



**ANTAGONISMO *in vitro* E *in vivo* DE *Trichoderma*
spp. A *Rhizopus stolonifer* EM MARACUJAZEIRO
AMARELO**

MARINÊS PEREIRA BOMFIM

2007

MARINÊS PEREIRA BOMFIM

ANTAGONISMO *in vitro* E *in vivo* DE *Trichoderma* spp. A *Rhizopus stolonifer* EM MARACUJAZEIRO AMARELO

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para a obtenção do título de Mestra.

Orientador
Prof.^o D.Sc. Abel Rebouças São José

VITÓRIA DA CONQUISTA
BAHIA-BRASIL
2007

“Sei que prosseguir a vida não seja simplesmente conhecer a marcha e ir tocando em frente, cada um de nós compõe a sua história, cada ser em si, carrega o dom de ser capaz e ser feliz”.

(Almir Sater & Renato Teixeira)

B696a Bomfim, Marinês Pereira

Antagonismo *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo/Marinês Pereira Bomfim - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Vitória da Conquista - BA, 2007.

[14], 74 f.: il.: (Collor)

Orientador: Profº. D.Sc. Abel Rebouças São José

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2007.

Referências: f. 65-74

1. Controle Biológico. 2. Podridão Floral. 3. Manejo Integrado de Praga. 4. Maracujazeiro. 5. Fitotecnia. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. II. São José, Abel Rebouças. III. T.

CDD: 632.96

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Área de Concentração em Fitotecnia
Campus de Vitória da Conquista-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: Antagonismo *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo.

Autora: Marinês Pereira Bomfim

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRA EM AGRONOMIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FITOTECNIA, pela Banca Examinadora:

Profº. Abel Rebouças São José, D. Sc. - UESB
Presidente

Pesquisador José Luiz Bezerra, D. Sc. - CEPLAC

Profº. Quelmo Silva de Novaes, D. Sc. - UESB

Data de realização: 06 de fevereiro de 2007.

Estrada do Bem-Querer, Km 4 - Caixa Postal 95 - Telefone: (77) 3424-8731 - Fax: (77) 3424-1059
Vitória da Conquista - BA - CEP: 45.083 - 900 - e-mail: mestrado.agronomia@uesb.br

AGRADECIMENTOS

É muito bom passar por uma jornada destas e ter tanto a agradecer, e querer a tantos homenagear. É muito bom dizer obrigada a tantas pessoas que, neste período de mestrado, em que se é acometido de tantos surtos de tristeza, incapacidade, euforia, incerteza, cansaço, alegrias, conseguiram se manter simplesmente presentes, ao nosso lado. Por isso, meus sinceros agradecimentos.

Ao bom Deus, pela graça de estar simplesmente viva, pela permissão de realizar um grande sonho e pela presença constante em todos os momentos da minha vida.

A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia pela oportunidade de realização do Curso de Graduação e Mestrado;

A FAPESB - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia pela concessão de bolsas de estudo Apoio Técnico e Mestrado;

Ao professor e orientador Dr. Abel Rebouças São José por ser um interlocutor paciente e generoso, disposto a oferecer estímulos e, principalmente, a percorrer novos caminhos. Por sua amizade, principalmente. Pelas conversas e conselhos, não só durante o mestrado, mas desde a época de graduação. Pela compreensão silenciosa dos momentos difíceis e de dúvidas pelos quais passei, permitindo que meu tempo interno fluísse, respeitosamente. Pela alegria de trabalharmos juntos;

A Prof^ª Dra. Tiyoko Nair Hojo Rebouças, pela oportunidade de trabalharmos juntas, pela confiança que sempre depositou em meu trabalho, pelos ensinamentos e que tanto aprendi com seus conselhos e estímulos;

A prof^ª Dra. Maria de Lourdes do Nascimento pela amizade, carinho, apoio e incentivo constante;

Ao prof Dr. Quelmo Silva de Novaes, pelas idéias e sempre disposto a ajudar;

Aos Amigos Ellen e Ronaldo, pela amizade, carinho, pelos momentos que choramos juntos e pela grande ajuda na condução deste trabalho;

Aos amigos Saulo e Márcio pelo grande apoio na condução dos experimentos em laboratório e campo;

Aos amigos da Biofábrica, Ana Paula, Farley, Marcelo, Nilma, Katiane, Daniela, Kawai e Mariana por todo apoio, convívio e pelos momentos alegres que passamos juntos;

Aos amigos Ivan e Celeste, pela ajuda no momento mais difícil da minha vida, e pela grande contribuição na minha vida profissional;

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação pela amizade e companheirismo, Odair, Obertal, Anderson, Toninho, André, Patrícia, Vitória, Urbano e José Neto, em especial aos amigos Pedro Guedes, Alexandre e Ricardo pelo carinho, amizade e incentivo nos momentos difíceis;

Aos professores dos Cursos de Graduação e Pós-Graduação pelo enriquecimento profissional;

A minha mãe Carmem (*in memoriam*), pois sei que onde estiver estará feliz por mim;

Aos meus irmãos por todo apoio e admiração aos meus estudos;

A secretária do mestrado, Angélica pela colaboração durante o curso;

Aos amigos e todos que, de alguma forma colaboraram durante o Curso e no desenvolvimento deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

BOMFIM, M. P. **Antagonismo *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo.** Vitória da Conquista - BA: UESB, 2007. 74p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia).*

Podridão mole ou podridão floral do maracujazeiro é causada pelo fungo *Rhizopus stolonifer* o qual ataca as flores recém abertas e frutinhas novas. A infecção inicia-se nas partes internas dos botões florais onde causa lesões encharcadas, cujos tecidos florais adquirem coloração pardo-escuro. Sobre as lesões, frequentemente observa-se a presença de micélio escuro e frutificação do fungo. O presente trabalho tem por objetivo estudar a potencialidade antagônica de espécies de *Trichoderma* spp. *in vitro* e *in vivo* a *Rhizopus stolonifer*. Com o intuito de avaliar a eficiência antagônica de agentes de controle biológico na podridão floral do maracujazeiro, foram realizados ensaios *in vitro* e *in vivo* com as espécies: *Trichoderma viride*, *T. virens*, *T. harzianum* e *T. stromaticum*, na Biofábrica da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* de Vitória da Conquista - BA, e em propriedade agrícola no município de Eunápolis - BA. Nos testes *in vitro* foram avaliados os crescimentos miceliais do fitopatógeno e antagonistas nas temperaturas 10°C, 15°C, 20°C, 25°C e 30°C. Avaliou-se também o crescimento micelial em 24h e 48h, para verificar a taxa de crescimento dos isolados. Para a inibição do crescimento micelial do fitopatógeno foi realizado o pareamento de culturas, avaliando a potencialidade dos antagonistas e a produção de metabólitos voláteis e não voláteis. Em campo, os antagonistas foram avaliados quanto a sua capacidade de prevenir a infecção por *Rhizopus stolonifer* sendo avaliado o número médio de frutos efetivos aos 15 e 30 dias após aplicação dos antagonistas. Através dos resultados obtidos pôde-se observar que as melhores temperaturas para o crescimento dos antagonistas e fitopatógeno foram de 25°C e 30°C, para todos os isolados. Nos períodos de incubação de 24 e 48h, foram constatadas diferenças significativas no crescimento micelial entre os isolados de *Trichoderma* spp. Com relação a *R. stolonifer*, os antagonistas apresentaram velocidade de crescimento significativamente maior que o fitopatógeno. Em cultura pareada todos os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram rápido crescimento micelial, impedindo o desenvolvimento do fitopatógeno. O mecanismo antagônico envolve a produção de metabólitos voláteis e não voláteis de ação antifúngica ao *R. stolonifer*. No teste em campo houve efeito significativo nos tratamentos,

* Orientador: Abel Rebouças São José, D. Sc. – UESB

verificando maior vingamento entre os antagonistas em estudo cujos percentuais de pegamento foram 74% para os tratamentos T3 - *Trichoderma harzianum* e T5 - *T. virens*, e os tratamentos T2 - *T. viride* e T4 - *T. stromaticum* obtiveram um percentual de 75% já a testemunha obteve um menor percentual (42%).

Palavras-chave: Controle Biológico. Podridão Floral. Manejo Integrado de Praga.

ABSTRACT

BOMFIM, M. P. *In vitro* and *in vivo* antagonism of *Trichoderma* spp. to *Rhizopus stolonifer* in yellow passion fruit plant. Vitória da Conquista - BA: UESB, 2007. 74p. (Dissertation - Masters degree in Agronomy, Area Concentration in Fitotecnia).*

Floral rot of passion fruit is caused by the fungus *Rhizopus stolonifer*, which attacks newly open flowers and young little fruits. The infection starts in the inner parts of the flower buds where it causes water-soaked lesions, whose floral tissues acquire a dark-brown coloration. The presence of dark mycelium and fungus fructification is often noticed on the lesions. The present work aimed at studying the *in vitro* and *in vivo* antagonistic potentiality of species of *Trichoderma* spp. to *Rhizopus stolonifer*. In order to assess the antagonistic efficiency of biological control agents in the floral rot of yellow passion fruit, *in vitro* and *in vivo* tests were carried out with these species: *Trichoderma viride*, *T. virens*, *T. harzianum* and *T. stromaticum*, at the Biofactory of the State University of Southwestern Bahia (Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia), campus of Vitória da Conquista - BA, and at a farm in the municipality of Eunápolis - BA. In the *in vitro* tests the mycelial growths of the phytopathogen and antagonists at the temperatures of 10°C, 15°C, 20°C, 25°C and 30°C were evaluated as well as the mycelial growth within 24h and 48h, in order to verify the growth rate of the isolates. To inhibit the mycelial growth of the phytopathogen, the pairing of cultures was carried out to assess the potentiality of antagonists and the production of volatile and non-volatile metabolites. Field, the antagonists were assessed according to their capacity. In the of preventing the infection by *Rhizopus stolonifer*, the average number of effective fruits being evaluated on the 15th and 30th day after the application of antagonists. Through the obtained results, it was noticed that the best temperatures for the growth of antagonists and phytopathogen were at 25°C and 30°C for all isolates. During the incubation periods of 24 and 48h, significant differences in the mycelial growth were evidenced among isolates of *Trichoderma* spp. In relation to *R. stolonifer*, the antagonists demonstrated growth speed significantly higher than the phytopathogen. In paired culture, all the isolates of *Trichoderma* spp. showed fast mycelial growth, thus preventing the development of the phytopathogen, demonstrating antagonism in the production of volatile and non volatile metabolites with fungal action against *R. stolonifer*. In the field test, there was significant effect in the treatments, a higher

* Adviser: Abel Rebouças São José, D. Sc. - UESB

fruit set of 74% was noted for the treatments T₃ - *Trichoderma harzianum* and T₅ - *T. virens*, and 75% for the control. The treatments T₂ - *T. viride* and T₄ - *T. stromaticum* obtained a lower percentage (42%).

Keywords: Biological control, floral rot, integrated pest management.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sintomas (A e B) e sinais (C e D) de <i>Rhizopus stolonifer</i> em flores e frutos de maracujá.	23
Figura 2 - Ciclo vital de <i>Rhizopus</i> sp.	25
Figura 3 - Cultivo pareado <i>R. stolonifer</i> e <i>Trichoderma viride</i>	43
Figura 4 - Identificação das flores.	46
Figura 5 - Pulverização das flores.	47
Figura 6 - Flores sendo ensacadas.	47
Figura 7 - Flores ensacadas após a Pulverização.	47
Figura 8 - Flor após a retirada do saco no dia seguinte.	47
Figura 9 - Diferenças entre diâmetro médio de colônias de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>R. stolonifer</i> incubado aos cinco dias, sob diferentes temperaturas.	51
Figura 10 - Taxa de crescimento micelial de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Rhizopus stolonifer</i> em cultivo individual.	52
Figura 11 - Cultivo pareado de <i>R. stolonifer</i> e <i>Trichoderma stromaticum</i>	53
Figura 12 - Efeito de metabólitos voláteis produzidos por <i>Trichoderma</i> spp. sobre o crescimento micelial de <i>Rhizopus stolonifer</i>	56
Figura 13 - Avaliação de metabólitos não voláteis produzidos por <i>Trichoderma</i> spp. através da técnica do papel celofane.	58
Figura 14 - Frutos após aplicação dos tratamentos	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Crescimento radial dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Rhizopus stolonifer</i>	51
Tabela 2 - Crescimento micelial de <i>Rhizopus stolonifer</i> em presença dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. avaliado por meio da técnica do pareamento.....	54
Tabela 3 - Efeito dos agentes de controle biológico na porcentagem do (NMFE) número médio de frutos efetivos em condições de campo.....	59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACB	Agentes de Controle Biológico
BDA	Batata Dextrose Agar
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
NMFE	Número Médio de Frutos Efetivos
PGSV	<i>Passion fruit green spot virus</i>
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
PVCV	<i>Passion fruit vein clearing virus</i>
PWV	<i>Passion fruit woodiness virus</i>
PAYMV	<i>Passion fruit yellow mosaic virus</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Considerações gerais sobre o maracujazeiro	18
2.2 Podridão floral em maracujazeiro	22
2.2.1 Controle	25
2.3 Controle biológico	26
2.3.1 Utilização de fungos como agentes de biocontrole.....	28
2.3.2 Micoparasitismo.....	30
2.3.3 Produção de antibióticos.....	31
2.3.4 Produção de enzimas extracelulares	31
2.3.5 Produção de metabólitos.....	32
2.3.6 Competição por nutrientes e nichos de colonização	34
2.3.7 Indução de resistência no hospedeiro	34
2.3.8 Características biológicas e importância de <i>Trichoderma</i>	35
2.3.9 Ocorrência e distribuição de <i>Trichoderma</i> spp.....	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Local	40
3.1.1 Obtenção dos isolados de <i>Rhizopus stolonifer</i>	40
3.1.2 Obtenção dos Agentes de Controle Biológico (ACB)	41
3.2 Interações <i>in vitro</i>	41
3.2.1 Efeito de temperaturas no crescimento micelial de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Rhizopus stolonifer</i>	41
3.2.2 Crescimento de <i>Rhizopus stolonifer</i> e espécies de <i>Trichoderma</i> spp. em cultivo individual	41
3.2.3 Antagonismo entre <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Rhizopus stolonifer</i> em cultivo pareado.....	42
3.2.4 Produção de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. e seu efeito sobre o crescimento micelial de <i>R. stolonifer</i>	43
3.2.5 Metabólitos não voláteis produzidos por <i>Trichoderma</i> spp.....	44
3.3 Interação <i>in vivo</i>	45
3.3.1 Caracterização do pomar e delineamento experimental	45
3.3.2 Produção dos agentes de controle biológico	45
3.3.3 Marcação das flores para montagem do experimento.....	46
3.3.4 Aplicação dos agentes de controle biológico.....	46
O experimento foi instalado às 16h no dia 14 de janeiro, mês em que a incidência da doença estava relativamente alta.	46
3.4 Avaliações.....	47

