

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

***Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole de *Cylindrocladium*
scoparium e como promotores de crescimento em mudas de eucalipto**

Magno Rodrigues de Carvalho Filho

**BRASÍLIA
2008**



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fitopatologia
Programa de Pós-graduação em Fitopatologia

***Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole de *Cylindrocladium scoparium* e como promotores de crescimento em mudas de eucalipto**

Magno Rodrigues de Carvalho Filho

Orientadora: Dr^a. Sueli Corrêa Marques Mello

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Fitopatologia.

BRASÍLIA

2008

Dissertação de Mestrado realizada junto ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília sob orientação da Pesquisadora Dr^a Sueli Corrêa Marque Mello. Apoio institucional da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Banca examinadora:

Dra. Sueli Corrêa Marques Mello (Orientadora)

Universidade de Brasília

Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dr. Adalberto Corrêa Café Filho

Universidade de Brasília

Dr. Alan William Vilela Pomella

Pesquisador- Laboratório de Biocontrole - Sementes Farroupilha

*Aos meus pais Magno Rodrigues de
Carvalho e Laura Suely Mendes Rodrigues
e aos meus irmãos Camyla e Renan
Mendes Rodrigues, **dedico.***

AGRADECIMENTOS

À minha família de um modo geral, em especial aos meus pais, Magno Rodrigues de Carvalho e Suely Mendes Rodrigues pelo amor, compreensão e confiança.

Agradeço a minha orientadora Dr^a Sueli Corrêa Marques Mello, pelos ensinamentos, orientação, conselhos e incentivos durante a realização deste trabalho e por ter me concedido uma oportunidade no início da minha carreira científica.

Aos professores, Café Filho, Juvenil Cares, Carlos Uesugi, Marisa Ferreira, Marisa Sanches, Carlos Inácio, Cláudio Lúcio Costa, Renato Rezende, Alice Nagata, pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia da UnB, principalmente Cesar e Ribamar e da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em especial aos pesquisadores Dr. João Batista Tavares da Silva e José Eustáquio de Menezes e à analista Irene Martins, pelo apoio, em diferentes formas.

Ao amigo Leonardo Minaré Braúna pelo incentivo, amizade e a grande ajuda na revisão da tese.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Fitopatologia, em especial, aos amigos Leonardo Albuquerque e, pela amizade e companheirismo durante todo o curso.

Ao Pesquisador Dr. Antônio Carlos Torres pela amizade, confiança e grande incentivo para ingressar em minha vida profissional.

Ao Sr. Simão L. Stanislawski, proprietário do Projeto Paraíso Verde, por haver disponibilizado a infra-estrutura para a condução dos estudos de campo e ao Fernando Flores Cardoso e Maria Flores Cardoso pelo apoio na condução dos ensaios.

À Empresa Sementes Farroupilha, em especial ao Dr. Alan Pomella ao Técnico Agrícola Valdetino Portinari, pelo apoio nos experimentos realizados em Patos de Minas (MG) e bons conselhos para minha vida profissional.

Ao Instituto Estadual pela disponibilização da área e especialmente ao Agrônomo Washington Luís, pelo apoio.

À International Paper, em especial à Simone Takahashi por ter cedido isolados de fungos.

Ao Pesquisador Dr. Miguel Michereff pelo precioso auxílio nas análises estatísticas.

À minha namorada, Sílvia Aranha por ter me incentivado, ajudado e principalmente pelo companheirismo.

Ao Dr. Marcos Freitas pelo auxílio no uso do programa de estatística.

Ao amigo Fabrício Oliveira pelo auxílio nos abstracts.

Aos meus amigos do Cenargen, Danilo, Rodrigo, Gisele, Artur e em especial ao amigo Renato Popov pela colaboração, alegria e amizade, fundamentais durante a condução de toda a dissertação.

Aos meus amigos Marcelo Junger, Rodrigo Lima, Hugo Santos, Fábio Moreth e Diego Riso pela amizade e incentivo.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro concedido.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por oferecer a infra-estrutura para a execução dos experimentos.

ÍNDICE

RESUMO GERAL.....	1
GENERAL ABSTRACT.....	3
INTRODUÇÃO GERAL.....	5
Referências Bibliográficas.....	15

CAPÍTULO I – Ocorrência de doenças foliares em viveiro de eucalipto comercial, no município de Luziânia (GO)

Resumo.....	20
Abstract.....	20
Introdução.....	21
Material e Métodos.....	21
Resultados e Discussão.....	22
Referências Bibliográficas.....	25

CAPÍTULO II - Produção de conídios de *Cylindrocladium scoparium* em meios líquidos

Resumo.....	27
Abstract.....	27
Introdução.....	28
Material e Métodos.....	28
Resultados e Discussão.....	30
Referências Bibliográficas.....	31

CAPÍTULO III - Avaliação de isolados de *Trichoderma* no controle da mancha foliar do eucalipto *in vitro* e quanto a esporulação em dois substratos sólidos

Resumo.....	32
Abstract.....	33
Introdução.....	34
Material e Métodos.....	35

Resultados e Discussão.....	42
Referências Bibliográficas.....	54

CAPÍTULO IV - Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético *in vitro* e colonização endofítica de mudas de eucalipto.

Resumo.....	57
Abstract.....	57
Introdução.....	58
Material e Métodos.....	60
Resultados e Discussão.....	64
Referências Bibliográficas.....	71
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I- Ocorrência de doenças foliares em viveiro de eucalipto comercial, no município de Luziânia (GO)

Tabela 1 – Patógenos foliares identificados em amostras foliares procedentes de viveiro comercial de eucalipto, Luziânia (GO).....	22
---	-----------

CAPÍTULO III - Avaliação de isolados de *Trichoderma* no controle da mancha foliar do eucalipto *in vitro* e quanto a esporulação em dois substratos sólidos

Tabela 1- Classificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. quanto ao antagonismo exercido sobre dois isolados de <i>Cylindrocladium scoparium</i> , no teste de pareamento de culturas	44
Tabela 2- Interações antagonistas entre hifas de <i>Trichoderma</i> e de isolados de <i>Cylindrocladium scoparium</i> , observadas ao microscópio óptico, com aumento de 40x.....	45
Tabela 3- Bioatividade de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. em relação ao crescimento micelial de dois isolados <i>Cylindrocladium scoparium</i> (CEN 494 e CEN 517).....	47
Tabela 4 - Bioatividade de metabólitos não voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. em relação ao crescimento micelial de dois isolados <i>Cylindrocladium scoparium</i> (CEN 494 e CEN 517).....	48
Tabela 5 - Efeito de isolados de <i>Trichoderma</i> na supressão da mancha-foliar de <i>C. scoparium</i> , em folhas de destacadas de eucalipto.....	49
Tabela 6 – Efeito dos substratos e tempo de incubação na esporulação de <i>Trichoderma</i>	51
Tabela 7 - Esporulação de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em dois substratos sólidos diferentes, aos 7 dias de incubação.....	52
Tabela 8 - Esporulação de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em dois substratos	

sólidos aos 11 dias de incubação..... 53

CAPÍTULO IV - Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético *in vitro* e colonização endofítica de mudas de eucalipto

Tabela 1 - Promoção de desenvolvimento de mudas de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, Luziânia, GO..... 64

Tabela 02 - Promoção de desenvolvimento em mudas de *Eucalyptus urophylla* por isolados de *Trichoderma*, Patos de Minas (MG)..... 66

Tabela 03 – Detecção da presença endofítica de *Trichoderma* em mudas tratadas com isolados do fungo..... 70

ÍNDICE FIGURAS

CAPÍTULO I- Ocorrência de doenças foliares em viveiro de eucalipto comercial, no município de Luziânia (GO)

Figura 1 – Mancha foliar causada por <i>Hainesia sp.</i>	23
Figura 2 – Mancha foliar causada por <i>Pestalotiopsis sp.</i>	23
Figura 3 – Mancha foliar causada por <i>Pleospora sp.</i>	24
Figura 4 – Mancha foliar causada por <i>Cylindrocladium scoparium</i>	24
Figura 5 – Mancha foliar causada por <i>Rhizoctonia solani</i>	25

CAPÍTULO III - Avaliação de isolados de *Trichoderma* no controle da mancha foliar do eucalipto *in vitro* e quanto a esporulação em dois substratos sólidos

Figura 1 - Escala diagramática de severidade (% de área foliar lesionada) da mancha - foliar causada por <i>Cylindrocladium spp.</i> em eucalipto 40x.....	41
Figura 2 - Interações observadas ao microscópio óptico entre hifas de <i>C. scoparium</i>	46

CAPÍTULO IV - Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético *in vitro* e colonização endofítica de mudas de eucalipto

Figura 01 – Enraizamento e crescimento de híbridos de <i>Eucalyptus grandis x Eucalyptus urophylla</i> em substrato tratado com os isolados de <i>Trichoderma</i> , CEN 162, CEN 209, CEN 262, CEN 498, CEN 500 e com aspersões adicionais com suspensões fúngicas.....	65
Figura 02 – Produção de AIA pelos os isolados de <i>Trichoderma spp.</i> a 535 nm de absorbância.....	68

Resumo geral

***Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole da mancha-foliar causada por *Cylindrocladium scoparium* e como promotores de crescimento em mudas de eucalipto**

Um breve levantamento de patógenos foliares em área de produção comercial de mudas de eucalipto em um viveiro comercial de eucalipto no município de Luziânia (GO) revelou a ocorrência de cinco patógenos: *C. scoparium*, *Pleospora* sp., *Hainesia* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Rhizoctonia solani* (Capítulo I). Dentre esses patógenos de eucalipto (*Eucalyptus* sp.), destaca-se a mancha foliar causada pelo *Cylindrocladium spp.* Morgam (Teleomorfo: *Calonectria* sp. De Not). Esta enfermidade é especialmente importante em viveiros para a produção de mudas de eucaliptos, especialmente na clonagem de híbridos da espécie. O controle da doença tem sido baseado, principalmente, no tratamento das plantas com a aplicação de fungicidas em todos os estágios da clonagem do eucalipto.

No capítulo II, foram testados os meios de cultura líquidos SG (Sacarose-Glicose), BD (Batata-Dextrose) e SDY (Extrato de levedura) para a produção de esporos de *C. scoparium*. O meio líquido SG possibilitou a produção de conídios dos dois isolados do patógeno que se mostraram infectivos em folhas de eucalipto.

Para elaborar um programa de controle biológico contra doenças de plantas, é necessária seleção de antagonistas bem adaptados com alto grau de controle contra os fitopatógenos e, preferencialmente, que promovam o crescimento e enraizamento das miniestacas.

Neste trabalho foram selecionados cinco isolados de *Trichoderma* por meio de testes *in vitro* e *in vivo*, foi avaliado o controle biológico de dois isolados de *Cylindrocladium scoparium* em folhas destacadas, a habilidade dos isolados do antagonista como produtores do hormônio de crescimento ácido Indolacético (AIA) e quanto à

capacidade de colonização endofítica, em mudas de clones híbridos (G-100) de eucalipto. Estudou-se a promoção de crescimento e enraizamento de mudas de *Eucalyptus urophylla* obtidas por sementes e no híbrido G-100 (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*) obtido por clonagem. Também foi estudada a capacidade de esporulação dos isolados de *Trichoderma* em dois substratos sólidos: grãos de arroz parboilizado de milheto.

Os experimentos *in vitro* consistiram em pareamento de colônias e exposição do patógeno a metabólitos voláteis e não voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. Observaram-se alterações morfológicas em hifas e inibição no crescimento micelial de *C. scoparium*. Em folhas destacadas de eucalipto, os cinco isolados de *Trichoderma* conferiram proteção contra a doença, sendo que o isolado CEN 517 de *C. scoparium* mostrou-se mais agressivo comparado ao CEN 494 de *C. scoparium*, quando quantificados os níveis de incidência da mancha foliar.

Os dados obtidos na esporulação dos antagonistas em arroz parboilizado e milheto revelaram grande variação entre esses isolados. O isolado CEN 262 (*T. harzianum*) apresentou maior produção de esporos em ambos os substratos, aos 07 e 11 dias de incubação (capítulo III).

Nos experimentos para a avaliação da promoção de crescimento, utilizando cinco isolados de *Trichoderma* selecionados nos ensaios de laboratório, o isolado CEN 262 apresentou um incremento significativo da matéria seca das raízes, da parte aérea e da altura das mudas. *In vitro*, constatou-se a produção de AIA pelos seguintes isolados: CEN 209, CEN 500 e CEN 262. O isolado CEN 262 apresentou concentração do hormônio 19 vezes maior que o CEN 209. Os isolados CEN 162, CEN 262, CEN 498 demonstraram capacidade de colonizar raízes de eucalipto (capítulo IV).

General Abstract

***Trichoderma* spp. as agents for biocontrol of leaf-spot caused by *Cylindrocladium scoparium* and as growth promoter in eucalyptus seedlings**

A brief survey of leaf pathogens in a commercial production area of eucalyptus seedlings in a commercial nursery in the municipality of Luziânia (GO) showed the occurrence of five pathogens: *C. scoparium*, *Pleospora* sp., *Hainesia* sp., *Pestalotiopsis* sp. and *Rhizoctonia solani* (Chapter I). Among these pathogens of eucalyptus (*Eucalyptus* spp.), leaf spot caused by *Cylindrocladium* spp. Morgam (Teleomorph: *Calonectria* sp. de Not) stands out. This disease is especially important in nurseries that produce eucalyptus seedlings, especially in the cloning of hybrid species. Control of the disease has been based mainly on treating plants with fungicides at all stages of eucalyptus cloning.

In Chapter II, liquid culture media SG (Sucrose-Glucose), BD (Potato-Dextrose) and SDY (Yeast extract) were tested to produce spores of *C. scoparium*. The SG liquid medium enabled the production of conidia of two pathogen isolates, which were showed to be infective in eucalyptus leaves.

To draw up a biological control program against plant diseases, it is necessary and appropriate to select well adapted antagonists with a high degree of control against the plant pathogens and, preferably, to promote growth and rooting of the minicuttings.

In this study five isolates of *Trichoderma* were selected through *in vitro* and *in vivo* tests. The biological control of two isolates of *Cylindrocladium scoparium* in detached leaves was evaluated, as well as the ability of the antagonist isolates to produce indoleacetic acid (IAA) growth hormone and for endophytic colonization in seedlings of hybrid clones (G-100) of eucalyptus. The promotion of plant and root growth was studied in *Eucalyptus urophylla* seedlings obtained from seeds and in the hybrid G-100

(*Eucalyptus urophilla* x *Eucalyptus grandis*) obtained by cloning. The capacity of *Trichoderma* isolates to sporulate in two solid substrates, grains of parboiled rice and millet, was also studied.

The *in vitro* experiments consisted of pairing colonies and exposing the pathogen to volatile and non-volatile metabolites produced by *Trichoderma* spp. Morphological changes were observed in hyphae and inhibition of micelial growth of *C. scoparium*. On detached eucalyptus leaves, the five *Trichoderma* isolates gave protection against the disease, and isolate CEN 517 of *C. scoparium* proved to be more aggressive than CEN 494 of *C. scoparium*, when the levels of incidence of leaf spot were quantified.

The results obtained for sporulation of antagonists in grains of parboiled rice and millet showed great variation between these isolates. The isolate CEN 262 (*T. harzianum*) showed higher production of spores in both substrates, at 07 and 11 days of incubation (Chapter III).

In experiments to evaluate growth promotion, using five isolates of *Trichoderma* selected in laboratory tests, isolate CEN 262 (*Trichoderma harzianum*) showed a significant increase in dry roots, shoots and height of the seedlings. *In vitro*, the production of IAA was observed in the following isolates: CEN 209, CEN 500 and CEN 262. Isolate CEN 262 presented concentration of the hormone that was 19 times greater than that of CEN 209. CEN 162, CEN 262 and CEN 498 isolates demonstrated capacity to colonize roots of eucalyptus (Chapter IV).

Introdução Geral

As florestas existentes no mundo somam cerca de quatro bilhões de hectares, cobrindo aproximadamente 30% da superfície terrestre do globo. Cinco países concentram mais da metade desta área – a Federação Russa, Brasil, Canadá, Estados Unidos e China. No Brasil, cuja área territorial é de 851,5 milhões de hectares, há 477,7 milhões de hectares cobertos com florestas. As plantações florestais comerciais ocupam 0,67% do território nacional, somando 5,74 milhões de hectares, dos quais, 3,55 milhões são de eucalipto; 1,82 milhões de *Pinus* e 370,5 mil de outras espécies (SBS, 2007).

O eucalipto (*Eucalyptus* spp.) ocorre naturalmente na Austrália, Indonésia e ilhas próximas. O gênero *Eucalyptus* pertence à família das Mirtáceas, com cerca de 600 espécies e subespécies, apresenta ampla plasticidade e dispersão mundial, crescendo satisfatoriamente em diferentes situações edafoclimáticas. Menos de 1 % dessas 600 espécies têm sido usadas com propósitos industriais. Assim, o uso do eucalipto na indústria mundial é baseado em três espécies: *E. globulus*, *E. grandis* e dos híbridos gerados do cruzamento com *E. urophylla* (Santos et al., 2001).

É notório que as florestas nativas foram exploradas irracionalmente ao longo dos séculos, devido à grande demanda por madeira, que durante muito tempo foi o principal combustível disponível, e de matéria-prima para as construções. Aos poucos, as florestas plantadas vêm ocupando esse papel, promovendo a preservação e a restauração das florestas nativas remanescentes. O Brasil é o sétimo país do mundo em áreas plantadas com florestas, que representam aproximadamente 7,7% das áreas agriculturáveis do País. A presença dessas florestas cultivadas se traduz em ganhos ambientais evidentes, reduzindo a pressão sobre as florestas naturais e contribuindo para a recuperação de áreas degradadas e preservação dos solos. As características climáticas do Brasil e a tecnologia de manejo florestal aqui desenvolvida fazem da eucaliptocultura uma atividade

extremamente promissora, economicamente viável, ambientalmente correta e socialmente justa. Desta atividade silvicultural, destina-se principalmente à produção de papel e carvão, mas o setor congrega também as empresas florestais voltadas para geração de energia, indústria moveleira, painéis de madeira e madeira sólida. A cadeia produtiva, que tem por base as florestas plantadas, gera cerca de 4,1 milhões de empregos e é responsável por 4,5% do Produto Interno Bruto, (Abraf, 2005).

Atualmente, quase tudo se aproveita na eucaliptocultura. Das folhas, extraem-se óleos essenciais empregados em produtos de limpeza, alimentícios, perfumes e até na medicina. A casca oferece o tanino, usado para curtimento do couro. O tronco fornece madeira para sarrafos, lambris, ripas, vigas, postes, varas, esteios para minas, mastros para barcos, tábuas para embalagens e móveis. Sua fibra é utilizada como matéria-prima para indústria de papel e celulose (Alfenas et al., 2004).

Em condições de viveiro, as doenças que mais afetam as mudas de eucalipto são: tombamento e podridão de estacas para enraizamento e as manchas foliares causadas por espécies de *Cylindrocladium*. O mecanismo de ataque deste patógeno não está totalmente elucidado, porém, sabe-se que a atuação de exoenzimas e fitotoxinas produzidas por estes organismos são importantes na penetração e colonização do hospedeiro (Schwan-Estrada et. al., 2003). *Cylindrocladium* spp. são espécies que produzem estruturas de resistência, os microesclerócios, responsáveis por sua sobrevivência nos tecidos das plantas infectadas e no solo, sob condições adversas. Quando as raízes das plântulas entram em contato com os microescleródios, estes germinam, originando a infecção (Cordell et. al., 1989). Tanto o *Cylindrocladium* quanto outros fungos fitopatogênicos causam redução na taxa de crescimento e desenvolvimento da planta, motivada por danos na parte aérea, caule ou radicular, reduzindo a quantidade e a qualidade dos produtos (Isaac, 1992).

