

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

COMPATIBILIDADE DE *Trichoderma* spp. A PRINCÍPIOS ATIVOS DE  
FUNGICIDAS COMERCIAIS APLICADOS NA CULTURA DO FEIJÃO

Priscila Pauly Ribas  
Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia/UERGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia  
Ênfase em Fitopatologia

Porto Alegre (RS), Brasil  
Março de 2010

FOLHA DE HOMOLOGAÇÃO

Dedico ao meu avô Ervino Pauly,  
que estaria muito orgulhoso

## AGRADECIMENTOS

Já dizia um homem que admiro muito: “Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta”, por isso, agradeço a Deus por a cada novo dia me dar a oportunidade de escrever a minha própria história e recomeçar, se achar necessário!

Não tenho palavras pra agradecer a minha mãe, Maria Lúcia Pauly, uma mulher forte, que me educou sozinha, abdicou dos seus desejos pra realizar os meus e ainda hoje torce pra que eu possa sempre ser alguém melhor, apóia, incentiva e se orgulha de tudo aquilo que eu faço. Tenho muita admiração pela pessoa maravilhosa que tu és, mãe!

Ao meu pai agradeço pelo esforço em tentar estar presente em minha vida e por ajudar a realizar os meus sonhos, mesmo sem entender.

Ao meu avô-pai, Ervino Pauly, agradeço em especial por estar comigo sempre, ainda hoje, dentro do meu coração, ajudando a fazer escolhas de acordo com aquilo que ele me ensinou. “Tá tudo errado, compadre, tá tudo errado!”

Jonas te agradeço por tudo, nem sei por onde começar... amor, companheirismo, apoio, paciência, compreensão, carinho e nesse momento, conhecimentos de informática! Agradeço também a tua família, por ser aqui, um pouquinho da minha.

Aos meus tios, Vera, Ivone, Ivanir, Darci, Gilmar, Mauro, Ivanete e a “Dinda” Rosi que sempre me incentivaram e me apoiaram e que, perto ou longe, são muito importantes pra mim, sempre. Tia Darcila e tio Jair, vocês também me ensinaram muito!

Aos primos, meus “quase” irmãos, amo muito. Em especial Sandro, Carla, Lucas, Isabela e Mariana, que estiveram sempre presentes em todos os momentos.

Aos “Bolas”, Patrícia e Cássio. Amigos queridos, obrigada pela amizade sempre presente, fazendo com que Ivaiporã fique bem pertinho de Porto Alegre!

“Bando” da UERGS, não sei o que seria de mim sem vocês! Manu, Camille, Angéli, Duda, Dani, Márcia, Crica, Naiana, Gi, Lisa, Cris, Éder e Martim, vocês fazem parte dos melhores momentos da minha vida! Ao Éder pelo apoio na reta final da dissertação.

Ao povo que fez parte do “antigo Lab. 4” Marcus, Rita, Alexandre, Juliana e principalmente Isabel, minha “chefa” do coração, responsável por muito do que aprendi nos últimos três anos! Aos amigos do Departamento de Fitossanidade, da Micro, dos Solos, da ESALQ, da Biofábrica...

Aos professores que fizeram parte da minha formação (E.E.E.B. Érico Veríssimo, UERGS, UFRGS), como a professora Andréia, que fez despertar o interesse pela pesquisa e a professora Aida, que me ensina muito, mais que uma orientadora, uma amiga, alguém que posso confiar e contar muito além dos quatro cantos do laboratório. À Julia e Marisa, secretárias do Departamento de Fitossanidade e PPG Fitotecnia, respectivamente, pelo auxílio e amizade.

Também agradeço a CAPES, pelo auxílio financeiro que possibilitou a execução desse projeto.

Agradeço a todos, que entraram e saíram da minha vida, ajudando, atrapalhando, ensinando, divertindo, magoando, acompanhando, torcendo...

Théo e Joe... miau!