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 Interações <i>in vitro</i>	49
4.1.1 Efeito de diferentes temperaturas no crescimento micelial de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Rhizopus stolonifer</i>	49
4.1.2 Crescimento micelial em cultivo individual de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Rhizopus stolonifer</i>	51
4.1.3 Crescimento micelial em cultivo pareado de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Rhizopus stolonifer</i>	53
4.1.4 Metabólitos voláteis produzidos por <i>Trichoderma</i> spp. sobre o crescimento micelial de <i>Rhizopus stolonifer</i>	55
4.1.5 Teste de antibiose e efeito de metabólitos não voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. na sobrevivência de <i>Rhizopus stolonifer</i>	57
4.2 Interação <i>in vivo</i>	59
4.3 Controle biológico <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> a <i>Rhizopus stolonifer</i>	62
5 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) com uma produção aproximada de 330.777T (FNP CONSULTORIA; AGROINFORMATIVOS, 2003). Os mercados de suco e de fruta fresca têm crescido, e a produção, embora estagnada nos últimos anos, é substancialmente maior que aquela de décadas anteriores (AGUIAR; SANTOS, 2001). O destino da produção varia de acordo com a região, porém, verifica-se ao longo das últimas duas décadas uma inversão: o mercado da fruta fresca que absorvia aproximadamente 30% da produção nacional, hoje absorve mais da metade (RUGGIERO; OLIVEIRA, 1998).

A produtividade dos pomares brasileiros de maracujá é bastante variável, estando a média nacional em torno de 10 a 12T/ha/ano. Embora existam pomares com produção acima de 40T/ha/ano em plantações de vida útil de dois anos, é baixa quando comparada a de outros países produtores, como por exemplo, o Haváí (EUA) com 45T/ha/ano (RUGGIERO e outros, 1996).

A baixa produtividade dos pomares brasileiros está associada a diversos fatores, sendo as pragas as principais responsáveis pela redução da vida útil de produção.

Dentre as diversas doenças de importância econômica para a cultura do maracujazeiro destaca-se a podridão floral causada por o *Rhizopus stolonifer*, uma enfermidade recente, cujos danos podem chegar em algumas condições especiais a quase 100% de perda na produção (SÃO JOSÉ e outros, 2000).

O fungo *Rhizopus* se desenvolve com maior intensidade após período chuvoso o que contribui para a queda de flores. Segundo Pizza Junior (1991) citado por Ataíde (2005), essa condição compromete a produção, por impedir a polinização ou o desenvolvimento do grão de pólen. Sob precipitações, a

atividade dos insetos polinizadores se reduz ou fica ausente, obrigando o uso da polinização artificial que favorece adisseminação da doença.

O presente trabalho tem por objetivo estudar a potencialidade antagônica de espécies de *Trichoderma* spp. *in vitro* e *in vivo* a *Rhizopus stolonifer* agente causal da podridão floral do maracujazeiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações gerais sobre o maracujazeiro

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, tendo produzido em 2002, cerca de 478.000T. Essa produção destina-se tanto ao mercado de consumo *in natura* como ao processamento para a produção de suco concentrado (IBGE, 2004).

Seu cultivo ocupa 34.000ha e, embora presente em todas as regiões, assume papel de destaque no Nordeste (43,3% da produção brasileira) e Sudeste (41%), sendo a Bahia, Espírito Santo e São Paulo os principais Estados produtores (IBGE, 2004).

Nesse cenário, a Bahia ocupa posição privilegiada, sendo, desde 1996 o maior produtor da fruta no Brasil, respondendo em média por cerca de 44% da produção nordestina e 21% da brasileira. A produção baiana representou em 2001 cerca de R\$ 40 milhões, correspondendo a 1,18% do valor da produção agrícola do Estado. Além disso, os dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) indicam que em 1996 a região metropolitana de Salvador apresentava o maior consumo per capita domiciliar 2,096 kg/habitante/ano.

A passicultura baiana é desenvolvida em aproximadamente 8.200 hectares (25% da área com maracujá no Brasil) distribuídos em todas as regiões; 26 das 32 microrregiões baianas possuem plantios de maracujá. As microrregiões do Centro-Sul e o Sul Baiano se destacaram; em 2001, concentrando 62% da área e da produção nestas regiões do Estado. As microrregiões mais importantes foram, em 2001, as de Jequié (20,7% da produção baiana), Livramento de Brumado (17,4%), Porto Seguro (16,4%), Juazeiro (8,2%), Alagoinhas (6,4%), Barreiras (5,6%) e Santa Maria da Vitória (5,4%) (IBGE, 2004).

Dentre os problemas fitossanitários, as doenças são os que mais contribuem para a baixa produtividade observada na maioria dos pomares brasileiros.

O cultivo do maracujazeiro tem-se deparado com situações adversas e fatores limitantes. Dentre os diversos problemas, aqueles de ordem fitossanitário, notadamente as doenças, têm causado os maiores transtornos ao segmento produtivo desta frutífera. As moléstias que afetam o maracujazeiro podem ser classificadas de acordo com o seu agente causal: bacterianas, fúngicas da parte aérea, fúngicas do sistema radical, viróticas e aquelas de causa desconhecida (RUGGIERO e outros, 1996).

A fusariose do maracujazeiro causada por *Fusarium oxysporum* f. *passiflorae* é uma das principais doenças do maracujazeiro, que provoca murcha imediata, deficiência de água, colapso e morte das plantas em qualquer estágio de desenvolvimento (BASTOS, 1976; MANICA, 1981).

A podridão do colo é atribuída a *Thielaviopsis basicola* ou *Fusarium solani*. Mas nas regiões produtoras do Brasil, ocorre com maior frequência, o fungo *Phytophthora cinnamomi* (SANTOS FILHO e outros, 1999).

A morte prematura do maracujazeiro que ocasiona a morte das plantas em plena idade produtiva, geralmente ocorrendo em reboleiras, tem sido associada aos fungos *Fusarium* e *Phytophthora*, a nematóides e, mais recentemente, a uma bactéria, estando a sua etiologia mal esclarecida (PIZA JÚNIOR, 1994).

O tombamento da muda, mela ou “damping off” é uma doença causada por fungos como *Pythium aphanidermatum*, *P. ultimum*, *Phytophthora parasítica*, *Fusarium* sp. e *Rhizoctonia* sp. (SANTOS FILHO e outros, 1999).

A antracnose é uma enfermidade da parte aérea causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, cuja ação é favorecida por alta umidade, especialmente com chuvas frequentes, abundantes e temperatura média por volta

de 26°C a 28°C (GÓES, 1998). A cladosporiose ou verrugose causada pelo fungo *Cladosporium herbarum* Link, ataca a maioria da passifloriáceas, sendo uma doença típica de tecidos tenros aparecendo sempre em brotações (folhas e ramos) e em frutinhas pequenos.

A septoriose é uma doença de baixa frequência no Brasil, causada pelo fungo *septoria* sp., mas que em algumas regiões tem sido relatada causando prejuízos relevantes, tanto em viveiros como em plantas adultas (YASMAHIRO, 1980).

A podridão floral do maracujazeiro provocada por (*Rhizopus stolonifer*) incide sobre as flores recém abertas e frutinhas novos. A infecção inicia-se nas partes internas dos botões florais onde causa lesões encharcadas, do tipo podridão mole, cujos tecidos florais adquirem coloração pardo-escuro. Sobre as lesões, frequentemente observa-se a presença de micélio escuro e frutificação do fungo (GÓES, 1998).

A doença bacteriana causadas por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* em condições naturais, ocorre em maracujá-amarelo, maracujá-roxo e maracujá-doce. Aliada com outros patógenos, provoca uma anomalia denominada “morte-precoce” do maracujazeiro, que diminui drasticamente o período de exploração comercial e de vida das plantas afetadas (YAMASHIRO, 1980).

O vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (“*Passion fruit woodiness virus*” - PWV) induz nas plantas afetadas mosaico, clareamento das nervuras, mancha anelare, rugosidade, distorção e mosqueado amarelo (BEZERRA e outros, 1995).

O vírus do mosaico do pepino (“*Cucumber Mosaic virus*” - CMV) apresenta sintomas foliares na forma de anéis e semi anéis de coloração amarelo intensa, às vezes coalescidos, tomando boa parte do limbo, pontuações cloróticas nas regiões das nervuras, leve deformação nas folhas e frutos pequenos,

endurecidos e deformados.

O vírus do mosaico amarelo do maracujazeiro (*Passion fruit yellow mosaic virus* - PAYMV) Plantas atacadas são menos desenvolvidas e menos produtivas, embora o vírus não afete a produção de modo geral. As folhas apresentam mosaico amarelo brilhante, amarelecimentos das nervuras e leve enrugamento (CHAGAS, 1991).

O vírus do mosaico do maracujá roxo (*Purple granadilla mosaic virus* - PGMV) é transmitido pelo besouro *D. speciosa* e apresenta uma gama de hospedeiros restrita ao gênero *Passiflora*, com expressão de sintomas apenas em maracujá roxo. Plantas infectadas apresentam sintomas de mosaico somente em condições de temperatura abaixo de 20°C que tendem a desaparecer a temperaturas altas (CHAGAS e outros, 1984; OLIVEIRA e outros, 1994).

O vírus do enfezamento do maracujazeiro (*Passion Fruit Vein-clearing Virus* - PVCV). Causa o endurecimento do entrenó, folhas coriáceas, ramos de cor verde escura e quebradiço, clareamento de nervuras e produção de frutos pequenos e mal formados. A anomalia ficou conhecida como “enfezamento”, mas o sintoma característico é o clareamento das nervuras (CHAGAS, 1991).

O vírus da pinta verde do maracujazeiro (*Passion fruit green spot virus* - PGSV) está associado à infestação de ácaros da espécie *Brevipalpus phoenicis* Geijsk e quando a infestação se dá precocemente e não for controlada, ocorre uma rápida proliferação e a cultura pode ser destruída. Efeitos citopáticos similares àquelas descritas para o vírus da leprose do citros foram confirmados ao microscópio eletrônico (COLARICCIO e outros, 1995).

O Begomovirus (vírus da família Geminiviridae) foi descrito em 2002 no município de Livramento de Nossa Senhora, Bahia. A doença foi observada em 100% das 10.000 plantas que apresentaram sintomas de mosaico amarelo, intensa redução e encarquilhamento do limbo foliar e redução no desenvolvimento vegetativo. Sua transmissão está relacionada a altas populações

de mosca branca (*Bemisia tabaci Gennadius*) e este patógeno foi tentativamente denominado de “*Passion flower little leaf mosaic virus*” (NOVAES e outros, 2002).

2.2 Podridão floral em maracujazeiro

Trata-se de uma enfermidade causada pelo fungo *R. stolonifer* relativamente nova para a cultura e, por isso, existem poucas informações sobre a sua distribuição geográfica, incidência, níveis de prejuízos e controle. Inicialmente foi verificada na Região de Brasília - Distrito Federal, provocando graves prejuízos na cultura do maracujazeiro (GÓES, 1998). Atualmente tem sido verificada na região Sudeste, especialmente nos estado de São Paulo e Minas Gerais, e na região Norte, em plantios localizados no Pará. Alguns relatos dão conta do seu surgimento nos cultivos de maracujazeiros no Extremo Sul da Bahia (SÃO JOSÉ e outros, 2000).

Rhizopus stolonifer infecta as flores recém abertas e frutinhos novos, desenvolvendo-se nas partes internas dos botões florais onde causa lesões encharcadas, do tipo podridão mole, cujos tecidos florais adquirem coloração pardo-escuro. Sobre as lesões, frequentemente observa-se a presença de micélio escuro e frutificação do fungo (Figuras 1 A e B).

Os botões florais afetados tornam-se murchos e caem, deixando apenas as sépalas. Nos botões florais afetados, pode-se observar a presença de micélio do fungo e as respectivas frutificações, as quais aparentam pequenas pontuações de cor preta (Figuras 1C e D).



Figura 1 - Sintomas (A e B) e sinais (C e D) de *Rhizopus stolonifer* em flores e frutos de maracujá.

Sob condições de elevada umidade, especialmente após período chuvoso prolongado, micélio e frutificação do fungo podem ser observadas na superfície das flores (GÓES, 1998).

A medida predominante de controle que se tem conhecimento até o momento é a pulverização com fungicida na época da florada. No entanto, algumas dificuldades são encontradas neste tipo de controle. Sabe-se que a severidade da doença aumenta quando períodos longos de chuva ou umidade elevada ocorrem por ocasião do pico do florescimento, o que dificulta o controle com fungicida. A ocorrência de várias floradas aumenta a incidência da doença ficando mais difícil o seu controle (SÃO JOSÉ e outros, 2000).