Morgan em 1892, trabalhando com folhas de *Gleditshia triacanthos*, descreveu o gênero *Cylindrocladium*, como organismo de reprodução assexuada que tem no gênero *Calonectria* De Not, a sua fase sexuada ou perfeita, pertencente do filo Ascomycota (Crous & Wingfield, 1994).

Fungos do gênero *Cylindrocladium* podem causar variados tipos de sintomas em todos os órgãos e estádios da planta. A incidência desses fungos na produção de mudas de eucalipto por estaquia em viveiros pode ocasionar tombamento durante o enraizamento. Os sintomas de tombamento são: apodrecimento das raízes e posteriormente do caule e morte da planta. Sinais do patógeno podem ser observados em forma de micélio cotonoso branco nas áreas afetadas. Brotações infectadas, substratos, bandejas e tubetes contaminados podem, nesta fase, constituir fontes de inóculo para as estacas (Alfenas et al., 1997). Manchas foliares em eucalipto derivadas da patogênese do fungo podem ser encontradas em quaisquer partes das folhas e em diferentes idades da planta, com maior importância nos estádios mais jovens do eucalipto (Ferreira, 1989). Os sintomas das manchas foliares são numerosas lesões no limbo, individualmente pequenas (1 a 7 mm de diâmetro), circulares a alongadas (Ferreira et al., 1992), com sinais caracterizados também pela presença de um micélio cotonoso.

O conceito de controle de doenças mudou nas últimas décadas. Anteriormente, o objetivo era eliminar completamente o patógeno com o uso indiscriminado e contínuo de produtos químicos, sem medir as conseqüências. Esse procedimento provocou alterações no ambiente, como a seleção de patógenos resistentes, ocorrência de surtos de doenças consideradas secundárias, diminuição de microorganismos benéficos, além dos efeitos nocivos ao homem, animais e na qualidade ambiental, com o crescente acúmulo de resíduos no solo, na água e nos alimentos (Grigolleti, 2000).

Nos dias atuais, tem-se notado uma crescente preocupação, em todo o mundo, com os problemas ambientais decorrentes das diversas atividades humanas, incluindo a agricultura. Essa preocupação, que se traduz na busca por uma agricultura “limpa”, alimentos sem resíduos e conservação dos recursos naturais, demanda novas tecnologias, assentadas nos conceitos ecológicos e de sustentabilidade. O controle biológico se ajusta a esses conceitos, por isso vem ganhando mais espaço nos últimos anos.

Cook e Baker (1983) conceituam controle biológico como redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno ou parasitando seus estados de atividade ou dormência, por um ou mais organismos, realizado naturalmente ou através da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas. Esse método tem sido usado no controle de vários fitopatógenos presentes em diferentes culturas como as hortaliças, cereais, soja, feijão, eucalipto, dentre outras. Os componentes do controle biológico de plantas são os patógenos, os hospedeiros e os antagonistas, interagindo num sistema biológico, onde todos sofrem isolada ou conjuntamente influências do ambiente (Bettioli 1991).

Existe uma grande quantidade de produtos à base de fungos disponibilizada para comercialização, com registro, no exterior. Esses produtos apresentam qualidade variável em termos de formulação, concentração do ingrediente ativo e vida de prateleira. Os biofungicidas são resultados de um processo que inclui a seleção do agente de biocontrole, com extensiva avaliação da eficácia, desenvolvimento do formulado, registro, “scale up” e avaliação do mercado (Tigano & Mello, 2006). Eles podem ser aplicados diretamente no solo ou em tratamento de sementes ou, ainda, como inoculantes de partes aéreas, tais como folhas e órgãos de propagação, a depender da parte da planta que se deseja proteger.

Os fungos anamórficos do gênero *Trichoderma* (Hypocerales, Ascomycota) estão entre os microrganismos mais estudados como agentes de biocontrole. Eles têm sido também amplamente relatados como promotores de crescimento (Bettiol & Ghini, 1995; Fortes et al., 2007).

A literatura traz exemplos, como no caso do isolado de *T. harzianum* 2413 citada por Benítez et al. (2004), que estimula o crescimento de plantas de tomate, fumo e algodão e ao mesmo tempo as protege contra vários patógenos fúngicos. Certos isolados seriam capazes de colonizar raízes produzindo compostos que estimulam crescimento e mecanismos de defesa das plantas a doenças e estresses abióticos. Ainda, de acordo com esses autores, junto com a síntese ou estimulação da produção de fitohormônios estimuladores do crescimento, alguns isolados de *Trichoderma* acidificam o ambiente à sua volta, por secreção de ácidos orgânicos resultantes do metabolismo de compostos carbônicos, principalmente glicose, por isso são capazes para solubilizar fosfatos e micronutrientes. Embora a habilidade de isolados de *Trichoderma* como protetores de plantas a doenças radiculares seja atribuída aos efeitos diretos contra os patógenos, a própria associação do agente de biocontrole com as raízes também resultaria em efeitos benéficos nas plantas.

O primeiro trabalho que descreve *Trichoderma* como agente de biocontrole de fitopatógenos foi publicado por Weindling (1932). Desde então, várias espécies do gênero vêm sendo pesquisadas e desenvolvidas como biofungicidas para diversos fungos fitopatogênicos (Adams, 1990). Trata-se de um gênero formado por fungos cosmopolitas de solo e frequentemente encontrado associado à madeira em decomposição, com espécies que são eficientes produtoras de enzimas industriais e, por isso, economicamente importantes (Druzhinina & Kubicek, 2005). Muitos são produtores de antibióticos ou tem aplicação no controle biológico, por diferentes mecanismos (Harman, 2000).

O gênero *Trichoderma* foi proposto por Person (1794). Porém, sua taxonomia e identificação até os dias de hoje permanecem obscuras. As características macroscópicas adotadas para diferenciação do gênero (rápido crescimento em meio de cultura, micélio aéreo esparso e pústulas conidiogênicas verdes ou brancas) e mesmo, as características de conidióforos e conídios, são variáveis e em muitos casos semelhantes às encontradas nos gêneros *Gliocladium* Corder e *Verticillium* Nees (Gams & Bisset, 1998). Rifai (1969) propôs um delineamento genérico, pelo qual, reconhecem-se nove espécies agregadas: *T. hamatum* Bain, *T. viride* Persoon, *T. aureoviride* Rifai, *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Lieckfeldt, *T. pseudokoningii* Rifai, *T. longibrachiatum* Bissett, *T. polysporum* Link e *T. glaucum* Rifai, admitindo que algumas delas, particularmente *T. hamatum*, possam conter duas ou mais espécies morfologicamente indistintas. Bisset (1991) e Gams & Bisset (1998) revisaram as espécies agregadas de Rifai, estabelecendo a subdivisão do gênero em cinco seções: *Longibrachiatum*, *Pachybasium*, *Trichoderma*, *Saturnisporum* and *Hypocreanum*. Estes últimos autores sugerem que talvez as espécies a serem acomodadas no gênero possam, em alguns casos, serem resolvidas tão-somente por suas conexões com os teleomorfos (que no caso de *Gliocladium* parece ser polifilético) e a partir de estudos de relacionamento genético, mediante investigação molecular.

De acordo com os atuais conceitos, a maioria dos taxa amostrados e determinados antes de 1969 estariam incorretos (Druzhinina & Kubicek, 2004). Estes autores propõem a utilização de marcadores moleculares, especialmente as diferenças na seqüência de nucleotídeos das regiões ITS1 e ITS2 para determinação de espécies. Com esses marcadores, teriam sido distinguidos 70 de 77 espécies de *Trichoderma* e *Hypocrea*. De acordo com os autores, alguns dos taxa não identificados, uma vez delimitados mediante a utilização desse método, poderiam ser mais facilmente separados por critérios morfológicos.

A despeito do que foi dito anteriormente, a maioria das espécies de *Trichoderma* seguem sendo definida com base na morfologia, enquanto análises de seqüências gênicas têm sido empregadas apenas como complementos na confirmação ou distinção de taxa. Chaves de identificação podem ser encontradas, em forma impressa, como a proposta por Gams e Bisset (1998) ou interativa disponível na internet (<http://nt.ars.grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>).

O sucesso no uso de espécies de *Trichoderma* no biocontrole de fitopatógenos reside em sua alta capacidade reprodutiva, habilidade de sobreviver em condições desfavoráveis, eficiência na mobilização e absorção de nutrientes, capacidade de modificar a rizosfera (acidificação pela produção de ácidos orgânicos), agressividade contra fungos fitopatogênicos e eficiência como promotoras de desenvolvimento das plantas (Chet et al., 1997) e na estimulação dos seus mecanismos de defesa (De Meyer et al, 1998; Yedidia et al, 2001).

Os mecanismos utilizados pelas espécies de *Trichoderma* para reconhecer e controlar os fungos fitopatogênicos não é totalmente conhecido, apesar de que alguns determinantes desses mecanismos já foram identificados (Grinyer, 2005). Antagonistas desse gênero utilizam basicamente quatro mecanismos de ação no controle de fitopatógenos: micoparasitismo, antibiose, competição e a indução de mecanismos de defesa da planta (Van Driesche & Bellows, 1996).

De acordo com Cassiolato (1998) o micoparasitismo é uma forma comum de associação entre organismos, por meio do qual se estabelecem relações nutricionais favoráveis à existência do micoparasita, que pode ser principalmente: necrotrófica – o micoparasita mata o hospedeiro, utilizando seu conteúdo celular como fonte de nutrição; biotróficas – o micoparasita obtém nutrientes das células do hospedeiro sem acarretar, a

estes, danos imediatos. De acordo com Benítez et al. (2004), o micoparasitismo como ação direta de um fungo contra outro fungo compreende um complexo processo que envolve eventos seqüenciais, incluindo reconhecimento, ataque e a subsequente penetração, seguida de morte do hospedeiro.

Outro mecanismo de ação que também pode ocorrer durante interações do *Trichoderma* com fungo é a antibiose, onde há envolvimento de compostos difusos de baixo peso molecular, os antibióticos na inibição do fungo alvo. A maioria dos isolados de *Trichoderma* produzem metabólitos tóxicos voláteis e não voláteis, os quais atuam na supressão da colonização do organismo atingido. Dentre esses metabólitos, são conhecidos: ácido harziânico, alamethicinas, tricholina, antibióticos, glisopreninas, ácido heptelídico, gliovirina, viridina e massoilactona (Benítez et al., 2004). Weindling (1934) demonstrou a produção, por *T. lignorum*, de um metabólito descrito por ele como “princípio letal”, com capacidade de controlar o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn e outros fungos *in vitro*. Esse “princípio letal” foi identificado posteriormente como o antibiótico Gliotoxina (Weindling, 1941). A partir dos trabalhos pioneiros conduzidos por Weindling, vários outros foram conduzidos, resultando na identificação de um vasto número de antibióticos produzidos por fungos.

Competição tem sido considerada um dos mais eficientes mecanismos de ação usados por *Trichoderma* e está relacionada à capacidade desses organismos em mobilizar e absorver prontamente os nutrientes à sua volta e de utilizar diferentes fontes, por exemplo, de carbono. Assim eles se multiplicam e colonizam rapidamente a rizosfera. Além disso, várias espécies de *Trichoderma* se caracterizam por sua resistência a diferentes compostos tóxicos, não apenas àqueles produzidos e liberados pelas plantas em resposta ao ataque por patógenos, como também, a vários agrotóxicos comumente utilizados na agricultura (Chet et. al., 1997; Benítez et al., 2004). Também a competição por espaço ou sítios de infecção

poderá ocorrer concomitantemente contribuindo para a atividade de biocontrole (Vinale et al., 2008). De acordo com Gullino (1992), o controle de *Botrytis cinerea* Persoon ex Fries em videiras por *T. harzianum* é decorrente da colonização dos tecidos florais, que constituem os sítios de infecção do patógeno. Sivan & Chet (1989) postularam que a competição por nutrientes seja o principal mecanismo usado por *T. harzianum* no controle de *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *melonis*.

A indução de resistência é outro mecanismo de controle biológico no qual a planta responde à agressão por patógenos por meio da produção de fitoalexinas, lignina adicional das células e compostos fenólicos (Horsfall & Cowling, 1980; Bailey, 1985). Tais respostas podem também ocorrer ao contato com organismos não patogênicos ou isolados não virulentos do patógeno (Van Driesche & Bellows, 1996).

Vários estudos com *Trichoderma* vêm indicando a capacidade de certos isolados em promover o crescimento de plantas. Em trabalhos conduzidos por Melo (1996), duas linhagens mutantes de *T. koningii* antagônicas a *Sclerotinia sclerotiorum* de Bary revelaram ser eficientes produtoras de celulase, além de promoverem emergência e acúmulo de massa seca em plântulas de pepino. Resende (2004) observou que sementes de milho inoculadas com um isolado de *T. harzianum*, também, promoveram acúmulo de massa seca nas raízes. Embora os mecanismos pelos quais isolados de *Trichoderma* possam atuar como promotores de desenvolvimento de plantas não estejam completamente elucidados, existem evidências da produção de ácido Indolacético (AIA), cujas principais funções nos vegetais superiores consistem na regulação do crescimento por alongamento de caules jovens (Gravel, 2007). Esse mesmo autor cita, ainda, a solubilização de fosfato por *Trichoderma* e conseqüente disponibilização de fósforo, um macronutriente extremamente importante para desenvolvimento das culturas agrícolas.

As espécies de *Trichoderma* possuem um amplo espectro de ação, podendo atuar contra patógenos de raízes, foliares e nas fases de pré e pós-colheita. Dentre vários exemplos de biocontrole de doenças exercido por *Trichoderma*, citam-se o controle de *Pythium* Pringsh (Naseby et. al., 2000); tombamento e manchas foliares em diversas culturas (*Rhizoctonia solani*) por *T. longibrachiatum* e *T. inhamatum*, neste último caso, atuando sobre os escleródios do patógeno (Cúndom et. al., 2003); murcha verticilar (*Verticillium dahliae* Kleb) em berinjela (Corder & Melo, 1998); manchas foliares (*C. spathulatum* El-Gholl em erva-mate (Gomes et. al., 2001); galhas (*Meloidogyne javanica* Treub) em tomateiro (Sharon et. al., 2001); bem como, controle de doenças causadas por *Venturia* Sacc spp., *Botrytis* (Hjeljord et. al., 2001; Lisboa et. al., 2007), *Crinipellis perniciososa* Stahel, (Sanogo et. al., 2002), todos de parte aérea. O controle de doenças nas fases de pré e pós-colheita também tem sido registrado, como por exemplo, em tubérculos (Okibo & Ikediugwu, 2000) e proteção de sementes (Burns & Benson, 2000; Harman et al, 1980).

As metas buscadas pelos agricultores - aumento da produtividade e redução dos custos de produção - podem ser alcançadas com um mínimo de impacto ao meio ambiente, utilizando o controle biológico (Rezende et. al., 2004). No caso das doenças causadas por *Cylindrocladium*, o controle químico mantém-se como método de controle mais utilizado. Entretanto, Yang (1995) comprovou a eficiência do tratamento de pré e pós-emergência de Pinus vermelho com isolados de *Trichoderma*. Resultados obtidos, utilizando esse fungo como promotor de desenvolvimento de plantas e no controle da mancha foliar abrem a possibilidade de aplicação prática desse agente biológico, na produção de mudas de eucalipto, em escala comercial.

Referencias Bibliográficas

ABRAF. Associação brasileira de produtores de florestas plantadas. **Anuário Estatístico da ABRAF**, p. 80. 2005.

ADAMS, P.B. The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v.28. p.59-72, 1990.

ALFENAS, A.C.; SILVEIRA S.F. & SANFUENTES, E. Current status and control strategies of diseases associated to clonal propagation of *Eucalyptus* in Brazil. In: **Iufro Conference on Silviculture and Improvement of Eucalyptus**. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisas Florestais, Colombo. P.106-111, 1997.

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. Viçosa. Editora UFV. 2004. 442p.

BAILEY, J.A. (ed). **Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions**. Springer-Verlag, Berlin, German,. 1985.

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

BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol, W. (Org.) **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna. Embrapa - CNPMA. pp. 179. 1991.

BETTIOL, W. & GHINI, R. Controle Biológico. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H. & Amorim, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia**. 3° ed. Agronômica Ceres. P. 919. 1995.

BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma* II. Infrageneric classification. **Canadian Journal of Botany**, v.68, p.2357-2372, 1991.

BURNS, J.R., BENSON, D.M. Biocontrol of damping-off of *Catharanthus roseus* caused by *Pythium ultimum* with *Trichoderma virens* and binucleate *Rhizoctonia* fungi. **Plant Disease**, v.84, p.644-648. 2000.

CASSIOLATO, A.M.R. Ecologia de fungos fitopatogênicos formadores de escleródios. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna. Embrapa – CNPDA, p.139- 165, 1998.

CASSIOLATO, A.M.R. Parasitismo de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary por mutantes de *Trichoderma harzianum* Rifai. **Tese (Doutorado em Genética e melhoramento de Plantas)** Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. p.133, 1995.

CHET, I.; INBAR, J. & HADAR, I. Fungal antagonists and mycoparasites. In: WICKLOW D.T, SÖDERSTRÖM B. (eds) **The Mycota IV: Environmental and microbial relationships**. Springer-Verlag, Berlin, p.165-184, 1997.

COOK, R.J. & BAKER, K.F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. **The American Phytopathological Society**. Minnesota. U.S.A. p.533. 1983.

CORDELL, C.E.; BARNARD, E.L. & FILER, T.H. *Cylindrocladium* Diseases. In: FOREST Nursery Pests. Disponível em: <http://www.forestpests.org/nursery/cylindrocladium.html>. 1989. Acesso em: 15 de fevereiro de 2008.

CORDER, M.P.M., MELO, I.S. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahlia*. **Ciência Agrícola**, v.55, p.1-7, 1998.

CROUS, P.W. & WINGFIELD, M.J. A monograph of *Cylindrocladium*, including anamorphs of *Calonectria*. **Mycotaxon**, v.51. p.341-435, 1994.

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

DE MEYER, G.; BIGIRIMANA, J.; ELAD, Y. & HOFTE, M. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinera*. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p.279-286, 1998.

DRUZHININA, I.; KUBICEK, C.P. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? **Journal of Zhejiang University Science**, v.6, p.100-112, 2005.

FERREIRA, F.A. Patologia florestal: principais doenças florestais do Brasil. SIF. Viçosa, MG, p.570, 1989.

FERREIRA, F.A.; ALFENAS, A.C.; MOREIRA, A.M. & DAMUNER, N.L. Mancha de folha e desfolha do eucalipto no sudeste da Bahia causada por *Cylindrocladium pteris*. **Fitopatologia Brasileira**, v.17, p.226, 1992.

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

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

GOMES, N.S.B.; GRIGOLETTI JUNIOR, A., & AUER, C.G. Seleção de antagonistas para o controle de *Cylindrocladium spathulatum* em erva mate. **Boletim de pesquisa. Embrapa Florestas**, n 43, p.123-138, 2001.

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

GRIGOLETTI JR., A.; SANTOS, A.F. & AUER, C.G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Revista Floresta**, v.30, p.155-165, 2000.

GRINYER, J.; HUNT, S.; MCKAY, M.; HERBERT, B.R. & NEVALAINEN, H. Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. **Current Genetic**, v.47, p.381-388, 2005.

GULLINO, M.L. Control of *Botrytis* rot of grapes and vegetables with *Trichoderma* spp. In: TJANOS, E.C.; PAPAVIDAS, G.C. & COOK, R.J. (Eds) **Biological Control of Plant Diseases, Progress and Challenges for the Future**. Plenum Press, New York, pp. 125-132. 1992.

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

HARMAN, G.E., CHET, I., BAKER, R. *Trichoderma hamatum* effects on seed and seedlings diseases induced in radish and peas by *Pythium* sp. or *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v.70, p.1167-1172, 1980.

