágio (J2), penetram as raízes por meio da secreção de enzimas que degradam a parede celular das raízes e ação mecânica com o estilete. Após a penetração, inicia-se o processo de colonização e formação do sítio de alimentação, onde os nematóides inserem os estiletos na célula e secretam a saliva, que estimulam a ampliação celular e liquefaz o conteúdo celular, então sugado pelos nematóides (AGRIOS, 2004).

No presente estudo, alguns isolados foram capazes de diminuir a quantidade de ovos e juvenis de *M. incognita* em plantas de tomateiros, interrompendo o ciclo de vida desse patógeno, devido a interferência nas fases de disseminação, sobrevivência e infecção. *Bacillus* spp. podem ter agido de diversas formas para a redução populacional de *M. incognita*, como a produção de substâncias antagônicas aos juvenis, produção de substâncias quitinolíticas e lipídicas com ação sobre os ovos ou ainda, alterando as secreções radiculares.

A partir do experimento de promoção de crescimento e do experimento preliminar de controle de *M. incognita*, foram selecionados 50 isolados de *Bacillus* para serem avaliados novamente quanto ao controle de *M. incognita*, visando a confirmação dos resultados.

O tratamento das plantas com o nematicida microbiológico formulado a partir de *B. subtilis* não apresentou efeito no controle de *M. incognita*. No entanto, 19 isolados de *Bacillus* causaram reduções no número de galhas por grama de raiz de tomateiro, com reduções variando entre 45,6% (B665 e B20) e 79,5% (B165), em relação às plantas não tratadas. Apenas 17 isolados causaram reduções variando entre 67,9% (B1041) e 24,6% (B206) no número

de massas de ovos de *M. incognita* por grama de raiz das plantas de tomate, quando comparados com as plantas não tratadas com *Bacillus* spp. (Tabela 2).

Tabela 2. Número de galhas (NG) e massa de ovos (MO) de *M. incognita* em raízes de tomateiro tratados com *Bacillus* spp.

Tratamentos	NG/g raiz	MO/g raiz	Tratamentos	NG/g raiz	MO/g raiz
Controle (água)	17,1 c	8,1 c	B344	7,0 b	6,0 b
<i>B. subtilis</i>	16,1 c	8,0 c	B349	6,1 a	4,2 b
B4	4,8 a	3,0 a	B351	8,9 c	8,1 c
B7	6,2 a	2,7 a	B390	5,3 a	5,2 b
B20	3,5 a	3,7 a	B438	14,2 c	11,5 d
B30	6,2 a	4,3 a	B456	15,8 c	12,8 e
B71	13,7 c	11,9 d	B457	4,7 a	3,3 a
B84	12,6 c	6,3 c	B479	8,1 b	2,7 a
B97	13,9 c	11,0 d	B496	4,4 a	2,7 a
B100	10,2 c	7,8 c	B591	8,4 b	7,1 c
B105	8,8 b	5,2 b	B600	9,0 c	6,9 c
B106	10,9 c	12,4 d	B618	11,0 c	9,2 c
B117	4,9 a	2,8 a	B665	3,5 a	2,9 a
B129	6,8 b	6,2 c	B677	4,4 a	3,9 a
B165	9,3 b	5,0 b	B723	9,0 c	7,0 c
B179	4,1 a	3,0 a	B790	4,1 a	3,7 a
B190	12,3 c	7,3 c	B804	11,4 c	11,3 d
B194	14,9 c	8,7 c	B809	5,3 a	4,3 a
B206	8,3 b	6,1 b	B838	12,0 c	7,6 c
B235	21,9 c	12,9 e	B924	3,6 a	3,8 a
B236	7,2 b	8,2 c	B1041	4,2 a	2,6 a
B259	13,9 c	9,1 c	B1042	5,4 a	4,3 b
B289	15,2 c	10,8 d	B1082	7,0 b	5,2 b
B293	13,0 c	5,7 b	B1120	5,6 a	3,7 a
B305	14,8 c	8,1 c	B1123	5,8 a	3,7 a
B319	9,2 b	10,3 c	B1157	10,8 c	7,5 c

Letras iguais nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

As galhas são caracterizadas pela ampliação das células radiculares colonizadas, devido à formação do sítio de alimentação das fêmeas de *M.*

incognita. Cada fêmea produz cerca de 500 ovos e os expõe na superfície da raiz envoltos em uma matriz gelatinosa, formando a massa de ovos (AGRIOS, 2004).

Confirmando os dados do experimento anterior, isolados de *Bacillus* foram capazes de controlar *M. incognita*., possibilitando melhores resultados em comparação ao tratamento controle e ao tratamento com o nematicida microbiológico. A redução no número de galhas pode indicar parasitismo dos juvenis ou ainda, que devido a presença de metabólitos tóxicos ou alterações dos exsudados radiculares, os juvenis se diferenciaram em machos. Estudos indicam que alguns fatores, como a nutrição da planta, exsudados radiculares e densidade de infecção, podem influenciar na diferenciação sexual favorecendo a formação de machos, que vivem no solo como nematóides de vida livre (SNYDER et al., 2006).

Reduções no número de massa de ovos podem indicar que houve parasitismo dos ovos, má formação dos ovos ou impedimento de ovoposição por toxinas produzidas pelos isolados bacterianos. Machado et al. (2012) relata que *B. subtilis* sintetiza mais de 60 tipos de antibióticos e endotoxinas que podem interferir no ciclo reprodutivo dos nematóides, especialmente na oviposição e na eclosão dos juvenis. *B. thuringiensis*, encontrado em diferentes substratos, se caracteriza por produzir inclusões protéicas com propriedades inseticidas, acaricidas e nematicidas, além de ser considerada uma bactéria promotora de crescimento das plantas, devido à produção de fitoreguladores vegetais na rizosfera (CRICKMORE, 2005). A modificação dos exsudatos radiculares pelas bactérias pode fazer com que os nematóides não reconheçam o estímulo quimiotrópico, desorientando-os até a morte (ARAÚJO & MARCHESI, 2009). Estes autores demonstraram que a microbiolização de plantas de tomateiro com *B. subtilis* aumentou a biomassa da parte aérea das plantas e reduziu a reprodução dos nematóides do gênero *Meloidogyne*. *B. firmus* secreta algumas toxinas que podem prejudicar a formação da película externa dos ovos de nematóides formadores das galhas, inibindo a eclosão, além de atuarem sobre as formas juvenis (MACHADO et al., 2012).

Os isolados bacterianos foram capazes de proporcionar incrementos na altura, diâmetro caulinar, massa fresca da parte aérea e das raízes, massa

seca da parte aérea e das raízes dos tomateiros e de reduzir meloidoginose nas plantas. Esses resultados indicam haver micro-organismos com potencial para a promoção de crescimento e o controle de patógenos e a necessidade de estudos de seleção visando encontrar isolados com maior competência do que os já conhecidos e estudados. Faz-se necessário a realização de trabalhos adicionais, utilizando tais micro-organismos em condições de campo e trabalhos laboratoriais, objetivando elucidar os mecanismos envolvidos nas interações entre esses *Bacillus* spp. e *M. incognita*.

CONCLUSÃO

Os isolados de *Bacillus* spp. codificados como B31, B89, B129, B235, B236, B262, B528, B259, B564, B727, B818 e B1218 se destacaram em promover o crescimento vegetativo de tomateiros em condições de casa de vegetação. Os isolados de *Bacillus* spp. codificados como B4, B7, B20, B117, B179, B349, B390, B457, B479, B496, B665, B677, B790, B809, B924, B1041, B1042, B1120 e B1123 se destacaram por reduzir a população de *M. incognita* em raízes de tomateiros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, M.; HEUER, H.; HALLMANN, J. Bacterial antagonists of fungal pathogens also control root-knot nematodes by induced systemic resistance of tomato plants. **PloS one**, v. 9, n. 2, 2014.

AGRIOS, G.N. Plant diseases caused by nematodes. In: GEORGE, N. AGRIOS, F.N. (Ed.). **Plant Pathology**. 5th ed.. San Diego: Academic Press. p.826-874, 2004.

ALI, S.; CHARLES, T. C.; GLICK, B. R. Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 80, p. 160-167, 2014.

ARAÚJO, F. F.; MARCHESI, G. V. P. Uso de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1558-1561, 2009.

BERLITZ, D. L.; RABINOVITCH, L.; MACHADO, V.; SANTIN, R. C.; GUIMARÃES, A. M.; MATSUMURA, A. T. S.; FIUZA, L. M. Evaluation of biocontrol of the *Meloidogyne javanica* with *Bacillus subtilis* and *Purpureocillium lilacinus* in greenhouse with lettuce. **Int J Res Eng, IT Soc Sci**, v. 6, n. 7, p. 38-45, 2016.

BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exiguae* cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.6, p.553, 1981 (Resumo).

BONTEMPO, A. F.; FERNANDES, R. H.; LOPES, J.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A. *Pochonia chlamydosporia* controls *Meloidogyne incognita* on carrot. **Australasian Plant Pathology**, v. 43, n. 4, p. 421-424, 2014.

CARDOZO, R. B.; ARAÚJO, F. F. Multiplicação de *Bacillus subtilis* em vinhaça e viabilidade no controle da meloidoginose, em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, n.12, p.1283–1288, 2011.

CHOWDAPPA, P.; KUMAR, S. M.; LAKSHMI, M. J.; UPRETI, K. K. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. **Biological Control**, v. 65, n. 1, p. 109-117, 2013.

CLEMENTE, J. M., CARDOSO, C. R., VIEIRA, B. S. E., DA MATA FLOR, I., & COSTA, R. L. Use of *Bacillus* spp. as growth promoter in carrot crop. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 35, p. 3355-3359, 2016.

CRICKMORE, N. Using worms to better understand how *Bacillus thuringiensis* kills insects. **Trends in Microbiology**, v. 13, p. 347-350, 2005.

DAWAR, S.; TARIQ, M.; ZAKI, M. J. Application of *Bacillus* species in control of *Meloidogyne javanica* (treub) chitwood on cowpea and mash bean. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, p. 439-444, 2008.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; DIAS-ARIEIRA, C. R. **Manejo sustentável de fitonematoides**, 1 ed., Viçosa: Editora UFV, 306 p, 2010.

FERREIRA, D. F. **Manual do Sistema Sisvar para análises estatísticas**. Lavras: Departamento de ciências exatas, 2000.

GAO, H.; QI, G.; YIN, R.; ZHANG, H.; LI, C.; ZHAO, X. *Bacillus cereus* strain S2 shows high nematocidal activity against *Meloidogyne incognita* by producing sphingosine. **Scientific reports**, v. 6, 2016.

HANIF, M. K.; HAMEED, S.; IMRAN, A.; NAQQASH, T.; SHAHID, M.; VAN ELSAS, J. D. Isolation and characterization of β -propeller gene containing phosphor bacterium *Bacillus subtilis* strain KPS-11 for growth promotion of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2015.

HIGAKI, W. A.; DE ARAUJO, F. F. *Bacillus subtilis* e abamectina no controle de nematoides e alterações fisiológicas em algodoeiro cultivado em solos naturalmente infestados [*Bacillus subtilis* and abamectin for nematode control and physiological changes in cotton grown in soil naturally infested]. **Nematropica**, v. 42, n. 2, p. 295-303, 2012.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogynespp.* including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v. 57, n. 12, p. 1025-1028, 1973.

KAVITHA, J.; JONATHAN, E. I.; UMAMAHESWARI, R. Field application of *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* and *Trichoderma viride* for the control of *Meloidogyne incognita* in sugarbeet. **Journal of Biological Control**, v. 21, p. 211-215, 2007.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). In: KIMATI, H. et al. (Eds.) **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, p.607-626, 2005.

Laboratório Farroupilha. Em: <<http://www.labfarroupilha.com/Portifolio/rizos>>. Acesso em 27 de julho de 2017.

MACHADO, V.; BERLITZ, D. L.; MATSUMURA, A. T. S.; SANTIN, R. C. M.; GUIMARÃES, A.; SILVA, M. E.; FIUZA, L. M. Bactérias como agentes de controle biológico de fitonematóides. **Oecologia Australis**, v. 16, n. 2, p. 165-182, 2012.

MEHTA, P.; WALIA, A.; KULSHRESTHA, S.; CHAUHAN, A.; SHIRKOT, C. K. Efficiency of plant growth-promoting P-solubilizing *Bacillus circulans* CB7 for enhancement of tomato growth under net house conditions. **Journal of basic microbiology**, v. 55, n. 1, p. 33-44, 2015.

PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, F. M. Doenças do caupi (*Vigna unguiculata* L.) Walp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; FILHO, A.B.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p.215-222, 2005.

QIAO, J.; YU, X.; LIANG, X.; LIU, Y.; BORRIS, R.; LIU, Y. Addition of plant-growth-promoting *Bacillus subtilis* PTS-394 on tomato rhizosphere has no durable impact on composition of root microbiome. **BMC microbiology**, v. 17, n. 1, 2017.

RITZINGER, C. H. S. P.; FANCELLI, M.; RITZINGER, R. Nematoides: Bioindicadores de sustentabilidade e mudanças edafoclimáticas. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1289-1296, 2010.

SANTOS, J. F.; SACRAMENTO, B. L.; MOTA, K. N. A. B.; SOUZA, J. T.; AZEVEDO NETO, A. D. Bactérias endofíticas promovem o crescimento de girassol e aumentam os teores de solutos orgânicos envolvidos no ajuste osmótico sob déficit hídrico. **Revista Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 2, 2014.

SANTOS, R. F.; HECKLER, L. I.; LAZAROTTO, M.; DA RESSURREIÇÃO GARRIDO, L.; CECILIA, R. E. G. O.; BLUME, E. *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* for control of *Dactylonectria macrodidyma* in grapevine. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 55, n. 2, p. 293-300, 2016.

SIDDIQUI, I. A.; SHAUKAT, S. S.; GHAZALA, H. K.; ALI, N. I. Suppression of *Meloidogyne javanica* by *Pseudomonas aeruginosa* IE-6S in tomato: the influence of NaCl, oxygen and iron levels. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 35, p. 1625–1634, 2003.

SNYDER, D. W.; OPPERMAN, C. H.; BIRD, D. McK. A method for generating *Meloidogyne incognita* males. **Journal of Nematology**, v. 38, p. 192-194, 2006.

TEREFE, M.; TEFERA, T.; SAKHUJA, P. K. Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of tomato plants in the greenhouse and nursery. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 100, p. 94-99, 2009.

YEGORENKOVA, I. V.; KONNOVA, S. A.; SACHUK, V. N.; IGNATOV, V. V. *Azospirillum brasilense* colonisation of wheat roots and the role of lectin–carbohydrate interactions in bacterial adsorption and root-hair deformation. **Plant and soil**, v. 231, n. 2, p. 275-282, 2001

CAPÍTULO 2

***Trichoderma* spp. NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita* E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE TOMATEIROS ¹**

¹Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico Pesquisa Agropecuária Brasileira, em versão na língua inglesa.

***Trichoderma* spp. no controle de *Meloidogyne incognita* e promoção de crescimento de tomateiros**

Resumo: Os nematóides fitoparasitas pertencentes ao gênero *Meloidogyne* causam sérios problemas ao cultivo de tomateiros, sendo o controle biológico uma alternativa ao manejo desses patógenos. Neste trabalho avaliou-se o efeito de isolados de *Trichoderma* spp. para a promoção de crescimento de tomateiros e o manejo de *Meloidogyne incognita*. Dos 21 isolados de *Trichoderma* spp., 87% foram identificados como *T. harzianum*, 9% como *T. atroviride* e 4% como *T. viride*. A inoculação de *Trichoderma* spp. possibilitou incrementos na altura (*T. harzianum* isolados ALF225 e FA10), no diâmetro caulinar (*T. harzianum* isolados ALF79, FA02, ALF26), na massa fresca da parte aérea (*T. harzianum* isolados ALF69, ALF68, ALF57, ALF26, ALF25) e das raízes (*T. harzianum* isolados FA555, ALF70, FA02, FA66, ALF1207, ALF57, 169C, ALF26, ALF225, *T. viride* isolado FA111 e *T. atroviride* isolado FA01), na massa seca da parte aérea (*T. harzianum* isolados ALF68 e ALF26) e das raízes (*T. harzianum* isolados FA66, 173K, ALF1207, ALF57, 169C, ALF26, ALF225 e *T. atroviride* isolado ALF80) dos tomateiros. *T. harzianum* isolados ALF85 e ALF225 se destacaram no manejo da meloidoginose por reduzirem o número de galhas em 56% e 47%, respectivamente, e o número de massa de ovos de *M. incognita* em 58% e 51%, respectivamente, nas raízes das plantas. Isolados de *T. harzianum*, *T. atroviride* e *T. viride* apresentam potencial para o crescimento de tomateiros e isolados de *T. harzianum* para o manejo de *M. incognita*.