Rhizopus stolonifer pertence a classe Zygomycetes, ordem Mucorales. Morfologicamente são fungos com micélios não-septado, cotonosos e formando esporangióforos nos nódulos onde se encontram os rizóides. Seus esporângios são, usualmente, muito grandes e negros e suas columelas são hemisféricas. A base do esporângio, ou *apófise*, tem a forma de taça. Esses bolores produzem agrupamentos de hifas semelhantes a raízes, denominados rizóides, assim como estolões ou "estolhos" (como os dos morangueiros), capazes de formar "raiz" onde pode se originar um novo organismo (AGRIOS, 1998).

O ciclo vital do *Rhizopus*, apresentado na Figura 2, o que ilustra o fato de que todos os fungos apresentam ciclos vitais. Pode ser observado que o *Rhizopus* é heterotático. A reprodução sexuada requer dois talos de tipos diferentes. Uma vez que os talos são morfológicamente indistinguíveis, são designados com os sinais + e -, em lugar dos adjetivos macho e fêmea. Geralmente, entre os gametas morfológicamente diferentes, o maior é identificado como feminino e o menor como masculino. Do mesmo modo, um gameta que deixa a estrutura em que se forma e mais tarde se funde com um gameta relativamente imóvel é considerado como masculino. Estando presentes os dois talos, as extremidades das hifas se diferenciam em *progametângios*, que entram em contato e se desenvolvem em *gametângios* pela formação de septos (COVA, 1993).

As paredes existentes entre os dois gametângios se dissolvem e seus protoplastos coalescem. Os núcleos de ambos os tipos acasalados se fundem em pares, dando origem a muitos núcleos zigóticos. A estrutura que os contém é chamada de cenozigoto. A parede do cenozigoto logo se espessa, torna-se negra e rugosa, desenvolvendo o *zigósporo*. O estado de repouso do zigósporo dura 1 a 3 meses e, às vezes, mais. Na germinação ocorre a meiose; o zigósporo se abre, emergindo um único *esporângio germinal* em sua extremidade. Este é esporangióforo semelhante a um esporângio produzido assexuadamente. Alguns

desses esporângios contêm esporos de um só tipo (ou + ou -), enquanto outros encerram esporos dos dois tipos, em números aproximadamente iguais (COVA, 1993).

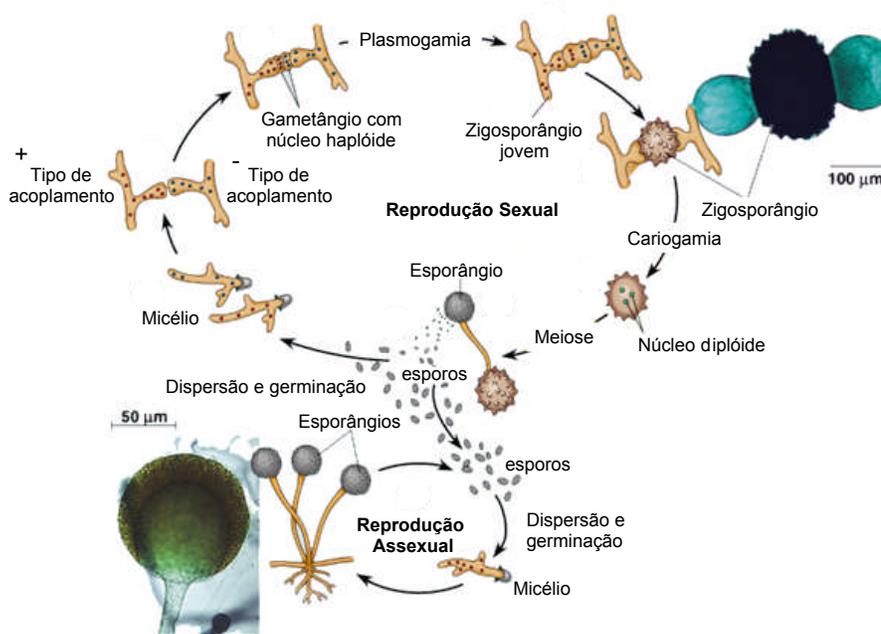


Figura 2 - Ciclo vital de *Rhizopus sp.*

Fonte: <http://www.cca.ufscar.br> - Adaptado pelo autor.

2.2.1 Controle

O fungo *Rhizopus* é de difícil controle através dos fungicidas disponíveis no mercado. Na região do Extremo Sul da Bahia, foram testados mais de 20 fungicidas, visando controlar o fitopatógeno, sem sucesso. Apenas o fungicida tebuconazole tem demonstrado boa eficiência no controle do *Rhizopus*, entretanto, tem sido observado em condições de campo, tanto no Norte do Espírito Santo, quanto no Extremo Sul da Bahia e platô de Neópolis em Sergipe, que este fungicida, provoca uma fitotoxicidade bastante pronunciada na planta,

que às vezes leva mais de 40 dias para recuperação (SÃO JOSÉ e outros, 2000).

Apesar da importância da doença, são poucas as informações acerca da sua incidência, níveis de prejuízos e controle. O controle biológico tem sido bastante eficiente nas condições de Eunópolis - BA (ATAÍDE e outros, 2003) onde apesar do número elevado de flores infectadas houve controle do fungo, com percentual de vingamento de 70% em condições de campo.

2.3 Controle biológico

Desde o início da domesticação das plantas pelos humanos há 10.000 anos atrás, fitopatógenos têm causado perdas nos campos cultivados e redução do valor estético e do tempo de armazenamento da colheita (PUNJA; UTKHEDE, 2003).

As plantas cultivadas podem ser consumidas frescas ou depois de processadas e podem ser produzidas em fazendas através de métodos de produção convencional ou orgânica ou ainda sob intenso manejo em condições ambientais controladas em casas de vegetação. No entanto, não são poupadas da destruição por fitopatógenos, os quais afetam raízes, caules, folhas, flores e frutos (PUNJA; UTKHEDE, 2003).

O combate a doenças é altamente dependente de agrotóxicos, que são de modo geral, eficazes para controle de pragas, mas apresentam, por vezes, consequências indesejáveis. Os agrotóxicos são apontados como substâncias altamente venenosas, que se acumulam no organismo humano e são capazes de causar câncer e mutações genéticas em descendentes (LIMA e outros, 2000).

O desafio para os produtores no controle de doenças tem aumentado cada vez mais com a demanda por produtos livres de resíduos químicos tóxicos e pela percepção do público em geral sobre o impacto negativo das práticas utilizadas no controle de doenças, como o uso de agrotóxicos, sobre a saúde dos

seres humanos e sobre o meio ambiente. Tais pressões exercidas pela sociedade promoveram estabelecimento de políticas governamentais que restringem a utilização de agrotóxicos (GULLINO; KUIJPERS, 1994; RAGSDALE; SISLER, 1994). Desta forma, agricultores, bem como os pesquisadores começaram a considerar o uso de métodos alternativos no combate a doenças (PUNJA; UTKHEDE, 2003).

O controle alternativo no contexto da proteção de plantas contra fitopatógenos engloba o controle biológico e indução de resistência, e não inclui o controle químico clássico e o melhoramento genético de plantas para resistência a doenças. Alguns autores, no entanto, classificam a indução de resistência como um tipo de controle biológico (PASCHOLATI, 1998). O controle biológico tem como premissa básica, manter a densidade populacional das espécies de pragas associadas à agricultura, em níveis economicamente e ecologicamente aceitáveis (LIMA e outros, 2000). Em um conceito mais amplo, o controle biológico é definido segundo Baker e Cook (1974) como “a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, por um ou mais organismos sobre um fitopatógeno ou parasita nos seus estados de atividade ou dormência, realizada naturalmente ou através da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas.” Posteriormente, Cook e Baker (1983) redefiniram o controle biológico como sendo “a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um fitopatógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem.”

No contexto particular deste estudo, o controle biológico de doenças de plantas pode ser definido simplesmente como “o controle de um microrganismo através de outros microrganismos.”

Os 200 produtos biológicos disponíveis no mercado, os biopesticidas, que possuem microrganismos como ingredientes ativos, representaram em 1995,

apenas 0,7% do mercado mundial de pesticidas, mas que cresce entre 10 e 25% ao ano, ao passo que pesticidas químicos vêm crescendo a taxas entre 1 a 2%. A grande fatia do mercado de biopesticidas (cerca de 80%) é representada por produtos à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* no controle de insetos. Outros exemplos de microrganismos comercializados são a *Agrobacterium radiobacter* no controle da galha da coroa causada por *A. tumefaciens*, o vírus *Baculovirus anticarsia* contra a lagarta desfolhadora (*Anticarsia gemmatalis*) em soja, *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene* utilizado como bioherbicida em culturas de arroz e soja, *Trichoderma harzianum* no controle de *Sclerotium rolfsii* e a levedura *Candida oleophila* no controle de fitopatógenos em pós-colheita (NARDO; CAPALBO, 1998).

2.3.1 Utilização de fungos como agentes de biocontrole

O entendimento do ciclo da doença e do ciclo de vida do fitopatógeno é crucial para o sucesso de qualquer estratégia de controle de uma determinada doença. A maioria dos fitopatógenos que afeta diversas culturas foi razoavelmente estudada e as informações sobre sua biologia estão disponíveis (AGRIOS, 1998).

A utilização de fungos no controle de doenças requer uma interrupção de algum estágio da doença ou do ciclo de vida do fitopatógeno, e isto pode ocorrer através de diversos mecanismos. A prevenção da infecção, redução na colonização do tecido hospedeiro, redução da esporulação ou da sobrevivência do fitopatógeno podem proporcionar diferentes níveis de controle através da utilização de agentes biológicos (PUNJA; UTKHEDE, 2003).

Muitos fungos estão presentes naturalmente no interior ou próximo às folhas, raízes e outras estruturas como epífitas ou saprófitas, usando nutrientes disponíveis em vários nichos. Pesquisas no intuito de elucidar se estes

microrganismos poderiam potencialmente ser utilizados como agentes de controle biológico tem se intensificado nos últimos 20 anos, e isto tem levado ao desenvolvimento e registro de diversos agentes microbianos de uso comercial empregados no controle de doenças. Logo em seguida a descoberta inicial, o desenvolvimento de agentes de controle biológico da fase laboratorial até a obtenção do produto comercial é uma tarefa muito difícil. É necessário obter diversas informações com relação à eficácia, modo de ação do agente em questão, bem como sobre a sobrevivência, colonização e potencial toxicidade para espécies não-alvo. Além disso, estudos com relação à formulação, estabilidade e vida de prateleira também são necessários (MATHRE e outros, 1999; HARMAN, 2000).

Diversos fungos têm o seu sucesso comprovado como agentes de biocontrole e muitos outros estão sendo apontados como potenciais. Alguns exemplos a serem citados são: *Trichoderma harzianum*, *T. koningii*; *T. viride*; *T. hamatum*; *T. virens* e *T. pseudokoningii*.

O sucesso maior com o uso de *Trichoderma* tem sido documentado para patógenos de solo, como: *Rhizoctonia solani*; *Sclerotium rolfsii*; *Sclerotinia sclerotiorum*; *Fusarium* spp. e *Pythium* spp. (CORABI-ADELL, 2004).

No entanto, diversos trabalhos têm relatado o parasitismo num grande e diversificado grupo de fungos fitopatogênicos: *Armillaria*; *Colletotrichum*; *Verticillium*; *Venturia*; *Endotia*; *Phytophthora*; *Rhizopus*; *Diaporthe*; *Fusicladium*; *Botrytis*; *Poria monticola* e *Stereum purpureum* (MELO, 1998).

O controle biológico de fitopatógenos de ocorrência na pós-colheita pode ser feito durante o ciclo da cultura ou após a colheita. O controle, ainda no campo, tem como objetivo evitar a penetração dos fitopatógenos nos tecidos de frutos e hortaliças e seu posterior desenvolvimento durante o armazenamento.

O controle após a colheita tem dois objetivos: evitar que os fitopatógenos latentes nos tecidos causem podridões e impedir novas infecções

(BETTIOL; GHINI, 1995).

A busca por agentes de controle biológico tem dado oportunidade para que fitopatologistas, micologistas, geneticistas, bioquímicos e biólogos moleculares interajam de forma a melhor compreender como estes microrganismos reduzem o desenvolvimento do fitopatógeno e da doença. Não há uma característica única que possa ser identificada nos agentes de controle biológico para explicar como eles se manifestam como antagonistas aos fitopatógenos, entretanto, diversas características importantes têm surgido a partir das investigações científicas com relação aos modos de ação (PUNJA; UTKHEDE, 2003).

Os mecanismos pelos quais fungos podem reduzir o crescimento e desenvolvimento de fitopatógenos fúngicos, e reduzir a doença são: parasitismo, produção de compostos antibióticos, produção de enzimas extracelulares, interferência nos fatores de patogenicidade, indução de resistência na planta hospedeira, e competição por nutrientes e nichos de colonização. É provável que os diferentes mecanismos atuem em sinergia durante a interação antagônica (PUNJA; UTKHEDE, 2003).

2.3.2 Micoparasitismo

Os primeiros relatos que demonstraram que patógenos fúngicos podem ser parasitados por outros fungos foram feitos na década de 30. A maioria dos estudos é referente a diversas espécies de *Trichoderma* (HOWELL, 2003).

Neste tipo de interação é necessário que fitopatógenos e micoparasitas estejam fisicamente próximos. A maioria das observações tem sido feita em placas de Petri ou em tecido vegetal destacado, mantido sob condições controladas. *Ampelomyces quisqualis* parasita hifas e conídios de oídio (ROTEM e outros, 1999), enquanto *Coniothyrium minitans* é micoparasita sobre

escleródios de *Sclerotinia* spp. (BUDGE; WHIPPS, 2001; GICZEY e outros, 2001), e *Pythium oligandrum* e parasitado por outros fungos (BENHAMOU; CHET, 1997; MADSEN; NEERGAARD, 1999).