HJELJORD, L.G.; STENSVAND, A. & TRONSMO, A. Antagonism of nutriente-activated conidia of *Trichoderma harzianum* (*atroviride*) P1 against *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, v.91, p.1172-1180, 2001.

HORSFALL, J.G. & COWLING, E.B. (ed). **Plant Disease: An Advanced Treatise**. Vol. 2. How Diseases Develop in Populations. Academic Press, New York. 1980.

ISAAC, S. Fungal life-style. In: ISAAC, S. (Ed) **Fungal-Plant interactions**. Chapman & Hall (Ed), London. 418p, 1992.

LISBOA, B.B.; BOCHESSE, C.C.; VARGAS, L.K.; SILVEIRA, J.R.P.; RADIN, B. & OLIVEIRA, A.M.R. DE O. Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na redução da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. **Ciência Rural**, v.37, p.1255-1260, 2007.

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

NASEBY, D.C.; PASCUAL, J.A. & LYNCH, J.M. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 161-189, 2000.

OKIGBO, R.N. & IKEDIUGWU, F.E.O. Studies on biological control of postharvest rot in yams (*Dioscorea* spp.) using *Trichoderma viride*. **Journal of Phytopathology**, v.148, p.351-355, 2000.

RIFAI, M.A. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological Papers**, Wallingford, v.16, p.1-56, 1969.

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

SANOGO, S.; POMELLIA, A.; HEBBAR, P.K.; BAILEY, B.; COSTA, J.C.B.; SAMUELS, G.J. & LUMSDEN, R.D. Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipelis pernicioso* on cacao. **Phytopatology**, v.92, p.1032-1037, 2002.

SANTOS, F.A.; AUE, C.G. & GRIGOLETTI JUNIOR, A. Doenças do eucalipto no sul do Brasil. **Boletim de Pesquisa da Embrapa Florestas**, v. 45, p.20, 2001.

SBS – Sociedade Brasileira de Silvicultura. **Fatos e números do Brasil floresta**, Sao Paulo, Disponível em: <http://www.sbs.org.br/FatoseNumerosdoBrasilFlorestal.pdf>. 2007. Acessado em 10 de março de 2008.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; FIORI, A.C.G. & PASCHOLATI, S.F. Atividade celulolítica e metabólitos tóxicos de *Cylindrocladium clavatum*. **Acta Scientiarum**, v.25, p.155-160, 2003.

SHARON, E.; BAR-EYAL, M.; CHET, A.H.E.; KLEIFELD, O. & SPIEGEL, Y. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v.91, p.687-693, 2001.

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

TIGANO, M.S.; MELLO, S.C.M. Fungos agentes de controle biológico. In: OLIVEIRA FILHO, E.C; MONNERAT, R.G (Eds). **Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**. Planaltina (DF), Embrapa Cerrados, 2006. p.157-174.

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

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.1153- 1179, 1934.

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

VAN DRIESCHE, R.G. & BELLOWS, JR., T.S. **Biological Control**. Ed. Chapman & Hall, London. 539p. 1996.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; MARRA, R.; WOO, S. L.; LORITO, M. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v.40, p.1-10, 2008.

YANG, D.; BERNIER, L. & DESSUREAULT, M. *Phaeothea dimorphopora* increases *Trichoderma harzianum* density in soil and suppress red pine damping off caused by *Cylindrocladium scoparium*. **Canadian Journal of Botany**, v.73, p.693-700, 1995.

YEDIDIA, I.; SRIVASTVA, A.K.; KAPULNIK, Y. & CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and growth of cucumber plants. **Plant and Soil**, v.235, p.235-242, 2001.

CAPÍTULO I

Ocorrência de doenças foliares em viveiro de eucalipto comercial no município de Luziânia (GO)

Resumo – Um projeto para o manejo de doenças na agricultura deve basear-se em diagnósticos dos problemas nas áreas de cultivo. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de doenças foliares em viveiro de eucalipto comercial no município de Luziânia (GO). No ano 2007, foi detectada a ocorrência de seguintes patógenos foliares: *Pleospora* sp., *Hainesia* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Cylindrocladium scoparium* e *Rhizoctonia solani*. Os dois últimos apresentam elevado potencial destrutivo para a cultura do eucalipto, especialmente em minijardim clonal.

Termos para indexação: Patógenos de eucalipto, mancha foliar e mudas de eucalipto.

Abstract – A project for disease management in agriculture should be based on diagnoses of the problems in crops. Therefore, the goal of this study was to assess the occurrence of eucalyptus leaf diseases in a commercial nursery in the municipality of Luziânia (GO). In the year 2007, the occurrence of the following leaf pathogens was detected: *Pleospora* sp., *Hainesia* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Cylindrocladium scoparium* and *Rhizoctonia solani*. The last two have a high destructive potential for the cultivation of eucalyptus, especially in clonal minihedges.

Index terms: Eucalyptus pathogens, leaf spot and Eucalyptus seedlings

Introdução

O gênero *Eucalyptus*, pertencente à família das Mirtáceas, ocorre naturalmente na Austrália, Indonésia e ilhas próximas, tais como Flores, Alor e Wetar. Ele representa cerca de 600 espécies e subespécies, com ampla plasticidade e dispersão mundial e cresce satisfatoriamente em diferentes situações edafoclimáticas, extrapolando àquelas das regiões de origem (Santos, et al., 2001).

Nos últimos anos, têm sido relatados inúmeros fungos patogênicos na cultura do eucalipto, em áreas cultivadas de diversos países (Crous et al., 2006). Dentre os causadores de manchas foliares, destacam-se como principais patógenos, as espécies *Cylindrocladium scoparium* e *Rhizoctonia solani*. Outros fungos, embora muito frequentes, vêm sendo relatados como patógenos secundários: *Pestalotiopsis* sp., *Hainesia* sp. e *Pleospora* sp.

O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de patógenos foliares em clones de eucalipto e identificá-los, como subsídio para futuros estudos visando ao manejo das doenças do eucalipto nas condições do Planalto Central.

Material e Métodos

Folhas com sintomas de doenças fúngicas foram coletadas de minijardim clonal e de viveiro e plantas adultas de eucalipto, em área comercial localizada no município de Luziânia (GO). As folhas coletadas foram examinadas ao microscópio estereoscópico, no laboratório de Fitopatologia do Núcleo Temático de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Após serem lavadas com água e sabão e enxugadas com papel filtro, os tecidos foliares foram seccionados nas margens das lesões. Os fragmentos foram tratados com álcool 70% por 30 segundos, seguido de hipoclorito de sódio (0,1%) por 1 minuto e, finalmente, lavados com água esterilizada. Esses fragmentos foliares foram, então, plaqueados em meio de batata-dextrose-ágar (BDA) e incubados a

25⁰C, com fotoperíodo de 12 horas. As colônias desenvolvidas foram transferidas para outras placas contendo o mesmo meio, obtendo-se as culturas puras, como recomendado por Alfenas e Mafia (2007). A identificação dos patógenos foi realizada de acordo com as descrições de Ferreira e Milani (2002) e Alfenas et al. (2004) com exceção da *Pleospora* que foi identificado de acordo com Arx e Müller (1975).

Resultados e Discussão

São relatados cinco gêneros de fungos fitopatogênicos, de quatro grupos distintos, isolados a partir das amostras foliares, procedentes de viveiro comercial de eucalipto, no município de Luziânia (GO), conforme Tabela 2 e Figuras 1, 2, 3, 4 e 5.

Tabela 1 – Patógenos foliares identificados em amostras foliares procedentes de viveiro comercial de eucalipto, Luziânia (GO).

Grupos	Patógenos foliares	Sintomas
Ascomicetos:	<i>Pleospora</i> sp.	Pequenas lesões necróticas foliares assimétricas na parte adaxial das folhas.
	<i>Hainesia</i> sp.	Lesões foliares circulares, de coloração marrom-claras e contornadas por halo marrom-avermelhado.
Celomicetos:	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Lesões necróticas em folhas e haste de estacas e miniestacas. Geralmente associado a hospedeiros debilitados e a injúrias ocasionadas no processo de preparo de estacas e miniestacas, por isso é considerado um patógeno oportunista.
Hifomicetos:	<i>Cylindrocladium scoparium</i>	Manchas foliares geralmente pequenas, circulares e arroxeadas, distribuídas sobre o limbo foliar. Incide em minicepas clonais e em mudas na fase de aclimação.
Agonomicetos:	<i>Rhizoctonia solani</i>	Lesões inicialmente acinzentadas e úmidas. Depois dessas lesões se tornam secas, adquirindo tons de marrom a cinza. O limbo foliar pode se apresentar totalmente necrosado ou recoberto por lesões de tamanhos e formatos irregulares, devido à paralisação do crescimento, por falta de continuidade da umidade ambiental.

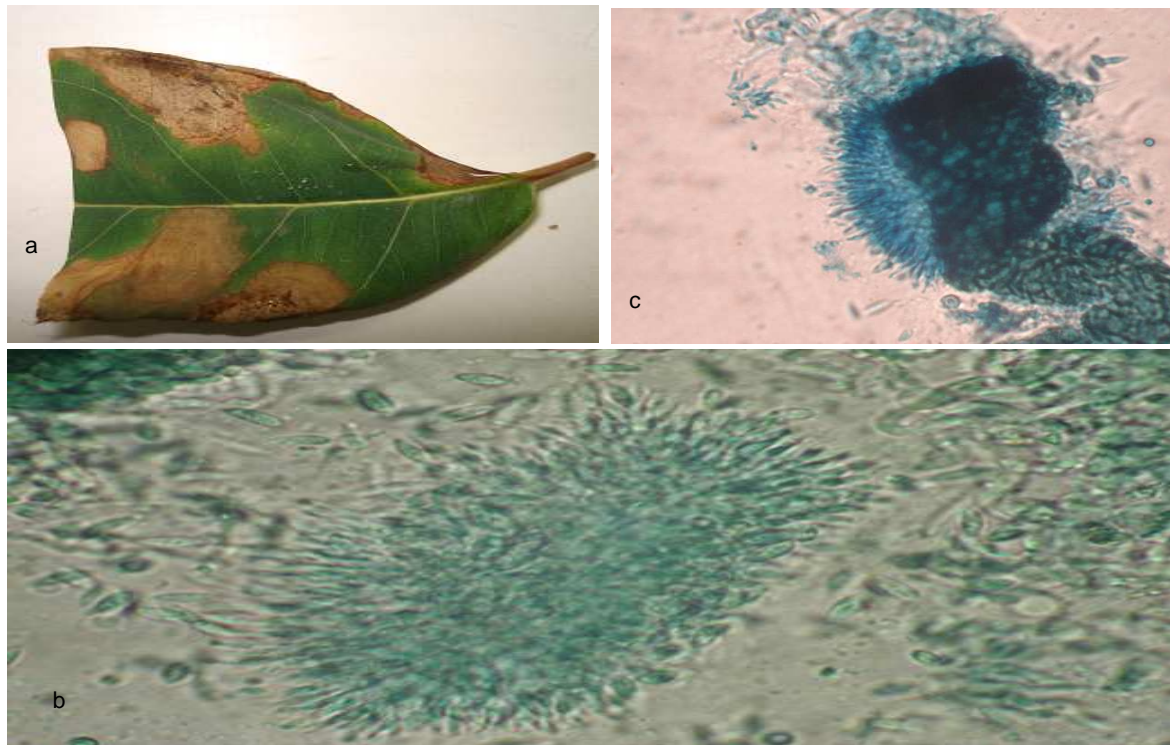


Figura 1 – Mancha foliar causada por *Hainesia*: A) Sintomas foliares; B) estruturas esporogênicas do patógeno; C) Estruturas esporogênicas e esporos do patógeno.

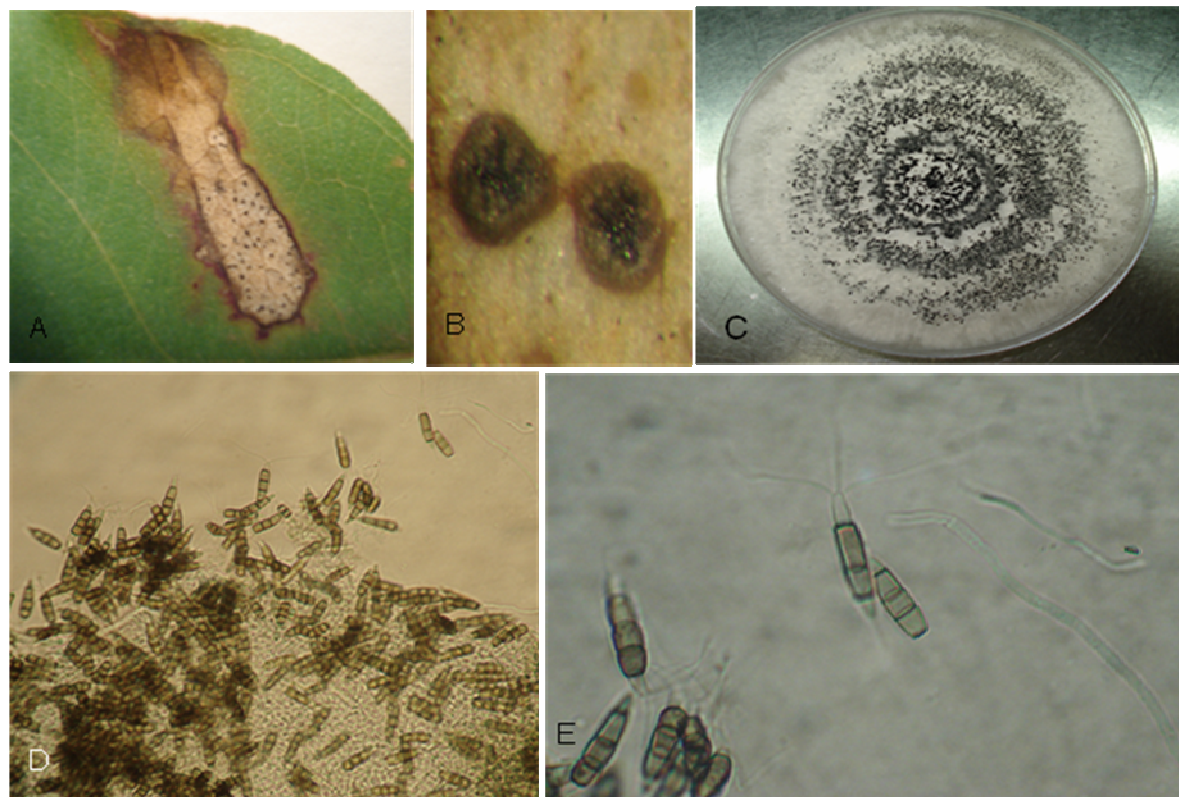


Figura 2 – Mancha foliar causada por *Pestalotiopsis* sp: A) Sintomas foliares com Sinais dos patógenos; B) Conidioma acervular do patógeno; C) Colônia do patógeno em meio BDA; D e E) Conídios ao microscópio óptico;

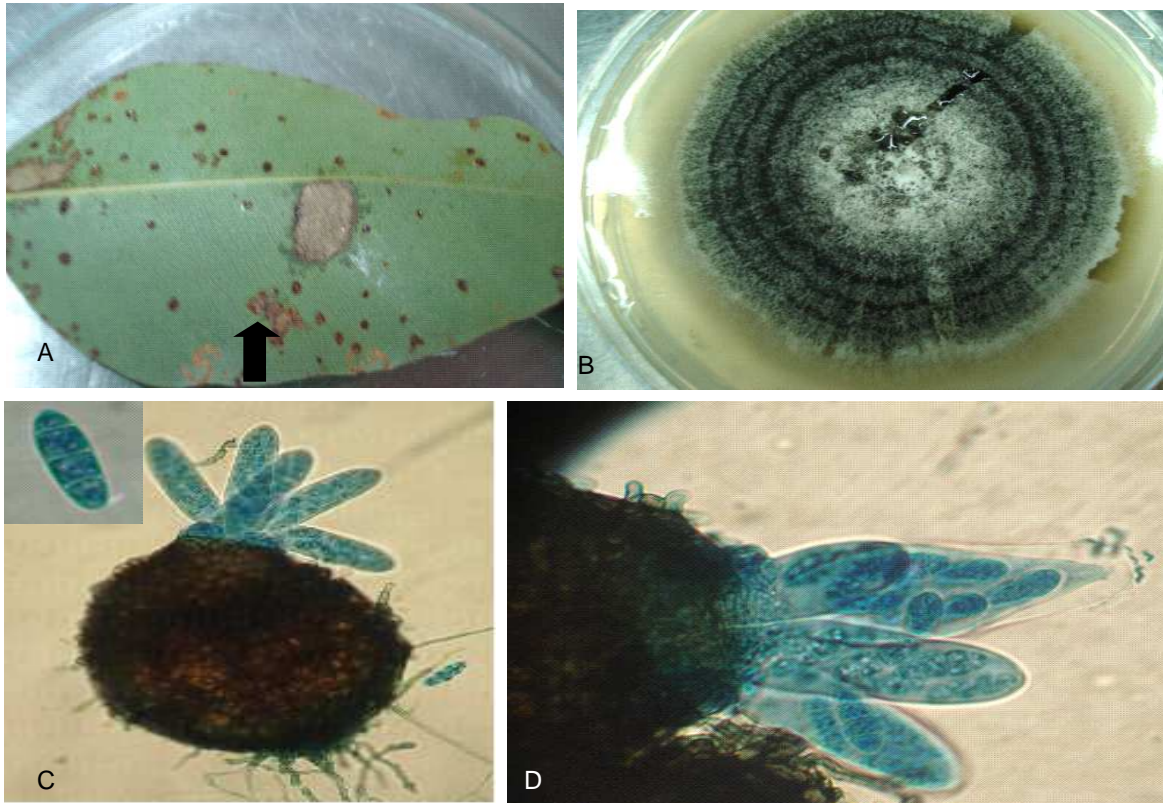


Figura 3 – Mancha foliar causada por *Pleospora* sp.; A) Sintomas foliares B) Colônia do patógeno em meio; C) Detalhes do pseudotécio esférico ostiolado; D) Ascus bitunicados.

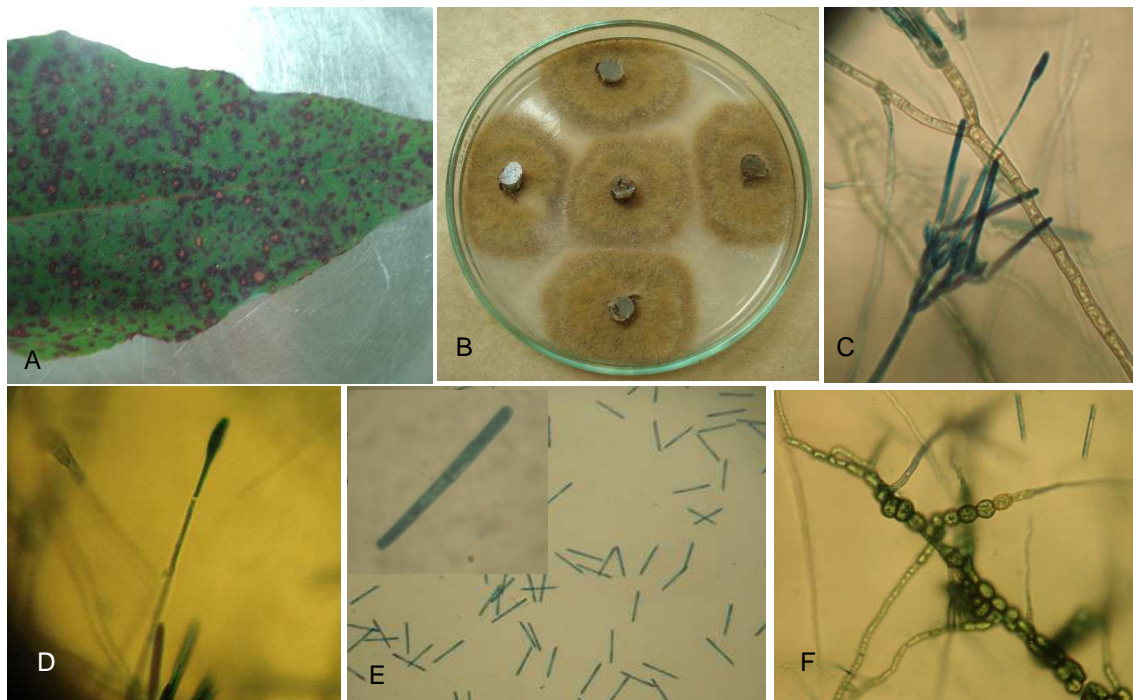


Figura 4 – Mancha foliar causada por *Cylindrocladium scoparium*: A) Sintomas foliares; B) Colônia do patógeno em meio; C) Conidióforos, conídios e hifa estéril do patógeno; D) Hifa estéril do patógeno; E) Conídios bicelulares; F) Estrutura de resistência ambiental do patógeno (microesclerócios).