Palavras-chave: *Meloidogyne* spp., *Solanum lycopersicum*, biocontrole, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma viride*.

**Control of *Meloidogyne incognita* and tomato growth promotion by
Trichoderma spp.**

Abstract: The phytoparasitic nematode *Meloidogyne incognita* causes serious problems to tomato cultivation and biological control is an alternative to manage these pathogens. In this study, the effect of *Trichoderma* spp. on tomato growth and control of *M. incognita* were evaluated. Of the 21 *Trichoderma* isolates, 87% were identified as *T. harzianum*, 9% as *T. atroviride* and 4% as *T. viride*. Treatment with *Trichoderma* spp. increased height (*T. harzianum* isolates ALF225 and FA10), stem diameter (*T. harzianum* strains ALF79, FA02, ALF26), shoot fresh weight (*T. harzianum* strains ALF69, ALF68, ALF57, ALF26, ALF25), root fresh weight (*T. harzianum* strains FA555, ALF70, FA02, FA66, ALF1207, ALF57, 169C, ALF26, ALF225, *T. viride* strain FA111 and *T. atroviride* strain FA01), shoot dry weight (*T. harzianum* strains ALF68 and ALF26) and root dry weight (*T. harzianum* strains FA66, 173K, ALF1207, ALF57, 169C, ALF26, ALF225 and *T. atroviride* strain ALF80) of tomato plants. *T. harzianum* isolates ALF85 and ALF225 were distinguished in the control of *M. incognita* by reducing the number of galls in 56% and 47%, and the number of eggs in 58% and 51%, respectively. *T. harzianum*, *T. atroviride* and *T. viride* isolates show potential to promote tomato growth and *T. harzianum* isolates to control *M. incognita*.

Keywords: *Meloidogyne* spp., *Solanum lycopersicum*, biocontrol, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma viride*.

INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma das hortaliças mais cultivadas e consumidas no mundo (ALVARENGA, 2004), no entanto, muitos fatores limitam seu cultivo, entre eles, os nematoides radiculares pertencentes ao gênero *Meloidogyne* (AGRIOS, 2004; SINGH et al., 2012). *Meloidogyne* spp. são nematóides endoparasitas, que se alimentam do conteúdo citoplasmático das células vegetais e se reproduzem nas plantas vivas, induzindo a formação de células multinucleadas nas raízes, ao redor das quais são formadas as galhas (BERLITZ et al., 2016). Além de consumir os fotoassimilados, esses nematoides reduzem a eficiência do sistema radicular, com consequente redução do crescimento das plantas (ZAMBIASI & BELOT, 2010; GAO et al., 2016).

O controle de nematoides habitantes do solo é bastante dificultoso, sendo a prevenção a melhor forma de manejo. No entanto, após a detecção da doença, existem diversas formas de minimizar a infestação desses micro-organismos, destacando o controle químico, o plantio de variedades de plantas resistentes, a rotação de culturas, a solarização do solo e o controle biológico (AGRIOS, 2004). Apesar de a utilização de agrotóxico ser o mais comum, apresenta elevado custo para a agricultura, causa impacto ambiental, como o acúmulo de substâncias tóxicas no solo, na água superficial e no lençol freático e causa contaminação de pessoas e animais (BETTIOL et al., 2009). Desse modo, a adoção de métodos eficientes e sustentáveis no manejo de nematoides é necessário (ROMEIRO, 2007; FERRAZ et al., 2010), e a utilização de micro-organismos no manejo desses micro-organismos vem ganhando espaço em todo o mundo (GAO et al., 2016; COLLANGE et al., 2011)

Muitos trabalhos têm relatado a seleção de fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* como potenciais antagonistas no patossistema *Meloidogyne*–tomateiro. Affokpon et al. (2011), Radwan et al. (2012) e Elgorban et al. (2013) observaram que *Trichoderma* spp são capazes de reduzir o número de galhas e de juvenis de *Meloidogyne* spp. em raízes tomateiros. Esses fungos habitam o solo e a rizosfera e têm características

essenciais para um agente de controle biológico, como ausência de impacto negativo ao meio ambiente, presença de estruturas de reprodução de fácil propagação e capacidade de sobreviver em ambientes desfavoráveis (VINALE et al., 2008). Seus mecanismos de ação no controle de nematóides incluem a produção de metabólito secundários tóxicos, o parasitismo direto de ovos e larvas através da atividade da quitinase e protease e indução dos mecanismos de defesa do hospedeiro (SAHEBANI & HADAVI, 2008; RADWAN et al., 2012).

Adicionalmente, alguns isolados têm a habilidade em promover o crescimento vegetal por meio da síntese de substâncias reguladoras de crescimento vegetal, da solubilização, translocação e absorção de nutrientes do solo, do melhor desenvolvimento radicular, de incrementos na eficiência fotossintética e no estímulo às plantas a ativarem mecanismos de defesa frente a condições ambientais desfavoráveis (STEWART & HILL, 2014). Harman (2006) relatou *T. harzianum* como sendo efetivo na promoção da formação de raízes de tomateiros, quando comparados às plantas controle não tratadas. Benítez (2004) também observou o estímulo no crescimento de tomateiros com *T. harzianum*. Chacon et al. (2007) constataram que um isolado de *T. harzianum* foi capaz de aumentar em 140% a massa fresca e em 300% a área foliar de tomateiros.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar *Trichoderma* spp. quanto à promoção de crescimento de tomateiros e controle do nematoide *Meloidogyne incognita* nessa cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de inóculo de *Meloidogyne incognita*

O inóculo de *M. incognita* consistiu de indivíduos obtidos de uma população pura, coletados de raízes de tomateiros mantidos em casa de vegetação. Os nematóides foram extraídos de acordo com a metodologia proposta por Hussey e Barker (1973) modificada por Boneti e Ferraz (1981). As raízes foram cortadas em pedaços de aproximadamente 2,0 cm e trituradas com água em liquidificador por 1 minuto. Após a trituração, a suspensão foi vertida em um conjunto de peneiras (0,5 mm sobre 0,18 mm sobre 0,025 mm) e o material

retido na última peneira foi coletado e observado em câmara de Peters sob microscópio estereoscópio.

Obtenção dos isolados de *Trichoderma* spp. e extração dos esporos fúngicos

Foram avaliados 21 isolados de *Trichoderma* spp. pertencentes à coleção de micro-organismos do Laboratório de Genética Microbiana (LabGem) da UFRB, codificados como ALF85, FA77, FA555, FA111, ALF70, 172H, FA01, FA02, FA66, ALF69, ALF68, ALF80, 173K, ALF1207, FA624, ALF409, ALF57, 169C, ALF26, ALF225 e FA10. Os micro-organismos encontravam-se preservados em água destilada esterilizada, de acordo com o método Castellani (1939), e mantidos a temperatura ambiente.

Para a obtenção da suspensão de conídios, os *Trichoderma* spp. foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e incubadas a 25°C. Posteriormente, foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada na superfície do meio de cultura contendo as colônias fúngicas, fez-se a raspagem das colônias com uma alça de Drigalski e a lavagem da placa com mais 40 mL de água destilada esterilizada. A suspensão fúngica foi filtrada em gaze de dupla camada, e o número de conídios foi quantificado em câmara de Neubauer, utilizando microscópio ótico. As concentrações das suspensões de esporos fúngicos foram ajustadas para obtenção de 10⁶ esporos mL⁻¹.

Caracterização morfológica de *Trichoderma* spp.

A identificação morfológica dos isolados de *Trichoderma*, em nível de espécie, foi realizada considerando aspectos macroscópicos e microscópicos. Para a análise macroscópica, os isolados foram transferidos para placas de Petri com meio de cultura BDA, incubadas sob 25 °C por 72 horas, para medições do crescimento radial das colônias.

Na análise microscópica, foi empregada a técnica de microcultura de *Trichoderma* spp. em meio de cultura BDA. Após 72 horas à 25°C de incubação, foi verificado o crescimento fúngico e procedeu-se a montagem das lâminas com lactofenol, para observação em microscópio. Foram medidos os

conídios, conidióforos, fiálides e clamidósporos. Foram realizadas 30 medições por lâmina, com o software Nikon ACT-1C ligado ao microscópio óptico (Nikon 80i) a 1000X. Foi utilizada a chave *on line* de identificação de espécies de *Trichoderma* spp. proposta por Samuels et al. (2013).

Seleção de *Trichoderma* spp. para a promoção de crescimento de tomateiro

Para avaliar a promoção de crescimento de tomateiros em condições de casa de vegetação, sementes de tomateiro cultivar Santa Clara comercializada pela empresa Feltrin Sementes, foram desinfestadas superficialmente por meio de imersão em hipoclorito de sódio a 1% por 2 minutos, seguido de álcool a 70% por 1 minuto e três lavagens em água destilada esterilizada.

Após desinfestação, as sementes foram imersas durante 5 minutos na suspensão fúngica de igual concentração (10^6 esporos mL⁻¹) e fez-se a semeadura em sacos de mudas contendo 1L de substrato composto por uma mistura de solo e areia (1:1 v:v) esterilizados em autoclave. Amostra do solo foi coletada para caracterização química e o resultado é apresentado na Tabela 1 (EMBRAPA, 1999).

Para garantir que as rizosfera fosse colonizada pelos isolados de *Trichoderma*, quinze dias após a germinação, as plantas foram reinoculadas com 5 ml da suspensão de esporos fúngicos contendo 10^6 esporos mL⁻¹. Quarenta dias após a segunda inoculação, o experimento foi avaliado, quanto à altura das plantas, diâmetro de caule, massas fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular.

Seleção de *Trichoderma* spp. para o controle de *Meloydogine incognita*

Em casa de vegetação, instalou-se um experimento visando avaliar o controle de *M. incognita* por *Trichoderma* spp. As sementes de tomate foram desinfestadas superficialmente e tratadas com os isolados de *Trichoderma*, como descrito acima, e semeadas em sacos de mudas contendo 1L de substrato composto por uma mistura de solo e areia (1:1 v:v, caracterização química apresentada na Tabela 1) esterilizados em autoclave. Para garantir que as rizosfera fosse colonizada pelos isolados de *Trichoderma*, quinze dias

após a germinação, as plantas foram reinoculadas com 5 ml da suspensão de esporos de *Trichoderma* contendo 10^6 esporos mL^{-1} . No dia seguinte, as plantas receberam uma suspensão contendo 1.000 indivíduos de *M. incognita*, composto por juvenis e ovos. Aos quarenta dias após a inoculação dos nematoides, o experimento foi avaliado quanto ao número de massa de ovos e número de galhas nas raízes.

Tabela 1. Caracterização química do substrato utilizado no experimento.

Característica	pH	SB	CTC	K	Ca	Mg	V	MO ¹	P
	(em água)	cmol/dm ³				%	g/ kg	mg/dm ³	
Valor	5,1	2,23	5,09	0,08	1,3	0,8	44	4,86	10

1-Matéria orgânica

Análise estatística e delineamento experimental

Os experimentos foram instalados em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 22 tratamentos (21 isolados fúngico e o tratamento controle com água esterilizada) e cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Scott-Knott à 5% de significância. Os dados de contagem de nematoides foram transformados em $\text{Log}(x+1)$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização morfológica de *Trichoderma* spp.

Pelas características morfológicas observadas por microscopia de luz dos isolados fúngicos foi possível constatar que pertencem ao gênero *Trichoderma*. Estes, foram isolados de diversas localidades, geralmente associado a material orgânico em decomposição. Segundo Druzhinina et al. (2011), *Trichoderma* spp. são micro-organismos de vida livre, facilmente encontrados no solo, especialmente nos ricos em matéria orgânica, com capacidade de se associar às raízes, formando simbiose com as plantas.

Entre as características observadas, encontra-se a crescimento rápido em meio de cultura, produção abundante de conídios em formato subglobosos,

ovoides ou elipsóides, sendo produzidos no ápice das fiálides, que surgem dos conidióforos ramificados (Figura 1). Em meio de cultura, as colônias cresceram rapidamente, apresentando inicialmente uma superfície lisa e quase translúcida e, posteriormente, tornam-se flocosas ou compactadas. O micélio composto por hifas hialinas, ramificadas e de parede lisa.



Figura 1. Conídios, fiálides e conidióforos de *T.harzianum* isolado 172K.

Verificou-se variação na coloração do micélio e da colônia, entre branca, amarela e verde. A produção destes pigmentos, frequentemente, não se limitava apenas aos conídios e micélio, mas se difundia no meio, alterando a sua coloração variando nas tonalidades de amarelo. Os esporos de *Trichoderma* spp. soltavam-se facilmente do micélio vegetativo, e eram reconhecidas utilizando-se um microscópio óptico.

Dos 21 isolados de *Trichoderma* spp. estudados, 87% foram identificados como *T. harzianum* (169C, ALF225, ALF69, ALF85, ALF70, FA555, ALF57, FA77, 172K, ALF68, FA10, FA624, ALF26, ALF409, ALF1207, 173K, FA02, FA66), 9% como *T. atroviride* (ALF80, FA01) e 4% como *T.viride* (FA111) (Figura 2).

As características dos isolados fúngicos observadas no presente trabalho corroboram com as descrições das espécies realizadas por Gams e

Bissett (1998). Os isolados de *Trichoderma harzianum* produziram conídios globoso com diâmetros variando entre 1,8 μ m (isolados ALF225 e FA624) e 3,3 μ m (isolado FA555), fiálides em forma de ampola e colônias exalando odor doce semelhante a óleo de coco (*Cocos nucifera*), devido à produção do metabólito volátil δ -lactona 6-pentil- α -pirona (GAMS & BISSETT, 1998). Em baixas concentrações, δ -lactona 6-pentil- α -pirona ativa mecanismos de defesa e regulam o crescimento das plantas (VINALE et al., 2008). Isolados de *T. atroviride* e *T. viride* também possuem a capacidade de produzir esse metabólito (GAMS & BISSETT, 1998), mas, não foi observado no presente estudo.

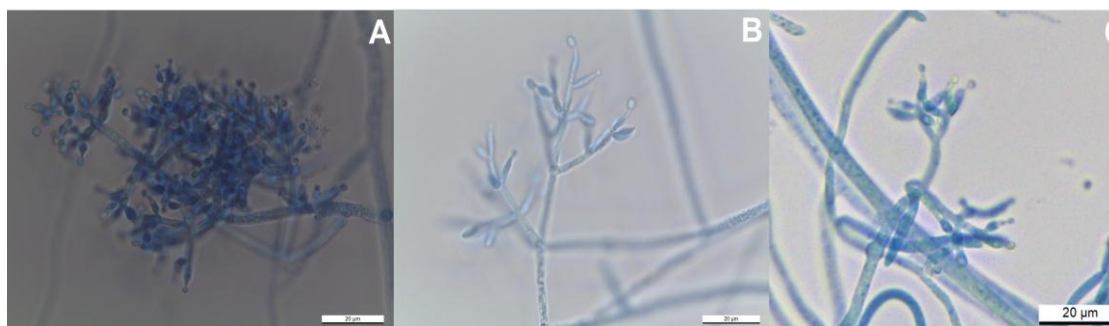


Figura 2. Estruturas de *T.harzianum* isolado ALF69 (A), *T. atroviride* isolado ALF80 (B) e *T.viride* isolado FA111 (C).

T. atroviride isolados ALF80 e FA01 produziram conídios globosos a subglobosos com dimensões variando entre 2,5 μ m e 3,4 μ m, fialides solitárias e longilíneas medindo em média 1,5-2,5 μ m x 6,0-11,0 μ m. *T. viride* isolado FA111 produziu conídios globosos com diâmetros variando entre 1,5 μ m e 3,0 μ m e fialides em forma de ampola ligeiramente curva com dimensões médias de 1,8-3,2 μ m x 7,1-9,0 μ m. Foi observada a formação de clamidosporos em isolados de *T. atroviride* e *T. viride*.