2.3.3 Produção de antibióticos

A produção de compostos antibióticos é característica de muitos fungos utilizados como agentes de biocontrole. Espécies de *Trichoderma* são conhecidos produtores de diversos metabólitos secundários com amplo espectro de atividade antimicrobiana, e já são produtos comerciais (PUNJA; UTKHEDE, 2003).

A obtenção de mutantes incapazes de produzirem antibióticos e avaliação da sua eficiência podem fornecer evidências conclusivas sobre o papel dos antibióticos na supressão de doenças. Um mutante de *Trichoderma virens*, incapaz de sintetizar gliotoxina e gliovirina perdeu a sua habilidade de controlar fungos que infectam raízes como *Pythium*, no entanto, trabalhos utilizando mutantes com deficiência na produção de gliotoxina ainda permaneceram capazes de inibir *Rhizoctonia*. Desta forma, pode-se supor que outros atributos em *Trichoderma* tenham papel importante no controle de fitopatógenos (HOWELL, 2003). Usando-se mutagênese de inserção que tornava *Pseudozyma* eficaz na produção do glicolipídio floculosina observou-se significativa redução na atividade de biocontrole contra oídio (CHENG e outros, 2003).

2.3.4 Produção de enzimas extracelulares

As células fúngicas são envoltas por paredes celulares rígidas que mantém a forma e protege a célula de intempéries e hostilidade ambientais, proporciona ambiente adequado à organização e ocorrência de processos vitais,

atua como filtro para determinadas moléculas e serve como receptor para hormônios e toxinas. Em resumo, ela serve como barreira às ações exercidas pelos microrganismos antagonistas. Poderá ter sucesso o antagonista que tiver êxito em romper a parede celular do fitopatógeno ou interromper os processos relacionados a sua síntese (LORITO e outros, 1996; LIMA e outros, 2000). A parede celular é composta por carboidratos, quase todos sob a forma de polissacarídeos (80 a 90%), tais como quitina, β -1,3 e β -1-6-glucanas, além de proteínas e lipídios em quantidades significativas. A produção de enzimas hidrolíticas capazes de hidrolisar os componentes da parede celular pode desempenhar um importante papel no processo antagônico (LIMA e outros, 2000).

A secreção de enzimas hidrolíticas, particularmente quitinases e glucanases, é uma característica comum em muitos agentes de biocontrole. Quando o gene *ech42*, responsável pela codificação de uma quitinase é interrompido em *Trichoderma virens* e *T. harzianum* é evidenciada uma perda na capacidade de controle dos patógenos *Rhizoctonia solani* e *Botrytis cinerea*, respectivamente quando comparado as linhagens selvagens (BAEK e outros, 1999; WOO e outros, 1999). No entanto, a superexpressão de diversos genes em *Trichoderma* codificantes de enzimas como quitinases (*ech42*, *chit33*) (BAEK e outros, 1999), endoglucanase (*egl1*) e proteinase (*prb1*) (FLORES e outros, 1997), melhorou substancialmente o potencial antagonista dos agentes contra fitopatógenos como *Rhizoctonia* e *Pythium*, tanto *in vitro* como *in vivo*.

2.3.5 Produção de metabólitos

As primeiras referências sobre a produção de metabólitos, no caso tóxicos, produzidos por *Trichoderma* sp. são de Weindling (1934). Desde então várias substâncias de natureza diversa têm sido extraídas e identificadas a partir

de isolados específicos.

Espécies de *Trichoderma* produzem um grande número de antibióticos os quais apresentam efeitos variados sobre fungos e bactérias, tanto de interesse agrícola como na medicina. Entre os principais efeitos estão atividades do tipo antifúngicas, antibacteriana, antiviral, imunossupressores, citostática e inibidora de ATP (MELO, 1998).

As enzimas líticas compõem um outro grupo de substâncias bastante analisadas em virtude do potencial de utilização deste microrganismo na área de controle biológico. Por tratar-se de um micoparasita necrotrófico, apresenta grande eficácia no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos, sobretudo aqueles com estruturas de resistência consideradas difíceis de serem atacadas por microrganismos. Este controle pode ser realizado tanto por inibição como pela destruição dos propágulos (MELO, 1998).

Um dos fatores atribuídos a essa alta capacidade de biocontrole deve-se a produção de enzimas líticas extracelulares degradadoras da parede celular de muitos fungos, tais como quitinases, celulasas, β -1,3-D-glicanases, β -1,4-glicosidasas e proteases. Sabe-se, atualmente, que estas enzimas estão envolvidas diretamente no processo de parasitismo (RIDOUT e outros, 1986; ELAD e outros, 1982). Estes últimos autores sugeriram ainda que linhagens de *Trichoderma* spp. podem ser selecionadas como agentes de biocontrole, com base na atividade de β -1,3-D-glicanase e quitinase, considerando a quitina e os glicanos como sendo os substratos mais prováveis de ataque nas paredes celulares de fungos fitopatogênicos.

Algumas espécies com alta produção de celulase, como *T. reesei*, são cultivadas em escala industrial no setor químico. Além disso, diferentes estratégias vêm sendo desenvolvidas para aperfeiçoar a produção *in vitro* de metabólitos, como aquela desenvolvida por Schaffner e Toledo (1991), que obtiveram uma maior produção de celulase através da suplementação do meio de

cultura com xilose e sorbose.

2.3.6 Competição por nutrientes e nichos de colonização

Fitopatógenos fúngicos necessitam de sítios de entrada para terem acesso ao interior do tecido do hospedeiro. Em parasitas obrigatórios, isto é usualmente obtido através da penetração direta da hifa através da cutícula e epiderme da planta, já no caso dos parasitas facultativos que são mais saprofíticos, a entrada é feita através de lesões, tecidos em senescência, ou aberturas naturais como estômatos e lenticelas. Tais locais são de modo geral ricos em nutrientes devido a exudação de açúcares e aminoácidos.

Microrganismos de controle que tem capacidade de competir de forma efetiva por estes sítios de infecção e usar os nutrientes disponíveis podem deslocar de forma eficaz o patógeno por impedir a germinação de propágulos ou a infecção (PUNJA; UTKHRDE, 2003).

Espécies de *Trichoderma* e *Gliocladium* podem se sobressair em relação ao fitopatógeno, principalmente se aplicados antes da chegada do fitopatógeno (HARMAN, 2000). Isolados não patogênicos de *F. oxysporum* competem por fontes de nutrientes e sítios de colonização em raízes (EPARVIER; ALABOUVETTE, 1994).

2.3.7 Indução de resistência no hospedeiro

Plantas superiores são capazes de se defender contra fitopatógenos em potencial prevenindo e restringindo a penetração, crescimento e multiplicação através da indução de diversos componentes físicos e bioquímicos. A indução é desencadeada por moléculas eliciadoras ou agentes indutores (BENHAMOU,

1996). A indução de resposta do hospedeiro por fungos utilizados como agentes de biocontrole pode ser desencadeada pela colonização do tecido hospedeiro, produção de moléculas eliciadoras e compostos sinalizadores, e produção de substâncias promotoras de crescimento. *Candida oleophila* foi capaz de induzir resistência em videiras contra *Penicillium digitatum*.

2.3.8 Características biológicas e importância de *Trichoderma*

As espécies do gênero *Trichoderma* são comuns no meio ambiente, especialmente nos solos (SAMUELS, 1996). Elas têm sido utilizadas na produção de muitas exoenzimas em escala industrial como, por exemplo, as enzimas celulolíticas, além de serem amplamente utilizadas no controle biológico de doenças de plantas. Algumas espécies têm sido estudadas e utilizadas em processos de biodegradação de compostos clorofenólicos e na biorremediação do solo (ESPOSITO; SILVA, 1998). O conhecimento do que constitui uma espécie do gênero em nível morfológico ainda não está definido, nem mesmo as inter-relações entre as espécies do gênero (SAMUELS, 1996).

Também, pouco se conhece sobre a biologia de muitas das espécies, como o ciclo de vida e modos de reprodução e recombinação. Devido ao fato de que, no gênero *Trichoderma*, as características morfológicas que definem uma espécie serem muito variáveis, tem sido utilizado pelos taxonomistas o termo de agregado de espécies (SAMUELS, 1996), sendo definidos como grupos de espécies morfológicamente muito semelhantes. Foram propostos inicialmente por Rifai (1969) nove agregados de espécies, os quais foram elevados ao nível de seção por Bisset (1984; 1991a, b e c). Devido ao isolamento de espécies de *Trichoderma* a partir de ascósporos do gênero *Hypocrea* (pertencente aos ascomicetos), estas são atualmente classificadas como formas anamórficas deste gênero e de gêneros relacionados (SAMUELS, 1996). As espécies do gênero são

caracterizadas por apresentarem rápido crescimento de colônia, atingindo de dois a nove centímetros de diâmetro após quatro dias cultivados em meio de cultura (ESPOSITO; SILVA, 1998). As colônias podem se apresentar dispersas e flocosas ou compactadas em tufos. O tamanho e o formato dos conídios são muito variáveis e de limitado valor taxonômico. É observada nas espécies de *Trichoderma* a existência de clamidósporos, os quais são esporos assexuais originados pela modificação de segmentos da hifa, podendo ser intercalares ou terminais. Os conídios podem ser verdes, amarelos ou em tons verdes amarelados e ainda incolores. Não existem em *Trichoderma* conidióforos definidos (SAMUELS, 1996), sendo os conídios formados nas extremidades das fiálides em determinadas hifas diferenciadas. Os conídios tendem a se agregar em massas, sendo estes agregados formados em hifas contendo fiálides. Em algumas espécies do gênero existe uma dependência de luz para a esporulação (GRESSEL; HARTMANN, 1968).

Algumas espécies são capazes de degradar celulose. Nadalini e outros (1999) ao quantificarem a produção de celulasas em linhagens mutantes, verificaram um aumento na produção em uma linhagem mutante em relação a forma selvagem original, demonstrando a utilidade do método de indução de mutação - seleção para a obtenção de linhagens hiperprodutoras.

O gênero *Trichoderma* está amplamente distribuído por todo o mundo e ocorre em quase todos os tipos de solos e ambientes naturais, especialmente naqueles contendo matérias orgânicas (ESPOSITO; SILVA, 1998). Muitas espécies do gênero são também encontradas na rizosfera de muitas plantas. O fato das espécies do gênero se desenvolver em um amplo espectro de substratos e condições ambientais torna este grupo de grande interesse biotecnológico (ESPOSITO; SILVA, 1998).

As espécies do gênero *Trichoderma* produzem grandes quantidades de celulasas e outras enzimas hidrolíticas (KUBICEK, 1992), sendo *Trichoderma*

reesei um conhecido produtor de múltiplas enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. Neste contexto Margolles-Clark e outros (1997) estudaram o padrão de expressão de dez genes de hemicelulase de *T. reesei* em várias fontes de carbono. As espécies do gênero *Trichoderma* podem ser utilizadas na reciclagem de materiais celulósicos para a obtenção de resíduos úteis (ESPOSITO; SILVA, 1998). As xilanases são produzidas em escala industrial, principalmente por espécies de *Trichoderma* e *Aspergillus* (HALTRICH e outros, 1996). As xilanases são utilizadas na indústria de alimentos, rações e de papel.

Outras enzimas produzidas por espécies de *Trichoderma* são as quitinases, característica esta que pode estar relacionada à capacidade destas de atuar como micoparasitas, onde estas enzimas atuam na digestão das paredes celulares fúngicas (LORITO e outros, 1993).

As espécies de *Trichoderma* têm sido usadas em preparações comerciais para o controle biológico de fungos causadores de doenças em plantas, reduzindo a necessidade de utilização de poluentes químicos. O fungo *Trichoderma harzianum* é o agente ativo do composto comercial “Tricodex”, o qual é utilizado contra o fungo causador do apodrecimento pós - colheita da maçã, e é utilizado em combinação com o fungo *T. polysporum* no composto denominado “Binab-T”, o qual é utilizado no controle do apodrecimento da madeira (RICARD, 1981). Uma linhagem de *T. harzianum* (*T. harzianum* AG2), obtida a partir de fusão de protoplastos, é utilizada no controle de um grande espectro de doenças de plantas transmitidas via solo (HARMAN, 1990). O composto “GlioGard” possui o fungo *Trichoderma virens* como seu agente ativo e é utilizado na prevenção do tombamento de plântulas causado por espécies de *Pythium* e *Rhizoctonia* (LUMSDEN; LOCKE, 1989).

As espécies do gênero *Trichoderma* são reconhecidas como organismos controladores presentes no solo em ambientes florestais, devido ao fato de

estarem envolvidos em processos de decomposição, na reciclagem de nutrientes e na regulação da microbiota associada (ESPOSITO; SILVA, 1998). Tem sido evidenciada a importância das espécies de *Trichoderma* na decomposição de compostos xenobióticos (SMITH, 1995). O fungo *T. harzianum* é capaz de degradar compostos clorofenólicos incluindo vários pesticidas como Glifosato, DDT, Dieldrin, Endosulfan etc. (KATAYAMA; MATSUMURA, 1993). *T. viride* é capaz de degradar o inseticida photodieldrin em compostos não tóxicos e solúveis em água (TABET; LICHTENSTEIN, 1976).

O gênero *Trichoderma* apresenta um excelente potencial para a aplicação em várias áreas de interesse agrícola, ambiental e industrial. Portanto, um melhor conhecimento da taxonomia, da definição de espécie, assim como estudos do ciclo de vida, formas de reprodução e recombinação, estudos fisiológicos, bioquímicos entre outros, tornam-se necessários para um melhor aproveitamento do potencial destes fungos nas diversas áreas de interesse (ESPOSITO; SILVA, 1998).