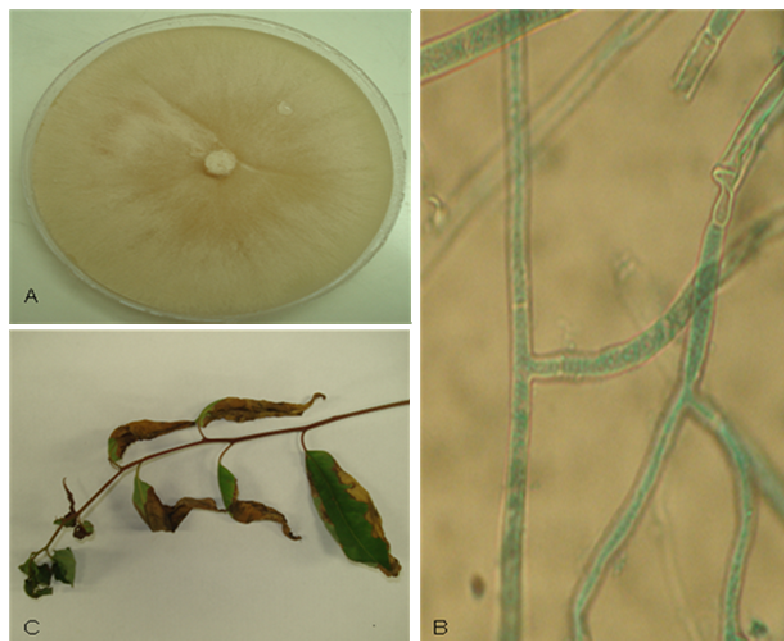


Figura 5 – Mancha foliar causada por *Rhizoctonia solani*: A) Sintomas foliares; B) Hifa típica do patógeno, mostrando ramificação em ângulo reto e septo em constrição próximo à ramificação; C) Manchas foliares.

De acordo com Kimati et al., (2005) e Alfenas et al., (2004), manchas foliares causadas por *C. scoparium* e *R. solani* não representam riscos para o eucaliptal em campo, pois essas manchas e posteriores desfolhas são supridas pelo rápido re-enfoltamento das plantas. Já em viveiros de mudas, as infecções por esses patógenos podem reduzir drasticamente a produção de clones. *Hainesia* sp., *Pleospora* sp. e *Pestalotiopsis* sp., vêm sendo relatados como patógenos secundários, porém, podem se relevantes sobretudo na produção de clones, quando os tecidos ainda jovens são mais susceptíveis.

Referências Bibliográficas

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. Viçosa. Editora UFV. 2004. 442p.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa. Editora UFV, v.01, 2007. 382 p.

CROUS, P.W.; VERKLEY, G.J.M.; GROENEWALD, J.Z. *Eucalyptus* microfungi known from culture. 1. *Cladoriella* and *Fulvoflamma* genera nova, with notes on some other poorly known taxa. **Studies in Mycology**, v.55, p.53–63, 2006.

FERREIRA, F.A.; MILANI, D. **Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do Eucalipto no Brasil**. Mogi-Guaçu. 91p. 2002.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; **Manual de Fitopatologia**, Vol. II (4ª ed.). Editora Agronômica Ceres. 663p.2005.

SANTOS, F.A.; AUE, C.G. & GRIGOLETTI JUNIOR, A. Doenças do eucalipto no sul do Brasil. **Boletim de Pesquisa da Embrapa Florestas**, v. 45, p.20, 2001.

VON ARX, J.A.; Müller, E. A re-evaluation of the bitunicate ascomycetes with keys to families and genera. **Studies in Mycology**, v.9, p.1-159, 1975

CAPÍTULO II

Produção de conídios de *Cylindrocladium scoparium* em meios líquidos

Resumo – O objetivo desse trabalho foi estabelecer metodologia para produção de conídios do patógeno de *Cylindrocladium scoparium* em meio líquido e avaliar a infectividade dos conídios em folhas de eucalipto. Dos três meios líquidos testados, SG (Sacarose-Glicose), BD (Batata-Dextrose) e SDY (Extrato de leveduras) apenas o meio líquido SG mostrou ser adequado para cultivo do fungo, proporcionando uma concentração de esporos 2×10^5 e 4×10^5 conídios/ml para os isolados CEN 494 e CEN 517, respectivamente. Com os meios BD e SDY constatou-se a miceliação e formação de microesclerócios em abundância, sem produção de conídios. Os conídios obtidos foram coletados por filtração em duas camadas de gaze, com a parte líquida aspergida na superfície de folhas destacadas de eucalipto. Os sintomas da mancha-foliar foram verificados cinco dias após a inoculação.

Termos para indexação: produção de inóculo, mancha-foliar do eucalipto, fungo.

Production of *Cylindrocladium scoparium* conidia in liquid medium

Abstract – The goal of this study was to establish a methodology for production of conidia of the *Cylindrocladium scoparium* pathogen in liquid medium and to evaluate the infectivity of conidia in eucalyptus leaves. Among the three liquid media tested, SG (Sucrose-Glucose), BD (Potato-Dextrose) and SDY (of Yeast extract), only the SG liquid medium was shown to be suitable for cultivation of the fungus, providing spore concentration of 2×10^5 and 4×10^5 conidia/ml for CEN 494 and CEN 517 isolates, respectively. With the BD and SDY media, myceliation and formation of microesclerotia were found in abundance, without conidia production. The conidia were collected by

filtration in two layers of gauze, with the liquid part sprayed on the surface of detached eucalyptus leaves. Leaf spot symptoms were checked five days after inoculation.

Index terms: Liquid medium, leaf spot, *Cylindrocladium*.

Introdução

O gênero *Cylindrocladium* Morgan (teleomorfo: *Calonectria* De Not) compreende espécies habitantes de solo que causam doenças em plantas de diversas famílias botânicas em todo o mundo, embora existam representantes desse gênero que são tipicamente saprofíticos. Os sintomas característicos das espécies patogênicas de *Cylindrocladium* são: podridão radicular, murcha, manchas foliares e lesões necróticas em frutos (Crous & Wingfield, 1994). Em eucalipto, esse fungo é responsável por doenças em campo e minijardim clonal, exigindo medidas de controle, como o cultivo de variedades resistentes e aplicações de fungicidas (Ferreira e Milani, 2002). Estudos recentes vêm demonstrando o potencial de fungos antagonistas, como *Trichoderma*, para controle biológico das doenças de parte aérea causadas por esse patógeno (Elad, et al., 2000; Perelló, et al., 2003). As pesquisas na busca de agentes de biocontrole demandam certa quantidade de esporos, muitas vezes não alcançada pelo método de cultivo em meio agarizado. O cultivo de *C. scoparium* em meios líquido foi testado como metodologia alternativa para a produção de conídios infectivos em quantidade suficiente para a realização de bioensaios no estudo de controle biológico. Esse trabalho objetivou avaliar a esporulação de dois isolados de *C. scoparium* patogênicos ao eucalipto em meios de cultura líquidos.

Material e Métodos

Foram utilizados os isolados de *C. scoparium* CEN 494 e CEN 517 obtidos de amostras foliares de eucalipto, procedentes dos Estados de Goiás e São Paulo. Os meios

testados foram: BD (batata-dextrose), SDY (peptona 10g/L; dextrose 40g/L; extrato de levedura 10g/L) e SG, (Sacarose, 0,2/L; Glicose, 0,2/L; KNO₃, 1,0/L; KH₂PO₄, MgSO₄ . 7 h₂O, 0,5/L; KCl, 0,5/L).

Foram utilizados três frascos por tratamento de Erlenmeyer de 500 mL, cada um recebendo 250 mL de meio líquido. Após vedação, os frascos foram autoclavados a 120 °C durante 25 minutos. Cada frasco recebeu, assepticamente, sete discos de (5 mm de diâmetro) retirados de colônias desenvolvidos em meio de batata-dextrose-ágar (BDA), a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. As culturas líquidas foram incubadas em estufas incubadoras (Lab-line incubator-shaker modelo NT 711), com agitação a 150 rpm, à temperatura de 25 °C, durante 15 dias. Após esse período, as culturas foram filtradas em camada dupla de gaze e observadas em microscópio óptico. Quando constatada a presença de conídios, foram estipuladas as concentrações. Testes de infectividade dos conídios produzidos foram realizados em folhas destacadas de clones de híbridos (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*). As folhas destacadas utilizadas nos experimentos foram obtidas de plantas do mesmo clone, procedentes de minijardim clonal de eucalipto, livres de doenças, estabelecidas em casa de vegetação, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Utilizaram-se folhas jovens, com idade de 10 a 15 dias, que tiveram seus pecíolos destacados junto às hastes. As folhas, previamente lavadas com água destilada, tiveram os pecíolos envolvidos em algodão umedecido com água destilada esterilizada e foram, então, dispostas sobre papel de filtro, também umedecido com água esterilizada, em caixas do tipo gerbox (um par de folhas/caixa). O inóculo foi aspergido sobre as folhas, na concentração de 10⁵ con/mL, para ambos os isolados de *C. scoparium*. Após inoculação, as caixas gerbox foram envolvidas com película plástica transparente de PVC, a fim de manter a umidade no seu interior, sendo mantidas sobre a bancada de laboratório, à temperatura ambiente. Para cada tratamento foram utilizadas três repetições.

Resultados e Discussão

Produção de conídios foi verificada no meio SG, nas concentrações 2×10^5 e 4×10^5 para os isolados CEN 494 e CEN 517, respectivamente. Com os meios SDY e BD, ocorreu miceliação e formação de microesclerócios em abundância, não sendo detectada presença de conídios.

Folhas destacadas de eucalipto, inoculadas com suspensões de conídios obtidas do meio SG desenvolveram as lesões típicas da mancha-foliar induzidas pelo patógeno. As lesões começam com pequenas manchas cinza que posteriormente crescerem e formaram lesões com margens avermelhadas e centro marrom. As lesões exibiram massa branca e brilhante de conídios sobre a superfície abaxial da folha, aos 3-5 dias após a inoculação, conforme descrito por Keane et al. (2000) e Old, et al. (2003).

Os resultados obtidos neste trabalho revelam que a produção de conídios dos dois isolados de *C. scoparium* ocorreu no meio de cultura líquido relativamente mais pobre em nutrientes. Daí presume-se que o estresse causado pelo esgotamento dos nutrientes no meio tenha sido fator determinante para a esporulação do fungo. Segundo Carnáuba et al. (2007), nem sempre as condições que favorecem o crescimento do fungo são as mesmas para esporulação. Sabe-se ainda que, alguns meios de cultura são mais favoráveis para a esporulação de fungos que outros. Resultados semelhantes foram obtidos por Martins, et al. (2007), com isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao maracujazeiro, onde os maiores níveis de esporulação foram verificados em meio mais pobre, que no caso foi o BD, comparado aos meios contendo nutrientes adicionais (BD com extrato de levedura e V8).

O cultivo de *C. scoparium* em meio líquido mostrou ser viável para a produção de conídios, atendendo às necessidades de inóculo para os ensaios em controle biológico.

Referencias Bibliográficas

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. Viçosa. Editora UFV. 2004. 442p.

CROUS, P.W.; WINGFIELD, M.J. A monograph of *Cylindrocladium*, including anamorphs of *Calonectria*. **Mycotaxon**, v.51, p.341-435, 1994.

Carnaúba, J.P.; Sobral, M.F.; Amorim, E.P.R.; Silva, J.C.; Santos, V.B.; Felix, K.C.S. Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Scytalidium lignicola*, **Summa Phytopathologica**, v.33, p.199-200, 2007.

ELAD, Y. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. **Crop Protection**, v.19, p.709-714, 2000.

FERREIRA, F.A.; MILANI, D. **Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do Eucalipto no Brasil**. Mogi-guaçu, 91p. 2002.

KEANE, P.J.; KILE, G.A.; PODGER, F.D.; BROWN, B.N.; **Diseases and Pathogens of Eucalypts**. Australia, Ed. Csiro Publishing, 576p. 2000.

MARTINS, I.; PEIXOTO, J.R.; ÁVILA, Z.R.; MELLO, S.C.M.; PÁDUA, R.R. Esporulação de *Colletotrichum gloeosporioides* em meios líquidos. **Summa Phytopathologica**, v.33, p.203, 2007.

OLD, K.M.; WINGFIELD, M.J.; YUAN, Z.Q. **A Manual of Diseases of Eucalypts in South-East Asia**. Australia, Ed. CIFOR, 106p. 2003.

PERELLÓ, A.; MÓNACO, C.; SIMÓN, M.R.; SISTERMA, M. & DALL BELLO, G. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan spot of wheat in Argentina. **Crop Protection**, v.22, p.1099-1106, 2003.

CAPÍTULO III

Avaliação de isolados de *Trichoderma* no controle da mancha foliar do eucalipto *in vitro* e quanto a esporulação em dois substratos sólidos

Resumo - Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de isolados de *Trichoderma* spp. no controle da mancha-foliar do eucalipto causada por *Cylindrocladium scoparium* por meio de ensaios *in vitro* e utilizando folhas destacadas, como também, determinar a capacidade de esporulação dos isolados de *Trichoderma* spp. em dois substratos, grãos de arroz parboilizado e de milho. Os experimentos *in vitro* consistiram em pareamentos de culturas e exposição do patógeno a possíveis metabólitos voláteis e não voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. Foram constatadas, por exames ao microscópio de luz, alterações morfológicas em hifas e inibição no crescimento micelial de *C. scoparium*. Para os testes com folhas destacadas, foram utilizadas folhas de um clone híbrido de eucalipto resultante de cruzamentos entre *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*. Observou-se a supressão de sintomas da doença com todos os isolados de *Trichoderma* nas folhas inoculadas com o isolado CEN 494 de *C. scoparium*, enquanto que com o isolado CEN 517, aparentemente mais agressivo, os isolados de *Trichoderma* não apresentaram a mesma eficiência. A esporulação dos isolados de *Trichoderma* testados, em termos de biomassa colonizada foi variável, de $5,7 \times 10^9$ a $7,3 \times 10^8$ conídios/g de substrato. Com base nos resultados obtidos, isolados de *Trichoderma* poderão ser usados em estratégias de desenvolvimento de biofungicidas, especialmente o CEN262, identificado como *T. harzianum*, dado o seu efeito supressivo sobre *C. scoparium* e sua capacidade de esporulação, independente do substrato e do período de avaliação adotados.

Termos para indexação: Controle biológico, produção de inóculo, *Cylindrocladium scoparium*.

**Evaluation of *Trichoderma* isolates in the control of leaf spot in *Eucalyptus* species
and for sporulation capacity in solid substrates**

Abstract- This study aimed to evaluate the potential of *Trichoderma* spp. isolates in the control of eucalyptus leaf spot caused by *Cylindrocladium scoparium* through *in vitro* tests using detached leaves, as well as to determine the sporulation capacity of *Trichoderma* spp. isolates in two substrates, grains of parboiled rice and millet. The experiments consisted of *in vitro* pairing of cultures and the pathogen's exposure to possible non-volatile and volatile metabolites produced by *Trichoderma* spp. Morphological changes in hyphae and inhibition of mycelial growth of *C. scoparium* were found by examination under light microscope. For the tests with detached leaves, leaves were used from a eucalyptus hybrid clone derived from crosses between *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla*. Suppression of disease symptoms was observed with all isolates of *Trichoderma* in the leaves inoculated with isolate CEN 494 of *C. scoparium*, while with the apparently more aggressive isolate CEN 517, the *Trichoderma* isolates did not have the same efficiency. The sporulation of tested *Trichoderma*, in terms of colonized biomass, varied from 5.7×10^9 to 7.3×10^8 conidia/g of substrate. Based on the results obtained, the *Trichoderma* isolates can be used in e strategies to develop biofungicide, especially CEN262 isolate, identified as *T. harzianum*, given its suppressive effect on *C. scoparium* and its capacity for sporulation, independent of the substrate and the assessment period adopted.

Index terms: Biological control, inoculum production, *Cylindrocladium scoparium*.

Introdução

A produção de mudas de eucalipto, na maioria das empresas florestais, é realizada por meio de propagação vegetativa, visando uniformidade dos povoamentos, melhor adaptação dos clones às condições locais e aumento da produtividade. Com a expansão da cultura do eucalipto, houve um incremento na demanda por mudas clonais, conduzindo ao aumento das doenças em miniestacas, principalmente quando acondicionadas em casas de nebulização. Esses locais, caracterizados pela umidade e temperatura elevadas, apresentam as condições ideais para o enraizamento das miniestacas, porém, favoráveis aos diversos patógenos (Xavier e Comério, 1998).

No Brasil, a mancha-foliar de eucalipto, causada por espécies de *Cylindrocladium* Morgan, é uma doença de ocorrência quase sempre severa, provocando desfolha em plantios jovens e morte de mudas clonais (Ferreira, 1989). As manchas foliares resultam em necrose das folhas, seguida de morte ou inibição do crescimento das mudas. Estas, se utilizadas para plantio, quase sempre morrem, quer pela ação do patógeno original, quer por ataque de patógenos secundários. Alfenas et al., (1987) relataram a perda diária de mais de 50.000 estacas de eucalipto para enraizamento e alta incidência de *Cylindrocladium scoparium* Morgan, apesar das freqüentes aplicações de benomyl, em área do estado do Espírito Santo.

Espécies de *Trichoderma* têm recebido grande atenção da pesquisa, pela sua versatilidade como agentes de biocontrole de patógenos de planta. Resultados de campo com a espécie *Trichoderma harzianum* Rifai, por exemplo, indicaram que esse fungo pode atuar eficientemente sob diferentes condições ambientais, no controle de várias doenças (Queiroz et al., 2004).

A bioatividade desses fungos pode se dar de forma direta, mediada por enzimas degradadoras da parede celular (Lima et al., 1997; EL-Katatny et al., 2001), por secreção

de diversos antibióticos, competição por espaço e por nutrientes, ou ainda, por indução de resistência de plantas a doenças e ao estresse (Harman, 2000; Howell, 2003). O potencial de biocontrole de diversos isolados de *Trichoderma* spp. foi demonstrado por Gomes et al. (2001), contra a pinta-preta das folhas da erva-mate, causada por *C. spathulatum* El-Gholl, Kimbrough, Barnard, Alfieri & Schoulties.

Produção de inóculo em condições de laboratório é informação necessária para o desenvolvimento de agentes de biocontrole. O cultivo de fungos em larga escala, em muitos casos, tem-se baseado no uso de substratos sólidos (Jackson, 1997; Thangavelu et al., 2004; Fortes et al., 2007). Grãos de cereais oferecem a vantagem de serem prontamente biodegradáveis, facilitando as aplicações no campo (Thangavelu et al., 2004). Adicionalmente, eles apresentam facilidade para quantificação dos propágulos produzidos.