Seleção de *Trichoderma* spp. para a promoção de crescimento de tomateiro

Isolados de *Trichoderma* spp. promoveram aumentos significativos ($p \leq 0,05$) na altura, diâmetro caulinar, massa fresca da parte aérea e das raízes, massa seca da parte aérea e das raízes de tomateiros após 55 dias de cultivo

(Tabela 1). O tratamento dos tomateiros com sete isolados de *T. harzianum* promoveram incrementos na altura das plantas, com destaque para ALF225 e FA10 por promoverem incrementos de 10,8% e 12,5%, respectivamente, em relação às plantas não tratadas.

T. harzianum ALF69, ALF68, ALF57, ALF26 e ALF225 proporcionaram incrementos na massa fresca da parte aérea das plantas variando entre 7,3% (ALF69) e 17,7% (ALF26) em relação às plantas não tratadas. Enquanto *T. harzianum* 172K, 173K, ALF85, FA02, FA555 e *T. atroviride* FA01 possibilitaram decréscimo à massa fresca da parte aérea variando entre 9% e 19%. Apenas os tratamentos com *T. harzianum* ALF68 e ALF26 incrementaram a massa seca da parte aérea das plantas, com incrementos de 7,2% e 3,7%, respectivamente, em relação às plantas sem *Trichoderma* (Tabela 1). As plantas tratadas com *T. harzianum* ALF57, ALF69 e FA10 não diferiram do tratamento controle, e os demais isolados decresceram a massa seca da parte aérea em até 6% (*T. harzianum* FA77).

O tratamento das plantas com *T. harzianum* ALF70, FA02 e ALF26 proporcionaram aumento de 22,7%, 26% e 19% no diâmetro do caule dos tomateiros, respectivamente, em relação às plantas não tratadas (Tabela 1). Dos 21 isolados testados, 12 foram benéficos ao desenvolvimento radicular dos tomateiros, com incrementos na massa fresca das raízes variando entre 26,5% (*T. harzianum* FA555) e 41,4% (*T. harzianum* FA77 e ALF1207), em relação às plantas não tratadas. Para massa seca das raízes, sete isolados de *T. harzianum* (169C, ALF26, ALF57, ALF80, ALF225, ALF1207 e FA66) se destacaram, por proporcionarem incrementos variando entre 6,6% e 9,6%, em relação às plantas não tratadas; dois isolados de *T. harzianum* (173K e ALF85) decresceram a massa seca das raízes de tomateiro em aproximadamente 4,0% em relação ao tratamento controle; e os demais tratamentos não demonstraram efeito sobre a massa seca das raízes (Tabela 1).

O melhor desenvolvimento dos tomateiros tratados com *Trichoderma* spp. pode estar relacionado à produção de substâncias reguladoras de crescimento vegetal; maior eficiência no uso de nutrientes, aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes pelas plantas e pelo controle de agentes patogênicos (STEWART & HILL, 2014).

Tabela 1. Altura das plantas, diâmetro caulinar, massa fresca da parte aérea e das raízes, massa seca da parte e aérea das raízes de tomateiros tratados com *Trichoderma* spp.

TRATAMENTOS	Altura (cm)	Massa parte aérea (g)		Diâmetro (cm)	Massa raízes (g)	
		Fresca	Seca		Fresca	Seca
Controle (água)	37,1±3,6 c ⁽¹⁾⁽²⁾	8,8±0,4 b	2,1±0,1 b	3,4±0,5 c	4,8±1,0 c	1,8±0,1 b
<i>T. harzianum</i> 169C	38,4±2,6 b	8,4±0,7 b	2,0±0,1 c	3,8±0,4 b	7,1±0,4 a	2,0±0,0 a
<i>T. harzianum</i> 172K	35,0±2,2 c	7,6±0,7 c	2,0±0,1 c	3,8±0,4 b	5,7±0,8 b	1,8±0,0 b
<i>T. harzianum</i> 173K	37,0±2,5 c	8,0±0,7 c	1,9±0,1 c	3,6±0,5 c	5,1±0,5 c	1,7±0,0 c
<i>T. harzianum</i> ALF26	39,4±3,6 b	10,7±0,4 a	2,3±0,1 a	4,2±0,8 a	6,9±1,1 a	2,0±0,1 a
<i>T. harzianum</i> ALF57	38,0±3,3 b	9,9±0,6 a	2,2±0,0 b	3,8±0,4 b	6,7±1,2 a	2,0±0,1 a
<i>T. harzianum</i> ALF68	36,4±2,7 c	10,1±0,7 a	2,5±0,3 a	4,0±0,7 b	6,2±0,6 b	1,9±0,2 b
<i>T. harzianum</i> ALF69	36,2±2,4 c	9,5±0,8 a	2,1±0,1 b	3,6±0,5 c	5,8±0,5 b	1,9±0,1 b
<i>T. harzianum</i> ALF70	35,0±3,3 c	8,4±0,5 b	2,0±0,1 c	4,4±0,5 a	6,6±1,0 a	1,8±0,0 b
<i>T. harzianum</i> ALF85	33,2±1,3 c	7,6±0,7 c	1,9±0,1 c	3,6±0,5 c	4,6±0,7 c	1,7±0,2 c
<i>T. harzianum</i> ALF225	41,6±3,5 a	10,3±0,9 a	2,1±0,2 c	3,6±0,5 c	7,9±1,5 a	2,0±0,3 a
<i>T. harzianum</i> ALF409	37,8±3,1 b	8,1±0,1 b	1,9±0,1 c	3,8±0,4 b	4,9±0,7 c	1,8±0,1 b
<i>T. harzianum</i> ALF1207	37,0±2,5 c	8,6±0,6 b	2,1±0,1 c	3,8±0,4 b	6,5±1,0 a	2,0±0,2 a
<i>T. harzianum</i> FA02	35,6±1,6 c	8,0±0,7 c	2,0±0,0 c	4,6±0,8 a	6,8±1,1 a	1,9±0,1 b
<i>T. harzianum</i> FA10	42,4±2,0 a	9,0±0,6 b	2,2±0,2 b	3,4±0,5 c	5,9±0,9 b	1,8±0,1 b
<i>T. harzianum</i> FA66	35,8±2,6 c	8,2±0,1 b	2,1±0,1 c	4,0±0,7 b	7,0±0,6 a	2,1±0,3 a
<i>T. harzianum</i> FA77	33,4±2,8 c	7,1±0,6 c	1,8±0,1 c	3,4±0,5 c	6,5±1,0 a	1,9±0,1 b
<i>T. harzianum</i> FA555	34,2±2,8 c	7,7±0,6 c	2,0±0,2 c	3,6±0,5 c	8,2±1,0 a	1,9±0,0 b
<i>T. harzianum</i> FA624	37,6±3,5 b	8,3±0,6 b	2,0±0,1 c	3,6±0,5 c	6,0±0,7 b	1,8±0,0 b
<i>T. atroviride</i> FA01	35,4±3,3 c	7,9±0,4 c	2,1±0,2 c	3,6±0,5 c	7,2±0,7 a	1,9±0,1 b
<i>T. atroviride</i> ALF80	36,6±2,8 c	8,4±0,7 b	2,0±0,1 c	3,8±0,4 b	6,3±0,6 b	2,1±0,1 a
<i>T. viride</i> FA111	34,6±2,6 c	8,4±0,7 b	2,0±0,2 c	2,8±0,4 c	6,8±1,1 a	1,9±0,2 b

⁽¹⁾ Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ⁽²⁾ Média±erro padrão das variáveis avaliadas (n = 5).

Vários trabalhos têm demonstrado resultados promissores na utilização de *Trichoderma* spp. como promotores de crescimento em muitas espécies vegetais de importância econômica, e o presente estudo confirma esses resultados. *T. harzianum* tem sido relatado na literatura como sendo promotor de crescimento para eucalipto (CARVALHO FILHO et al., 2008) e para plantas de milho (RESENDE et al., 2004). Três isolados de *Trichoderma* apresentaram efeitos positivos significativos, em relação ao tratamento controle, com relação ao acúmulo de matéria seca de maracujazeiro (SANTOS et al., 2010). Mastouri et al. (2010) concluiu que o tratamento de sementes de tomateiro com *T. harzianum* acelera a taxa de germinação, melhora o vigor das plântulas e ajudam as plantas a sobreviverem em condições de estresses abióticos.

Seleção de *Trichoderma* spp. para o controle de *Meloydogine incognita*

Os tomateiros tratados com 67% dos isolados de *Trichoderma* diferiram estatisticamente das plantas não tratadas para o número de galhas e 38% diferiram para a massa de ovos de *Meloydogine incognita* nas raízes. *Trichoderma harzianum* isolados ALF85 e ALF225 se destacaram no controle de *M. incognita* por proporcionarem reduções no número de massa de ovos de 51,2% (ALF225) e 57,7% (ALF85) e no número de galhas de 47,2% (ALF225) e 56,2% (ALF85) em relação ao tratamento controle (Tabela 2).

Estas reduções podem ter ocorrido devido ao parasitismos dos ovos de *M. incognita* pelos isolados de *Trichoderma*, impedindo a reprodução do nematoide ou também devido a alterações nos exudatos radiculares proporcionados pelos isolados de *Trichoderma* nas raízes do tomateiro. Estes efeitos foram relatados por diversos autores, Freitas et al. (2012) observaram que isolados de *Trichoderma* spp. foram capazes de diminuir significativamente a reprodução do nematoide e parasitaram os ovos de *M. incognita* em plantas de cana de açúcar. Ferreira e Ferraz (2008) relataram que nove isolados de *Trichoderma* spp. foram capazes de parasitar ovos do nematoide. Eapen et al. (2005) também relataram colonização de ovos de *M. incognita* por espécies de *Trichoderma*. Segundo Stirling (1991), os fungos apresentam estratégias sofisticadas para infectar ou capturar os nematoides, atuando como

predadores, endoparasitas, parasitas de ovos e fêmeas, comportando-se como oportunistas e produzindo metabólitos tóxicos.

Tabela 2. Número de galhas e massa de ovos de *Meloidogyne incognita* em raízes de tomateiros tratados com *Trichoderma* spp.

TRATAMENTOS	Massa de ovos/g raiz	Número de galhas/g raiz
Controle (água)	27,9±4,2 d ⁽¹⁾⁽²⁾	26,7±3,8 d
<i>T. harzianum</i> 169C	24,7±3,0 d	30,3±4,9 d
<i>T. harzianum</i> 172K	22,7±3,6 c	25,7±6,0 d
<i>T. harzianum</i> 173K	19,1±3,6 c	26,9±4,9 d
<i>T. harzianum</i> ALF26	22,1±3,8 c	22,9±4,1 c
<i>T. harzianum</i> ALF57	26,2±3,4 d	22,8±2,1 c
<i>T. harzianum</i> ALF68	23,7±1,6 c	20,3±3,7 c
<i>T. harzianum</i> ALF69	15,7±2,0 b	21,1±3,8 c
<i>T. harzianum</i> ALF70	26,0±2,8 d	25,9±3,4 d
<i>T. harzianum</i> ALF85	11,8±2,0 a	11,7±1,0 a
<i>T. harzianum</i> ALF225	13,5±2,0 a	14,1±2,3 a
<i>T. harzianum</i> ALF409	26,4±3,8 d	31,8±4,6 e
<i>T. harzianum</i> ALF1207	21,2±2,6 c	27,1±2,9 d
<i>T. harzianum</i> FA02	27,9±1,8 d	26 b±4,6 e
<i>T. harzianum</i> FA10	14,8±2,3 b	18,4±2,9 b
<i>T. harzianum</i> FA66	21,6±2,9 c	26,1±2,8 d
<i>T. harzianum</i> FA77	21,0±2,0 c	25,5±4,6 d
<i>T. harzianum</i> FA555	20,6±1,9 c	24,9±2,4 d
<i>T. harzianum</i> FA624	28,4±2,1 d	31,9±3,7 e
<i>T. atroviride</i> FA01	23,5±2,7 c	26,6±5,2 d
<i>T. atroviride</i> ALF80	28,6±1,6 d	35,3±5,7 d
<i>T. viride</i> FA111	16,0±1,4 b	22,3±1,8 c

⁽¹⁾ Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ⁽²⁾ Média±erro padrão das variáveis avaliadas (n = 5).

A forma como *Trichoderma* spp. interferem no ciclo de vida dos nematoides, envolve o parasitismo de ovos e larvas, a produção de metabólitos secundários tóxicos como quitinase e protease, alterações dos exsudatos radiculares reduzindo a eclosão dos juvenis, a atração e o reconhecimento do hospedeiro pelos juvenis de segundo estágio e a indução de mecanismos de defesa sistêmica nas plantas (COLLANGE et al., 2011; RADWAN et al., 2012). De acordo com Harman et al. (2004), esses fungos competem por exsudatos liberados pelas sementes no processo de germinação e desenvolvimento radicular, inibindo a eclosão dos juvenis de nematoides pela falta de estímulo devido à redução de exsudatos radiculares.

Os isolados de *Trichoderma* avaliados mostraram ser benéficos na rizosfera do tomateiro, promovendo o crescimento das plantas e inibindo a reprodução de *M. incognita*. A sobrevivência destes isolados de *Trichoderma* no solo e seu efeito no manejo deste nematoide em ciclos subsequentes da cultura do tomateiro deverão ser estudados. A capacidade de colonização das raízes dos tomateiros e dos tecidos internos também deverá ser objeto de investigação assim como a elucidação dos mecanismos de ação destes isolados.

CONCLUSÕES

Isolados de *T. harzianum* promovem o crescimento de tomateiros, com destaque para os isolados ALF68, ALF26, ALF225 e FA10. Os isolados de *T. harzianum* codificados como ALF85 e ALF225 inibiram a reprodução de *M. incognita*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFOKPON, A.; COYNE, D. L.; HTAY, C. C.; AGBÈDÈ, R. D.; LAWOUIN, L.; COOSEMANS, J. Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, p. 600–608, 2011.

AGRIOS, G. N. Plant diseases caused by nematodes. In: GEORGE, N. AGRIOS, F.N. (Ed.). **Plant Pathology**. 5th ed.. San Diego: Academic Press. p.826-874, 2004.

ALVARENGA, M. A. R. **Tomate: produção em campo, casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras: UFLA. 400p., 2004.

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

BERLITZ, D. L.; RABINOVITCH, L.; MACHADO, V.; MATSUMUR, A. T. S.; GUIMARÃES, A. M.; SANTIN, R. C.; CASSAL, M.; FIUZA, L. M. Evaluation of Biocontrol of the *Meloidogyne Javanica* with *Bacillus Subtilis* and *Purpureocillium Lilacinus* in Greenhouse with *Lettuce*. **International Journal of Research in Engineering, IT and Social Sciences**, v. 6, número 7, p. 38-45, 2016.

BETTIOL, W.; GHINI, R.; MARIANO, R. R. L.; MICHEREFF, S. J.; MATTOS, L. P. V.; ALVARADO, I. C. M.; PINTO, Z. V. Supressividade de fitopatógenos habitantes do solo. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p.187-208, 2009.

BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exiguae* cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.6, p.553, 1981 (Resumo).

CARVALHO FILHO, M. R.; MELLO, S. C. M.; SANTOS, R. P.; MENÊZES, J. E. Promoção de crescimento, produção de ácido indolacético *in vitro* e colonização endofítica de mudas de eucalipto. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento 226**, 2008.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 24, p. 270-276, 1939.

CHACON, M. R.; RODRIGUEZ-GALAN, O.; BERITEZ, T.; SOUSA, S.; REY, M.; LLOBELL, A.; DELGADO-JARANA, J. Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. **International Microbiology**, v. 10, p. 19-27, 2007.

COLLANGE, B.; NAVARRETE, M.; PEYRE, G.; MATEILLE, T.; TCHAMITCHIAN, M. Rootknot nematode (*Meloidogyne*) management in vegetable crop production: the challenge of an agronomic system analysis. **Crop Protection**, v. 30, p. 1251–1262, 2011.

DRUZHININA, I. S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M.; MONTE, E.; MUKHERJEE, P. K.; ZEILINGER, S.; GRIGORIEV, I. V.; KUBICEK, C. P. Trichoderma: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 749–759, 2011.

EAPEN, S. J.; BEENA, B.; RAMANA, K. V. Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 88, p. 218-225, 2005.

ELGORBAN, A. M.; ABDEL-WAHAB, M. A.; BAHKALI, A. H.; AL-SUM, B. A. Biocontrol of *Meloidogyne javanica* on Tomato Plants by *Hypocrea lixii* (the Teleomorph of *Trichoderma harzianum*). **Clean – Soil, Air, Water**, v. 42, n. 10, p. 1464–1469, 2014.