2.3.9 Ocorrência e distribuição de *Trichoderma* spp.

Trichoderma possui uma distribuição bastante ampla ocorrendo no mundo inteiro em quase todos os tipos de solos e outros habitats naturais, especialmente naqueles que contém ou consistem de matéria orgânica. Agregados (ou complexos) de espécies podem estar restritos a uma determinada área, entretanto, são escassas as informações sobre sítios preferenciais ou fatores críticos para seu estabelecimento e persistência em diferentes ecossistemas. Embora pareça ser um colonizador secundário, como indica seu isolamento freqüente a partir de matéria orgânica bastante decomposta (DANIELSON; DAVEY, 1973b), é bastante agressivo na competição por nutrientes e exudatos

vegetais (SAMUELS, 1996). É encontrado também na superfície de raízes de diversas plantas (PARKINSON e outros, 1963); sobre cascas caídas, especialmente quando estão lesadas por outros fungos (DANIELSON; DAVEY 1973b); ou sobre esclerócios ou outros propágulos de outros fungos (WELLS e outros, 1972).

As preferências ecológicas foram revistas com maior profundidade por (DANIELSON; DAVEY, 1973a).

Estudos qualitativos sobre a distribuição e a ocorrência dos agregados individuais foram dificultados devido as imprecisões taxonômicas e pelas limitações metodológicas na caracterização morfológica e intrínseca das amostras. Observou-se que quando as condições do solo são mantidas secas por um longo período a população como um todo decai (DAVET, 1979). Danielson e Davey (1973b) concluíram que certos isolados de *T. hamatum* e *T. pseudokoningii* estão adaptados a condições de excessiva umidade de solo e que *T. viride* e *T. polysporum* estão restritos a áreas onde baixas temperaturas prevalecem, enquanto *T. harzianum* é mais comumente encontrado em regiões de clima quente. Já as espécies *T. hamatum* e *T. koningii* são amplamente distribuídos em áreas de condições climáticas diversas. Estes autores, ainda sugerem, como determinantes físicos e químicos, a heterogeneidade dos agregados de espécies (ou complexos), pH do solo, propriedades químicas, concentração de CO_2 e HCO_3^- , conteúdo de matéria orgânica e sais ou ausência de microrganismos no solo. O conteúdo de ferro no solo pode também ser um determinante importante na preferência de microsítios por *Trichoderma* (HUBBARD e outros, 1983). Em termos taxonômicos, devido ao grande avanço das técnicas moleculares e o acesso a bancos genômicos mundiais (e.g. GenBank), as informações disponíveis deverão ser reavaliadas mediante a nomenclatura atualmente reconhecida para uma melhor interpretação dos dados ecológicos obtidos até então.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O presente trabalho foi conduzido na Biofábrica Pesquisa e Produção de Microrganismos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* de Vitória da Conquista - BA e na propriedade agrícola Água Rosada no município de Eunapólis - BA, com as coordenadas geográficas de 16°22' de latitude sul e 39°33' de longitude WG; com uma altitude aproximada de 180 m sobre o nível do mar; a região localiza-se em área de clima Af (classificação de Köppen), caracterizando-se como tropical úmida, sem estação de seca definida; a umidade relativa do ar média é 84,8%; 2142,2 horas de insolação/ano; a temperatura média anual é de 23,3°C; índice pluviométrico em torno de 1260 mm anuais; a evapotranspiração potencial anual é estimada em 1298 mm; ventos vindos do oeste com velocidade média de 3,16 m/s.

3.1.1 Obtenção dos isolados de *Rhizopus stolonifer*

O fungo *R. stolonifer* foi isolado a partir de flores de maracujazeiro naturalmente infectadas. Para tal, fragmentos das flores foram cortadas (\pm 0,5cm) e imersos em solução de hipoclorito de sódio a 2% por 2 minutos. Em seguida, os fragmentos foram transferidos para solução de álcool a 70% por 1 minuto. Após a desinfecção, os fragmentos foram lavados com água destilada esterilizada e transferidos sob condições assépticas para placas de Petri de 90mm de diâmetro, contendo como substrato, o meio Batata Dextrose Agar (BDA) sendo incubados em câmara BOD ajustada à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas (GÓES, 1995).

3.1.2 Obtenção dos Agentes de Controle Biológico (ACB)

Os ACB utilizados no experimento foram: *Trichoderma viride* - cepa da Biofábrica - UESB, *Trichoderma stromaticum* proveniente da CEPLAC - BA, *Trichoderma harzianum* - da Empresa Itaforte - SP e *Trichoderma virens*, obtidos na Mata ciliar de Contendas do Sincorá - BA, identificado pela UFRPE.

3.2 Interações *in vitro*

3.2.1 Efeito de temperaturas no crescimento micelial de *Trichoderma* spp. e *Rhizopus stolonifer*

Foram retirados discos agarizados de 7mm de diâmetro, de culturas crescidas por sete dias, dos antagonistas e fitopatógeno, sendo depositados no centro de placas de Petri de 90mm, separadamente, sendo incubado na ausência de luz nas temperaturas 10°C, 15°C, 20°C, 25°C e 30°C. Os tratamentos foram repetidos cinco vezes, sendo cada repetição formada por cinco placas em um delineamento inteiramente casualizado.

Após cinco dias de incubação, foi avaliado o crescimento da colônia através da medição do diâmetro utilizando-se uma régua milimetrada.

3.2.2 Crescimento de *Rhizopus stolonifer* e espécies de *Trichoderma* spp. em cultivo individual

A metodologia aplicada neste experimento, baseou-se em Jackisch-Matsuura e Menezes (1999).

Foram determinados o crescimento micelial e a taxa de crescimento dos isolados de *Trichoderma* spp. e *R. stolonifer*

Discos de 7mm de diâmetro foram retirados das margens das colônias dos isolados de ambos os fungos com sete dias e transferidos para o centro das placas de Petri contendo BDA. As placas foram mantidas a 25°C sob fotoperíodo de 12h. Para cada tratamento foram feitas cinco repetições, em um delineamento inteiramente casualizado.

O registro do crescimento micelial deu-se pela medida do diâmetro de cada colônia, com auxílio de régua milimetrada, em dois intervalos de tempo, 24h e 48h. A taxa de crescimento de cada organismo foi determinada aplicando-se a fórmula adaptada de Lilly e Barnett (1951), citada por Jackisch-Matsuura e Menezes (1999):

$$T_{xc} = \frac{C_2 - C_1}{T_2 - T_1}$$

onde:

T_{xc} = taxa de crescimento (mm/h);

C_2 = crescimento após 48 horas de incubação;

C_1 = crescimento após 24 horas de incubação;

T_2 = 48h e T_1 = 24h.

3.2.3 Antagonismo entre *Trichoderma* spp. e *Rhizopus stolonifer* em cultivo pareado

Para avaliar o antagonismo de *Trichoderma* spp., por meio do hiperparasitismo a *R. stolonifer*, foi utilizado o pareamento de culturas em placas de Petri. Foi colocado em cada placa, em um dos lados, um disco de cultura do fitopatógeno e no outro, um disco de cultura do antagonista, ambos a 2,0cm de distância da borda da placa, em posições opostas (Figura 3). Os discos foram obtidos de culturas puras dos antagonistas e fitopatógeno, as quais foram incubadas em condições ambientais de laboratório, por sete dias. Após a

transferência, as placas foram mantidas a 25°C e fotoperíodo de 12h (DENNIS; WEBSTER, 1971b).

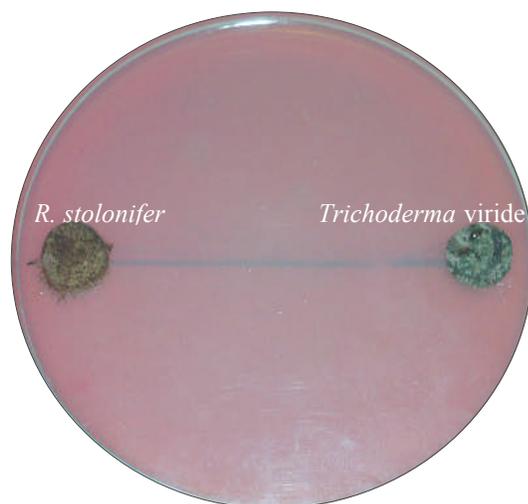


Figura 3 - Cultivo pareado *R. stolonifer* e *Trichoderma viride*

O potencial de antagonismo dos isolados foi avaliado aos 4, 8, 12 e 16 dias em cinco repetições, através de medições do crescimento micelial das colônias de *R. stolonifer*.

3.2.4 Produção de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. e seu efeito sobre o crescimento micelial de *R. stolonifer*

Baseado no método de Bharat e outros (1980), foi estudado o efeito de extratos livres de células de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *R. stolonifer*. Placas de Petri contendo meio BDA, foram posicionadas umas sobre as outras, sendo colocado na parte inferior um disco de ágar de 7 mm de *Trichoderma* spp. e na superior um disco de *R. stolonifer*. As placas foram

vedadas com membrana plástica e em seguida, foram incubadas a 25°C, com fotoperíodo de 12h por sete dias. Cada tratamento foi composto por cinco repetições em um delineamento inteiramente casualizado. Para a testemunha foi utilizado apenas discos de *R. stolonifer* tanto na parte inferior como na superior da placa de Petri.

3.2.5 Metabólitos não voláteis produzidos por *Trichoderma* spp

O método consistiu em cobrir assepticamente toda a superfície do meio (BDA), com discos de papel celofane (9 mm de diâmetro). A seguir, discos de ágar contendo micélio mais conídios de *Trichoderma* spp. foram colocados no centro, sobre a superfície do papel celofane (DENNIS; WEBSTER, 1971a). As placas foram incubadas por 48h à temperatura ambiente, sob luz contínua. Após as 48h, as placas com os antagonistas já estabelecidos sobre o papel celofane foram abertas em câmara asséptica, e retirou-se o papel celofane juntamente com as colônias dos antagonistas. As placas foram invertidas e adicionou-se aproximadamente 10mL de clorofórmio na sua parte inferior, a fim de eliminar resíduos estruturais dos antagonistas em estudo. Após a evaporação do produto, voltou-se à posição original das placas, onde foram colocados discos de 7mm de diâmetro retirados das margens das colônias do fitopatógeno. As placas foram mantidas a 25°C sob fotoperíodo de 12h. A testemunha foi constituída de placas contendo apenas o fitopatógeno sem a presença de metabólitos.

Cada tratamento foi composto por cinco repetições em um delineamento inteiramente casualizado. Os tratamentos foram comparados com base no diâmetro das colônias do fitopatógeno, após alcançar os bordos da placa, o que ocorreu cinco dias após a inoculação.

3.3 Interação *in vivo*

3.3.1 Caracterização do pomar e delineamento experimental

No experimento foram utilizadas 1.250 flores de um pomar comercial de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg), com sete meses de idade em período de floração.

Foram estudados cinco tratamentos, T₁ - Testemunha; T₂ - *Trichoderma viride*; T₃ - *T. harzianum*; T₄ - *T. stromaticum* e T₅ - *T. virens*, com cinco repetições sendo 50 flores por repetição em um delineamento em blocos casualizados.

3.3.2 Produção dos agentes de controle biológico

As espécies de *Trichoderma* spp. em estudo foram produzidos em grão de arroz parboilizado tipo 1, autoclavado em sacos de polipropileno de 30 x 40 cm com 300g de arroz e 100mL de água destilada, sendo autoclavado a 125°C, por 30 minutos, sob condições de assepsia. Para preparação dos antagonistas, foram selecionadas placas com sete dias de incubação, onde foram raspadas para retirada dos conídios e esporos sendo utilizada a câmara de Neubauer, para contagem de esporos e preparação das suspensões na concentração de 2×10^8 conídios/mL

A inoculação do substrato foi realizada em câmara de fluxo laminar, usando-se uma seringa descartável de 20 mL, sendo inoculado 10mL na suspensão em cada recipiente. Após a inoculação, o substrato foi acondicionado em sala climatizada a 25°C por 15 dias, período suficiente para total esporulação dos antagonistas.

3.3.3 Marcação das flores para montagem do experimento

Após a abertura das flores o que ocorre na região por volta das 13h30 foi realizada a polinização manual, em seguida as flores foram identificadas com fita plástica (Figura 4), para a seguir aplicar os tratamentos.



Figura 4 - Identificação das flores.

3.3.4 Aplicação dos agentes de controle biológico

No dia anterior da instalação do experimento houve ocorrência de uma chuva de 100mm, com isso a umidade relativa e a temperatura estavam favoráveis para o desenvolvimento do fitopatógeno.

O experimento foi instalado às 16h no dia 14 de janeiro, mês em que a incidência da doença estava relativamente alta.

A pulverização foi realizada com o auxílio de um pulverizador manual, sendo aplicada em cada flor 1mL da suspensão dos antagonistas na concentração de 2×10^8 conídios/mL; a testemunha foi pulverizada com água destilada. Após a pulverização as flores foram protegidas com sacos de papel, sendo retirados no

dia seguinte de manhã (Figuras 5, 6, 7 e 8).



Figura 5 - Pulverização das flores.



Figura 6 - Flores sendo ensacadas.



Figura 7 - Flores ensacadas após a Pulverização.

Fotos: BOMFIM, 2006.



Figura 8 - Flor após a retirada do saco no dia seguinte.

3.4 Avaliações

As avaliações foram realizadas aos 15 e 30 dias após a aplicação dos antagonistas, efetuando-se a contagem do número de frutos vingados, a fim de se obter o número médio de frutos efetivos (NMFE), de acordo com Góes (1995).

$$\text{NMFE} = (A/(A + B)) \times 100$$

A = N° DE BOTÕES VINGADOS

B = N° DE BOTÕES CAÍDOS

Após o último dia de avaliação todos os frutos foram colhidos e levados para a Biofábrica, sendo realizado isolamento para verificar a presença ou não dos antagonistas em estudo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Interações *in vitro*

4.1.1 Efeito de diferentes temperaturas no crescimento micelial de *Trichoderma* spp. e *Rhizopus stolonifer*

Os resultados podem ser observados na (Figura 9) onde as melhores temperaturas de crescimento dos isolados foram de 25°C e 30°C para todos os isolados em estudo, não havendo diferença significativa. Nessas temperaturas antagonistas e fitopatôgeno cobriram toda a superfície do meio, concordando com o observado por Jaill e outros (2006). Estes autores realizando investigações sobre as temperaturas ideais de crescimento de *Trichoderma* spp. observaram que as temperaturas ótimas de crescimento de *Trichoderma* spp. foram 25 a 28°C, e verificaram que nas temperaturas de 10 a 17°C os isolados não apresentaram um crescimento micelial satisfatório. No presente estudo, verificou-se também uma inibição no crescimento micelial de todos os isolados nas temperaturas de 10 e 15°C.