Com base no exposto acima, este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o potencial de isolados de *Trichoderma* no biocontrole da mancha-foliar do eucalipto *in vitro* e a capacidade de esporulação, dos mesmos isolados, em grãos de arroz e de milho.

Material e Métodos

Isolados do patógeno e do antagonista

O trabalho foi conduzido com 12 isolados de *Trichoderma*, quais sejam: cinco (CEN 515, CEN 516, CEN 518, CEN 519 e CEN 520) obtidos de amostras de solo coletas em área de plantio de eucalipto localizada em Luziânia (GO); um isolado (CEN 498), de amostras de solo rizosférico de *Pinus*, coletadas no Parque da Cidade, localizado em Brasília-DF; um isolado (CEN 500), de campo de produção de goiabas com relatos de infecção por *Cylindrocladium*, no estado do Pernambuco; os outros seis isolados, pertencentes às espécies *T. asperellum* (CEN 162), *T. harzianum* (CEN 201 e CEN 262), *T. pseudokoningii* (CEN 209) e CEN 492 (*Trichoderma* sp.) são pertencentes à coleção de Culturas de Fungos para o controle de Fitopatógenos e de Plantas Daninhas da Embrapa

Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) Tabela 1. Estes últimos foram escolhidos com base em resultados anteriormente obtidos no controle do mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum* de Bary), tombamento (*Rhizoctonia solani* Kunh) e podridões de raízes e do colo (*Sclerotium rolfsii* Sacc) do feijoeiro (dados não publicados). As amostras de solo foram processadas segundo o método de diluição seriada (Dhingra & Sinclair, 1985) em meio de Martin e a identificação dos isolados obtidos se realizou de acordo com chave interativa desenvolvida por Samuels et al. (2008).

Para os ensaios de biocontrole, utilizaram-se dois isolados de *Cylindrocladium scoparium*: CEN 494, doado pela empresa International Paper, de Mogi-Guaçu (SP) e CEN 517, obtido de lesões foliares de plantas coletadas em área comercial de eucalipto, situada no município de Luziânia (GO). Para determinação da espécie, foram consideradas a formação de hifa estéril, a septação e a morfologia dos conídios, conforme Crous e Wingfield (1994). Os dois isolados do patógeno foram identificados como pertencentes à espécie *C. scoparium*, por apresentaram hifas estéreis com formato elipsóide a piriforme e conídios eretos com um septo, como proposto por Crous e Wingfield (1994).

Avaliação do antagonismo ao fungo *C. scoparium* por isolados de *Trichoderma* spp. em cultivo pareado

O antagonismo dos isolados de *Trichoderma* spp. contra *C. scoparium* foi avaliado em confronto direto, utilizando o método de pareamento de culturas em placas de Petri, de acordo com Dennis e Webster (1971a). A multiplicação inicial, tanto dos isolados de *Trichoderma* quanto dos isolados do patógeno, foi realizada em placas contendo o meio de batata-dextrose-ágar (BDA), acondicionadas em câmara de crescimento do tipo B.O.D. (Fanen, mod. 347), à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas, durante 5 dias. Para o confronto direto dos organismos, foram estabelecidas três repetições. Discos (5 mm de

diâmetro) retirados das culturas puras do patógeno e do antagonista foram depositados diametralmente opostos em placas contendo o mesmo meio e incubadas nas mesmas condições descritas. Placas de BDA, contendo só o patógeno, foram utilizadas como controle.

Para as avaliações, aos sete dias de cultivo, foram atribuídas notas de acordo com escala estabelecida por Bell et al. (1982):

Nota 1-sobreposição de *Trichoderma*, que colonizou toda a superfície do meio e reduziu a colônia do patógeno.

Nota 2-sobreposição de *Trichoderma*, que colonizou pelo menos 2/3 da superfície do meio.

Nota 3-*Trichoderma* e patógeno colonizaram mais que 1/3 e menos que 2/3 da superfície do meio.

Nota 4-patógeno colonizou ao menos 2/3 da superfície do meio e resistiu a invasão por *Trichoderma*.

Nota 5-sobreposição do patógeno que colonizou toda a superfície do meio.

Para verificação de alterações nas hifas de *Cylindrocladium* sp., foram preparadas lâminas contendo as estruturas da zona de confronto dos dois fungos e examinada, sob microscópio óptico (Olympus BX40), com lente de aumento de 40X, a presença de enrolamento e plasmólise de hifas, crescimento de hifas paralelas, bem como alterações estruturais.

Avaliação do efeito inibidor de metabólitos voláteis e não voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. sobre *C. scoparium*

O efeito inibidor de metabólitos voláteis dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre *C. scoparium* foi testado, conforme descrito por Dennis & Wester (1971b). Duas bases de placas de Petri, contendo BDA, foram individualmente inoculadas com discos (5 mm de

diâmetro) de culturas do patógeno e do antagonista e, em seguida, incubadas nas condições anteriormente descritas. Após 24 horas, as bases contendo o antagonista e o patógeno foram sobrepostamente unidas por filme de PVC, para impedir o escape de metabólitos voláteis, sendo novamente incubada nas mesmas condições. Como testemunha, foram sobrepostas bases contendo apenas o patógeno. As avaliações do crescimento micelial foram realizadas quando toda a superfície do meio se apresentou colonizada pelo patógeno, nas placas testemunha.

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram também testados quanto à inibição do desenvolvimento do patógeno por metabólitos não voláteis, utilizando o método descrito por Agrawal et al. (1977), com modificações. Esse método consistiu no cultivo dos isolados em frascos Erlenmeyer contendo 250 mL de meio líquido à base de batata-dextrose (5 discos de 5 mm de diâmetro por frasco), retirados de culturas de *Trichoderma* com cinco dias de idade. A incubação ocorreu em agitador orbital (Lab-line incubator-shaker modelo NT 711), a 150 RPM, à temperatura de 25°C, em ausência de luz. Após esse período, a parte líquida foi coletada por filtração em papel de filtro e, após passagem por membrana estéril de celulose (0,45 µm), foi incorporada ao meio BDA autoclavado, na proporção de 25% (v/v). Foram preparadas três placas com filtrado de cada antagonista, para cada um dos dois isolados do patógeno. As placas de Petri com o meio foram inoculadas, no centro, com discos de culturas do patógeno e incubadas a 25°C. A testemunha consistiu de placas contendo meio BDA sem filtrado de *Trichoderma*, inoculadas com *C. scoparium*. As medições do crescimento radial foram tomadas quando toda a superfície do meio nas placas testemunhas se apresentou colonizada pelo patógeno.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa de estatística Sisvar (Ferreira, 2000).

Preparo de *Trichoderma* para testes em folhas destacadas

O inóculo para os ensaios em folha destacada foi produzido em grãos de arroz parboilizado, utilizando, como inóculo - semente, discos de culturas desenvolvidas em meio BDA. Foram utilizados cinco isolados de *Trichoderma* (CEN 162, CEN 209, CEN 262, CEN 498, CEN 500), selecionados nos ensaios anteriores.

Grãos de arroz, previamente umedecidos com água destilada a 60% (p/v) foram distribuídos em sacos plásticos de polipropileno (300 g de arroz seco /saco), sendo estes vedados com grampos, e autoclavado (120°C durante 25 min). No fechamento, os sacos receberam tampões de gaze e algodão para permitir a troca gasosa com o ambiente externo. Cada saco recebeu, assepticamente, oito discos (5 mm de diâmetro) das colônias de *Trichoderma*. A incubação ocorreu em incubadora B.O.D. à temperatura de 25°C com fotoperíodo de 12 horas. A cada dois dias o substrato foi revolido para promover a troca gasosa, quebra do micélio e aumento da superfície de contato do fungo com o substrato para a produção mais elevada de esporos (Jackson, 1997). Após sete dias de incubação, o substrato de cada saco foi lavado com água corrente (aproximadamente 2 litros de água) para a extração do inóculo. A concentração de conídios foi determinada em câmara de Neubauer (lente de 40X) e ajustada a 10^7 conídios/mL de suspensão.

Avaliação da supressão da mancha - foliar causada por *C. scoparium* por *Trichoderma* spp. em folhas destacadas de eucaliptos

Para avaliação da supressão da mancha foliar de *C. scoparium* em folhas destacadas de eucaliptos, primeiramente foi induzida a esporulação dos patógenos CEN 494 e CEN 517 em meio líquido SG (Carvalho Filho, M.R. dados não publicados). Após 15 dias de cultivo em agitador orbital com rotação de 170 RPM a temperatura de 27°C, os conídios

foram coletados por filtração em camada dupla de gaze e preparadas as suspensões de inóculo, contendo 10^5 conídios/mL.

Cinco antagonistas foram selecionados a partir de testes *in vitro* (CEN 162, CEN 209, CEN 262, CEN 498, CEN 500). Para a preparação do inóculo desses isolados de *Trichoderma*, discos retirados da periferia de colônias dos isolados cultivados em BDA (5 mm de diâmetro) foram distribuídos em frascos erlenmeyer contendo grãos de arroz umedecidos com água destilada (60 % p/v), previamente autoclavados. A incubação se realizou a 25°C e 12 h de luz, durante sete dias.

As folhas destacadas utilizadas nos experimentos foram obtidas de minijardim clonal de eucaliptos (clone G-100) livre de doenças, cultivadas em casa de vegetação, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Utilizaram-se folhas jovens, com idade de 10 a 15 dias, que tiveram seus pecíolos destacados junto às hastes. As folhas, previamente lavadas com água destilada, tiveram os pecíolos envolvidos em algodão umedecido com água destilada esterilizada e foram, então, dispostas sobre papel de filtro, também umedecido com água esterilizada e distribuídas em caixas do tipo gerbox (um par de folhas/caixa).

O inóculo foi aspergido sobre as folhas, nas concentrações de 10^5 e 10^7 , para os isolados de *C. scoparium* e *Trichoderma*, respectivamente. As pulverizações do antagonista foram imediatamente seguidas de inoculação dos patógenos. Foram incluídos três tratamentos testemunha: 1) pulverização com água destilada; 2) pulverização com os dois isolados de *C. scoparium* e 3) pulverização com isolados do antagonista.

Após inoculação, as caixas gerbox foram envolvidas com película plástica transparente de PVC a fim de manter uma alta umidade relativa do ar no seu interior, sendo mantidas sobre a bancada de laboratório, à temperatura ambiente.

Foram realizadas três repetições por tratamento, constituindo a unidade experimental, uma caixa de gerbox. As avaliações ocorreram aos cinco dias de incubadas, com o auxílio da escala proposta por Alfenas et al. (2004) ilustrada na figura 1.

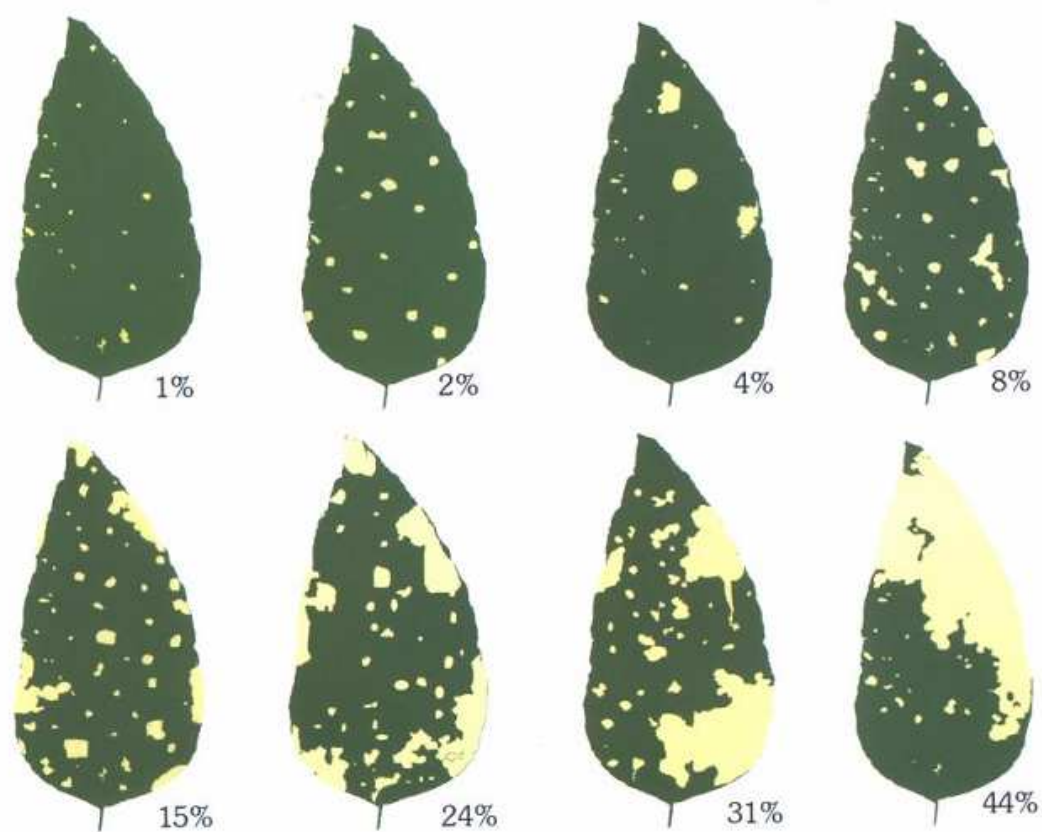


Figura 1 - Escala diagramática de severidade (% de área foliar lesionada) da mancha foliar causada por *Cylindrocladium* spp. em eucalipto (Alfenas et al., 2004).

Avaliação da esporulação de *Trichoderma* em grãos de arroz parboilizado e de milho

Doze isolados de *Trichoderma* foram utilizados para o presente experimento: CEN 162, CEN 201, CEN 209, CEN 262, CEN 492, CEN 498, CEN 500, CEN 515, CEN 516, CEN 518, CEN 519 e CEN 520. Foram utilizados frascos Erlenmeyer de 125 mL, cada um recebendo 25 g do substrato, adicionado de água destilada 60% (p/v). Após vedação com tampão de algodão, os frascos foram autoclavados a 120 °C durante 25 minutos. Foi

transferido, assepticamente, três discos (5 mm de diâmetro) de BDA contendo micélio e esporos dos agentes de biocontrole. Os frascos foram incubados na B.O.D. em fotoperíodo de 12 horas à temperatura de 25° C por sete e 11 dias. A cada dois dias, os frascos com substrato foram revolvidos para promover a aeração, quebra do micélio para aumentar a superfície de contato com o intuito de aumentar a taxa de esporulação dos fungos. Amostras do substrato colonizado foram processadas para determinação da concentração de esporo por grama de substrato, conforme descrito anteriormente, aos 07 e aos 11 dias.

O presente experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, em arranjo fatorial 12 x 2 x 2, representados pelos 12 isolados de *Trichoderma*, pelos períodos de incubação e pelos dois substratos sólidos

Os dados obtidos em todos os experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tukey, ao nível de 0,5%, utilizando o programa de estatística SAEG (Ribeiro, 2001).

Resultados e Discussão

Neste trabalho, identificaram-se seis isolados do gênero *Trichoderma* como pertencentes às espécies: *T. harzianum* (CEN 498, CEN 500, CEN 515 e CEN 519, CEN 520), *T. atroviride* (CEN 516). A identificação foi baseada na chave interativa proposta por Samuels (2008), que se encontra disponível na internet. O isolado CEN 518 não foi identificado ao nível específico.

Apesar de criticados (Druzhinina & Kubicek, 2005), o uso de marcadores morfológicos permanece como principal meio para classificação infragenérica de *Trichoderma* ainda hoje. A delimitação das espécies, utilizando apenas esses critérios, é reconhecidamente difícil, mesmo com o auxílio das chaves de identificação disponíveis, o que pode conduzir a erros de identificação. Considerando a diversidade de implicações dos

fungos do gênero *Trichoderma*, que também inclui a espécie *T. longibrachiatum* (seção *longibrachiatum*), na qual alguns isolados têm sido relatados como patógenos oportunistas de animais e humanos com sistema imunológico deprimido (Antal et al., 2006), identificar acuradamente estas espécies se reveste de importância. A possibilidade de que alguns dos isolados utilizados neste trabalho seja *T. longibrachiatum*, entretanto, foi descartada em testes preliminares (negativos) de crescimento e esporulação a 40°C, desde que os membros da seção *longibrachiatum* são os únicos com capacidade de crescimento e multiplicação a essa temperatura. Permanece a necessidade de confirmação acurada das espécies, como requisito importante em caso de registro de biofungicida (Hermosa et al., 2001). A análise de seqüências gênicas é uma metodologia eficiente e deverá ser empregadas como complementos para distinção de taxa sempre que necessário, conforme sugerido por Druzhinina e Kubicek (2005).

Os resultados obtidos na inibição do crescimento micelial dos isolados de *C. scoparium*, quando confrontados em cultivo pareado com os 12 isolados de *Trichoderma* são mostrados na Tabela 1. Cinco isolados (CEN 162, CEN 209, CEN 262, CEN 498 e CEN 500) apresentaram grau máximo (classe 1) da escala de Bell et al. (1982), reduzindo o crescimento de ambos os isolados do patógeno e esporulando sobre toda a superfície das placas. Três isolados (CEN 201, CEN 519 e CEN 520), também em relação aos dois isolados do patógeno, colonizaram pelo menos 2/3 da superfície do meio (classe 2), apresentando também potencial de biocontrole, juntamente com outros isolados que se colocaram ora na classe 1 (CEN 515 e CEN 516), ora na classe 2 (CEN 518), dependendo do isolado do patógeno utilizado. O isolado CEN 492, foi o único que não exerceu atividade antagônica contra os isolados do patógeno, nos testes de pareamento de culturas, uma vez que estes avançaram sobre ele e colonizaram a maior superfície do meio.

Tabela 1 – Classificação dos isolados de *Trichoderma* spp. quanto ao antagonismo exercido sobre dois isolados de *Cylindrocladium scoparium*, no teste de pareamento de culturas .

	*Classe	
	<i>C. scoparium</i> (CEN 494)	<i>C. scoparium</i> (CEN 517)
CEN 162 <i>T. asperellum</i>	1	1
CEN 201 <i>T. harzianum</i>	2	2
CEN 209 <i>T. pseudokoningii</i>	1	1
CEN 262 <i>T. harzianum</i>	1	1
CEN 492 <i>Trichoderma. sp.</i>	3	3
CEN 498 <i>T. harzianum</i>	1	1
CEN 500 <i>T. harzianum</i>	1	1
CEN 515 <i>T. harzianum</i>	1	2
CEN 516 <i>T. atroviride</i>	1	2
CEN 518 <i>T. harzianum</i>	2	1
CEN 519 <i>T.harzianum</i>	2	2
CEN 520 <i>T. harzianum</i>	2	2

*Classificação em conformidade com a escala de Bell et al., 1982.

A Tabela 2 apresenta achados referentes aos exames de amostras de micélio retiradas da zona de confronto, cujos isolados de *Trichoderma* foram classificados com notas 1 e 2 frente a *C. scoparium* no pareamento das culturas. Ao serem examinadas ao microscópio óptico, tais amostras revelaram crescimento paralelo e enrolamento das hifas de *Trichoderma* em torno das hifas do patógeno, bem como plasmólise de hifas do patógeno. Os exames de amostras retiradas de placas cultivadas apenas com os isolados do patógeno, por sua vez, não evidenciaram tais alterações, que foram atribuídas à ação do antagonista. Essas alterações morfofisiológicas estão ilustradas na Figura 2.

Tabela 2 – Interações antagonistas entre hifas de *Trichoderma* e de isolados de *Cylindrocladium scoparium*, observadas ao microscópio óptico, com aumento de 40x.