EMBRAPA - **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes/** Embrapa Solos, Embrapa Informática Agropecuária. In: SILVA, F. C. (Org.). Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. 370 p.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; DIAS-ARIEIRA, C. R. **Manejo sustentável de fitonematoides**, 1 ed., Viçosa: Editora UFV, 306 p, 2010.

FERREIRA, P. A.; FERRAZ, S. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 2, n. 17, 2008.

FREITAS, M. A.; PEDROSA, E. M. R.; MARIANO, R. L. R.; GUIMARÃES, L. M. P. Seleção de *Trichoderma* spp. como potenciais agentes de biocontrole para *Meloidogyne incognita* em cana-de-açúcar. **Nematropica**, v. 42, n. 1, p. 115-122, 2012.

GAMS, W.; BISSETT, J. Morphology and Identification of *Trichoderma*. In: KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. (Eds). *Trichoderma and Gliocladium*. **Basic Biology, Taxonomy and Genetics**. London: Taylor and Francis Ltd., v. 1, p. 3–34, 1998.

GAO, H.; QI, G.; YIN, R.; ZHANG, H.; LI, C.; ZHAO, X. *Bacillus cereus* strain S2 shows high nematicidal activity against *Meloidogyne incognita* by producing Sphingosine. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

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

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

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogynespp.* including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v. 57, n. 12, p. 1025-1028, 1973.

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

RADWAN, M. A.; FARRAG, S. A. A.; ABU-ELAMAYEM, M. M.; AHMED, N. S. Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using bioproducts of microbial origin. **Applied Soil Ecology**, v. 56, p. 58– 62, 2012.

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

ROMEIRO, S. R. **Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos**. Viçosa: Ed. UFV, 2007.

SAHEBANI, N.; HADAVI, N. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 2016–2020, 2008.

SAMUELS, G. J.; CHAVERRI, P.; FARR, D. F.; MCCRAY, E. B. **Trichoderma Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA.**

Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>>. Acesso em: 5 de junho 2015.

SANTOS, H. A.; MELLO, S. C. M.; PEIXOTO, J. R. Associação de isolados de *Trichoderma* spp. e ácido indol-3-butírico (aib) na promoção de enraizamento de estacas e crescimento de maracujazeiro. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 6, p. 966-972, 2010.

SINGH, S. K.; CONDE, B.; HODDA, M. Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*) on Bitter Melon (*Momordica charantia*) near Darwin, Australia. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 7, p. 75-78, 2012.

STEWART, A.; HILL, R. Applications of *Trichoderma* in Plant Growth Promotion. In: GUPTA, V. G.; SCHMOLL, M.; HERRERA-ESTRELLA, A.; UPADHYAY, R. S.; DRUZHININA, I.; TUOHY, M. **Biotechnology and Biology of Trichoderma**, 2014, p. 415–428.

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

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; MARRA, R.; BARBETTI, M. J.; LI, H.; WOO, S. L.; LORITO, M. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.72, p. 80-86, 2008.

ZAMBIASI, T.; BELOT, J. L. Proteção integrada. **Revista Cultivar**, p. 10, 2010. (Caderno Especial Pragas)

CAPÍTULO 3

POTENCIAL DE *Trichoderma* spp. NO CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE FEIJOEIROS¹

¹Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico Brazilian Journal of Microbiology, em versão na língua inglesa.

Potencial de *Trichoderma* spp. no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary e promoção de crescimento de feijoeiros

Resumo: O fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal do mofo branco, tem ocasionado diversas perdas no cultivo de feijoeiros e a utilização de microorganismos benéficos insere-se como uma alternativa para o manejo desse patógeno. Esse trabalho teve o objetivo de estudar nove isolados de *Trichoderma* no manejo de *S. sclerotiorum* e na promoção de crescimento de feijoeiros. Avaliou-se: 1) O efeito *in vitro* dos metabólitos voláteis e não voláteis produzidos pelos isolados de *Trichoderma* sobre o crescimento de *S. sclerotiorum*; 2) o crescimento de *S. sclerotiorum* no teste de confronto direto sob diferentes temperaturas; 3) o efeito da inoculação do solo com isolados de *Trichoderma* no controle de *S. sclerotiorum* e crescimento de feijoeiros. Os metabólitos não voláteis produzidos por sete isolados de *Trichoderma* foram capazes de reduzir o crescimento de *S. sclerotiorum*. Apenas dois isolados produziram metabólitos voláteis com capacidade para reduzir o crescimento deste patógeno. No teste de confronto direto, todos os isolados foram capazes de reduzir o tamanho das colônias de *S. sclerotiorum*, exceto os isolados HRE342 (nas temperaturas de 15°C e 30°C), LU827 e LU1540 (ambos na temperatura de 30°C). A presença de *S. sclerotiorum* diminuiu o número de sementes germinadas (16%), número de plantas vivas (37%), número de nódulos (63%), massa seca da parte aérea (30%), altura das plantas (5%) e teor de clorofila nas folhas (9%) das plantas de feijão, em relação ao tratamento controle. Na presença de *S. sclerotiorum*, os isolados de *Trichoderma* foram capazes de proporcionar incrementos no teor relativo de clorofila nas folhas e no número de nódulos nas raízes de feijoeiro. Entre as plantas saudias, a incorporação dos isolados fúngicos possibilitou aumentos no número de sementes germinadas, no número de nódulos, na altura de plantas e no teor relativo de clorofila. Os isolados de *Trichoderma* testados têm potencial em promover o crescimento de feijoeiros, com destaque para os isolados LU827, LU618, LU820 e LU640, mas, não controlam *S. sclerotiorum*.

Palavras-chave: Mofo branco, controle biológico, fungos benéficos.

Potential of *Trichoderma* spp. in the control of *Sclerotinia sclerotiorum* and bean growth promotion

Abstract: *Sclerotinia sclerotiorum*, causal agent of white mold, is responsible for severe losses to bean cultivation and the use of beneficial microorganisms is an alternative for the management of this pathogen. This work aimed to study nine *Trichoderma* strains to control *S. sclerotiorum* and bean growth promotion. The following evaluations were performed: 1) the in vitro effect of volatile and non-volatile metabolites produced by *Trichoderma* strains on *S. sclerotiorum* growth; 2) growth of *S. sclerotiorum* in direct confrontation under different temperatures; 3) the effect of soil inoculation with *Trichoderma* strains on *S. sclerotiorum* control and bean growth. The non-volatile metabolites produced by seven *Trichoderma* strains were able to reduce the *S. sclerotiorum* growth. Only two strains produced volatile metabolites capable of reducing the growth of this pathogen. In the direct confrontation test, all strains were able to reduce the size of the *S. sclerotiorum* colonies, except for strain HRE342 at temperatures of 15°C and 30°C, and LU827 and LU1540 at 30°C. The presence of *S. sclerotiorum* decreased the number of germinated seeds (16%), number of live plants (37%), number of nodules (63%), shoot dry mass (30%), plant height (5%) and chlorophyll content in the leaves (9%) in comparison to the control treatment. In the presence *S. sclerotiorum*, *Trichoderma* strains were able to provide increases in the relative chlorophyll content in the leaves and in the number of nodules in common bean roots. Among the healthy plants, the incorporation of the fungal isolates allowed increases in the number of germinated seeds, number of nodules, height of plants and relative chlorophyll content. The *Trichoderma* strains tested have the potential to promote bean growth, specially LU827, LU618, LU820 and LU640, but not to control *S. sclerotiorum*.

Keywords: White mold, biological control, beneficial fungi

INTRODUÇÃO

Por ser rico em proteínas e vários nutrientes, o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos principais componentes da alimentação humana em todo o mundo (MERTZ et al., 2007). No entanto, várias doenças afetam esta cultura, ocasionando prejuízos na qualidade das sementes, dentre as quais, destaca-se o mofo branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, responsável por danos expressivos, podendo ocasionar perdas de até 100% (BOTELHO et al., 2013). Distribuído mundialmente, *S. sclerotiorum* afeta mais de 408 espécies de plantas, incluindo espécies de importância econômica, tais como soja, girassol, canola, ervilha, alfafa, fumo, tomate, batata e ornamentais (AGRIOS, 2005; IBARRA-MEDINA et al., 2010; JULLIATTI et al., 2013).

Os propágulos de *S. sclerotiorum* são disseminados, principalmente, através de sementes infectadas, e sobrevivem no solo por meio de escleródios, possibilitando o aumento da infestação a cada plantio da espécie hospedeira. Sob condições ambientais favoráveis e na presença do hospedeiro suscetível, os escleródios germinam e produzem um micélio cotonoso de coloração branca, que coloniza os tecidos da base da planta (SCHWATZ et al., 2012).

Pode haver também a formação de apotécios, que emergem no solo e liberam os ascósporos. Após a germinação, ocorre a colonização de materiais vegetais mortos ou em senescência, como flores senescentes, utilizando-os como fonte primária de nutrientes. Após a atividade saprofítica, o fungo penetra em tecidos vegetais saudáveis e intactos, ocasionando as típicas podridões, crescimento do micélio, e formação de escleródios. A doença progride com as lesões em folhas, caules, ramos e vagens, ocasionando em muitas vezes, a morte da planta (SCHWATZ et al., 2012; KAWASAKI & MACHADO, 2013).

Como *S. sclerotiorum* é um fungo que sobrevive no solo e incide sobre várias espécies vegetais, é de fundamental importância realizar a rotação de culturas com espécies não hospedeiras. Outras medidas de manejo dessa doença envolvem a utilização de sementes saudáveis e tratadas com fungicidas adequados; plantio de variedades resistentes e com arquitetura que favoreça boa aeração entre as plantas e com menor período de florescimento; formação de palhada para cobertura uniforme do solo, preferencialmente oriunda de

gramíneas; espaçamento das plantas adequado às cultivares; limpeza de máquinas e equipamentos após utilização em área infestada para evitar a disseminação de escleródios; utilização adequada de fertilizantes, principalmente o nitrogenados; e o emprego de controle químico, por meio de pulverizações foliares, antes e durante o período de maior suscetibilidade das plantas (MEYER et al., 2014; BIANCHINI et al., 2005; AGRIOS, 2005).

O emprego do controle biológico, por meio da propagação de agentes antagonistas tem sido bastante estudado, por interferir no patossistema *S. sclerotiorum* – feijoeiro (AGRIOS, 2005) e por ser uma alternativa sustentável à utilização de fungicidas (DA SILVA et al., 2017). Atualmente, existem fungicidas biológicos formulados à partir de micro-organismos, registrados para o manejo de *S. sclerotiorum* em feijoeiros, como por exemplo o fungicida Seranade composto por *Bacillus subtilis* linhagem QST713 (ZENG et al., 2012) e o fungicida Ecotrich®WP composto por *Trichoderma harzianum* (DA SILVA et al., 2017).

A utilização de micro-organismos benéficos, principalmente os pertencentes ao gênero *Trichoderma*, tem se mostrado promissor para o controle de *S. sclerotiorum* (BARBOSA et al., 2012). Durante a interação entre o patógeno e o hospedeiro, *Trichoderma* spp. podem interromper alguns estágios da doença ou do ciclo de vida do patógeno, por meio de mecanismos tais como antibiose, micoparasitismo, competição por sítios de infecção e nutrientes, produção de enzimas e indução de respostas de defesa, ou a combinação destes mecanismos (STROBEL, 2006). Isolados de *Trichoderma* podem colonizar e destruir escleródios de *S. sclerotiorum* (MASTOURI et al., 2010; SHORESH et al., 2010; CARVALHO et al., 2011; ZANCAN et al., 2012).

Além de atuar no controle de doenças, *Trichoderma* spp. têm a capacidade de estimular o crescimento das plantas, devido à colonização rizosférica, à produção de substâncias que estimulam o crescimento de plantas, à decomposição de resíduos vegetais e à solubilização de nutrientes próximos às raízes (MASTOURI et al., 2010; DRUZHININA et al., 2011).

A utilização desses micro-organismos no cultivo de espécies vegetais tem grande importância, tais como, diminuir o período de permanência das mudas nos viveiros, aumentar a produtividade e produção das plantas e

melhorar o vigor das plantas sob estresses bióticos e/ou abióticos. Além disso, a atual tendência de busca por sistemas agrícolas ecologicamente equilibrados tem incentivado o estudo de alternativas para o manejo de doenças de plantas sem a utilização de defensivos agrícolas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle do mofo branco e promoção de crescimento de feijoeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Para testar o potencial de isolados de *Trichoderma* pertencentes à coleção de culturas do Laboratório Bio-Protection Research Centre, Nova Zelândia, em promover o crescimento de feijoeiros e controlar *S. sclerotiorum*, os experimentos foram instalados no Laboratório Bio-Protection Research Centre e em casa de vegetação do campus experimental da Universidade de Lincoln, Nova Zelândia (43.6401° S, 172.4842° E), entre os meses de janeiro e abril de 2016, quando as temperaturas variaram entre 10°C (mínima) e 21°C (máxima).

Os isolados de *Trichoderma* codificados como: LU1308, LU827, LU820, LU640, LU1540, LU618, LU132, LU594 e HRE342, conservados pelo método de congelamento a temperatura de -20° C em glicerol, foram multiplicados por repicagens sucessivas em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA). Os escleródios e micélio de *S. sclerotiorum* foram obtidos à partir de placas de Petri contendo BDA e estruturas do micro-organismo.

1.1 Efeito de metabólitos não-voláteis no crescimento de *S. sclerotiorum*

Placas de Petri contendo BDA foram cobertas assepticamente com discos de papel celofane poroso estéril, largo o suficiente para cobrir o centro e as laterais das placas. Posteriormente, no centro dessa placa, foi depositado um disco de BDA contendo micélio e esporos de *Trichoderma* sp., crescidos por sete dias. Para permitir a produção de metabólitos não-voláteis, as placas foram incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D. à 25 °C por 48h, quando o celofane foi removido com a colônia fúngica.

Discos de BDA contendo micélio e escleródios de *S. sclerotiorum* foram removidos da borda de colônias crescidas por sete dias e transferidas para o

centro das placas contendo os metabólitos não-voláteis de *Trichoderma* spp. As placas contendo o patógeno e o antagonista foram incubadas a 25°C em BOD durante cinco dias. Posteriormente, foram observados e mensurados o crescimento das colônias do patógeno. O tratamento controle foi composto pela incubação do papel poroso celofane com o patógeno e sem a presença do antagonista.

O teste foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 10 repetições.

1.2 Efeito de metabólitos voláteis no crescimento de *S. sclerotiorum*

O experimento de produção de metabólitos voláteis foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Dick & Hutchinson (1966). Um disco de BDA de 0,8 cm de diâmetro contendo micélio e esporos de *Trichoderma* sp., crescido por sete dias, foi colocado no centro de uma placa de Petri contendo BDA. E no centro de outra placa contendo BDA, inoculou-se um disco de BDA do mesmo tamanho contendo micélio de *S. sclerotiorum*, crescidos por sete dias. O fundo de ambas as placas foram sobrepostos invertidos e selados com plástico filme.

As placas foram incubadas a 25°C durante sete dias, quando ocorreu a avaliação, por meio da mensuração do diâmetro da colônia. O tratamento controle foi composto pelo crescimento de *S. sclerotiorum* na ausência de *Trichoderma* spp.

O teste foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 10 repetições.

1.3 Efeito da temperatura no crescimento de *S. sclerotiorum* durante o teste de confronto direto

Em cada placa de Petri contendo BDA, foi disposto um disco contendo micélio de *S. sclerotiorum* à 0,5 cm da extremidade da placa, e incubado por 48 horas. Após esse período, um disco de BDA contendo micélio de *Trichoderma* sp. foi depositado no lado oposto ao disco de micélio de *S. sclerotiorum* na placa e esta foi incubada em câmaras de crescimento com fotoperíodo de 12 horas nas temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30 °C.

Após sete dias, os valores de crescimento micelial do patógeno foram obtidos e adicionalmente, procedeu-se a classificação quanto à capacidade de antagonismo segundo a escala de Bell et al. (1982):

1 = antagonista cresce em toda a placa de Petri;

2 = antagonista cresce em 2/3 da placa;

3 = antagonista e patógeno crescem na mesma proporção na placa;

4 = patógeno cresce em 2/3 da placa;

5 = patógeno cresce em toda a placa de Petri.

O teste foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 10 repetições.