Pratella e Mari (1993), estudando o antagonismo de *Trichoderma harzianum*, *T. viride* a *Gliocladium roseum* observaram que os antagonistas não apresentaram crescimento micelial a 0 e 2°C e um pequeno desenvolvimento a 5 e 10°C, o que concorda com as observações do presente trabalho.

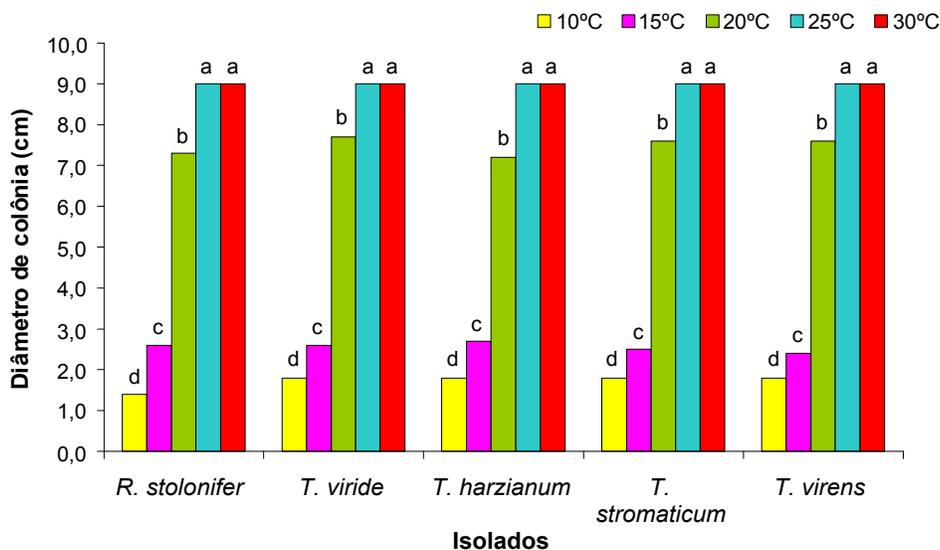


Figura 9 - Diferenças entre diâmetro médio de colônias de *Trichoderma* spp. e *R. stolonifer* incubado aos cinco dias, sob diferentes temperaturas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si em nível de significância a 5% de acordo com o teste Tukey.

No tratamento a 20°C houve um razoável crescimento dos isolados, porém não cobriram toda a superfície do meio, ficando claro que as melhores temperaturas para o desenvolvimento, tanto dos antagonistas quanto do fitopatógeno são acima de 20°C.

Através dos resultados obtidos, pode-se afirmar que tanto *R. stolonifer* como as espécies de *Trichoderma* spp. têm a mesma temperatura ótima de crescimento, aspecto importante, já que em estudos de controle biológico, o antagonista deve ter preferencialmente a mesma temperatura de crescimento do fitopatógeno; assim de acordo com Dennis e Webster (1971a) os isolados de uma mesma espécie, embora sejam morfológicamente semelhantes, podem diferir fisiologicamente e atuarem de maneira diferente quanto ao antagonismo, dependendo, portanto, mais das características fisiológicas do isolado que da

espécie propriamente dita. Além da possível variabilidade genética inerente a cada isolado, existem também fatores externos como equilíbrio nutricional e influência de temperatura que afetam o desenvolvimento.

4.1.2 Crescimento micelial em cultivo individual de *Trichoderma* spp. e *Rhizopus stolonifer*

Os resultados do crescimento micelial nos períodos de 24 e 48h estão apresentados na Tabela 1, e a taxa de crescimento em mm/h, na Figura 10. O crescimento micelial dos antagonistas em estudo nos períodos de 24 e 48h apresentaram diferença significativa em nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey, em relação ao fitopatógeno *R. stolonifer*.

Tabela 1 - Crescimento radial dos isolados de *Trichoderma* spp. e *Rhizopus stolonifer*.

ESPÉCIE	Crescimento micelial (mm)	
	24 horas	48 horas
T ₁ - <i>Rhizopus stolonifer</i>	25,00 b	55,00 b
T ₂ - <i>Trichoderma viride</i>	28,70 a	71,67 a
T ₃ - <i>Trichoderma harzianum</i>	28,71 a	71,63 a
T ₄ - <i>Trichoderma stromaticum</i>	28,69 a	71,67 a
T ₅ - <i>Trichoderma virens</i>	28,78 a	71,66 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Esta diferença ocorre pelas características de crescimento das espécies de *Trichoderma* spp. que possuem um crescimento rápido, geralmente em poucas horas ocupando toda a superfície da placa (CARABI-ADELL e outros, 2003).

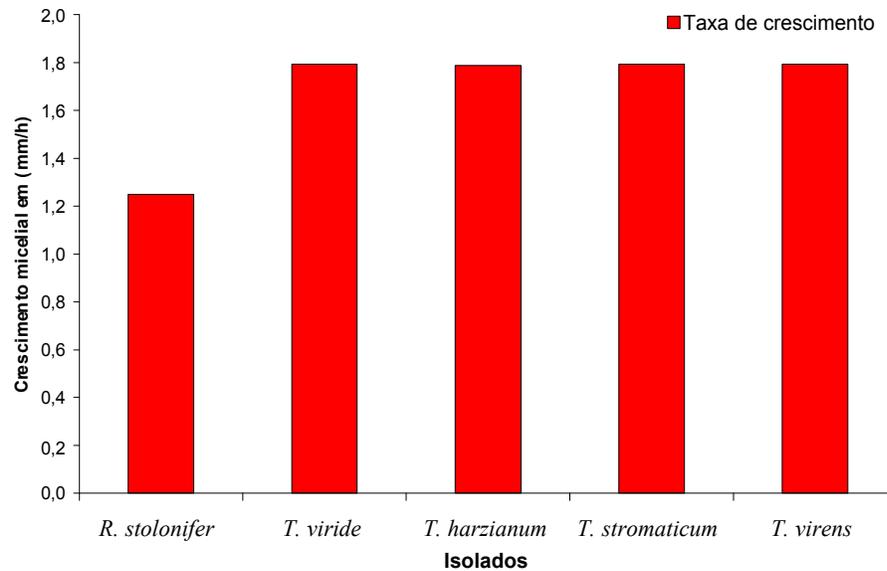


Figura 10 - Taxa de crescimento micelial de *Trichoderma* spp. e *Rhizopus stolonifer* em cultivo individual.

Com relação a taxa de crescimento micelial os dados obtidos não indicaram diferença significativa entre as espécies de *Trichoderma* estudadas, nas quais se obtiveram as maiores taxas de crescimento. Todos os antagonistas em estudo diferiram do *R. stolonifer*, que apresentou a menor taxa de crescimento (1,250 mm/h). Os resultados obtidos estão de acordo com os dados de Jackisch-Matsuura e Menezes (1999), ao estudarem o controle de *Pythium aphanidermatum* em fumo com espécies de *Trichoderma*. Os autores citados utilizaram, além das referidas espécies, isolados de *Trichoderma viride* e *T. harzianum*, os quais apresentaram taxas de crescimento, estatisticamente semelhantes entre si corroborando o presente estudo.

4.1.3 Crescimento micelial em cultivo pareado de *Trichoderma* spp. e *R. stolonifer*

Todos os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram rápido crescimento micelial em BDA. Com apenas três dias de incubação, os antagonistas já apresentavam uma inibição no desenvolvimento de *R. stolonifer*. Os diâmetros médios das colônias do fitopatógeno quando pareados com os isolados de *Trichoderma* spp. diferiram estatisticamente da testemunha (Figura 11).

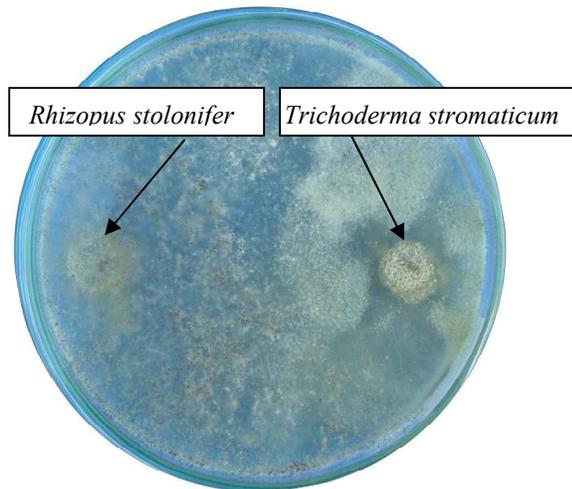


Figura 11 - Cultivo pareado de *R. stolonifer* e *Trichoderma stromaticum*.

Tabela 2 - Crescimento micelial de *Rhizopus stolonifer* em presença dos isolados de *Trichoderma* spp. avaliado por meio da técnica do pareamento.

Tratamentos	Dias de avaliação			
	4	8	12	16
T ₁ . <i>Rhizopus stolonifer</i>	9,00 a	9,00 a	9,00 a	9,00 a
T ₂ . <i>R. stolonifer</i> x <i>Trichoderma viride</i>	⁽¹⁾ 0,50 d	0,66 d	1,00 d	1,16 d
T ₃ . <i>R. stolonifer</i> x <i>T. harzianum</i>	1,16 c	1,50 c	1,66 c	1,83 c
T ₄ . <i>R. stolonifer</i> x <i>T. Stromaticum</i>	2,00 b	2,16 b	2,66 b	3,00 b
T ₅ . <i>R. stolonifer</i> x <i>T. virens</i>	2,00 b	2,33 b	3,00 b	3,00 b

⁽¹⁾Diâmetro da colônia de *R. stolonifer* (cm)

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Pelos dados da Tabela 2, verifica-se que houve diferença significativa entre os tratamentos, onde o T₂ apresentou uma maior inibição no crescimento do fitopatógeno, quando comparado aos demais tratamentos. Os tratamentos T₄ - *Trichoderma stromaticum* e T₅ - *T. virens* proporcionaram uma menor ação antagonica no crescimento do fitopatógeno em comparação aos outros. A menor ação antagonica nesses tratamentos pode ter resultado de uma maior competição pelos nutrientes do meio, ou uma menor produção de protease e cisteína, enzimas produzidas pelas espécies de *Trichoderma* que inativam a capacidade enzimática do fitopatógeno. Ao comparar os 4 tratamentos com a testemunha foi verificado que todos os isolados foram eficientes, visto que a testemunha aos quatro dias já cobria 100% da placa.

Mughogho (1967, 1968), citado por Dennis; Webster, (1971a), relatou que *Trichoderma viride* afetou o crescimento de *Rhizoctonia solani* e *Armillaria mellea*, mais do que qualquer outra espécie testada e que, isolados de *T. harzianum* não inibiram o crescimento desses fungos, diferentemente, portanto, dos resultados obtidos no presente trabalho, onde esta espécie inibiu o crescimento micelial de *R. stolonifer* diferente dos patógenos testados eles recobriram as colônias de *R. stolonifer*. A redução do crescimento da colônia do fitopatógeno, na presença de *Trichoderma* spp. pode ser atribuída a liberação de

metabólitos pelos antagonistas em estudo.

Ainda sobre a ação biocontroladora de espécies de *Trichoderma* spp. sobre fungos fitopatogênicos Michereff e outros (1993), em estudos *in vitro*, em culturas pareadas, constataram a ocorrência de zonas de inibição com as espécies de *Trichoderma harzianum* e *T. viride* em relação ao patógeno *Colletotrichum graminicola*. Verificaram, ainda, que essas espécies produziram metabólitos extracelulares, não voláteis, termoestáveis, difusíveis, que inibiram o crescimento do patógeno.

4.1.4 Metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *Rhizopus stolonifer*

Pelo teste de antibiose foi possível verificar a produção de metabólitos voláteis das espécies de *Trichoderma* spp. havendo uma inibição no desenvolvimento micelial do fitopatógeno (Figura 12). Os isolados *Trichoderma viride* e *Trichoderma harzianum*, respectivamente produziram notável efeito fungistático sobre o fitopatógeno.

O *Trichoderma viride* apresentou a melhor produção de metabólitos, visto que sua colônia, ao atingir cerca de 4,0cm inibiu completamente o crescimento de *R. stolonifer*.

Trichoderma stromaticum e *Trichoderma virens*, apesar de produzirem metabólitos capazes de inibir o crescimento do fitopatógeno, apresentaram instabilidade metabólica, pois, apesar de apresentar halo de inibição superior à média, após alguns dias, houve a retomada de crescimento de *R. stolonifer*.