# COMPATIBILIDADE DE *Trichoderma spp.* A PRINCÍPIOS ATIVOS DE FUNGICIDAS COMERCIAIS APLICADOS NA CULTURA DO FEIJÃO<sup>1</sup>

Autora: Priscila Pauly Ribas

Orientadora: Aida Terezinha Santos Matsumura

Co-orientadora: Andréia Mara Rotta de Oliveira

## RESUMO

O uso de fungicidas representa um dos principais métodos de controle de doenças em plantas, entretanto, o uso de produtos químicos causa impactos no meio ambiente e na saúde humana. O uso do controle integrado é uma alternativa ao uso desses produtos. A implementação dessa prática requer cuidado, já que os agentes de controle biológico podem ser afetados pelos produtos químicos. O trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito de princípios ativos captana, carbendazim, fluazinam, iprodiona e tiofanato metílico sobre o fungo antagonista, *Trichoderma spp.* (*Trichoderma harzianum* TH11, *Trichoderma viride* TV21 e *Trichoderma sp.* T04, T16 e T20). Foram analisados os parâmetros crescimento vegetativo, esporulação, confronto direto, produção de metabólitos voláteis, produção de enzimas e sideróforos em meio de cultura suplementado com cada princípio ativo. Os princípios ativos carbendazim, fluazinam e iprodione mostraram-se muito tóxicos aos isolados testados, em todas as concentrações. O princípio ativo captana mostrou-se moderadamente tóxico ao isolado T04 e tóxico ao isolado TV21 na concentração 120 g/L. Para os demais isolados e concentrações captana foi compatível. O princípio ativo tiofanato metílico também foi compatível em todas as concentrações para os isolados T04, T16, T20 e TV21. A concentração de 2800 g/kg desse princípio ativo foi moderadamente tóxica ao isolado TH11. As demais concentrações de tiofanato metílico foram compatíveis com esse isolado. Não é possível definir o efeito de captana, carbendazim, fluazinam e iprodiona sobre o confronto direto dos isolados testados e o patógeno, já tiofanato metílico não interfere na ação dos isolados. A produção de metabólitos voláteis é afetada pelos princípios ativos captana, carbendazim, iprodiona e tiofanato metílico. Com fluazinam, o desenvolvimento do patógeno foi menor devido a ação dos metabólitos voláteis, entretanto não é possível definir se a ação é sinérgica ou apenas provocada pelo produto químico. Todos os isolados produziram enzimas e sideróforos. Os princípios ativos impediram a detecção da produção de enzimas. Captana inibiu a produção de sideróforos. Dessa forma, é necessária a realização de testes de compatibilidade entre princípios ativos e agentes de controle biológico antes de sua aplicação no campo para controle integrado de doenças de plantas.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (104p). Março, 2010.

# COMPATIBILITY OF *Trichoderma* spp. TO ACTIVE INGREDIENTS OF COMMERCIAL FUNGICIDES APPLIED IN BEAN CULTURE<sup>2</sup>

Author: Priscila Pauly Ribas

Adviser: Aida Terezinha Santos Matsumura

Co-adviser: Andréia Mara Rotta de Oliveira

## ABSTRACT

The use of fungicides is one of the main methods of plant disease control, however, these chemicals cause impacts on the environment and on human health. The use of integrated control is an alternative to the use of these products. The implementation of this practice requires caution as the biological control agents can be affected by the chemical products. The aim of this work was to evaluate the effects of active ingredients captan, carbendazim, fluazinam, iprodione and thiophanate-methyl on *Trichoderma* spp. isolates (*Trichoderma harzianum* TH11, *Trichoderma viride* TV21 and *Trichoderma* sp. T04, T16 and T20). Samples were analyzed for vegetative growth, sporulation, direct confrontation, volatiles metabolites production, enzymes and siderophores production in culture medium supplemented with each active ingredient. The active ingredients carbendazim, fluazinam and iprodione were very toxic to isolates at all concentrations. The active ingredient captan was moderately toxic to T04 and toxic to TV21 isolates in 120 g/L of concentration. For other isolates and captan concentrations was compatible. The active ingredient thiophanate-methyl was also compatible at all concentrations for isolates T04, T16, T20 and TV21. The concentration of 2800 g/kg of this active ingredient was moderately toxic to TH11. The remaining concentrations of thiophanate-methyl was compatible with this isolate. Can not define the effect of captan, carbendazim, iprodione and fluazinam in direct confrontation of the isolates and pathogens, just thiophanate-methyl does not affect the action of isolates. The production of volatiles metabolites is affected by the active ingredients captan, carbendazim, iprodione and thiophanate-methyl. With fluazinam, the development of the pathogen was reduced by the action of volatiles metabolites, however is not possible to define if the action is synergistic or merely caused by the chemical product. All isolates produced enzymes and siderophores. The ingredient actives prevented the enzyme production detection. Captan inhibited the siderophores production. Thus, with this work it was possible to verify the need of compatibility tests between active ingredients and biological control agents before their implementation at the field level for the integrated control of plant diseases.