1.4 Biocontrole de *S. sclerotiorum* em feijoeiro sob condições de casa de vegetação

Discos de BDA, contendo micélio e escleródios de *S. sclerotiorum* foram transferidos para arroz parbolizado hidratado e autoclavado (1 kg de arroz: 600 ml de água), e foram incubados em câmaras de crescimento por 15 dias na ausência de luz. Posteriormente, as unidades formadoras de colônias (UFC) de *S. sclerotiorum* presentes no arroz foram determinadas por meio da diluição seriada em solução salina 0,85% estéril, sendo encontrados $1,56 \times 10^6$ UFC/ g arroz colonizado.

As suspensões de isolados de *Trichoderma* foram obtidas à partir da lavagem das colônias nas placas de Petri contendo esporos e micélio crescidos por 15 dias. Posteriormente, as concentrações de esporos foram determinadas por diluição em solução salina estéril (0,85% NaCl) e visualizadas em câmara de Newbauer e calibradas para 1×10^{-6} esporos/ml.

Vasos de plásticos foram preenchidos com 1 l de substrato, composto por 80% composted bark e 20% pumice (grade 1-7mm), e foram incorporados 20 g de arroz colonizado por *S. sclerotiorum*, nos tratamentos com o patógeno.

Após quatro dias, 5 ml da suspensão de isolados de *Trichoderma* (1×10^{-6} esporos/ml) foram adicionados e cinco sementes de feijão foram semeadas em cada vaso.

Oito dias após a semeadura, foram contabilizados o número de sementes germinadas. Trinta dias após a semeadura, todas as plantas foram avaliadas

em relação ao número de plantas vivas, altura das plantas, teor relativo de clorofila, número de nódulos nas raízes, e massa seca das raízes e da parte aérea.

O teor relativo de clorofila foi obtido utilizando um clorofilômetro SPAD (Soil Plant Analysis Development). Em cada planta, foi selecionado o terceiro par de folhas e as leituras foram feitas em três pontos a cada lado da nervura central da folha, na face adaxial da folha.

O teste foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 25 repetições. Todos os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de média de Scott-Knott a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito de metabólitos voláteis e não-voláteis no crescimento de *S. sclerotiorum*

Os metabólitos não-voláteis produzidos pelos isolados de *Trichoderma* foram capazes de reduzir o crescimento de *S. sclerotiorum*, exceto, os metabólitos não-voláteis produzidos pelos isolados codificados como HRE342 e LU1540. Os melhores resultados foram obtidos com isolados de *Trichoderma* LU132, LU640, LU1308 e LU594, os quais apresentaram capacidade de reduzir o crescimento de *S. sclerotiorum* em até 90% em relação ao tratamento controle ($P < 0.001$), e aos sete dias já colonizava 100% da placa (Figura 1). Os metabólitos voláteis produzidos pelos isolados de *Trichoderma* sp. LU132 e LU1308 foram capazes de reduzir o crescimento de *S. sclerotiorum* ($P < 0.001$), em 35% e 50%, respectivamente, em relação ao tratamento controle (Figura 1).

Os resultados mostram que os metabólitos produzidos por esses isolados são tóxicos a *S. sclerotiorum*. Muitas espécies fúngicas pertencentes ao gênero *Trichoderma* são conhecidas como produtoras de diversos metabólitos secundários, voláteis e não voláteis, como ácido harziânico, alameticinas e tricolinas, com amplo espectro de atividade antimicrobiana (BOMFIM et al., 2010; SILVA et al., 2017).

De acordo com Louzada et al. (2016), micro-organismos com capacidade para produzirem metabólitos não-voláteis nem sempre produzem metabólitos

voláteis, o que explica as diferenças encontradas no presente estudo para os isolados LU640 e LU594 quanto a esses testes. No entanto, os antagonistas LU132 e LU1308 se destacaram tanto por produzirem metabólitos voláteis como não-voláteis. De acordo com esses autores, é de grande importância ter conhecimento dos mecanismos de ação e selecionar isolados capazes de atuar por mais de um mecanismo.

No entanto, a ação de biocontrole encontrada sob condições controladas podem se distinguir daquela encontrada em campo, devido a fatores como temperatura, umidade e condições nutricionais. Soma-se a isso, a possibilidade de a ação antagonista ser resultado de mais de um mecanismo agindo simultaneamente (DELAGADO, 2010; BOTELHO et al. 2013).

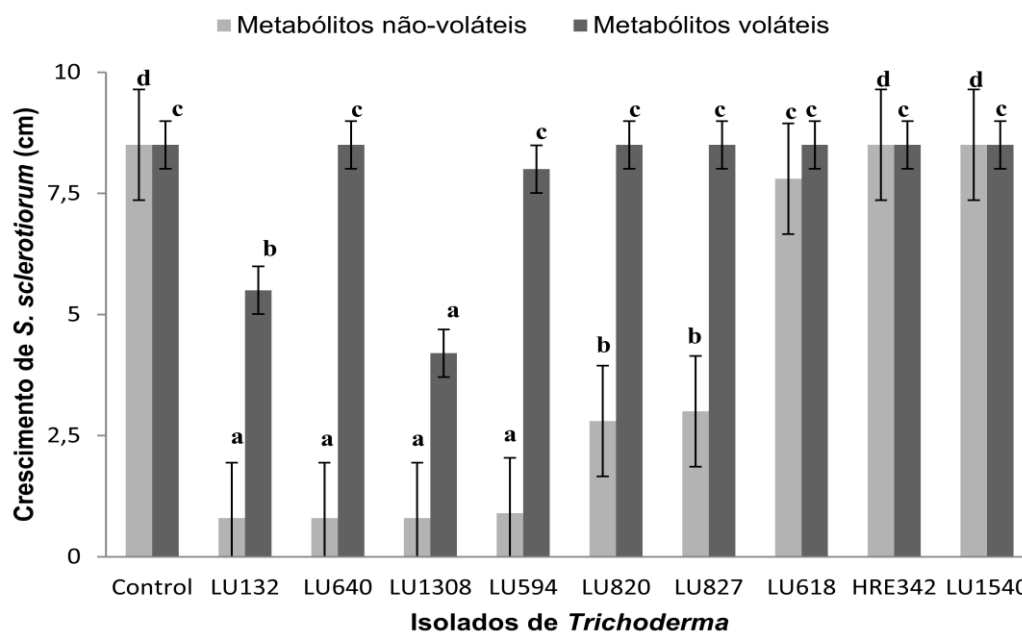


Figura 1. Crescimento de *S. sclerotiorum* submetido à metabólitos voláteis e não-voláteis produzidos por isolados de *Trichoderma*. Diferentes letras indicam diferença estatisticamente entre os tratamentos (Scott-Knott < 0.05). Barras de erro representam os erros padrões (n=10)

Efeito da temperatura no crescimento de *S. sclerotiorum* durante o teste de confronto direto

Observou-se redução do crescimento das colônias de *S. sclerotiorum* pareadas com os isolados de *Trichoderma* quando comparados com o

tratamento controle nas diferentes temperaturas ($P < 0.001$), com exceção dos isolados HRE342 (nas temperaturas de 15°C e 30°C), LU827 e LU1540 (ambos na temperatura de 30°C) (Tabela 1). Com apenas sete dias de incubação, os antagonistas já inibiram o desenvolvimento de *S. sclerotiorum*, evidenciando a produção de metabólitos antibióticos que inibem o crescimento do patógeno.

De acordo com a classificação proposta por Bell et al. (1982), os melhores resultados obtidos no presente se encontraram na categoria 3, quando os isolados *Trichoderma* e *S. sclerotiorum* cresceram na mesma proporção na placa. Esse resultado foi observado com os isolados LU820 e LU640 na temperatura de 25°C, LU594 e LU618 na temperatura de 30°C e LU132 nas temperaturas de 25 e 30°C (Tabela 1).

Foi observado que a melhor faixa de temperatura para os isolados de *Trichoderma* spp. crescerem e inibirem o crescimento de *S. sclerotiorum* encontra-se entre 25° e 30°C. Os resultados sugerem diversidade na ação dos isolados de *Trichoderma* no antagonismo contra o *S. sclerotiorum* e a temperatura apresenta influência marcante nesse processo. De acordo com Clarkson et al. (2014), em condições de alta umidade e temperaturas amenas, os danos ocasionados por *S. sclerotiorum* podem ser superiores a 50%, principalmente em viveiros de mudas, onde ocasionam o tombamento de plântulas.

Durante o teste de confronto, foi observada uma progressiva zona de inibição entre as colônias de *S. sclerotiorum* e de *Trichoderma* spp. Posteriormente, houve a formação de uma zona de coloração amarelo-alaranjada, como resultado da invasão do micélio de *S. sclerotiorum*. Possivelmente, a formação do halo de inibição impediu o crescimento do patógeno devido à produção de metabólitos. Nesse trabalho, não houve a formação de escleródios do patógeno.

A inibição do crescimento de *S. sclerotiorum* pode ser atribuída a ação de enzimas como quitinase, protease e celulase, produzidas pelo antagonista (EZZIYYANI et al., 2004) ou pode se relacionar à competição por recursos disponíveis no meio de cultura (CARVALHO et al., 2014).

Tabela 1. Crescimento de *S. sclerotiorum*, em diâmetro (D), em teste de confronto direto com isolados de *Trichoderma* em diferentes temperaturas.

Tratamentos	Temperaturas									
	10 °C		15 °C		20 °C		25 °C		30 °C	
	D (cm)	Classificação**	D (cm)	Classificação	D (cm)	Classificação	D (cm)	Classificação	D (cm)	Classificação
Controle	8,5 c*	5	8,5 c	5	8,5 d	5	8,5 d	5	6,5 c	4
LU820	6,0 a	4	5,9 a	4	6,0 a	4	4,7 a	3	6,0 c	4
LU594	6,3 a	4	6,2 b	4	6,0 a	4	5,1 b	4	4,8 a	3
LU827	6,3 a	4	5,4 a	4	6,3 b	4	6,7 c	4	6,1 c	4
HRE342	6,4 a	4	8,5 c	5	7,6 c	5	6,6 c	4	6,1 c	4
LU618	6,5 a	4	6,4 b	4	6,6 b	4	6,5 c	4	4,4 a	3
LU1308	6,6 b	4	5,7 a	4	6,0 a	4	5,4 b	4	5,1 b	4
LU132	6,7 b	4	5,7 a	4	5,8 a	4	4,0 a	3	4,8 a	3
LU1540	7,0 b	5	6,1 b	4	5,7 a	4	5,6 b	4	5,9 c	4
LU640	7,0 b	5	6,4 b	4	6,4 b	4	4,3 a	3	5,3 b	4

*Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si; **Classificação de acordo com a escala descrita por Bell et al. (1982): 1 = antagonista cresce em toda a placa de Petri; 2 = antagonista cresce em 2/3 da placa; 3 = antagonista e patógeno crescem na mesma proporção na placa; 4 = patógeno cresce em 2/3 da placa; 5 = patógeno cresce em toda a placa de Petri.

Controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoeiros

O agente causal do mofo-branco foi muito agressivo, reduzindo drasticamente o número de sementes germinadas (16%), número de plantas vivas (37%), número de nódulos por grama de raiz fresca (63%), massa seca da parte aérea (30%), altura das plantas (5%) e teor relativo de clorofila nas folhas das plantas de feijão (9%), em relação ao tratamento controle positivo, em que as plantas não receberam nenhum tipo de tratamento (Figura 2). Esses resultados confirmam que a presença do patógeno é prejudicial ao desenvolvimento do feijoeiro.



Figura 2. Feijoeiros saudáveis (T1) e inoculado com *S. sclerotiorum* (T2) após 30 dias de cultivo.

O tratamento das plantas com os isolados de *Trichoderma* não foram capazes de inibir o desenvolvimento do mofo branco nos feijoeiros, ocasionando efeito positivo apenas no teor relativo de clorofila nas folhas e no número de nódulos nas raízes dos feijoeiros sobreviventes. Os resultados obtidos nesse estudo confirmam com a discussão de Delgado (2010), pois a atividade

biocontroladora encontrada sob condições controladas se distinguiu daquelas encontradas em condições de cultivo, devido a fatores como temperatura, umidade e condições nutricionais.

Na presença de *S. sclerotiorum*, os isolados de *Trichoderma* LU594, LU820, LU1540, HRE342 e LU640 foram capazes de proporcionar incrementos no teor relativo de clorofila nas folhas das plantas variando entre 3% e 8%, em relação ao tratamento controle negativo, quando as plantas foram inoculadas com *S. sclerotiorum* e não foram tratadas com *Trichoderma* spp., mas, não diferiram do controle positivo, quando as plantas não foram inoculadas com *S. sclerotiorum* e nem tratadas com *Trichoderma* spp. (Figura 3).

O que presume afirmar que *S. sclerotiorum* não afetou a absorção de nutrientes pelos feijoeiros sobreviventes e tratados com tais isolados, pois o teor de clorofila nas folhas é utilizado para prever o teor de nitrogênio nas plantas, devido ao fato de a quantidade desse pigmento correlacionar-se positivamente com o de N na planta (LEONARDO et al., 2013).

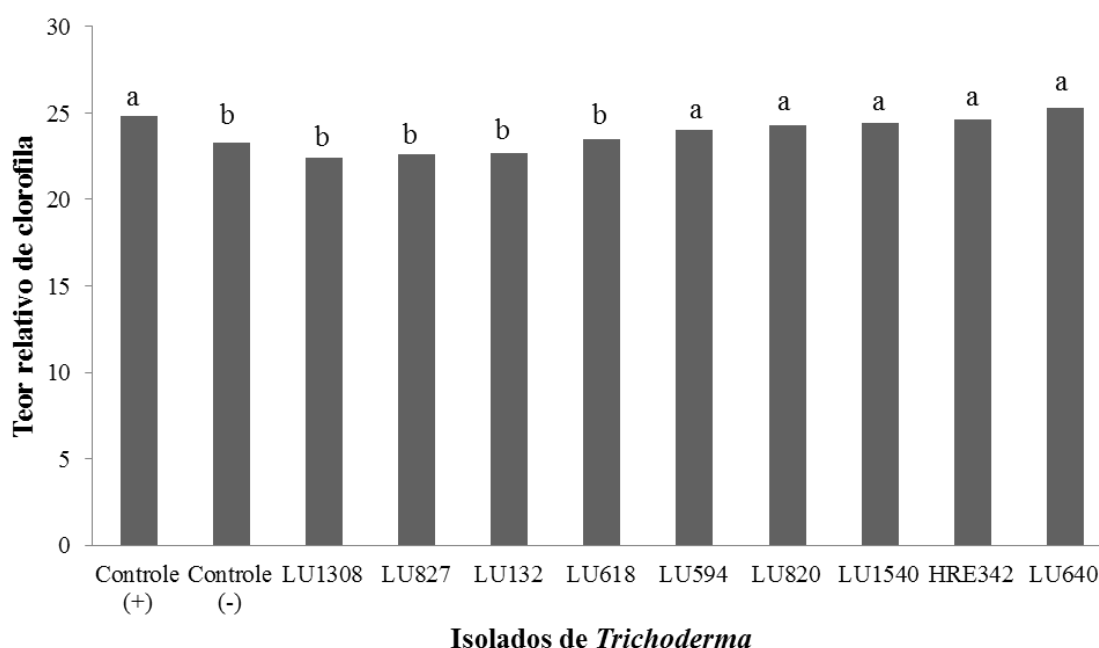


Figura 3. Teor relativo de clorofila em folhas de feijoeiro inoculadas com *S. sclerotiorum* e tratadas com isolados de *Trichoderma* após 30 dias de cultivo.

Apenas o tratamento com o isolado LU827 diferiu estatisticamente dos demais tratamentos em relação ao número de nódulos por grama de raízes fresca

de feijoeiros inoculados com *S. sclerotiorum*, pois, possibilitou incremento de 18% no número de nódulos, em relação ao tratamento controle, sem a presença de *Trichoderma* spp. (Figura 4).

Resultados semelhantes foram encontrados por Ogut et al. (2005), onde observaram aumento da massa e número de nódulos nas plantas de feijão quando inoculados com um isolado de *T. harzianum*.