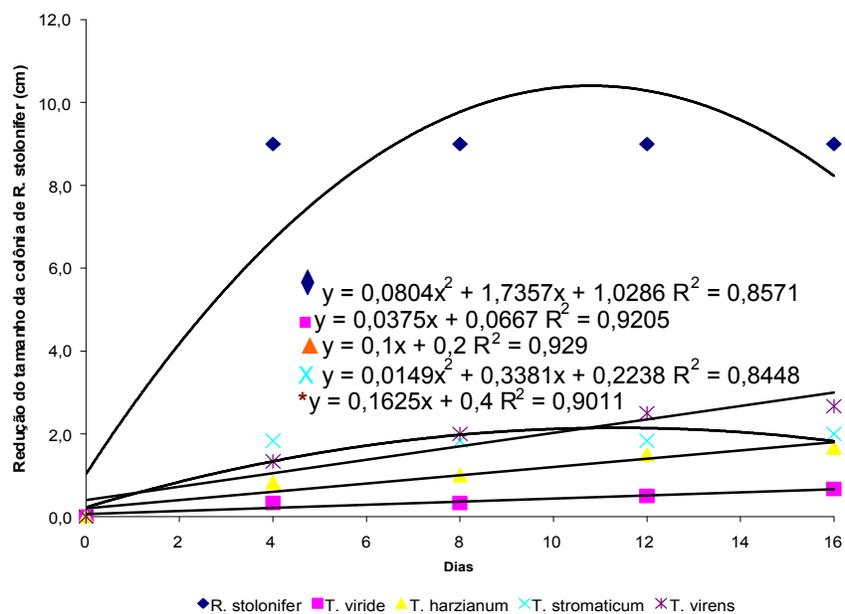


Figura 12 - Efeito de metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *Rhizopus stolonifer*

O fitopatógeno tornou-se reduzido na presença de *Trichoderma* spp. comparando com a testemunha que aos quatro dias já tomava quase 100% da placa o que está de acordo com Dennis e Webster (1971b), ao afirmarem que espécies de *Trichoderma* são eficientes produtoras de metabólitos voláteis em meio de cultura. Esses autores explicam que os antibióticos voláteis atuam sobre os fungos suscetíveis através da inibição do crescimento micelial.

Claydon e outros (1987), em estudo sobre a produção de metabólitos por *Trichoderma* spp. identificaram um composto produzido por *T. harzianum*, 5,6-dimetoxi-3-(2-metil-1-oxohex-4-enil)-2-piridona, ao qual foi dado o nome de harzianopiridona, que inibiu uma ampla gama de fungos fitopatogênicos.

Ordentlich e outros (1992), ao trabalharem com um isolado de *T. harzianum*, identificaram uma substância, que era produzida e excretada para o meio de cultura em grande quantidade, como 3-(2-hydroxypropyl)-4-(2hexadienyl)-2(5H)-furanone, um produto natural, capaz de inibir o crescimento de muitos microrganismos.

4.1.5 Teste de antibiose e efeito de metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. na sobrevivência de *R. stolonifer*

Observa-se na (Figura 13) que os antagonistas produziram efeito fungistático notável sobre o fitopatógeno. Comparando-se os dados do presente ensaio, com aqueles relativos à produção de metabólitos de *Trichoderma* spp. obtidos no ensaio anterior, verifica-se que todos os isolados em estudo produzem substâncias capazes de inibir o crescimento do fitopatógeno, apresentando diferença significativa em relação a testemunha, apesar de não diferirem entre si. Os metabólitos não voláteis produzidos pelos antagonistas provocaram um desenvolvimento micelial menos denso reduzindo o tamanho da colônia de *R. stolonifer* em comparação com a testemunha. Confirmou-se assim a produção de metabólitos não voláteis pelos antagonistas em estudo.

Os primeiros trabalhos científicos provando a produção de antibióticos por *Trichoderma* spp. foram realizados por Weidling (1934), que conseguiu identificar os antibióticos gliotoxina e viridina. Dennis e Webster (1971a, c) demonstraram que isolados deste gênero foram capazes de produzir metabólitos voláteis e não voláteis, com efeito inibitório sobre o crescimento de vários fungos. Entre os metabólitos voláteis, há gases como: etileno e cianeto de hidrogênio (CAMPBELL, 1989), acetaldeído, acetona, etanol e dióxido de carbono (TAMIMI; HUTCHINSON, 1975), que afetam o crescimento microbiano. Esses gases são ativos a baixas concentrações, mas não são

considerados como antibióticos. De acordo com Mangelot e Diem (1979), o CO₂ é uma das substâncias voláteis produzidas por antagonistas mais estudadas e seus efeitos em fungos são bastante variáveis, podendo ser estimulantes ou inibitórios, o mesmo ocorrendo com a amônia. Já o etileno não é inibitório, mas facilita a formação de derivados inibidores, como o alil-álcool.

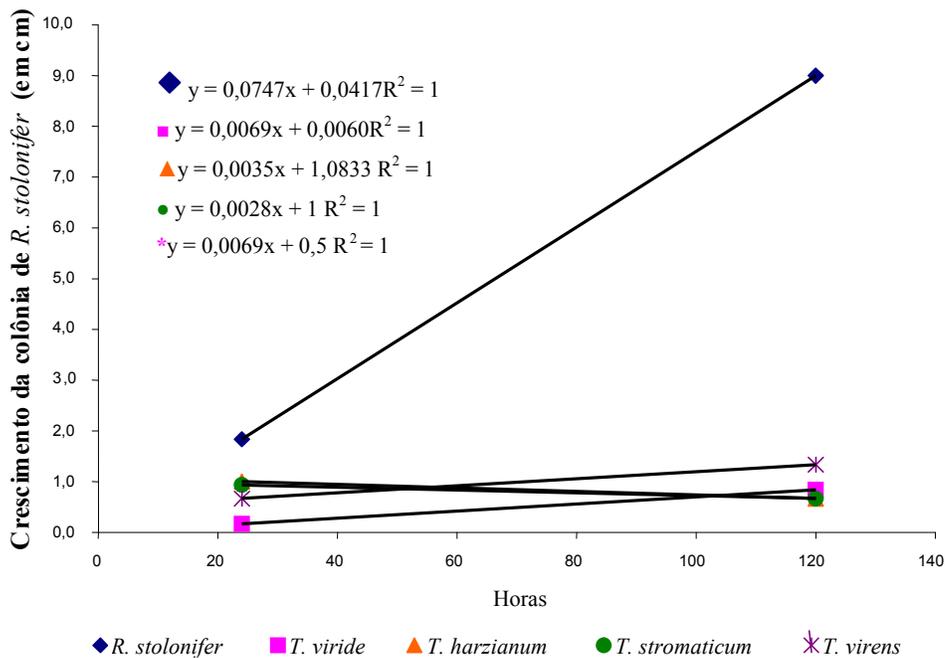


Figura 13 - Avaliação de metabólitos não voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. através da técnica do papel celofane.

Entre os efeitos provocados pelos antibióticos, podem ser observadas a redução ou paralisação do crescimento e esporulação, redução na germinação de esporos, além de distorções na hifa e endólise (CAMPBELL, 1989). Para Claydon e outros (1987), antibióticos são produtos do metabolismo secundário de seus produtores, e podem ser mais importantes na inibição de outros organismos do que a competição por nutrientes.

4.2 Interação *in vivo*

O antagonismo dos isolados de *Trichoderma* spp. *in vitro* foi confirmado através dos resultados obtidos em campo, quando comparando os dados com a testemunha (Tabela 3), constatou-se um controle eficiente do fitopatógeno, por todas as espécies de *Trichoderma* estudadas.

Os dados revelam que a doença ocorreu com grande intensidade e que, houve efeito significativo dos tratamentos aplicados. O Número Médio de Frutos Efetivos (NMFE) entre os antagonistas em estudo foi de 74% para os tratamentos T₃ - *Trichoderma harzianum* e T₅ - *T. virens*, e de 75% para os tratamentos T₂ - *T. viride* e T₄ - *T. stromaticum* enquanto que a testemunha controle teve um percentual de 42% de vingamento.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com aqueles encontrados por Ataide e outros (2003) estudando o antagonismo de *Trichoderma* sp. a *R. stolonifer* em cultivo *in vivo*, onde obteve um percentual de vingamento de botões florais de 70% contra 35% da testemunha.

Tabela 3 - Efeito dos agentes de controle biológico na porcentagem do (NMFE) número médio de frutos efetivos em condições de campo.

TRATAMENTOS	NMFE (%)
T ₁ - Testemunha	42 b
T ₂ - <i>Trichoderma viride</i>	75 a
T ₃ - <i>Trichoderma harzianum</i>	74 a
T ₄ - <i>Trichoderma stromaticum</i>	75 a
T ₅ - <i>Trichoderma virens</i>	74 a

O controle biológico, através de introdução de antagonistas, pode ser considerado uma alternativa viável para o controle de enfermidades no campo e na pós-colheita com base em estudos *in vitro* e *in vivo*. No controle de doenças da parte aérea espécies de *Trichoderma* têm demonstrado serem efetivas

reduzindo até 84% dos danos causados por *Botrytis cinérea* e 75% por *Curvularia eragrostidis* (ELAD; SHTIENBERG 1997, MICHEREF, DA-SILVEIRA, REIS, MARIANO, 1995).

Já existem no mercado cepas de *Trichoderma* spp. resistentes a alguns fungicidas entre eles, benomil, metalaxil e o propiconazol que podem ser usado ao mesmo tempo ou de maneira alternada no controle integrado dos fitopatógenos.

Efeito de *Trichoderma* spp. na sobrevivência de *R. stolonifer*

Com relação ao efeito de *Trichoderma* spp. na sobrevivência de *R. stolonifer*, foi realizado o reisolamento dos fungos através dos frutos colhidos no final do experimento, onde não foi constatada a presença do *Rhizopus* nos tratamentos, diferentemente da testemunha onde foi encontrado uma grande quantidade do fitopatógeno em todos os isolados realizados.

Com relação ao antagonismo de *Trichoderma*, (Figuras 14) mostra que todos os isolados utilizados nesse trabalho hiperparasitaram o fitopatógeno em campo.

A capacidade hiperparasitária de *Trichoderma*, já foi confirmada por diversos autores, em relação aos mais variados patógenos. Denis e Webster (1971a) verificaram o enrolamento de hifas de *P. ultimum* Trow. por hifas de *Trichoderma* sp. Chet e Elad (1983) observaram o parasitismo de *T. harzianum* sobre hifas de *R. solani*; May (1994) verificou o hiperparasitismo de cinco isolados de *Trichoderma* sobre hifas de *P. parasítica*.



Figura 14 - Frutos após aplicação dos tratamentos

Fotos: BOMFIM, 2006.

Verificando o desempenho dos microrganismos utilizados neste trabalho e em outros trabalhos de biocontrole de doenças, observou-se que alguns apresentaram um comportamento bem parecido e que não houve uma diferença entre as espécies de *Trichoderma* spp. em estudo, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, principalmente *in vivo* onde a maioria dos antagonista tem um comportamento muito diferenciado dos resultados encontrados *in vitro*; com isso, pode-se considerar que entre os antagonistas em estudo não há uma especificidade com relação ao fitopatógeno *Rhizopus stolonifer*.

4.3 Controle biológico *in vitro* e *in vivo* a *Rhizopus stolonifer*

A utilização de testes *in vitro* para a seleção de isolados microbianos é uma etapa que não pode ser desconsiderada em teste de controle biológico. É possível através deste ensaio, avaliar centenas de microrganismos do mecanismo de ação se este for relacionado à antibiose, parasitismo e competição.

O ensaio *in vitro* abrevia tempo, espaço e custos. Porém, em muitos casos o desempenho de antagonistas em condições controladas não corresponde ao desempenho em campo. Isto pode estar relacionado ao fato de que dificilmente é usado mais que um isolado do patógeno nos testes *in vitro*. Em campo o potencial microbiano é submetido, além das condições variadas, a diferentes isolados do patógeno. O sucesso de um bioagente resulta de uma seqüência de eventos que descortinarão diferentes atributos do microrganismo.

A temperatura pode ser considerada como ponto crítico no biocontrole de fitopatógenos, principalmente em ensaios *in vitro* visto que em temperaturas ideais de crescimento para o patógeno pode haver um efeito inverso onde o patógeno pode sobrepujar sobre o antagonista.

Deve-se avaliar o crescimento do antagonista e do patógeno sob diferentes faixas de temperaturas levando em conta o local onde foram encontrados. Não há garantia de que isolados de zonas frias sejam eficientes em zonas quentes e vice-versa. Também não há garantia mesmo com isolados da mesma zona.

A efetividade de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizopus stolonifer*, utilizando-se a técnica de confrontação direta (pareamento), além da antibiose observada no teste do papel celofane, permite supor que houve outras ações antagonicas, como o hiperparasitismo e a competição.

Através dos ensaios de produção de metabólitos voláteis e não voláteis de *Trichoderma* spp. pode-se sugerir que a inibição se deu por meio da produção de antibióticos já que a antibiose é um dos principais mecanismos de ação de *Trichoderma* spp.

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram efetivos no controle da podridão floral causada por *R. stolonifer*, elevando a porcentagem de pegamento de frutos para 74% a 75%, enquanto na ausência destes o índice de pegamento foi de 42%.

5 CONCLUSÕES

Nas condições em que o presente trabalho foi conduzido utilizando-se as espécies de *Trichoderma viride*, *T. harzianum*, *T. stromaticum* e *T. virens* conclui-se que:

As melhores temperaturas de crescimento dos antagonistas e fitopatógeno são 25°C e 30°C;

As espécies de *Trichoderma* apresentam velocidade de crescimento maior que o fitopatógeno nos períodos de incubação de 24 e 48h;

Em cultura pareada essas espécies são micoparasitas a *Rhizopus stolonifer*;

Os metabólitos voláteis e não voláteis das espécies de *Trichoderma* possuem ação fungistática a *Rhizopus stolonifer*;

As espécies em estudo controlam o *Rhizopus stolonifer*, agente causal da podridão floral em maracujazeiro em condições de laboratório e campo.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D.R.D.; SANTOS, C.C.F. Importância econômica e mercado. In: BRUCKNER, C.H.; PIÇANVO, M.C.; MANICA, I. (Ed.). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. 472p.
- AGRIOS, G. N. **Manual de Fitopatologia**. 2 ed. México, 1998. v1. 332-336p.
- ATAIDE, E. M. **Indução floral e produtividade do maracujazeiro amarelo em função do uso de reguladores de crescimento vegetal**. 2005. 100p. Tese (Doutorado) - UNESP Jaboticabal, SP.
- ATAIDE, E. M. et al. Controle biológico da podridão floral do maracujá amarelo. **Summa Phytopatologica**, v. 29. n. 1, p. 96, 2003.
- BAEK, J. M.; CHARLES, R; CHARLES, M. The role of extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv 29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. **Current Genetics**, v.35, p.41-50, 1999.
- BAKER, K.F.; COOK, R.J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: W.F. Freeman, 1974. 433p.
- BASTOS, C. N. Produção de metabólitos tóxicos por *Fusarium oxysporum f. passiflorae* causando murcha de plântulas de maracujá *Passiflora edulis Sims*. Turrialba, v. 26, n. 4, p. 371-373, 1976.
- BHARAT, R.; SINGH, V. N.; SINGH, D. B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. **Plant and Soil**, v. 57, p. 131-135, 1980.
- BENHAMOU, N. Elicitor-induced plant defense pathways. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 233-240, 1996.
- BENHAMOU, N.; CHET, I. Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2095-2099, 1997.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1. cap.36. p.717-728.