Interações	Isolados de <i>Trichoderma</i>											
	CEN 162	CEN 201	CEN 209	CEN 262	CEN 492	CEN 498	CEN 500	CEN 515	CEN 516	CEN 518	CEN 519	CEN 520
Crescimento de hifas paralelas.	+	-	+	+	*	+	+	+	+	+	-	-
Enrolamento de hifas	+	-	+	+	*	+	+	+	+	+	-	-
Plasmólise de hifas	+	-	+	+	*	+	+	+	+	+	-	-

(*) Interações não observadas.

(-) Ausência

(+) Presença

Rocha & Oliveira (1998) também relataram alterações em *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Saccardo, quando confrontado com isolados de *Trichoderma*. Segundo Papavizas (1985) essas alterações evidenciam o micoparasitismo direto exercido por *Trichoderma*.

Entretanto, mais de um mecanismo de ação pode estar simultaneamente envolvido na ação antagonista de *Trichoderma*. Competição, por exemplo, embora mais difícil de ser determinado, é considerado um dos mais eficientes, podendo resultar em limitação, para o patógeno, de nutrientes e água, ou de sítios onde esses fatores nutricionais são mais abundantes, durante o período de pré-penetração (Perelló et al., 2003).

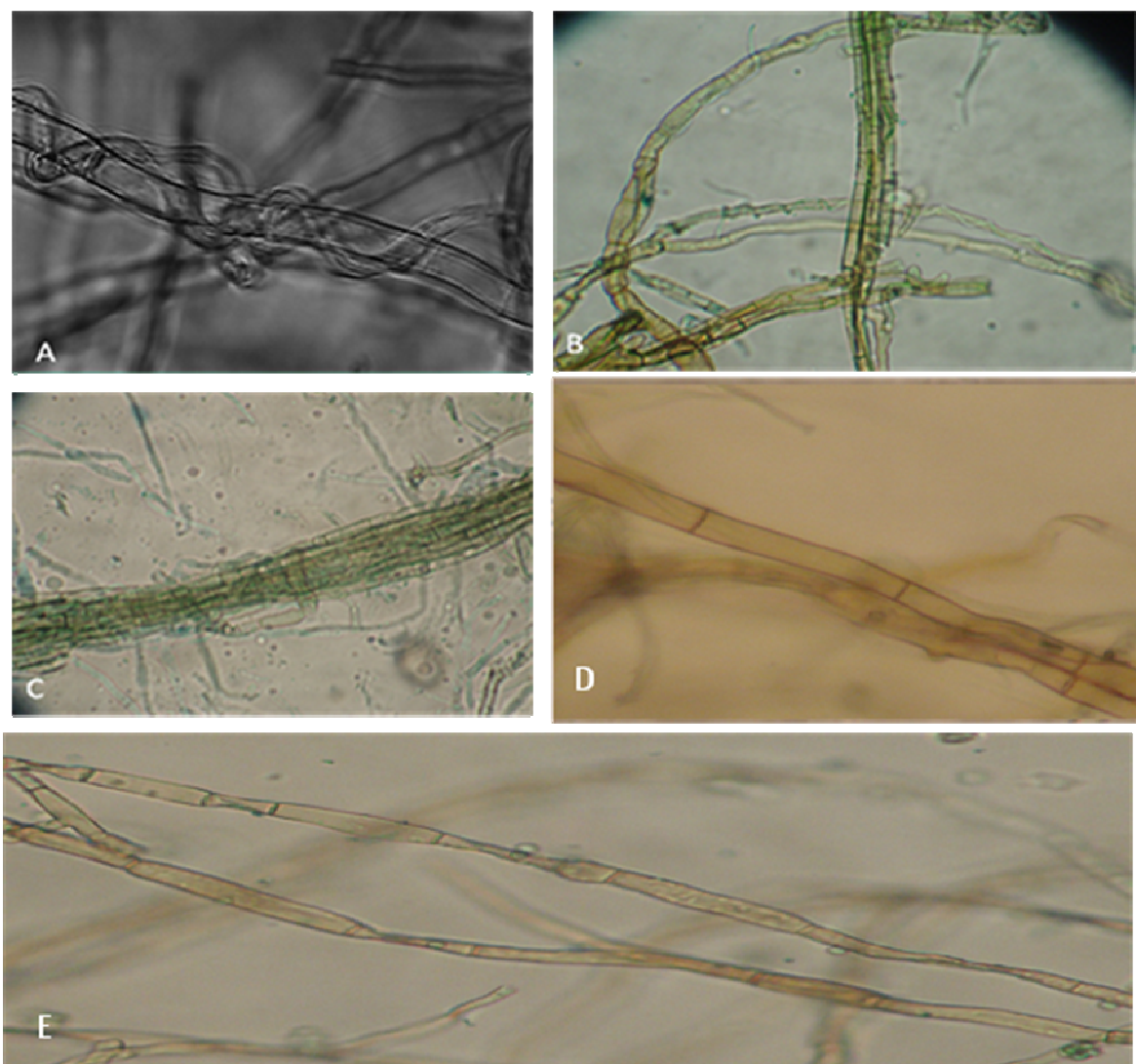


Figura 2- Interações observadas ao microscópio óptico entre hifas de *C. scoparium* e *Trichoderma* spp. : A: (CEN 209) e B: (CEN 500) - enrolamento das hifas de *Trichoderma* em hifas de *Cyindrocladium scoparium*; C: (CEN 498) - crescimento de hifas paralelas de *Trichoderma* e *Cyindrocladium scoparium* e D: Hifa sadia de *Cyindrocladium scoparium*; E: plasmólise em hifas de *C. scoparium* induzida pelo isolados CEN 162 de *Trichoderma*.

Quanto aos resultados relativos aos experimentos com metabólitos voláteis e não voláteis, houve pouca diferença no comportamento dos isolados de *Trichoderma* frente aos dois isolados do patógeno, conforme observado nas Tabelas 3 e 4. Com relação aos metabólitos voláteis, os valores médios da porcentagem de inibição micelial, exercida sobre os isolados CEN 494 e CEN 517 do patógeno, variaram de 7,4% (CEN 519) a 37,7 % (CEN 162, CEN 262 e CEN 498) e de 11,1% (CEN 520) a 33,3% (CEN 209 e CEN 500), respectivamente. Em termos de diâmetro médio de crescimento micelial, seis dos 12

isolados diferiram da testemunha, porém, não diferiram entre si, no confronto com o isolado CEN 494. Já em relação ao isolado CEN 517, todos os isolados de *Trichoderma* diferiram da testemunha. Entre isolados, essa diferença só foi significativa com o isolado CEN 520 comparado aos quatro melhores isolados (CEN 162, CEN 209, CEN 262, CEN 498, CEN 500) deste ensaio.

Tabela 3 - Bioatividade de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. em relação ao crescimento micelial de dois isolados *Cylindrocladium scoparium* (CEN 494 e CEN 517).

Metabólitos Voláteis				
Isolado	CEN 494		CEN 517	
	Diâmetro médio (cm)	Inibição %	Diâmetro médio (cm)	Inibição %
CEN 162 - <i>T. asperellum</i>	5,66 a	37,7	6,33 ab	29,6
CEN 201 - <i>T. harzianum</i>	7,66 bc	14,8	7,66 bc	14,8
CEN 209 - <i>T. pseudokoningii</i>	6,33 ab	29,6	6,0 a	33,3
CEN 262 - <i>T. harzianum</i>	5,66 a	37,7	6,33 ab	29,6
CEN 492 - <i>Trichoderma. sp.</i>	7,66 bc	14,8	7,0 abc	22,2
CEN 498 - <i>T. harzianum</i>	5,33 a	40,7	6,33 ab	29,6
CEN 500 - <i>T. harzianum</i>	5,66 a	37,7	6,0 a	33,3
CEN 515 - <i>T. harzianum</i>	7,0 abc	22,2	7,0 abc	22,2
CEN 516 - <i>T. atroviride</i>	6,33 ab	29,6	7,33 abc	18,5
CEN 518 - <i>T. harzianum</i>	7,66 bc	14,8	7,33 abc	18,5
CEN 519 - <i>T. harzianum</i>	8,33 c	7,44	7,0 abc	22,2
CEN 520 - <i>T. harzianum</i>	8,0 bc	11,1	8,0 c	11,1
Controle	9,0 c	0	9,0 d	0
C.V.	9,3		8,0	

*Colunas seguidas por letras distintas diferem entre si para < 5%.

Quanto aos testes de metabólitos não voláteis, a variação dos valores médios de porcentagem de inibição micelial verificada foi de 4,4% (CEN 519) a 42,2% (CEN 498) e de 4,3% (CEN 492) a 26,6% (CEN 162 e CEN 209), para os isolados CEN 494 e CEN 517, respectivamente. Também neste caso, em termos de diâmetro médio de inibição, 06 dos 12 isolados diferiram da testemunha, porém, quatro se destacaram dentre esses melhores (CEN 262, CEN 498, CEN 500 e CEN 515), no confronto com o isolado CEN

494. Já em relação ao isolado CEN 517, embora seis isolados tenham diferido da testemunha, não houve diferença significativa entre isolados, exceto para o isolado CEN 492, que apresentou o maior valor de diâmetro médio de colônia do patógeno.

Esses dados obtidos revelaram maior tolerância do isolado CEN 517 aos metabólitos voláteis e não voláteis produzidos por *Trichoderma*.

Tabela 4 - Bioatividade de metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. em relação ao crescimento micelial de dois isolados *Cylindrocladium scoparium* (CEN 494 e CEN 517).

Isolado de <i>Trichoderma</i>	Metabólitos não voláteis			
	CEN 494		CEN 517	
	Diâmetro médio (cm)	Inibição %	Diâmetro médio (cm)	Inibição %
CEN 162 - <i>T. asperellum</i>	7,0 abc	22,2	6,66 a	26,6
CEN 201 - <i>T. harzianum</i>	8,0 bc	11,1	7,66 abcd	14,8
CEN 209 - <i>T. pseudokoningii</i>	6,0ab	33,3	6,66 a	26,6
CEN 262 - <i>T. harzianum</i>	5,3 a	40,7	7,0 ab	22,2
CEN 492 - <i>Trichoderma. sp.</i>	7,8 bc	13,3	8,66 cd	4,3
CEN 498 - <i>T. harzianum</i>	5,2 a	42,2	7,0 ab	22,2
CEN 500 - <i>T. harzianum</i>	5,4 a	40	7,0 ab	22,2
CEN 515 - <i>T. harzianum</i>	5,66 a	37,7	7,66 abcd	14,8
CEN 516 - <i>T. atroviride</i>	6,7 ab	25,5	7,33 abc	18,5
CEN 518 - <i>T. harzianum</i>	8,0 bc	11,1	8,0 abcd	11,1
CEN 519 - <i>T. harzianum</i>	8,6 c	4,4	7,66 abcd	14,8
CEN 520 - <i>T. harzianum</i>	8,0 bc	11,1	8,33 abcd	7,4
Controle	9,0 c	0	9,0 d	0
C.V.	9,3		6,0	

*Colunas seguidas por letras distintas diferem entre si para < 5%.

O nível de controle biológico de um patógeno pode variar com o isolado do agente de biocontrole utilizado e com sua adaptabilidade às condições bióticas e abióticas específicas (Dennis e Webster, 1971a; 1971b), dentro e entre espécies de *Trichoderma*. Bell et al. (1982), ao comentar esse assunto, recomendaram a seleção de antagonistas contra doenças específicas. Antibiose exerce importante papel no controle biológico, podendo atuar em conjunto com a competição e agir sinergicamente com o micoparasitismo, resultando em maior nível de controle (Harman, 2000). Testes *in vitro*, baseados nesses mecanismos de biocontrole têm sido largamente utilizados para seleção de

isolados e servem, também, como indicativos do modo de ação do antagonista. Este trabalho representa um esforço para selecionar isolados ativos contra *C. scoparium*, sendo apontados, com base nos resultados obtidos, cinco isolados (CEN 162, CEN 209, CEN 262, CEN 498, CEN 500) como promissores para testes *in vivo*.

Nos ensaios para avaliação da supressão da mancha-foliar causada por *C. scoparium* conduzidos com folhas destacadas de eucaliptos (Tabela 5), com os cinco isolados selecionados de *Trichoderma* spp., observou-se um melhor efeito do antagonista contra o CEN 494 de *C. scoparium*. Nestes tratamentos, todos os isolados do antagonista apresentaram eficiência em suprimir a doença. Os valores médios de severidade da mancha-foliar não ultrapassaram o nível de 1% da escala proposta por Alfenas et al., (2004). Exceção foi verificada com o isolado CEN 498, para o qual esses valores chegaram a 4%. Já nos tratamentos utilizando os isolados CEN 517 do patógeno, índices de doença inferiores aos observados na testemunha foram obtidos com os isolados CEN 162, CEN 262 e CEN 500 (15% de doença). Com o isolado CEN 209 a severidade média de doença foi de 31%, superando a testemunha, com 24%.

Tabela 5 - Efeito de isolados de *Trichoderma* na supressão da mancha-foliar de *C. scoparium*, em folhas de destacadas de eucalipto.

Isolado	Severidade média	
	Isolados de <i>C. scoparium</i>	
	CEN 494 (%)	CEN 517 (%)
CEN 162 - <i>T. asperellum</i>	1	15
CEN 209 - <i>T. pseudokoningii</i>	1	31
CEN 262 - <i>T. harzianum</i>	0	15
CEN 498 - <i>T. harzianum</i>	4	24
CEN 500 - <i>T. harzianum</i>	1	15
Testemunha	24	24

Testes com folhas destacadas têm se mostrado úteis na determinação do potencial de agentes de biocontrole. Por exemplo, Tatagiba et al. (1998) selecionaram isolados de *T.*

inhamatum e *Gliocladium roseum*, para controle de *Botrytis cinerea*, em folhas de roseira. Segundo esses autores, foi possível diferenciar isolados com níveis de redução de esporulação nas lesões, da ordem de 90 a 100%. Também Gomes et al. (2001), embora não tenham alcançado sucesso na avaliação de isolados de *Trichoderma* para controle da mancha-foliar causada por *C. spathulatum*, em folhas destacadas de erva-mate, selecionaram isolados de *Bacillus subtilis*, utilizando esse método. Neste trabalho, aparentemente essa metodologia, com folhas destacadas de eucaliptos, não foi totalmente satisfatória para avaliação da ação antagonista dos isolados de *Trichoderma*. Aos cinco dias de inoculadas com *C. scoparium*, o índice da doença atingido nas parcelas testemunhas foi de 24%, quando o valor máximo da Tabela proposta por Alfenas et al.(2004) é de 44%. O experimento teve que ser encerrado após a primeira leitura, dada à rápida deterioração das folhas, após este período. De qualquer modo, experimentos de campo são sempre necessários para melhor avaliar as potencialidades dos isolados selecionados em laboratório.

O bom desempenho dos isolados de *T. asperellum* (CEN 162), *T. harzianum* (CEN 262, CEN 498 e CEN 500), e *T. pseudokoningii* (CEN 209) nos experimentos *in vitro* mostra que estes, além de práticos, servem para avaliação preliminar da capacidade antagonista e, ainda, o comportamento dos microrganismos, em termos de capacidade de adaptação, crescimento e reprodução. Entretanto, esses testes possuem limitações por não reproduzirem o ecossistema para os quais os organismos são selecionados, podendo os resultados, não coincidirem com aqueles obtidos em condições normais de ambiente (Fortes et al., 2007).

Na esporulação de *Trichoderma* em dois substratos sólidos (grãos de arroz parboilizado e milho), houve interação tripla entre os três fatores (isolados dos antagonistas, períodos de incubação e substratos), de acordo com as Tabelas 6, 7 e 8. Em

termos gerais, maiores taxas de esporulação dos isolados de *Trichoderma*, foram obtidas em arroz parboilizado em relação ao milho, sendo que os valores médios de esporulação dos isolados de *Trichoderma* foram de $3,37 \times 10^9$ conídios/g e $2,84 \times 10^9$ conídios/g, respectivamente. Com respeito ao tempo de incubação, a melhor taxa de esporulação foi obtida aos 11 dias, quando foram contados $3,37 \times 10^9$ conídios/g do substrato, enquanto aos sete dias esse valor foi de $2,85 \times 10^9$ conídios/g (Tabela 6).

Tabela 6 – Efeito dos substratos e tempo de incubação na esporulação de *Trichoderma*.

Efeito substrato		Efeito período de incubação	
Substrato	$\times 10^9$ Esporos.g ⁻¹	Tempo	$\times 10^9$ Esporos.g ⁻¹
Arroz	3,38 a	7 dias	2,85 b
Milho	2,84 b	11 dias	3,37 a
C.V.	11,23	C.V.	9,85

*Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Ao ser analisado o período de incubação de sete dias em relação aos dois substratos, observou-se que os isolados CEN 262, CEN 498 e CEN 519, alcançaram maiores níveis de esporulação. As médias variaram entre $5,6 \times 10^9$ (CEN 262) e $5,8 \times 10^9$ (CEN 498) conídios/g, em milho e $4,9 \times 10^9$ conídios/g, (CEN 519), em arroz parboilizado. Os isolados CEN 209, CEN 492, CEN 515, CEN 518 e CEN 520 apresentaram menores índices de esporulação em arroz parboilizado (CEN 518), milho (CEN 209, CEN 515 e CEN 520) ou em ambos os substratos (CEN 492) com variação de $0,6 \times 10^9$ (CEN 518) a $2,4 \times 10^9$ (CEN 209) conídios/g. Os isolados CEN 162, CEN 201, CEN 500 e CEN 516 esporularam em níveis intermediários, variando em $1,9 \times 10^9$ (CEN 201) a $4,4 \times 10^9$ (CEN 500) conídios/g, sendo que os isolados CEN 162 e CEN 516 proporcionaram maiores níveis de esporulação em arroz parboilizado, enquanto os isolados CEN 201 e CEN 500, em milho (Tabela 7).

Tabela 7 - Esporulação de isolados de *Trichoderma* spp. em dois substratos sólidos diferentes, aos 7 dias de incubação.

Isolados	Esporulação em conídios por grama	
	Arroz parboilizado	Milheto
CEN 162 - <i>T. asperellum</i>	3,5 A c	3,0 B cd
CEN 201 - <i>T. harzianum</i>	1,9 B d	2,6 A cd
CEN 209 - <i>T. pseudokoningii</i>	2,4 A d	0,8 B e
CEN 262 - <i>T. harzianum</i>	5,0 B a	5,6 A a
CEN 492 - <i>Trichoderma. sp.</i>	1,0 A e	1,0 A e
CEN 498 - <i>T. harzianum</i>	4,8 B ab	5,8 A a
CEN 500 - <i>T. harzianum</i>	4,3 B b	4,4 A b
CEN 515 - <i>T. harzianum</i>	2,0 A d	1,0 B e
CEN 516 - <i>T. atroviride</i>	3,5 A c	2,5 B d
CEN 518 - <i>T. harzianum</i>	0,6 B e	3,25 A c
CEN 519 - <i>T. harzianum</i>	4,9 A ab	2,5 B d
CEN 520 - <i>T. harzianum</i>	4,3 A b	0,73 B e
C.V	10,91	7,34

*Esporulação média ($\times 10^9$ esporos.g⁻¹ de substrato). Médias seguidas de mesma letra (maiúscula na horizontal e minúscula na vertical) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Quanto ao tempo de incubação de 11 dias, utilizando os mesmos substratos, observaram-se maiores níveis de esporulação, variando de $4,5 \times 10^9$ (CEN 162) a $7,7 \times 10^9$ (CEN 262) conídios/g com os isolados CEN 162, CEN 201 e CEN 262, sendo que os isolados CEN 162 e CEN 201 esporularam melhor em arroz parboilizado e o CEN 262, em milho. Os isolados CEN 209, CEN 500, CEN 515, CEN 516 e CEN 518 e CEN 519 apresentaram os menores índices de produção de esporos em milho (CEN 209, CEN 519); arroz parboilizado (CEN 515) ou em ambos os substratos (CEN 500, CEN 516 e CEN 518), com variação de $1,0 \times 10^9$ (CEN 516) a $1,6 \times 10^9$ (CEN 518 e CEN 519) conídios/g. Os isolados CEN 492, CEN 498 e CEN 520 esporularam em níveis intermediários, variando de $2,1 \times 10^9$ (CEN 520) a $7,0 \times 10^9$ (CEN 498) conídios/g (Tabela 8).