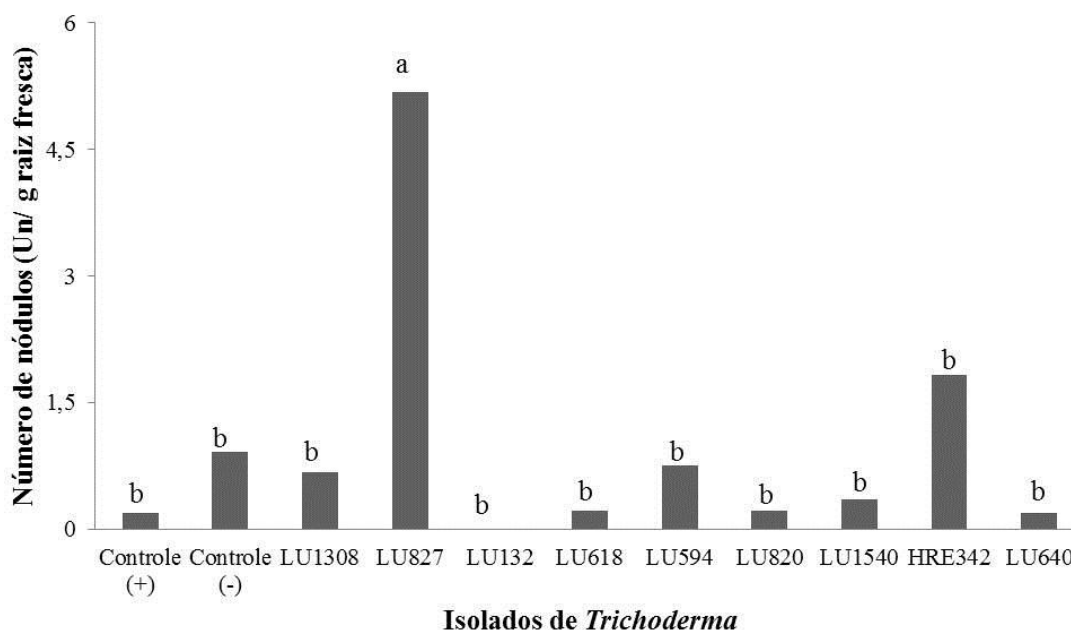


Figura 4. Número de nódulos por grama de raízes fresca de feijoeiros inoculadas com *S. sclerotiorum* e tratados com isolados de *Trichoderma* após 30 dias de cultivo.

Promoção de crescimento de feijoeiro

A incorporação dos isolados fúngicos possibilitou aumentos no número de sementes germinadas, no número de nódulos por grama de raízes fresca, na altura de plantas e no teor relativo de clorofila ($P < 0.001$).

Os isolados LU827, LU132, LU618, LU820 e LU640 possibilitaram que maior número de sementes germinassem. Das cinco sementes semeadas, esses isolados possibilitaram que, em média, quatro sementes germinassem, enquanto o tratamento controle, sem a utilização de *Trichoderma* spp., em média, apenas três sementes germinaram (Figura 5).

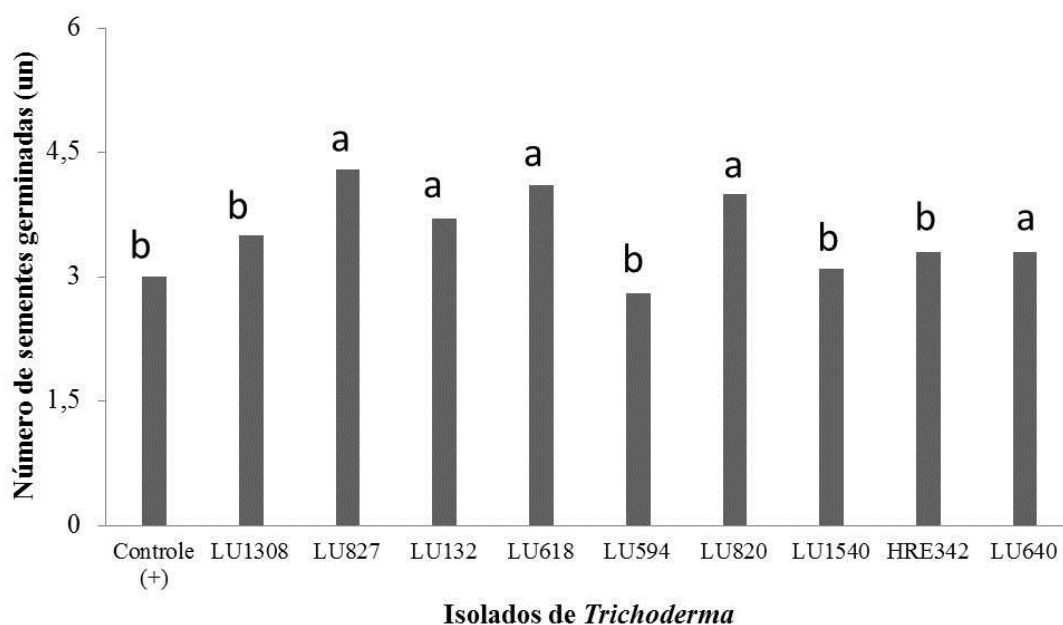


Figura 5. Número de sementes de feijoeiros germinadas, tratados com *Trichoderma* spp. após 30 dias da sementeira.

As plantas tratadas com os isolados LU132, LU594 e HRE342 apresentaram alturas inferiores ao tratamento controle e os demais tratamentos (Figura 6).

O tratamento de feijoeiros com *Trichoderma* pode promover o desenvolvimento das plantas, incluindo os efeitos benéficos na germinação das sementes, emergência e desenvolvimento das plântulas (CHAGAS JUNIOR et al., 2014).

Os isolados de *Trichoderma* codificados como LU1308, LU827, LU132 e LU820 favoreceram maior nodulação nas raízes do feijoeiro, em relação ao tratamento controle. O isolado LU132 proporcionou incrementos de em média, 5,8 unidades de nódulos nas raízes das plantas (Figura 7).

O fato de as leguminosas fixarem o nitrogênio, por meio da simbiose com bactérias, garante melhor desenvolvimento das plantas, contribuindo para redução do uso de fertilizantes nos cultivos. Assim, a associação de rizóbio e *Trichoderma* pode exercer ação mais eficiente contra patógenos da rizosfera e como promotor de crescimento vegetal (CHAGAS JUNIOR et al., 2010).

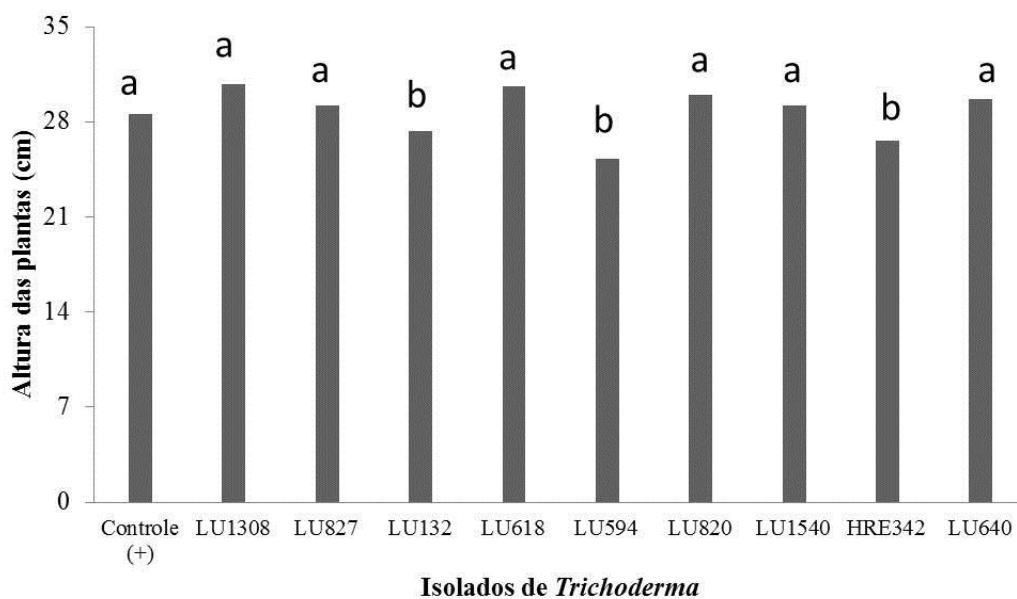


Figura 6. Altura de feijoeiros tratados com *Trichoderma* spp. após 30 dias de cultivo.

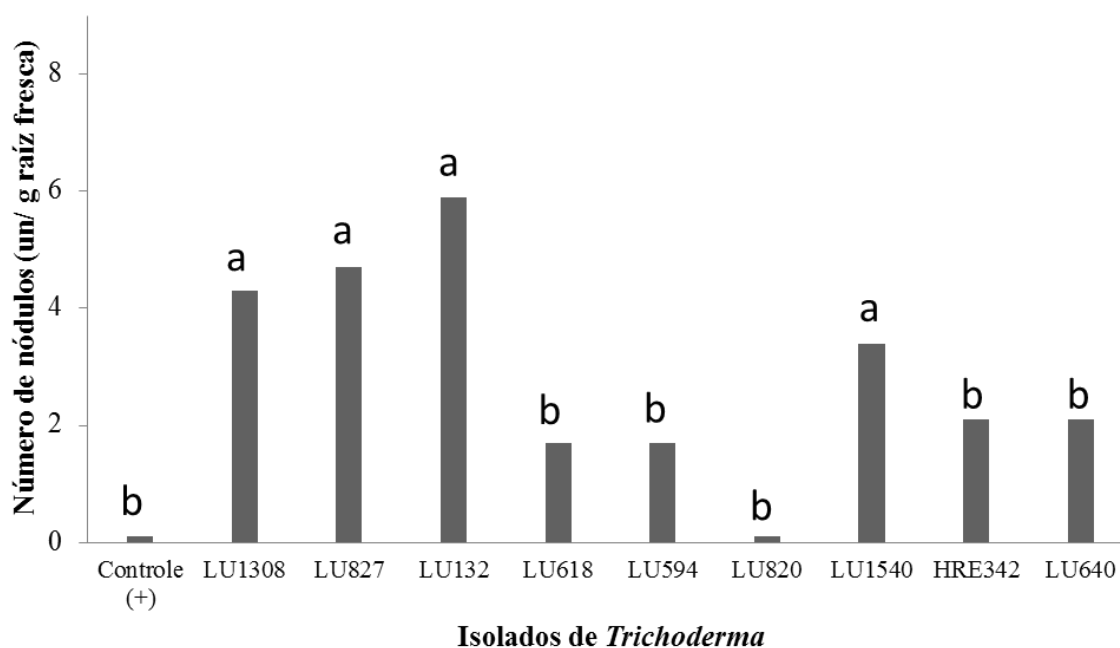


Figura 7. Número de nódulos em raízes de feijoeiros tratados com *Trichoderma* spp. após 30 dias de cultivo.

Para a variável teor relativo de clorofila nas folhas, as plantas tratadas com os isolados LU618, LU594, LU820, HRE342 se destacaram em relação aos

demaís tratamentos. Foi observado incrementos em até 10% (LU820) no teor de clorofila nas folhas de feijão, em relação ao tratamento controle (Figura 8). De acordo com Vargas et al. (2009), os exudados liberados pelas raízes das plantas são importantes fontes de nutrientes para *Trichoderma*, facilitando a colonização radicular e, posteriormente, incrementam a taxa de fotossintética das plantas.

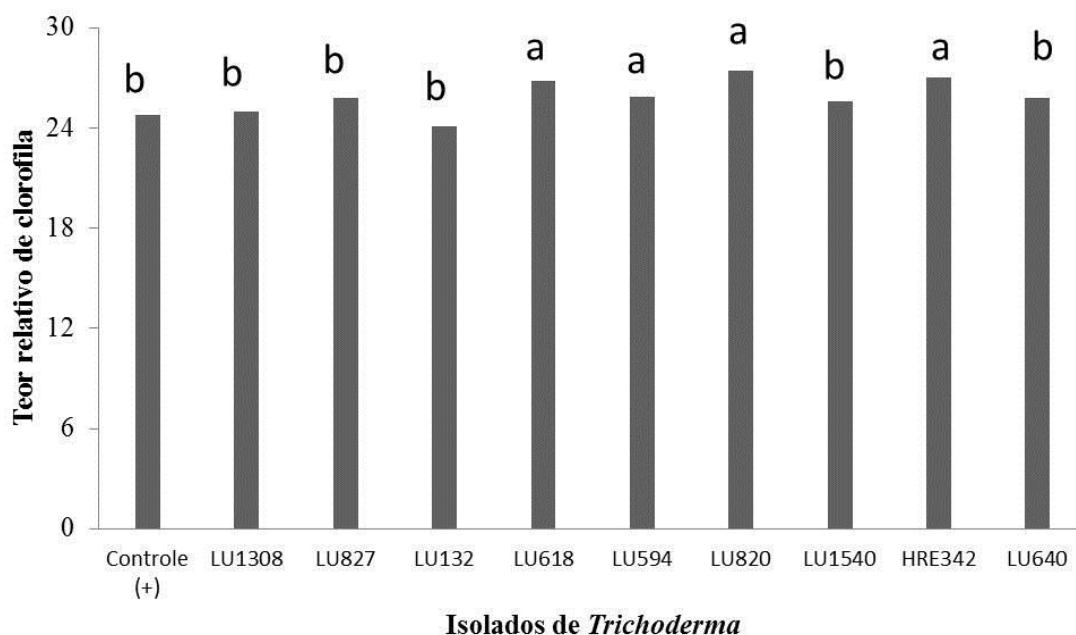


Figura 8. Teor relativo de clorofila em folhas de feijoeiros tratados com *Trichoderma* spp. após 30 dias de cultivo.

Levando em consideração os dados de porcentagem de sementes germinadas e a altura das plantas, observa-se que os isolados *Trichoderma* spp. LU827, LU618, LU820 e LU640 se destacaram diante os demais tratamentos, por permitirem um maior estande final de plantas e com melhor vigor.

Stewart e Hill (2014) relatam que a promoção de crescimento induzida por fungos do gênero *Trichoderma* tem sido observado em um grande número de espécies de plantas, incluindo vegetais, cultiváveis, ornamentais e selvagens. Yobo et al. (2011) observaram que *Trichoderma atroviride* foi capaz de incrementar a biomassa seca de plantas de feijão em 2%.

CONCLUSÕES

Sclerotinia sclerotiorum tem a capacidade de diminuir drasticamente o estande inicial de feijoeiros em condições controladas de casa de vegetação, além de prejudicar o crescimento das plantas sobreviventes. Os isolados de *Trichoderma* testados têm potencialidade em promover o crescimento de feijoeiros, com destaque para os isolados LU827, LU618, LU820 e LU640. E, apesar de reduzirem o crescimento de *S. sclerotiorum* em condições controladas, os isolados de *Trichoderma* não demonstraram capacidade de controlar *S. sclerotiorum* em feijoeiros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Fitopatologia**. Second edition. Editorial Limusa, México, D. F. pp. 448-452, 2005.
- BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. O. (Ed.). **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2012. (Documentos, 272)
- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v.72, n. 4, p.379-382, 1982.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. v. 2, cap. 37, p. 333-349, 2005.
- BOMFIM, M. P.; SÃO JOSPE, A. R.; REBOUÇAS, T. N. H.; ALMEIDA, S. S.; SOUZA, I. V. B.; DIAS, N. O. Avaliação antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.1, p.61-67, 2010.

BOTELHO, L. S.; ZANCAN, W. L. A.; MACHADO, J. C.; BARROCAS, E. N. Performance of common bean seeds infected by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal Seed Science**, v. 35, p. 153-160, 2013.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, A. G.; REIS, H. B.; SANTOS, G. R.; CHAGAS, L. F. B.; MILLER, L. O. Eficiência da inoculação combinada de rizóbio e *Trichoderma* spp. em diferentes cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) no cerrado (Savana Brasileira). **Revista de Ciências Agrárias**, v.37, n.1, 2014.

CLARKSON, J. P.; FAWCETT, L.; ANTHONY, S. G.; YOUNG, C. A model for *Sclerotinia sclerotiorum* infection and disease development in lettuce, based on the effects of temperature, relative humidity and ascospore density. **Plos One**, v. 4, n. 9, p. 1-12, 2014.

CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JUNIOR, M.; GERALDINE, A. M. Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.822-828, 2011.

CARVALHO, D. D. C.; LOBO JUNIOR, M.; MARTINS, I.; INGLIS, P. W.; MELLO, S. C. M. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, p. 384-391, 2014.

DELAGADO, G. V. **Inibição do crescimento de *Sclerotinia* por *Trichoderma* spp. *in vitro***, 2010.