- BEZERRA, D.R.; LIMA, J.A.A.; FILHO, J.X. Purificação e caracterização de um isolado cearense do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, p.553-560, 1995.
- BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* **Canadian Journal of Botany**, v. 62, p. 924-931, sect./nov. 1984.
- BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 2357-2372, 1991a.
- BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 2372-2417, 1991b.
- BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 2418-2420, 1991c.
- BUDGE, S. P.; WHIPPS, J. M. Potential for integrated control of *Sclerotinia sclerotiorum* in glasshouse lettuce using *Coniothyrium minitans* and reduced fungicide application. **Phytopathology**, v. 91, p. 221-227, 2001.
- CAMPBELL, R. **Biological control of microbial plant pathogens**. Sidney: C.U.P, 1989. 218p.
- CARABI-ADELL et al. Uma técnica simples para observação microscópica de *Trichoderma* spp. (Hypocreales) em cultura de lâminas. In: REUNIÃO ATUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 15. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70 Suplemento, p. 35-37, 2003.
- CHAGAS, C.M. et al. Estirpe incomum do vírus do mosaico do pepino (CMV) isolado de maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.9, p. 402, 1984.
- CHAGAS, C.M. Doenças viróticas e similares do maracujazeiro no Brasil. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L. **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p.175-184.
- CHENG, Y. et al. Insertional mutagenesis of a fungal biocontrol agent leads to discovery of a rare cellobiose lipid with antifungal activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 2595-2602, 2003.
- CHET, I, ELAD, Y. Les antagonismes microbiens mode d'action at application a la lute biologique contole lês maladies dès plantes: Mechanism of

mycoparasitism. *Colloque INRA Instituto Nat. Rech. Agron.*) v. 18, p. 35-40. 1983.

COOK, R. J.; BAKKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: The American Phytopathological Society. 1983. 615p.

COLARICCIO, A. et al. **Mechanical transmisión and ultrastructural aspects of citrus leprosis disease**. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 20, p. 208-213, 1995.

CORABI-ADELL, C. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (HYPOCREALES – FUNGI) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica. (Tese) Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2004. 220p.

COVA, S. R. **Hongos Fitopatogenos**. Universidad Autonoma Chapingo, 1993. 108p.

DANIELSON, R.M., DAVEY, C.B. Nonnutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 5, p. 495-504, 1973a.

DANIELSON, R.M., DAVEY, C. B. The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 5, p. 485-94, 1973b.

DAVET, P. Technique pour l'analyse des population de *Trichoderma* et *Gliocladium virens* dans le sol. **Annales de Phytopathologie**, v. 11, p. 529-33, 1979.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. 1- Production of non volatile metabolites. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 57, pt.4, p. 25-39. feb. 1971a.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. 3- Hiphal Interaction. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 57, pt.3, p. 363-369, dec. 1971c.

Disponível em:

http://www.cca.ufscar.br/lamam/disciplinas_arquivos/aula5_fungos.ppt#293,36, Slide 36, Acessado em 19 de dezembro 2006.

ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 28, p. 719-725, 1982.

ELAD, Y. SHTIENBERG, D. Integrated management of foliar diseases in greenhouse vegetables according to principles of a decision support systemgreenman. **IOBC/WPRS Bulletin**, 20, 71-76. 1997.

EPARVIER, A.; ALABOUVETTE, C. Use of ELISA and GUS transformed strains to study competition between pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* for root colonization. **Biocontrol Science and Technology**, v. 4, p.35-47, 1994

ESPOSITO, E.; SILVA, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 89-98, 1998.

FLORES, A.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by overexpression of the proteinaseencoding gene prb1. **Current Genetics**, v. 31, p. 30-37, 1997.

FNP CONSULTORIA & AGROINFORMATIVOS. **Agrianual 2003**: anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo: 2003. p. 399-405.

GICZEY, G. et al. Expression of *cmg1*, an $\text{exo-}\beta\text{-1,3}$ -glucanase gene from *Coniothyrium minitans*, increases during sclerotial parasitism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 865-871, 2001.

GOES, A. Doenças fúngicas da parte aérea da cultura do maracujá. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5., Jaboticabal. **Anais...** p. 214-215. 1998.

GOES, A. de **Queda prematura de frutos cítricos: Caracterização do agente causal, *Colletotricum gloeosporioides* Penz. (Sensu Arx, 1957), e controle da doença**. 1995. 143p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

GRESSEL, J.B.; HARTMANN, K.M. Morphogenesis in *Trichoderma*. Action spectrum of photoinduced sporulation. **Planta**, v. 79, p. 271-274, 1968.

GULLINO M.L.; KUIJPERS L.A.M. Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 559-579, 1994.

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

HARMAN, G.E. Development tactics for biocontrol fungi in plant pathology. In: BAKER, R.R.; DUNN, P.E. **New directions in biological control**. New York: Willey - Liss, 1990. p. 779-792.

HALTRICH, D. et al. Production of fungal xylanases. **Bioresearch Technology**, v. 58, p. 137-142, 1996.

HUBBARD, J.P., HARMAN, G.E., HADAR, Y. Effect of soilborne *Pseudomonas* spp. on the biological control agent, *Trichoderma hamatum*, on pea seeds. **Phytopathology**, v. 73, p. 655-659, 1983.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v. 87, p. 4-10, 2003.

IBGE. 2004. Banco de Dados Agregados. Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA. Disponível em: <www.sidra.ibge.gov.br/bda>. Acessado em: 10 jul. 2006.

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

JAILL, C.; APABLAZA, G.; NOREIRO, A. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum* T-39 y la relación interbiótica con *Botrytis cinera* procedente de tomate. Facultad de Agronomía, pontificia Universidad Católica de Chile, santiago. Disponible en http://alerce.inia.cl/sochifit/VI.htm#Articulo_42. Consultado 10outubro 2006. 2006.

KATAYAMA, A.; MATSUMURA, F. Degradation of organochlorine pesticides, particularly endosulfan, by *Trichoderma harzianum*. **Environmental and Toxicological Chemistry**, v. 12, p.1059-1065, 1993.

KUBICEK, C.P. The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*: structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. **Advances in Biochemistry and Engineering Biotechnology**, v. 45, p. 1-27, 1992.

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

LIMA, L.H.C.; MARCO, J.L. de; FELIX, C.R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. cap. 8. p.263-284.

LORITO, M. et al. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. **Phytopathology**, v. 83, p. 302-307, 1993.

LORITO, M. et al. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 9, p. 206-213, 1996.

LUMSDEN, R. D.; LOCKE, J. C. Biological control of damping-off caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* in soiless mix. **Phytopathology**, v. 79, p. 361-366, 1989.

MADSEN, A. M.; NEERGAARD, E. Interactions between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and sclerotia of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, p. 761-768, 1999.

MANGENOT, F.; DIEM, H.G. Fundamentals of biological control. In: KRUPA, S.V.; DOMMERGUES, Y. R. (Eds.). **Ecology of root pathogens**, Amstenolam: Elsevier, p. 207-215, 1979.

MANICA, I. Fruticultura tropical: maracujá. In: **Doenças e Pragas**. 26. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., p. 105-121. 1981.

MARGOLLES-CLARCK, E.; ILMEN, M.; PENTTILA, M. Expression patterns of ten hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Journal of Biotechnology**, v. 57, p. 167-172, 1997.

MATHRE, D. E.; COOK, R. J.; CALLAN, N. W. From discovery to use – traversing the world of commercializing biocontrol agents for plant disease control. **Plant Disease**, v. 83, p. 972-983, 1999.

MAY, L. L. **Controle biológico, físico e químico de *Phytophthora parasitica* dastur em plântulas de citros**. 1994. 89p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MICHEREFF, S. J.; DA-SILVEIRA, N. S. S.; REIS, A. Greenhouse screening of *Trichoderma* isolates for control of *Curvularia* leaf spot of yam. **Mycopathologia**, 130, p103-108. 1995.

MICHEREFF, S. J., MENEZES, M., MARIANO, R. L. R. Antagonismo de espécies de *Trichoderma* sobre *Colletotrichum graminicola*, agente da antracnose de sorgo em condições de laboratório. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 19, n. 1, p. 14-17, 1993.

NADALINI, M. F. C.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; CARMONA, E. C. Cellulolytic activity of wild and mutant *Trichoderma pseudokoningii*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 39, n. 5-6, p. 351-356, 1999.

NARDO, E. A.B. de; CAPALBO, D. M. F. Utilização de agentes microbianos de controle de pragas: mercado, riscos e regulamentações. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. v. 1, cap.8, p.231-262.

NOVAES, Q.S. et al. Infecção natural de maracujazeiros por um Begomovírus transmitido por *Bemisia tabaci* no estado da Bahia. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, Espírito Santo do Pinhal. **Resumos...** p. 129. 25, 2002.

OLIVEIRA, C.R.B. et al. Purification, serology and some properties of the purple granadilla (*Passiflora edulis*) mosaic virus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, p.455-462, 1994

ORDENTLICH, A., WIESMAN, Z., GOTTLIEB, H.E., COJOCARU, M., CHET, I. Inhibitory furanone produced by the biological agent *Trichoderma harzianum*. **Phytochemistry**, Oxford, v.31, n.2, p.485-486, 1992.

PARKINSON, D., TAYLOR, G.S., PEARSON, R. Studies on fungi in the root region. I. The development of fungi on young roots. **Plant Soil**, v. 19, p. 322-329, 1963.

PASCHOLATI, S. F. **Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos.** 1998. 123p. Tese (Livre Docência) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PIZA JÚNIOR, C. T. Moléstias fúngicas do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R. **Maracujá: produção e mercado.** Vitória da Conquista: UESB – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, p. 108-115. 1994.

PRATELLA, G. C.; MARI, M. Effectiveness of *Trichoderma*, *Gliocladium* and *Paecilomyces* in postharvest fruit protection. **Postharvest Biology and Technology**, Oxford, v. 3, p. 49-56. 1993.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, v. 21, p.400-407, 2003.

REZENDE, D.V.; JUNQUEIRA, N. T. V. Queda de flores de maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryand) provocadas por *Rhizopus stolonifer* SAC. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, supl. p. 301, 1997.

RAGSDALE, N.N.; SISLER H.D. Social and political implications of managing plant diseases with decreased availability of fungicides in the United States. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 545-557, 1994.

RICARD, J.L. Commercialization of a *Trichoderma*-based mycofungicide: some problems and solutions. **Biocontrol News and Information**, v. 2, p. 95-98, 1981.

RIDOUT, C.J., COLEY-SMITH, J.R., LYNCH, J.M. Enzyme activity and eletrophoretic profile of extracellular protein induced in *Trichoderma* spp. by cell walls of *Rhizoctonia solani*. **Journal of General Microbiology**, v. 132, p. 2345-2352, 1986.

RIFAI, M.A. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological Papers**, v. 116, p. 47-56, 1969.

- ROTEM, Y.; YARDEN, O.; SZTEJNBERG, A. The mycoparasite *Ampelomyces quisqualis* expresses *exgA* encoding an exo- β -1,3-glucanase in culture and during mycoparasitism. **Phytopathology**, v. 89, p. 631-638, 1999.
- RUGGIERO, C. et al. **Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília: Embrapa; SPI, 1996. 64p.
- RUGGIERO, C.; OLIVEIRA, J.C. Enxertia do maracujazeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJÁ, 5., Jaboticabal, 1998. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, 1998. p.70-92.
- SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. **Mycological Research**, v. 100, n. 8, p. 923-935, 1996.
- SÃO JOSÉ, A. R.; REBOUÇAS, T. H.H.; NIETO ANGE, D.; PIRES, M. M de. BOMFIM, P. M. **Maracujá práticas de cultivo e comercialização**, Vitória da Conquista, BA, UESB/DFZ, 2000. 61p.
- SCHAFFNER, D. W., TOLEDO, R. T. Cellulase production by *Trichoderma reesei* when supplemented with sorbose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, p. 12-16, 1991.
- SMITH, W.H. Forest occurrence of *Trichoderma* species: emphasis on potential organochloride (Xenobiotic) degradation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Environmental Research, v. 32, p. 179-183, 1995
- TABET, J.C.; LICHTENSTEIN, E.P. Degradation of [14C] photodieldrin by *Trichoderma viride* as affected by other insecticides. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 22, p. 1345-1350, 1976.
- TAMIMI, K. M.; HUTCHINSON, S. A. Differences between the biological effects of culture gases from several species of *Trichoderma*. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 64, pt.3, p. 455-463, 1975.
- WEINDLING, R. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. **Phytopathology**, v. 24, p. 1140-1153, 1934.
- WELLS, H.D., BELL, D.K., JAWORSKI, C.A. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, v. 62, p. 442-447, 1972.

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

WOO, S. L. et al. Disruption of the *ech42* (endochitinaseencoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* P1. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 12, p. 419-429, 1999.

YAMASHIRO, T. Doenças do maracujazeiro. In: RUGGIERO, C. **Cultura do maracujazeiro**. Jaboticabal: FCAV, 1980. p.94-98.