Os experimentos para avaliação da esporulação de agente de *Trichoderma* demonstram que a variabilidade dos isolados de *Trichoderma* reflete-se, também, em

termos de exigência nutricional e tempo de incubação para produção de esporos. Por outro lado, disponibilidade, custo, rendimento e praticidade são requisitos importantes a serem considerados na escolha do substrato para cultivo do agente de controle, especialmente quando o intuito é o desenvolvimento de biofungicida. Grãos de cereais oferecem essas vantagens, por isso são os mais utilizados (Jacson, 1997; Thangavelu et al., 2004; Fontes et al., 2007). Eles são prontamente biodegradáveis, facilitando as aplicações no campo e, adicionalmente, apresentam facilidade para quantificação dos propágulos produzidos.

Tabela 8 - Esporulação de isolados de *Trichoderma* spp. em dois substratos sólidos aos 11 dias de incubação.

Isolados	11 dias de incubação	
	Esporulação em conídios.g ⁻¹	
	Arroz parboilizado	Milheto
CEN 162 - <i>T. asperellum</i>	4,5 Aa	2,8 Ba
CEN 201 - <i>T. harzianum</i>	4,5 Aa	2,0 Bd
CEN 209 - <i>T. pseudokoningii</i>	1,5 Acde	1,1 Ba
CEN 262 - <i>T. harzianum</i>	5,0 Ba	7,7 Aa
CEN 492 - <i>Trichoderma. sp.</i>	3,3 Ab	3,3 Ac
CEN 498 - <i>T. harzianum</i>	3,3 Bb	7,0 Ab
CEN 500 - <i>T. harzianum</i>	1,3 Ade	1,5 Aef
CEN 515 - <i>T. harzianum</i>	1,1 Bde	3,3 Ac
CEN 516 - <i>T. atroviride</i>	1,0 Ae	1,0 Af
CEN 518 - <i>T. harzianum</i>	1,6 Acd	1,6 Adef
CEN 519 - <i>T.harzianum</i>	3,8 Ab	1,6 Bdef
CEN 520 - <i>T. harzianum</i>	2,1 Ac	2,2 Ad
C.V.	4,37	4,57

*Esporulação média ($\times 10^9$ esporos.g⁻¹ de substrato). Médias seguidas de mesma letra (maiúscula na vertical e minúscula na horizontal) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Conclusão

1) O isolado CEN 517 de *C. scoparium* é mais tolerante do que o CEN 494 à ação dos isolados de *Trichoderma* testados.

2) Bioensaios em folhas destacadas podem ser úteis na seleção prévia do agente de biocontrole da mancha-foliar do eucalipto, porém, tais testes devem ser validados em viveiros de produção de mudas.

3) Em termos de esporulação em substrato sólido, os isolados de *Trichoderma* apresentam respostas variáveis, com o tipo de substrato e período de avaliação utilizado.

Referências Bibliográficas

AGRAWAL, S.C.; KHARE, M.N. & AGRAWAL, P.S. Biological control of *Sclerotium rolfsii* causing collar rot of lentil. **Indian Phytopathology**, v.30, p.176-179, 1977.

ALFENAS, A.C.; DEMUNER, N.L. & SILVA, A.R. Resistência de *Cylindrocladium scoparium*, agente etiológico da podridão de estacas de *Eucalyptus* a Benomyl. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p.234, 1987.

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G. & ASSIS, T.F. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. Viçosa. Editora UFV. 2004.

ANTAL, Z.; VARGA, J.; KREDICS, L.; SZEKERES, A.; HATVANI, L.; MANCZINGER, L.; VAGVOLGYI, C.; NAGY, E. Intraspecific mitochondrial DNA polymorphism within the emerging filamentous fungal pathogen *Trichoderma longibrachiatum*. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.31-35, 2006.

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

CROUS, P.W. & WINGFIELD, M.J. A monograph of *Cylindrocladium*, including anamorphs of *Calonectria*. **Mycotaxon**, v.51. p.341-435, 1994.

DENNIS, C. & WEBSTER J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotic. **Transactions British Mycological Society**. v.57, p.25-39, 1971a.

DENNIS, C. & WEBSTER J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. **Transactions British Mycological Society**. v.57, p.363-369, 1971b.

DHINGRA, O.D. & SINCLAIR, J.B. **Basic Plant Pathology Methods**. CRC Press, Florida. 1985.

DRUZHININA, I.; KUBICEK, C.P. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? **Journal of Zhejiang University Science**, v.6, p.100-112, 2005.

ELAD, Y. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. **Crop Protection**, v.19, p.709-714, 2000.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In. **45ª Reunião Anual da Região Brasileira da sociedade internacional de Biometria**. UFSCar, São Carlos, SP, p. 255-258, 2000.

FERREIRA, F.A. **Patologia florestal: principais doenças florestais do Brasil**. SIF. Viçosa, MG., p. 570, 1989.

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

GOMES, N.S.B.; GRIGOLETTI JUNIOR, A., & AUER, C.G. Seleção de antagonistas para o controle de *Cylindrocladium spathulatum* em erva mate. **Boletim de Pesquisa Embrapa Florestas**, n.43, p.123-138, 2001.

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.

HERMOSA, M.R.; GONDONA, I.; MINGUEZ, J.M.D.; ITURRIAGA, E.A. & MONTE, E. Development of a strain-specific SCAR marker for the detection of *Trichoderma atroviride* 11, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. **Current Genetics**, v.38, p.343-350, 2001.

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.

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

LIMA, L.H.C.; ULHOA, C.J.; FERNANDES, A.P. & FELIX, C.R. Purification of a chitinase from *Trichoderma* sp. and its action on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* cell walls. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.43, p.31-37, 1997.

MELO, I.S. & FAULL, J.L. Parasitismo f *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. **Scientia Agricola**, v.57, p.55 – 59, 2000.

MELLO, S.C.M.; ÁVILA, Z.R.; BRAÚNA, L.M.; PÁDUA, R.R. & GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* spp., para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* SACC. **Fitosanidad**, v.11, p.3-9, 2007.

PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol. **Annual Review Phytopathological**, v.23, p.23-54, 1985.

PERELLÓ, A.; MÓNACO, C.; SIMÓM, M.R.; SISTERMA, M. & DALL BELLO, G. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan spot of wheat in Argentina. **Crop Protection**, v.22, p.1099-1106, 2003.

QUEIROZ, P.R.; VALADARES-INGLIS, M. C. & INGLIS, P. W. Survival in soil and detection of co-transformed *Trichoderma harzianum* by nested PCR. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.403-405, 2004.

RIBEIRO, J.R. **Análises Estatísticas no SAEG**. Viçosa, MG, Brasil: Universidade Federal de Viçosa. 301p. 2001.

ROCHA, J.R.S. & OLIVEIRA, N.T. *In vitro* antagonistic potencial of *Trichoderma* spp. against *Colletotrichum gloeosporioides* agent of anthracnose in the passion fruit (*Passiflora*). **Boletim Micológico**, v.13, p.103-110, 1998.

SAMUELS, G.J. *Trichoderma* in Biological Control: a Taxonomic Reports. 2004. ISTH, International Subcommittee on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy, **Disponível em:** http://isth.info/materials/topic.php?material_id=3. Acessado em 13 de abril de 2008.

SAMUELS, G.J.; CHAVERRI, P.; FARR, D.F. & MCCRAY, E.B. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. **Disponível em:** <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>. Acesso em março de 2008.

TATAGIBA, J.S.; MAFFIA, L.A.; BARRETO, R. W.; ALFENAS, R.W.; ALFENAS, A.C.; SUTTON, J.C. Biological control of *Botrytis cinerea* in residues and flowers of rose (*Rosa hybrida*). **Phytoparasitica**, v.26, p.1-12, 1998.

THANGAVELU, R.; PALANISWAMI, A.; & VELAZHAHAN, R. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing fusarium wilt of banana. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.103, p.259-263, 2004.

XAVIER, A. & COMÉRIO, J. Microestaquia na clonagem de *Eucaliptus*. **Informativo Técnico SIF**. Viçosa, MG, v. 11, p. 10, 1998.

CAPÍTULO IV

Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético *in vitro* e colonização endofítica de mudas de eucalipto.

Resumo – *Trichoderma* spp. são fungos habitantes de solo e geralmente vivem em ambientes próximos às raízes de plantas, no rizoplano ou na rizosfera. Os isolados de *Trichoderma* não são patogênicos às plantas e podem sobreviver endofiticamente em várias espécies botânicas, podendo produzir substâncias que auxiliem a planta, tanto no controle de fitopatógenos como na promoção de crescimento. Os objetivos desse trabalho foram: avaliar a promoção de crescimento em mudas de *Eucalyptus urophilla* e de clones híbridos G-100 (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophilla*); avaliar cinco isolados de *Trichoderma* quanto à produção de ácido indolacético *in vitro* e quanto à capacidade de colonização endofítica em mudas de eucalipto. Observou-se que o isolado CEN 262 (*Trichoderma harzianum*) promoveu aumento significativo da massa seca das raízes, parte aérea e a altura de plantas, nas duas espécies de eucalipto. Os isolados CEN 209, CEN 500 e CEN 262, em ordem crescente, demonstraram produção de AIA *in vitro*, sendo que a concentração do fitohormônio foi 19 vezes maior, nos filtrados de culturas de CEN 262, em relação ao CEN 209. Os isolados CEN 162, CEN 262, CEN 498 foram recuperados de tecidos internos de raízes.

Termo par indexação: Fitohormônio, *Eucalyptus*, miniestacas.

Evaluation of *Trichoderma* isolates in growth promotion, *in vitro* indolacetic acid production and endophytic colonization of eucalyptus seedlings

Abstract - *Trichoderma* spp. are fungi that inhabit soil, and they generally live in environments close to plant roots, in the rhizoplane or rhizosphere. *Trichoderma* isolates

are not pathogenic to the plants and can survive endophytically in various botanical species; they may produce substances that help the plant, both in the control of plant pathogens and also in promoting growth. The goals of this study were to evaluate growth promotion in seedlings of *Eucalyptus urophilla* and clone hybrids G-100 (*Eucalyptus urophilla* x *Eucalyptus grandis*) and to evaluate five *Trichoderma* isolates for their indolacetic acid production and their capacity for endophytic colonization of eucalyptus seedlings. It was observed that CEN 262 isolate (*Trichoderma harzianum*) promoted significant increase in the dry mass of roots, shoots and height of plants in two species of eucalyptus. CEN 209, CEN 500 and CEN 262 isolates, in ascending order, showed IAA production *in vitro*, and concentration of the phytohormone was 19 times greater in filtered cultures of CEN 262 than in those of CEN 209. CEN 162, CEN 262 and CEN 498 isolates were recovered from internal tissues of roots.

Index terms: Phytohormone, *Eucalyptus*, minicuttings.

Introdução

Propagação vegetativa, por meio de estaquia, constitui a principal forma de multiplicação do eucalipto em escala comercial. Essa estratégia de multiplicação clonal tem sido vantajosa, pois mantém características desejáveis, sem a variabilidade encontrada em árvores obtidas a partir de sementes, o que resulta em otimização da área de jardim clonal e em maior grau de juvenilidade e de enraizamento (Higashi et al., 2000). A silvicultura clonal tem como ponto de partida a seleção de genótipos superiores para, posteriormente, proceder-se à propagação clonal massal (Oliveira et. al., 2006). Segundo Mafia et. al., (2005), na propagação clonal do eucalipto por miniestaquia, devem ser considerados dois importantes fatores: a produção de brotos para a estaquia e a capacidade de enraizamento do material genético. Nesse sentido, todos os esforços devem ser despendidos para maximizar esse dois fatores. Assim, toda tecnologia que aperfeiçoe as

condições de crescimento e produção das minicepas favorece diretamente a capacidade produtiva do viveiro.

As condições ambientais para a multiplicação clonal de miniestacas de eucalipto são, também, altamente favoráveis ao desenvolvimento e disseminação de *Cylindrocladium*. Esse patógeno pode causar tombamento e manchas foliares geralmente pequenas, circulares e arroxeadas, distribuídas sobre o limbo foliar, às vezes confundidas com aquelas incitadas por fitobactérias e *Phaeophleospora epicoccoides* (Alfenas et. al., 2004).

Fungos do gênero *Trichoderma* estão entre os organismos mais estudados como antagonistas, principalmente, de patógenos de solo. Embora os mecanismos de ação desses fungos não estejam totalmente elucidados, alguns vêm sendo citados, tais como micoparasitismo; produção de compostos inibitórios; competição por nutrientes e espaço; promoção de crescimento, pela produção de hormônios vegetais ou por solubilização de nutrientes e resistência das plantas a doenças (Harmam, 2000; Marco et. al., 2004; Benítez et al., 2004 e Gravel et. al., 2007)

Outra característica importante apresentada por certos isolados de *Trichoderma* é a capacidade de colonizar, endofiticamente, diferentes órgãos das plantas (Rubini et. al., 2005 e Silva et. al., 2006). O habitat associado à planta é um dinâmico ambiente que possibilita a que vários fatores exerçam influência na composição e estrutura das comunidades microbianas presentes ou em interação com as raízes e outras partes vegetais (Sanogo et al., 2002)

Este trabalho teve como objetivos avaliar isolados de *Trichoderma* quanto à promoção de crescimento em mudas de eucalipto, produção do fitohormônio ácido indolcético (AIA) e capacidade de colonização de mudas de eucalipto.

Material e Métodos

Preparo e obtenção de inóculo de *Trichoderma* para os testes *in vivo*

Cinco isolados de *Trichoderma* foram selecionados para os experimentos *in vivo*, com base em resultados obtidos no biocontrole de *C. scoparium* Morgan (dados não publicados): *T. harzianum* (CEN 262, CEN 498 e CEN 500), *T. asperellum* (CEN 162) e *T. pseudokoningii* (CEN 209). Estes antagonistas fazem parte da Coleção de agentes de controle biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

O inóculo para os ensaios foi produzido em grãos de arroz parboilizado, utilizando, como inóculo - semente, discos de culturas desenvolvidas em meio BDA. Os grãos de arroz, previamente umedecidos com água destilada a 60% (p/v) foram distribuídos em sacos plásticos de polipropileno (300 g de arroz seco /saco), sendo estes vedados com grampos, e autoclavado (120°C durante 25 min). No fechamento, os sacos receberam tampões de gaze e algodão para permitir a troca gasosa com o ambiente externo. Cada saco recebeu, assepticamente, oito discos (5 mm de diâmetro) das colônias de *Trichoderma*. A incubação ocorreu em incubadora B.O.D. à temperatura de 25°C com fotoperíodo de 12 horas. A cada dois dias o substrato foi revolvido para promover a troca gasosa, aumento da superfície de contato do fungo e substrato e quebra do micélio para aumentar a taxa de esporulação dos isolados de *Trichoderma*. Após sete dias de incubação, o substrato de cada saco foi lavado com água corrente para a extração dos conídios. A concentração de conídios foi determinada em câmara de Neubauer e ajustada a 10^7 conídios/mL de suspensão.

Os experimentos foram conduzidos em dois viveiros comerciais de mudas de eucalipto, um em sistema de minijardim clonal, localizados nos município de Luziânia (GO) e outro, com a produção de mudas por sementes, localizado em Patos de Minas

(MG). Foram adicionados 100 mL da suspensão fúngica (10^7 conídios/mL) em 30 quilos de substrato composto por casca de arroz carbonizada e vermiculita na proporção de 1:1, previamente enriquecido com macro e micro nutrientes (45 g do adubo comercial Osmocote), seguido da homogeneização em misturador do tipo betoneira. Tubetes com volume de 50 cm³, previamente esterilizados conforme o método descrito por Alfenas et. al. (1999) foram preenchidos com essa mistura.

No minijardim clonal, cada tubete com o substrato recebeu uma estaca do clone G-100 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*) e foram, então, acondicionados em casa de enraizamento dotada de sistema de irrigação por nebulização. Decorridos 20 dias, as mudas foram transferidas para área com 50% de sombreamento, onde permaneceram por 10 dias. Ao completar 30 dias de idade, as mudas foram transferidas para canteiros a céu aberto, recebendo duas aplicações foliares com suspensões de *Trichoderma* nas mesmas concentrações anteriores, com intervalo de 30 dias.

No viveiro não protegido, os tubetes contendo substrato inoculado com *Trichoderma*, preparado como descrito acima, após receberam as sementes da espécie *Eucalyptus urophylla* foram mantidos em canteiros a céu aberto, com irrigação por aspersão. Após germinação, foi feito o desbaste, deixando uma planta por tubete. As mudas receberam aplicações mensais de suspensão de *Trichoderma*, como no experimento anterior.

Em ambos os experimentos, as plantas foram avaliadas quanto à altura, com o auxílio de régua milimetrada, arrancadas com as raízes e conduzidas ao laboratório. As raízes foram separadas na região do colo e lavadas, drenando-se o excesso de água. Foram então colocadas em estufa (70°C), raízes e parte aérea, tomando-se os valores de massa seca, após secagem por 48 horas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso com 3 repetições, sendo que cada repetição foi composta por uma bandeja contendo 214 mudas de eucalipto. Os dados obtidos foram avaliados pelo teste de Tukey (5% de probabilidade) utilizando o programa de estatística SISVAR (Ferreira, 2000).

Produção de Ácido Indolacético por *Trichoderma*

Os mesmos isolados de *Trichoderma* utilizados nos experimentos de promoção de crescimento foram transferidos para frascos de 250 mL, contendo 100 mL de meio BD (Batata Dextrose). Como inóculo, utilizaram-se cinco discos (5 mm de diâmetro) retirados da zona de crescimento de colônias com cinco dias de idade. As culturas foram incubadas em estufas incubadoras (Lab-line incubator-shaker modelo NT 711), com agitação a 150 rpm, à temperatura de 25 °C, durante sete dias. Após esse período, a parte líquida foi coletada por filtração a vácuo, utilizando papel de filtro (14 µm). Os filtrados das culturas foram distribuídos em tubos de ensaio e adicionados do Reagente de Salkowski, composto por 150 mL de HClO₄, 250 mL de água destilada e 7,5 mL de 0,5 M de FeCl₃.6H₂O, na proporção 1:2 (v/v), de acordo com a metodologia descrita por Gravel et al. (2007). Foram utilizados dois controles negativos: 1) tubo de ensaio contendo 1 mL do filtrado e 2 mL de água destilada; 2) tubo de ensaio contendo 1 mL de água destilada e 2 mL do reagente de Salkowski. Os tubos de ensaio, contendo as soluções, foram agitados por 30 segundos e, então, incubados à temperatura ambiente, por 20 minutos. A produção de AIA foi avaliada em espectrofotômetro, com absorvância de 535 nm (Gravel et al., 2007). As determinações de AIA de cada amostra foram realizadas em triplicata, ou seja, 3 erlenmeyers para cada tratamento.

Colonização endofítica de *Trichoderma* em mudas de eucalipto

Utilizaram-se mudas de eucalipto procedentes de viveiro comercial de Luziânia (GO). As mudas cultivadas em tubetes e com 90 dias idade haviam sido tratadas (três aplicações, uma com tratamento do substrato e duas pulverizações) com os isolados de *Trichoderma* CEN 162, CEN 209, CEN 262, CEN 498 e CEN 500, no ensaio anterior. Em laboratório, as mudas foram lavadas em água corrente, sem ferir as amostras e descartando-se as danificadas. A desinfecção superficial dos órgãos da plantas deu-se através de lavagens por imersão, como a seguir: duas vezes em água destilada esterilizada por 30 segundos, seguida de solução de álcool etílico a 70% por 1 minuto, solução de hipoclorito de sódio a 3% por 4 minutos, novamente em solução de álcool etílico a 70% por 30 segundos e três vezes em água destilada por 1 minuto, para retirar os resquícios dos esterilizantes, conforme utilizado por Pimentel (2006).