DICK, C. M.; HUTCHINSON, S. A. Biological activity of volatile fungal metabolites. **Nature**, v. 211, p. 868, 1966.

DRUZHININA, I. S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M.; MONTE, E.; MUKHERJEE, P. K.; ZEILINGER, S.; GRIGORIEV, I. V.; KUBICEK, C. P. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Review Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 749-759, 2011.

EZZIYYANI, M.; SÁNCHEZ, C. P.; AHMED, A. S.; REQUENA, M. E.; CANDELA, M. E. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). **Anales de Biología**, v.26, p. 35-45, 2004.

IBARRA-MEDINA, V. A.; FERRERA-CERRATO, R.; ALARCÓN, A.; LARA-HERNÁNDEZ, M. E.; VALDEZ-CARRASCO, J. M. Isolation and screening of *Trichoderma* strains antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia minor*. **Revista Mexicana De Micología**, v. 31, p. 53-63, 2010.

JULIATTI, F. C.; CRATO, F. F.; JULIATTI, F. C.; COUTO, K. R.; JULIATTI, B. C. M. Escala diagramática para avaliação da severidade de mofo branco em soja. **Bioscience Journal**, v. 29, p.676-680, 2013.

KAWASAKI, V. H.; MACHADO, J. C. Establishment of a semiselective method for the detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in dry bean and soybean seeds. **Journal of Seed Science**, v.35, n.4, p.435-442, 2013.

LEONARDO, F. A. P.; PEREIRA, W. E.; SILVA, S. M.; COSTA, J. P. Teor de clorofila e índice spad no abacaxizeiro cv. vitória em função da adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 377-383, 2013.

LOUZADA, G. A. S.; BARBOSA, H. N.; CARVALHO, D. D. C.; MARTINS, I.; LOBO JUNIOR, M.; MELLO, S. C. M. Relações entre testes com metabólitos e seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 14, n.1, p. 9-14, 2016.

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

MEYER, M.C.; CAMPOS, H.D.; GODOY, C.V.; UTIAMADA, C.M. (Ed.). **Ensaios cooperativos de controle químico de mofo branco na cultura da soja: safras 2009 a 2012**. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 100 p. (Embrapa Soja. Documentos, 345).

MERTZ, L. M.; HENNING, F. A.; MAIA, M. S.; MENEGHELLO, G. E.; HENRIQUES, A.; MADAIL, R. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de feijão-miúdo beneficiados em mesa gravitacional. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.3, 2007.

OGUT, M.; AKDAĞ, C.; DÜZDEMİR, O.; SAKIN, M. A. Single and double inoculation with *Azospirillum/ Trichoderma*: the effects on dry bean and wheat. **Biology and Fertility of Soils**, v. 41, n. 4, p. 262-272, 2005.

SCHWARTZ, H. F.; HARVESON, R. M.; STEADMAN, J. R. White mold of dry beans. Published by University of Nebraska-Lincoln Extension, **Institute of Agriculture and Natural Resources**, 2012.

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

SILVA, F. F.; CASTRO, E. M.; MOREIRA, S. I.; FERREIRA, T. C.; LIMA, A. E.; ALVES, E. Emergência e análise ultraestrutural de plântulas de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* sob efeito da aplicação de *Trichoderma harzianum*. **Summa Phytopathologica**, v.43, n.1, p.41-45, 2017.

STEWART, A.; HILL, R. Applications of *Trichoderma* in Plant Growth Promotion. In: GUPTA, V. G.; SCHMOLL, M.; HERRERA-ESTRELLA, A.; UPADHYAY, R. S.; DRUZHININA, I.; TUOHY, M. **Biotechnology and Biology of Trichoderma**, 2014, p. 415–428.

STROBEL, G. Harnessing endophytes for industrial microbiology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 240–244, 2006.

YOBO, K. S.; LAING, M. D.; HUNTER, C. H. Effects of single and combined inoculations of selected *Trichoderma* and *Bacillus* isolates on growth of dry bean and biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off. **African Journal Biotechnol**, v. 10, n. 44, p. 8746–8756, 2011.

VARGAS, W. A.; MANDAWAWE, J. C.; KENERLEY, C. M. Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. **Plant Physiology**, v. 151, p. 792–808, 2009.

ZANCAN, W. L. A.; MACHADO, J. C.; SOUSA, B. F. M.; MATOS, C. S. M. Crescimento micelial, produção e germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* na presença de fungicidas químicos e *Trichoderma harzianum*. **Bioscience Journal**, v.28, n.5, p.782-789, 2012.

ZENG, W.; KIRK, W.; HAO, J. Field management of *Sclerotinia* stem rot of soybean using biological control agents. **Biological Control**, v. 60, n. 2, p. 141-147, 2012.

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS DE FEIJÃO, DE CANOLA E DE TRIGO TRATADAS COM *Trichoderma* spp. ¹

¹Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico World Journal of Microbiology & Biotechnology, em versão na língua inglesa.

Avaliação do crescimento de plantas de feijão, de canola e de trigo tratadas com *Trichoderma* spp.

Resumo: Espécies de fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* são conhecidas devido ao potencial em controlar micro-organismos patogênicos e em promover o crescimento de espécies vegetais de importância econômica. Objetivando conhecer o potencial de 25 isolados de *Trichoderma* pertencentes à coleção de micro-organismos do Laboratório Bioprotection Research Centre da Universidade de Lincoln, Nova Zelândia, conduziu-se um experimento em condições controladas de casa de vegetação em delineamento experimental inteiramente casualizado para avaliar o crescimento de plantas de feijão, canola e trigo tratadas com esses isolados. As sementes foram semeadas em substrato inoculado com *Trichoderma* spp., tendo como tratamento controle o cultivo em substrato não inoculado. Após 50 dias de cultivo, o experimento foi finalizado, avaliando-se: massa seca da parte aérea e das raízes, altura das plantas e teor relativo de clorofila nas folhas. Adicionalmente, foram avaliados o número de vagens e o número de nódulos nas raízes dos feijoeiros. Nos feijoeiros, observou-se diferença significativa entre os tratamentos para massa seca da parte aérea e das raízes, altura das plantas, número de vagens por planta e número de nódulos por grama de raízes fresca; nas plantas de canola, houve diferença entre os tratamentos para massa seca da parte aérea e altura das plantas; e nas plantas de trigo, houve diferença entre os tratamentos para massa seca das raízes e teor relativo de clorofila nas folhas. Os resultados sugerem que o tratamento das plantas com isolados de *Trichoderma* pode aumentar o crescimento das plantas de feijão, canola e trigo. Além disso, observou-se efeito diferenciado dos isolados de *Trichoderma* sobre a promoção de crescimento das plantas.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*, *Brassica napus*, *Triticum aestivum*, promoção de crescimento.

Evaluation of the growth of bean, oil seed rape and wheat plants treated with *Trichoderma* spp.

Abstract: Species of the genus *Trichoderma* are known to have potential to control pathogenic microorganisms and to promote growth of plant species of economic importance. In this study, 25 *Trichoderma* strains from the collection of microorganisms from the Bioprotection Research Center of the University of Lincoln, New Zealand, were tested in a greenhouse to evaluate the growth of bean, oil seed rape and wheat plants. The seeds were sown on substrate treated with the different *Trichoderma* spp. strains. After 50 days of cultivation, dry mass of shoot and roots, height of plants and relative chlorophyll content in the leaves were evaluated. Additionally, the number of pods and the number of nodules in the bean roots were evaluated. On beans, a significant difference was observed between treatments for shoot and root dry mass, plant height, number of pods per plant and number of nodules per gram of fresh roots; on oil seed rape, there was difference between the treatments for dry mass of the aerial part and height of the plants; and for the wheat plants, there was difference between treatments for root dry mass and relative chlorophyll content in the leaves. The results suggest that the treatment of plants with *Trichoderma* strains can increase the growth of bean, canola and wheat plants. In addition, a distinctive effect of the *Trichoderma* strains on plant growth promotion was observed.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, *Brassica napus*, *Triticum aestivum*, growth promotion.

INTRODUÇÃO

A necessidade de elevar a produtividade das culturas de importância econômica tem aumentado excessivamente a utilização de fertilizantes químicos, ocasionando diversos problemas de ordem ambiental, tais como a contaminação do solo e da água, o desequilíbrio biológico e a redução da biodiversidade do solo (BETTIOL & MORANDI, 2009; HERMOSA et al., 2012). Dentre as alternativas sustentáveis para a redução do uso de fertilizantes químicos, tem se destacado a utilização de micro-organismos benéficos que agem como biofertilizantes (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2016).

Fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* são conhecidos por colonizar a rizosfera e os tecidos radiculares e, em troca, protegem as plantas contra patógenos e promovem o seu crescimento (HARMAN, G. E., 2011; HERMOSA et al., 2012; CHAGAS JÚNIOR et al., 2014). Possivelmente, as interações que ocorrem entre *Trichoderma* e as raízes são devido à falta de resposta de defesa das plantas contra a colonização e/ou à capacidade do fungo em resistir aos metabólitos tóxicos produzidos pelas plantas (CARVALHO et al., 2011).

Trichoderma spp. têm a capacidade de reduzir a severidade das doenças por meio do controle de patógenos, utilizando mecanismos como o parasitismo, a antibiose, a competição e a indução de resistência (BETTIOL & MORANDI, 2009; VITERBO & HORWITZ, 2010). E promovem o crescimento das plantas devido à produção de metabólitos análogos aos hormônios de crescimento vegetal, tais como auxinas; melhoria da adaptação à estresses abióticos, como a falta de água e alta salinidade; solubilização de nutrientes e minerais no solo, tornando-os disponíveis às plantas; e, melhoria da arquitetura do sistema radicular, facilitando a absorção de água e nutrientes (MASTOURI et al., 2010; AZARMI et al., 2011; SAMOLSKI et al., 2012).

É de grande importância o estudo de seleção de micro-organismos com potencial biotecnológico, que possam promover o crescimento vegetal e incrementar a produtividade. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de isolados fúngicos pertencentes ao gênero *Trichoderma* em

promover o crescimento de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*), trigo (*Triticum aestivum*) e canola (*Brassica napus*).

MATERIAL E METÓDOS

Para testar o potencial de isolados de *Trichoderma* pertencentes à coleção de culturas do Laboratório Bio-Protection Research Centre, Nova Zelândia, em promover o crescimento de espécies vegetais, foram instalados três experimentos simultaneamente, com feijão (experimento 1), canola (experimento 2) e trigo (experimento 3). Os experimentos foram instalados no Laboratório Bio-Protection Research Centre e em casa de vegetação, no campus experimental da Universidade de Lincoln, Nova Zelândia (43.6401° S, 172.4842° E), entre os meses de janeiro e abril de 2016, quando as temperaturas variaram entre 10°C (mínima) e 21°C (máxima).

Os testes foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 20 repetições, utilizando isolados de *Trichoderma* codificados como: LU659, FCC327, FCC55, FCC345, FCC340, FCC237, FCC456, LU753, FCC207, FCC316, LU1328, FCC664, LU668, FCC323, FCC318, FCC14, FCC312, FCC320, FCC180, FCC734, FCC16, FCC725, FCC714, FCC358 e FCC161.

Trichoderma spp., conservados pelo método de congelamento a -20 °C em glicerol, foram mantidos por repicagens sucessivas em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e incubados em câmara de crescimento do tipo B.O.D. (Biological Oxygen Demand).

As suspensões de isolados de *Trichoderma* foram obtidas a partir da lavagem com água destilada estéril, das colônias nas placas de Petri contendo esporos e micélio crescidos por 15 dias. Posteriormente, as concentrações de esporos foram determinadas por diluição em solução salina 0,85% estéril, visualizadas em câmara de Newbauer e calibradas para 1×10^{-6} esporos/ ml.

As sementes foram desinfestadas superficialmente por meio de lavagem com detergente líquido neutro, seguido da imersão em etanol a 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 1% por 2 minutos e água destilada estéril por três vezes consecutivas.

Vasos de plásticos foram preenchidos com 1 l de substrato, composto por 80% composted bark e 20% pumice (grade 1-7mm), onde foram semeadas 5 sementes por vaso e, posteriormente, foram adicionados 5 ml da suspensão de isolados de *Trichoderma* (1×10^{-6} esporos/ ml). Os vasos que constituíram o tratamento controle receberam apenas água. As sementes de feijão, canola e trigo foram desinfestadas, semeadas e tratadas com *Trichoderma* spp. da mesma maneira.

Cinquenta dias após a semeadura, todas as plantas foram avaliadas em relação à massa seca da parte aérea e das raízes, altura das plantas e teor relativo de clorofila nas folhas. Adicionalmente, foram avaliados o número de vagens e o número de nódulo nas raízes das plantas de feijão.

O teor relativo de clorofila foi obtido utilizando um clorofilômetro SPAD (Soil Plant Analysis Development). Em cada planta, foi selecionado o terceiro par de folhas e as leituras foram feitas em três pontos a cada lado da nervura central da folha, na face adaxial da folha, obtendo-se a média.

Todos os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, com auxílio do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos feijoeiros, observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos para massa seca da parte aérea e das raízes, altura das plantas, número de vagens por planta e número de nódulos por grama de raízes fresca (Tabela 1). Apenas o teor relativo de clorofila nas folhas nos feijoeiros, não foram afetados positivamente pela inoculação de *Trichoderma* spp.

Dos 25 isolados de *Trichoderma* testados, 18 isolados promoveram incrementos a massa seca da parte aérea dos feijoeiros, quando comparados aos tratamentos com demais isolados de *Trichoderma*. E apesar de não diferir do tratamento controle (24,5 g), quando as plantas não foram tratadas com *Trichoderma* spp., o isolado FCC161 (29,2 g) se destacou entre os demais isolados em relação à incrementos à massa seca da parte aérea (Tabela 1).

Possivelmente, os feijoeiros tratados com esses isolados de *Trichoderma* foram mais hábeis em absorver e assimilar os nutrientes do solo, resultando em maior produção de fotoassimilados e melhor desenvolvimento vegetativo. Carvalho et al. (2011), trabalhando com isolados de *Trichoderma harzianum* visando o controle de patógenos veiculados por sementes de feijoeiro, a promoção do crescimento das plantas e a rizocompetência, observaram que dois isolados foram capazes de promover o crescimento das plantas de forma similar aos defensivos químicos Carboxin+Thiram e superior ao tratamento controle, sem a presença de nenhum tratamento. Aguiar et al. (2012), fazendo um estudo de seleção de isolados de *Trichoderma* para a promoção de crescimento de feijoeiro e controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, observou que três isolados de *T. viride* promoveram o crescimento das plantas em relação às plantas crescidas sob o tratamento controle, sem os isolados, em substrato esterilizado e não esterilizado. Segundo esses autores, esse resultado deve-se a capacidade dos isolados em colonizar a rizosfera dos feijoeiros.

Observa-se que os isolados que apresentaram melhores resultados para a produção de nódulos nas raízes, também se destacaram para as variáveis massa seca da parte aérea (exceto o isolado FCC55) e número de vagens (exceto o isolado FCC316), o que demonstra haver uma relação harmônica e positiva entre esses isolados fúngicos e a população de rizóbio presente (Tabela 1).

Plantas de feijão são naturalmente colonizadas por bactérias capazes de fixar o nitrogênio atmosférico e transferí-lo para a planta na forma de amônia. Este processo confere maior produtividade às leguminosas e reduz o custo de produção, por minimizar ou eliminar a utilização de adubos nitrogenados solúveis (MALAVOLTA et al., 1997; FERREIRA et al., 2011).

Tabela 1. Médias da massa seca da parte aérea (MSPA), altura das plantas (ALT), número de vagens (NV), massa seca das raízes (MSR) e número de nódulos (NN) de feijoeiros tratados com *Trichoderma* spp. após 50 dias de cultivo.