Em dez plantas amostradas, foram utilizados quatro pedaços de cada órgão obtidas da seguinte maneira: as folhas foram cortadas em discos de 5 mm; os caules, em fragmentos de 3 a 5 mm e as raízes, em fragmentos de 1 a 2 cm. O material foi plaqueado e misturado de acordo com cada órgão e tratamento relacionado em meio BDA e incubados em câmara BOD a 25° C, com fotoperíodo de 12 horas, durante 5 dias. Também foram plaqueadas amostras retiradas de plantas com as mesmas características do ensaio, porém, não tratadas com *Trichoderma*. Foram realizadas três repetições para cada porção de órgãos das plantas inseridos nas placas de Petri , por amostra.

Resultados e Discussão

Nos experimentos de avaliação *Trichoderma* como promotor de crescimento, conduzidos com o clone G-100 (Tabela 1), os isolados CEN 162 e CEN 262 apresentaram as maiores médias de massa seca de raiz e parte aérea, diferindo significativamente das testemunhas. Os incrementos médios chegaram a 136% do peso seco de raiz e parte aérea em relação à testemunha. Para os isolados CEN 209, CEN 498, os valores médios desse incremento foram intermediários. O isolado CEN 500, por sua vez, não diferiu significativamente da testemunha, não tratada com *Trichoderma* (Figura 1).

Em termos de desenvolvimento de parte aérea, o isolado CEN 262 diferiu significativamente de todos isolados, com plantas mais robustas, o que resultou em um aumento médio de altura de 43% em relação à testemunha. As plantas tratadas com os isolados CEN 162, CEN 209 e CEN 498 mostraram-se, em média, 22,7% maiores do que a testemunha e não diferiram significativamente do isolado CEN 500 e da testemunha.

Tabela 1 - Promoção de crescimento de mudas de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, Luziânia, GO.

Isolados	<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i>		
	Massa seca (g)		
	Raiz	Parte aérea	Altura (cm)
CEN 162 - <i>T. asperellum</i>	0,52 a	1,54 a	38,8 b
CEN 209 - <i>T. pseudokoningii</i>	0,35 bc	1,1 bc	37,9 b
CEN 262 - <i>T. harzianum</i>	0,54 a	1,66 a	44,2 a
CEN 498 - <i>T. harzianum</i>	0,36 b	1,16 b	36,8 b
CEN 500 - <i>T. harzianum</i>	0,28 bc	0,84 cd	32,7 c
Testemunha	0,22 c	0,7 d	30,8 c
C.V	29,1	26,2	17,35

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ($p < 0,05$).



Figura 01 – Enraizamento e crescimento de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em substrato tratado com os isolados de *Trichoderma*, CEN 162, CEN 209, CEN 262, CEN 498, CEN 500 e com aspersões adicionais com suspensões fúngicas. A testemunha não recebeu tratamento com o fungo.

No experimento conduzido no município de Patos de Minas (MG) com mudas geradas a partir de sementes de *Eucalyptus urophylla* (Tabela 2), as análises estatísticas revelaram que as médias dos pesos de matéria seca de raízes e partes aéreas das plantas tratadas com o isolado CEN 262 (*Trichoderma harzianum*) foram significativamente superiores às plantas tratadas com os demais isolados de *Trichoderma*. O incremento médio de matéria seca obtido com esse isolado foi de 37,5% em relação à testemunha. Os isolados CEN 162, CEN 209, CEN 498 e CEN 500 não diferiram significativamente dos valores médios das testemunhas, em termos de matéria seca, tanto de raiz como de parte aérea.

As plantas tratadas com os isolados CEN 162, CEN 262 e CEN 498 apresentaram alturas semelhantes à da testemunha. Já aquelas tratadas com os isolados CEN 209, CEN 262 e CEN 500 mostraram crescimento menor que o apresentado pela testemunha.

Tabela 2 - Promoção de desenvolvimento em mudas de *Eucalyptus urophylla* por isolados de *Trichoderma*, Patos de Minas (MG).

Isolados	<i>Eucalyptus urophylla</i>		
	Massa seca (g)		
	Raiz	Parte aérea	Altura (cm)
CEN 162 - <i>T. asperellum</i>	0,4 b	1,0 cd	26,7 a
CEN 209 - <i>T. pseudokoningii</i>	0,45 ab	0,9 cd	19,0 b
CEN 262 - <i>T. harzianum</i>	0,55 a	1,5 a	29,7 a
CEN 498 - <i>T. harzianum</i>	0,4 b	1,12 bc	27,5 a
CEN 500 - <i>T. harzianum</i>	0,4 b	0,6 cd	20,5 b
Testemunha	0,4 b	0,7 cd	20,7 b
C.V.	25,9	34,2	24,1

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ($p < 0,05$).

Os experimentos conduzidos nas duas localidades apresentaram diferentes resultados, indicando respostas diferenciadas aos isolados de *Trichoderma* em relação ao uso de clone e sementes na produção de mudas. Esses resultados mostram que a ação dos isolados de *Trichoderma* são em nível de espécies para essas duas variedades de eucalipto. Ousley et al. (1993) relataram resultados evidenciando respostas diferenciadas a isolados de *Trichoderma*, sobre o crescimento de alface e trigo. Esses autores utilizaram isolados produtores de viridiol, um antibiótico que, aparentemente, teve efeito negativo na germinação de alface (*Lactuca sativa* L.) e outros isolados, produtores de ácidos graxos e glicerol, que atuaram positivamente no crescimento de trigo (*Triticum aestivum* L.). Harmann (2000) mostrou, em estudos conduzidos em casa de vegetação e campo, que aplicações de *Trichoderma* (T-22) no solo aumentou a taxa de desenvolvimento do tomateiro. Esse autor postula que esse efeito encontrado em seus estudos seja pelo controle da microbiota deletéria as raízes, já que foi constatada a colonização dos pelos radiculares pelo *Trichoderma* ou, ainda, pela ação direta, sobre as plantas, de metabólitos não

identificados, produzidos pelo antagonista. Resende (2004) verificou com um isolado de *T. harzianum*, maior acúmulo de matéria seca nas raízes das plantas de milho oriundas de sementes inoculadas. As raízes das plantas apresentaram sinais da colonização pelo *Trichoderma*. Lynck (1992) relatou o potencial do *Trichoderma* como agente biológico na agricultura, pela habilidade em estimular o crescimento de plantas, visto que esse proporcionou um aumento de 27 a 54% do peso fresco de alface. Tsahouridou e Thanassolopoulos (2001) observaram que isolados de *T. koningii* promoveram significativamente maior emergência de sementes de tomate e, também, aumento de peso seco e fresco em relação às plantas não tratadas com *Trichoderma*. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho corroboram com dados obtidos por diferentes autores, mostrando o grande potencial de uso agrícola desse fungo.

A partir da metodologia adotada por Gravel et al. (2007) observaram-se diferenças na produção de AIA entre os isolados de *Trichoderma* (Figura 2). Entretanto, outros fatores podem estar envolvidos na promoção de crescimento. De acordo com resultados obtidos neste trabalho, os isolados CEN 162 e CEN 498 não apresentaram produção de AIA em níveis detectáveis, enquanto com os isolados CEN 209 e CEN 500, esse hormônio foi detectado em baixos níveis. O isolado CEN 262 revelou níveis consideravelmente superiores em relação aos demais isolados, por exemplo, 19 vezes mais produção de AIA do que a detectada com o CEN 209 (Figura 2).

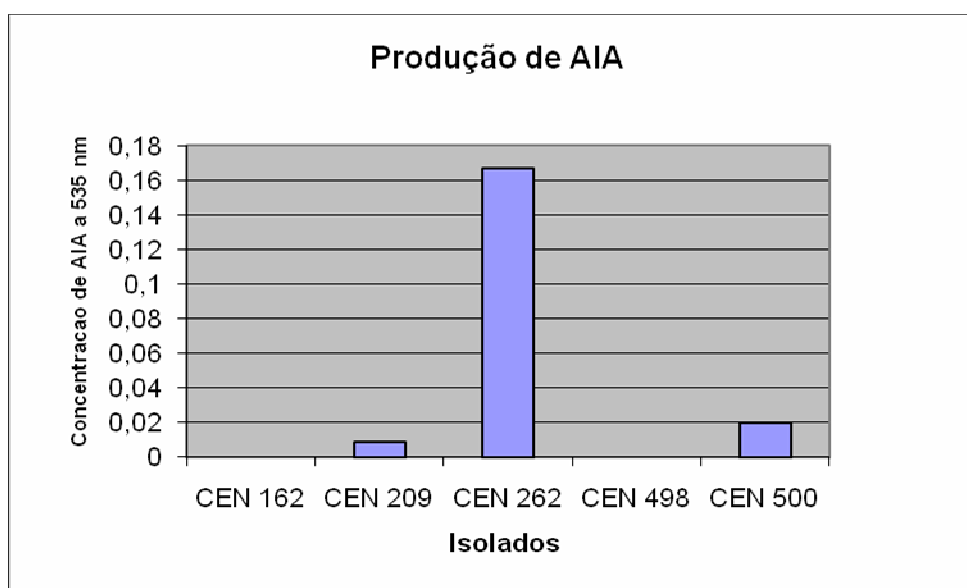


Figura 2 – Produção de AIA pelos isolados de *Trichoderma* spp. a 535 nm de absorvância.

A concentração elevada de AIA verificada nas análises de filtrado de cultura do isolado CEN 262 são compatíveis com os valores obtidos nos experimentos relativos ao desenvolvimento de miniestacas de eucalipto clonal, que atingiu aumento de 137%, 145% e 43% de parte aérea, raiz e altura das plantas, respectivamente, comparados à testemunha. Esse dado está em concordância com os resultados descritos por Gravel et al., (2007) que encontraram correlação entre a produção de AIA *in vitro* por um isolado de *T. atroviride in vitro* e a promoção de crescimento de plantas de tomate tratadas com o fungo, em cultivo hidropônico. Esses autores sugeriram a produção desse fitohormônio como mecanismo usados por alguns isolados de *Trichoderma*, que resultaria em maior enraizamento e crescimento de plantas e que, também, constituiria estratégica do hiperparasita em suas interações antagonistas. Esse postulado encontra sustentação no trabalho conduzido por Roco e Pérez (2001), ao demonstrar que a adição de AIA no meio de cultura não teria afetado o desenvolvimento de *T. harzianum*, mas teria reduzido o crescimento radial de colônias de *Alternaria alternata*.

Outros estudos devem ser desenvolvidos para demonstrar a possível correlação entre produção de AIA e promoção de crescimento de mudas de eucalipto, no caso específico do isolado CEN 262. Vale lembrar, entretanto, que filtrado de cultura do isolado CEN 162, embora não tenha mostrado presença de AIA pelo método de análise de utilizado, demonstrou efeito altamente positivo no desenvolvimento das miniestacas de eucalipto, nos ensaios conduzidos com o híbrido G-100.

De acordo com Bjorkman (2004), as taxas de crescimento de raízes de milho com alta sensibilidade a AIA podem ser reduzidas com adição desse fitohormônio, enquanto que a adição de AIA exógeno nas raízes de milho com baixa sensibilidade a esse fitohormônio pode resultar em maior taxa de crescimento. Parece razoável, portanto, sugerir que mudas de *E. urophylla* apresentam menor sensibilidade a AIA exógeno produzidos pelos isolados de *Trichoderma* em relação aos clones, já que as mudas obtidas de sementes e tratadas com o isolado CEN 262 apresentaram incremento médio em produção de raízes, de 37,5% . Por outro lado, as mudas tratadas com os isolados CEN 209 e CEN 500, produtores de AIA, não diferiram significativamente das testemunhas. As mudas clonais tratadas com esses mesmos isolados, por sua vez, apresentaram ganhos médios de peso seco de raízes, que variaram de 136% (CEN 262) a 27% (CEN 500).

As tentativas de localizar *Trichoderma* nas mudas de clones de eucaliptos G-100 revelaram ausência de qualquer indício de colonização pelo fungo, em todos os órgãos das mudas clonais de eucalipto, à exceção das raízes daquelas que foram tratadas com os isolados CEN 162, CEN 262 e CEN 498 (Tabela 3).

Tabela 3 – Detecção da presença endofítica de *Trichoderma* em mudas tratadas com isolados do fungo.

Plantas tratadas	Órgãos das plantas		
	Folhas	Caules	Raízes
Isolados			
CEN 162 - <i>T. asperellum</i>	-	-	+
CEN 209 - <i>T. pseudokoningii</i>	-	-	-
CEN 262 - <i>T. harzianum</i>	-	-	+
CEN 498 - <i>T. harzianum</i>	-	-	+
CEN 500 - <i>T. harzianum</i>	-	-	-
Testemunha	-	-	-

Os antagonistas que apresentaram efeito positivo no desenvolvimento das mudas clonais de eucalipto foram os mesmos detectados colonizando raízes das mudas, ou seja, os isolados que não promoveram desenvolvimento de mudas, não foram capazes de colonizar as raízes. Fungos do gênero *Trichoderma* têm sido encontrados colonizando, endofiticamente, plantas de diversas famílias botânicas, sem causar doenças ou, auxiliando a planta a controlar patógenos. Souza et al. (2004) isolaram inúmeros fungos endofíticos de plantas tóxicas da Amazônia, *Palicourea longiflora* Rich e *Strychnos cogens* Bentham, inclusive *Trichoderma*, comprovando, atividades biocontroladoras desses isolados endofíticos, contra vários patógenos de plantas. Evans et al. (2003), por outro lado, não obteve sucesso no re-isolamento de espécies de *T. harzianum* e *T. spirale* de folhas, embora esse fungo tenha sido isolado a partir de galhos e frutos de *Theobroma gileri*. De acordo com os autores, os isolados obtidos mostraram eficiência contra *Crinipellis roreri*. Portanto, os isolados de *Trichoderma* com presença endofítica nas raízes de eucalipto, provavelmente, desempenham algum tipo de relação com essas plantas.

Conclusão

1. Alguns isolados de *Trichoderma* revelaram produção do fitohormônio AIA, em testes de filtrados de colônias com o reagentes de Salkowski.

2. O isolado CEN 262 de *T. harzianum*, que apresentou maior produção do fitohormônio AIA, demonstrou também capacidade de colonizar raízes das mudas de eucalipto do clone G-100.
3. O isolado CEN 262 proporcionou o maior índice de desenvolvimento em raízes e parte aéreas das mudas de eucaliptos.

Referências Bibliográficas

ALFENAS, A.C. Mofo-cinzento, causado por *Botrytis cinerea* (Persoon ex Fries) em estacas e microestacas de *Eucalyptus* sp., resistência a benomil e erradicação de inóculo do patógeno com água quente. **Revista Árvore**, v.4, n.23, p.497-500, 1999.

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. Viçosa. Editora UFV. 2004. 442p.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R.G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa. Editora UFV, v.01, 2007. 382 p.

BJORKMAN, T. Effect of Trichoderma colonization on auxin-mediated regulation of root elongation. **Plant Growth Regulation**, v.43, p.89-92, 2004.

Evans H.C.; Holmes, K.A.; Thomas, S.E. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. **Mycological Progress**, v.2, p.149-160, 2003.

Ferreira, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In. 45^a **Reunião anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria**. UFSCar, São Carlos, SP, Julho de 2000. p.255-258.

Gravel, V.; Antoun, H.; Tweddell, R.J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). **Soil Biology & Biochemistry**, v.39, p.1968-1977, 2007.

Harman, G.E. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v.84, p. 377-93, 2000.

HIGASHI, E.N.; SILVEIRA, R.L.V.A.; GONÇALVES, A.N. Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: Princípios básicos e a sua evolução no Brasil. **Circular Técnica, IPEF**. n.192, p.11, 2000.

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

LYNCK, J.M.; Wilson, K.L.; Ousley, M.A.; Whipps, J.M. Response of lettuce to *Trichoderma* treatment. **Letters in Applied Microbiology**, v.12, p.59-61, 1991.

MAFIA, R.G.; ALFENAS A.C.; FERREIRA E.M.; ZARPELON, T.G.; SIQUEIRA, L. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratado com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**, v.29, n. 6, p.843-851, 2005.

MARCO, S.;D.; OSTI, F.; CESARI, A. Experiments on the control of esca by *Trichoderma*. **Phytopathology Mediterrania**, v.43, p.108-115, 2004.

OLIVEIRA, M.L.; XAVIER, A.; SANTOS, A.P.; ANDRADE H.B. Efeito da estaquia, miniestaquia, microestaquia e micropropagação no desempenho de clones silvicultural de clones híbridos de *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore**, v.30, n.4, p.503-512, 2006.

OUSLEY, M.A.; LYNCH, J.M.; WHIPPS, J.M. Effects of *Trichoderma* on plant growth: a balance between inhibition and growth promotion. **Microbial Ecology**, v.26, p.277-285, 1993.

PIMENTEL, I.C.; KUCZKOWSKI, F.R.; CHIME, M.A.; AUER, C.G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). **Floresta**, v.36, n1, p.123-128, 2006.

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

ROCO, A.; PÉREZ, L.M. *In vitro* biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* on *Alternaria alternata* in the presence of growth regulators. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.4, p.1-6, 2001.

RUBINI, M.; R.; RIBEIRO, R.;T.;S.; POMELLA, A.;W.;V.; MAKI, C.;S.; ARAÚJO, W.;L.; SANTOS, D.;R.; AZEVEDO, J.;L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biology Science**, v.1, p.24-33, 2005.

SANOGO, S.; POMELLIA, A.; HEBBAR, P.K.; BAILEY, B.; COSTA, J.C.B.; SAMUELS, G.J. & LUMSDEN, R.D. Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipellis pernicioso* on cacao. **Phytopatology**, v.92, p.1032-1037, 2002.

SILVA, R.L.O.; LUZ, J.S.; SILVEIRA, E.B.; CAVALCANTE, U.M.T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha. **Acta Botânica Brasileira**, v.23, p.649-655, 2006.

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

TSAHOURIDOU, P.C.; THANASSOULOPOULOS, C.C. Proliferation of *Trichoderma koningii* in the tomato rhizosphere and the suppression of damping-off by *Sclerotium rolfsii*. **Soil Biology & Biochemistry**, v.34, p.767- 776, 2001.

Considerações finais

O fungo *C. scoparium* é encontrado em todas as regiões brasileiras, causando várias doenças em eucaliptos como a mancha-foliar e o tombamento. Essas doenças podem afetar o enraizamento e crescimento de eucalipto, principalmente na fase de mudas, onde seu desenvolvimento ocorre em viveiros ou minijardins. Os métodos de controle desses fitopatógenos são baseados no uso de fungicidas, que aumentam o custo da produção das mudas e contribuem para a contaminação do meio ambiente. Várias espécies do gênero *Trichoderma*, são, comprovadamente, organismos com alta eficiência no controle biológico de doenças de plantas, além de atuarem como promotores de enraizamento e crescimento de plantas. Neste trabalho, foram selecionados isolados de *Trichoderma* altamente promissores para a cultura do eucalipto. A utilização prática em massa desse fungo para o controle da mancha-foliar causada por *C. scoparium* depende do desenvolvimento de pesquisa que focalizem formulações e métodos de dispersão do agente de biocontrole. Estudos taxonômicos também constituem um aspecto relevante no desenvolvimento de programas de controle biológico, especialmente no caso das espécies de *Trichoderma*, para as quais a taxonomia não está bem estabelecida. Caracterização em nível de espécies deve ser elaborada não apenas com base nos aspectos morfológicos e coloniais, mas também pelo uso de marcadores moleculares para identificação acurada das espécies.