Tratamentos	MSPA (g)	ALT (cm)	NV (un)	MSR (g)	NN (un)
Controle	24,5±0,7a ⁽¹⁾⁽²⁾	43,9±9,6b	7,3±2,9a	1,2±0,5b	2,6±3,4b
LU659	12,7±1,3b	41,0±10,0b	6,8±3,0a	1,1±1,0b	1,4±1,4b
LU668	20,0±0,8 a	43,1±5,0b	6,6±3,1a	0,8±0,6b	1,1±0,9b
LU753	19,0±0,7 a	43,5±4,0b	7,0±2,7a	0,6±0,3b	2,9±3,3b
LU1328	19,9±0,9 a	42,3±7,0b	8,9±4,9a	0,8±0,6b	1,4±2,2b
FCC14	21,4±1,0a	43,7±7,0b	6,2±3,1b	0,8±0,4b	3,3±2,9b
FCC16	23,3±1,2 a	43,4±15,0b	4,1±2,8b	0,8±0,8b	3,0±4,8b
FCC55	13,9±0,9b	39,6±6,0b	6,8±3,3a	0,6±0,6b	5,9±8,4a
FCC161	29,2±1,2 a	47,4±8,0a	7,0±4,1a	1,2±0,7b	0,9±1,0b
FCC180	23,2±1,1 a	49,6±7,0a	4,7±2,7b	0,6±0,5b	0,7±1,0b
FCC207	19,1±0,7 a	42,5±7,0b	7,0±3,5a	0,7±0,6b	4,4±8,0a
FCC237	16,4±1,0b	51,5±24a	8,0±4,1a	0,8±0,5b	0,4±0,5b
FCC312	22,4±1,3 a	46,5±8,0a	7,6±2,8a	4,4±7,6a	0,7±1,0b
FCC316	19,5±1,1 a	39,5±8,0 b	6,5±3,3b	0,7±0,5b	4,5±5,2a
FCC318	21,1±1,0a	39,8±10,0 b	8,0±4,7a	0,7±0,3b	7,7±6,9a
FCC320	22,4±0,7 a	39,5±6,0b	6,2±4,5b	0,7±0,7b	0,3±0,4b
FCC323	20,7±0,8a	43,6±4,0b	6,1±3,1b	0,8±0,6b	1,1±1,1b
FCC327	13,3±1,1b	43,7±14b	5,6±4,5b	0,6±0,5b	1,2±1,4b
FCC340	16,0±1,4b	41,0±8,0b	9,8±6,3a	0,8±0,7b	0,1±0,1b
FCC345	14,8±1,2b	47,1±11,0a	8,7±3,8a	0,6±0,3b	1,0±1,4b
FCC358	26,4±1,0a	45,8±8,0a	7,0±2,4a	1,2±0,7b	1,6±2,2b
FCC456	17,5±1,0b	39,2±12,0b	4,0±4,0b	0,5±0,4b	2,9±4,7b
FCC664	19,9±1,0a	50,2±11,0a	6,1±3,3b	0,6±0,5b	2,5±3,8b
FCC714	24,8±0,6 a	41,1±6,0b	8,0±3,5a	0,7±0,4b	4,0±4,2a
FCC725	23,9±1,1 a	43,2±16,0b	5,5±4,3b	0,6±0,5b	1,5±2,3b
FCC734	23,3±1,6 a	37,0±12,0b	5,2±5,2b	0,7±0,6b	1,9±3,4b

⁽¹⁾Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ⁽²⁾ Média±erro padrão das variáveis avaliadas (n = 20).

Em relação às plantas de canola, apenas seis isolados de *Trichoderma* (LU659, FCC55, FCC320, FCC734, FCC16, FCC161) foram capazes de incrementar a massa seca da parte aérea das plantas em relação aos demais isolados, no entanto, com valores semelhantes ao controle, quando as plantas não foram tratadas (Tabela 2). As plantas inoculadas pelos isolados FCC358, FCC323, LU668, LU1328, FCC316, FCC207, LU753, FCC345, FCC327 apresentaram alturas superiores aos demais tratamentos (Tabela 2 e Figura 1).



Figura 1. Ilustração da altura de plantas de canola tratadas com isolados de *Trichoderma* e tratamento controle (água) após 50 dias de cultivo.

A canola é uma das oleaginosa mais produzida no mundo e produz grãos ricos em óleo de excelente qualidade, sendo responsável por 15% da produção de óleo vegetal comestível do mundo, embora também seja utilizada na produção de biodiesel e rações para animais (TOMM et al., 2010; MIGLIORINI et al., 2012; ESTEVEZ et al., 2014).

Maag et al. (2013), investigando o efeito de *Trichoderma atroviride* LU132 sob a promoção de crescimento e desenvolvimento de *Plutella xylostella* em plantas de canola, encontrou que esse isolado fúngico tem a capacidade de incrementar a biomassa das raízes e da parte aérea das plantas em 29% e 13%, respectivamente, em relação ao tratamento controle.

Os isolados FCC316, LU1328, FCC664, LU668, FCC312, FCC725 e FCC714 incrementaram a massa seca das raízes de trigo em relação aos demais tratamentos, com destaque para o isolado FCC714, capaz de proporcionar incrementos de 42% em relação ao tratamento controle (Tabela 2).

Dos 25 isolados de *Trichoderma* testados, 68% possibilitaram que as plantas de trigo apresentassem maior teor relativo de clorofila em suas folhas, no entanto, não diferiram do tratamento controle (Tabela 2).

Incrementos no teor de clorofila nas folhas, aumentam a capacidade fotossintética das plantas. Ou seja, o teor de clorofila das folhas se correlaciona positivamente com o rendimento das culturas (MALAVOLTA et al., 1997; VIANA & KIEHL, 2010; STEWART & HILL, 2014).

Diversos autores relatam que *Trichoderma* ocorrem naturalmente no solo, colonizam as raízes, atraídos pelos exudados radiculares, e estimulam o crescimento das plantas, com positivo efeito na produção de biomassa vegetal e produtividade da cultura (HARMAN, 2011; CONTRERAS-CORNEJO et al., 2016). A promoção de crescimento devido à presença de *Trichoderma* ocorre devido à adaptações a estresses abióticos, aumento da solubilidade dos nutrientes no solo, aumento da permeabilidade radicular, produção de compostos indutores de crescimento e controle de patógenos (AZARMI et al., 2011; MASTOURI et al., 2012; MATHYS et al., 2012; SAMOLSKI et al., 2012; CONTRERAS-CORNEJO et al., 2016).

O tratamento das plantas de feijão, canola e trigo com os isolados de *Trichoderma* resultou em promoção de crescimento. No entanto, houve efeito diferenciado dos isolados fúngicos sobre a promoção de crescimento dessas plantas, sugerindo haver um reconhecimento planta-micro-organismo específico.

Na rizosfera, os micro-organismos e as plantas emitem sinais moleculares como forma de comunicação. Alguns compostos são liberados pelas raízes, como os açúcares, que atuam como sinais químicos para atrair *Trichoderma* spp. (VARGAS et al., 2009). Por sua vez, as plantas são capazes de reconhecer os compostos microbianos específicos e ajustar sua defesa ou crescimento de acordo com o tipo de micro-organismo encontrado (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2016). Contreras-Cornejo et al. (2016) concluem que os micro-organismos que incrementam a produção de biomassa das espécies vegetais, podem ser usadas como biofertilizantes.

Tabela 2. Médias damassa seca da parte aérea (MSPA) e altura das plantas (ALT) canola e massa seca das raízes (MSR) e teor relativo de clorofila nas folhas (CLF) de plantas trigo tratadas com *Trichoderma* spp. após 50 dias de cultivo.

Tratamentos	Espécies vegetais			
	Canola		Trigo	
	MSPA (g)	ALT (cm)	MSR (g)	CLF
Controle	20,2±0,7 a ⁽¹⁾⁽²⁾	25,4±6,8b	1,1±0,3b	34,3±4,5 a
LU659	21,7±1,0a	27,5±5,4b	1,1±0,7b	37,5±4,6 a
LU668	9,7±0,7b	31,7±4,5a	1,4±0,7a	32,7±4,6b
LU753	7,8±0,8b	30,1±7,2a	1,0±0,4b	32,4±3,2b
LU1328	8,0±0,7b	30,8±4,2a	1,5±0,2a	35,4±3,0a
FCC14	7,3±0,5b	28,5±4,6b	0,9±0,3b	34,9±4,6 a
FCC16	19,0±0,6 a	25,6±5,4b	1,1±0,8b	34,1±3,0a
FCC55	19,4±0,4 a	24,8±4,9b	0,8±0,4b	33,6±5,0b
FCC161	19,6±0,6 a	27,9±6,7b	0,8±0,2b	35,5±4,5 a
FCC180	6,1±0,5b	28,0±4,9b	0,9±0,4b	34,2±5,0a
FCC207	8,0±0,5b	33,1±3,6a	0,8±0,3b	35,5±5,4 a
FCC237	6,3±0,6b	27,6±5,2b	0,6±0,1b	36,2±4,2 a
FCC312	7,1±0,7b	28,3±4,3b	1,3±0,3a	35,7±4,3 a
FCC316	8,2±0,8b	30,4±5,4a	1,2±0,4a	30,3±6,3b
FCC318	7,3±0,7b	27,3±4,8b	0,6±0,4b	33,7±4,5b
FCC320	16,6±0,7a	27,2±5,9b	0,6±0,3b	35,9±2,8 a
FCC323	8,5±0,8b	30,7±5,4a	1,0±0,1b	30,8±4,5b
FCC327	7,7±0,5b	31,4±4,5a	0,7±0,4b	37,1±5,0a
FCC340	8,0±0,6b	28,6±5,5b	0,8±0,3b	35,2±2,7 a
FCC345	8,4±0,6b	29,9±5,3a	0,8±0,3b	32,5±4,4b
FCC358	8,7±0,6b	32,4±5,8a	0,7±0,5b	36,8±7,0a
FCC456	8,3±0,9b	27,1±4,7b	0,9±0,7b	36,2±3,1 a
FCC664	10,2±0,7b	25,0±4,8b	1,4±0,4a	34,3±6,4 a
FCC714	8,1±0,8b	28,3±5,1b	1,9±0,5a	33,9±3,7 a
FCC725	8,6±0,7b	28,2±7,1b	1,4±0,3a	35,4±6,5 a
FCC734	19,6±0,5a	26,7±4,8b	0,7±0,5b	32,1±4,2b

⁽¹⁾Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ⁽²⁾ Média±erro padrão das variáveis avaliadas (n = 20).

CONCLUSÕES

Trichoderma spp. promoveram o crescimento das plantas de feijão, canola e trigo. Houve efeito diferenciado dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre a promoção de crescimento dessas plantas. Nas plantas de feijão, os isolados de *Trichoderma* spp. codificados como FCC340, LU753, FCC207, LU1328, LU668, FCC318, FCC312, FCC714, FCC358 e FCC161 se destacaram; nas plantas de canola, se destacaram os isolados codificados como LU659, FCC55, FCC320, FCC734, FCC16 e FCC161; enquanto na plantas de trigo, se destacaram os isolados LU668, LU1328, FCC312, FCC316, FCC664, FCC714 e FCC725.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A. R.; MACHADO, D. F. M.; PARANHOS, J. T.; SILVA, A. C. F. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento de mudas do feijoeiro cv. carioca e controle de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Ciência e Natura**, v. 34, n. 2, p. 47-58, 2012.

AZARMI, R.; HAJIEGHRARI, B.; GIGLOU, A. *Trichoderma* isolated on tomato seedling growth response and nutrient uptake. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 31, p. 5850–5855, 2011.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Org.). **Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009, 332 p.

CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; JÚNIOR, M. L.; GERALDINE, A. M. Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by

Trichoderma harzianum. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.46, n.8, p.822-828, 2011.

CHAGAS JÚNIOR, A. F.; OLIVEIRA, A. G.; SANTOS, G. R.; REIS, A. F. B.; CHAGAS, L. F. B. Promoção de crescimento em feijão-caupi inoculado com rizóbio e *Trichoderma* spp. no cerrado. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 3, p. 190–199, 2014.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; RODRÍGUEZ, L. M.; VAL, E. D.; LARSEN, J. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, 2016.

ESTEVEZ, R. L.; DUARTE, J. B.; CHAMBO, A. P. S.; CRUZ, M. I. F. A cultura da canola (*Brassica napus* var. oleifera). **Scientia Agraria Paranaensis**, v.13, n.1, p.1-9, 2014.

FERREIRA, D. F. SISVAR 4,6 - programa de análise estatística. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2003. 1 CD-ROM.

FERREIRA, E. P. B.; STONE, L. F.; PARTELLI, F. L.; DIDONET, A. D. Produtividade do feijoeiro comum influenciada por plantas de cobertura e sistemas de manejo do solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 7, p. 695-701, 2011.

HARMAN, G. E. Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. **New Phytologist**, v. 189, p. 647-649, 2011.

HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v. 158, p. 17–25, 2012.

MAAG, D.; KANDULA, D. R. W.; MULLER, C.; MENDOZA-MENDOZA, A.; WRATTEN, S. D.; STEWART, A.; ROSTA'S, M. *Trichoderma atroviride* LU132 promotes plant growth but not induced systemic resistance to *Plutella xylostella* in oilseed rape. **BioControl**, v. 59, n. 2, p. 241–252, 2013.

MALAVOLTA, E. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. Princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.

MASTOURI, F.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G. E. *Trichoderma harzianum* enhances antioxidant defense of tomato seedlings and resistance to water. **Deficit Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 9, 2012, p. 1264–1271.

MATHYS, J.; DE CREMER, K.; TIMMERMANS, P.; VAN KERCKHOVE, S.; LIEVENS, B.; VANHAECKE, M.; CAMMUE, B. P. A.; CONINCK, B. Genome-wide characterization of ISR induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma hamatum* T382 against *Botrytis cinerea* infection. **Frontiers in Plant Science**, 2012.

MIGLIORINI, P.; KULCZYŃKI, S. M.; SILVA, T. A.; BELLÉ, C.; KOCH, F. Efeito do tratamento químico e biológico na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de canola. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.15, p. 956-966, 2012

SAMOLSKI, I.; RINCO' N, A. M.; PINZO' N, L. M.; VITERBO, A.; MONTE, E. The qid74 gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. **Microbiology**, v. 158, p. 129– 138, 2012.

STEWART, A.; HILL, R. Applications of *Trichoderma* in plant growth promotion. In: GUPTA, V. K.; SCHMOLL, M.; HERRERA-ESTRELLA, A.; UPADHYAY, R. S.;

DRUZHININA, I.; TUOHY, M. C. Biotechnology and Biology of *Trichoderma*. **Elsevier**, p. 415-428, 2014.

TOMM, G. O.; MENDES, M. R. P.; FADONI, A. C.; CUNHA, G. R. **Efeito de épocas de semeadura sobre o desempenho de genótipos de canola de ciclo precoce e médio, em Maringá, Paraná.** Passo Fundo: Embrapa Trigo, Brasil, 13 p., 2010.

VARGAS, W. A.; MANDAWAWE, J. C.; KENERLEY, C. M. Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. **Plant Physiology**, v. 151, p. 792–808, 2009.

VIANA, E. M.; KIEHL, J. C. Doses de nitrogênio e potássio no crescimento do trigo. **Bragantia**, v. 69, n. 4, p.975-982, 2010.

VITERBO, A.; HORWITZ, B. A. Mycoparasitism. In: BORKOVICH, K.; EBBOLE, D. Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi. **American Society for Microbiology**, v. 42, p. 676–693, 2010.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os insumos agrícolas utilizados nos agrossistemas para o controle de patógenos causam diversos problemas ambientais, e a utilização de micro-organismos benéficos surge como alternativa ao uso de agrotóxicos. Alguns micro-organismos avaliados neste trabalho demonstraram capacidade de controlar patógenos e promover o crescimento de espécies vegetais de importância econômica. Este efeito de biocontrole foi obtido ao utilizar isolados de *Bacillus* spp. (capítulo 1) e de *Trichoderma* spp. (capítulo 2) no controle de *Meloidogyne incognita* em tomateiros e também ao utilizar isolados de *Trichoderma* spp. (capítulo 3) no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoeiros cultivados em casa de vegetação. Alguns isolados de *Bacillus* spp. (capítulo 1) foram capazes de incrementar o crescimento de tomateiros, e isolados de *Trichoderma* spp. também promoveram o crescimento de tomateiros (capítulo 2), de feijoeiros (capítulos 3 e 4) e de plantas de canola (capítulo 4), no entanto, não tiveram efeito positivo sobre o crescimento das plantas de trigo (capítulo 4). O uso destes micro-organismos promissores podem reduzir as perdas devido à infecção das plantas por fitopatogenos em condições de cultivo. Trabalhos em campo deverão ser realizados para confirmar e aprimorar o conhecimento gerado sobre o potencial destes micro-organismos para o controle de tais patógenos, refletindo em melhor produtividade das espécies vegetais e menor impacto ambiental e, conseqüentemente, à saúde humana. De igual importância, faz-se necessário realizar a identificação desses isolados.