---

<sup>2</sup> Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (104p.) March, 2010.

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1 Controle biológico de doenças de plantas .....	4
2.1.1 <i>Trichoderma</i> sp. ....	5
2.1.2 Interações entre <i>Trichoderma</i> sp. e fitopatógenos .....	7
2.2 Controle químico de doenças de plantas .....	12
2.2.1 Grupo das dicarboximidas .....	14
2.2.2.1 Hidantoína .....	14
2.2.2.2 Ftalimidas .....	15
2.2.2 Grupo dos benzimidazóis .....	16
2.2.3 Grupo do tiofanato – Precursor de benzimidazol .....	17
2.2.4 Grupo da fenilpiridinilamida .....	17
2.3 Controle integrado de doenças de plantas .....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	21
3.1 Obtenção dos antagonistas e do patógeno .....	24
3.1.1 Obtenção de <i>Trichoderma</i> sp. ....	24
3.1.2 Obtenção de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> .....	24
3.2 Interferência dos princípios ativos no desenvolvimento de <i>Trichoderma</i> spp. ....	25
3.3 Avaliação de <i>Trichoderma</i> spp. em confronto direto com <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> .....	27
3.4 Avaliação do efeito dos princípios ativos no desenvolvimento de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> .....	28
3.5 Avaliação da interferência dos princípios ativos nos mecanismos de ação de <i>Trichoderma</i> spp. ....	28
3.5.1 Confronto direto .....	28
3.5.2 Metabólitos voláteis .....	29
3.5.3 Produção de enzimas hidrolíticas .....	30
3.5.3.1 Atividade quitinásica e glucanásica .....	30
3.5.3.2 Atividade proteásica .....	31
3.5.4 Competição por nutrientes .....	33
3.5.4.1 Produção de sideróforos .....	33
3.6 Análise estatística .....	34



	Página
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	35
4.1 Interferência dos princípios ativos no desenvolvimento de <i>Trichoderma</i> spp. ....	35
4.2 Avaliação do potencial antagonico de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> .....	49
4.3 Avaliação do efeito dos princípios ativos no desenvolvimento de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> .....	52
4.4 Avaliação da interferência dos princípios ativos nos mecanismos de ação de <i>Trichoderma</i> spp.....	55
4.4.1 Confronto direto .....	56
4.4.2 Metabólitos voláteis .....	60
4.4.3 Produção de enzimas hidrolíticas.....	69
4.4.4 Competição por nutrientes .....	71
5 CONCLUSÕES .....	76
6 PERSPECTIVAS .....	78
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
ANEXO I .....	90

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Fungicidas comerciais empregados nos testes de sensibilidade de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008. ....	23
2. Relações das concentrações de princípio ativo dos fungicidas comerciais empregados nos testes de sensibilidade de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008. ..	26
3. Valores de T para a classificação do efeito de princípios ativos de fungicidas comerciais sobre <i>Trichoderma</i> spp. de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008. ....	27
4. Tratamentos realizados para avaliação da produção de metabólitos voláteis por <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (2009). ....	29
5. Análise da variância do efeito de diferentes concentrações de captana sobre o crescimento vegetativo de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009. ....	36
6. Análise da variância do efeito de diferentes concentrações de tiofanato metílico sobre o crescimento vegetativo de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009. ....	38
7. Análise da variância do efeito de diferentes concentrações de captana sobre a esporulação de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009. ....	41
8. Análise da variância do efeito de diferentes concentrações de tiofanato metílico sobre a esporulação de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009. ....	43

9.	Frequência (%) de recuperação dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. de meios de cultura suplementados com carbendazim, fluazinam e iprodiona. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009. ....	46
10.	Compatibilidade de princípios ativos de fungicidas comerciais e isolados de <i>Trichoderma</i> spp. Segundo Alves <i>et al.</i> (1998). Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009. ....	49
11.	Análise da variância do potencial antagônico de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> . Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009. ....	50
12.	Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. a <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> . Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009. ....	50
13.	Análise da variância do efeito de diferentes concentrações dos princípios ativos captana, carbendazim, fluazinam, iprodiona e tiofanato metílico sobre o crescimento vegetativo de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> . Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009. ....	53
14.	Análise da variância do efeito dos princípios ativos captana, carbendazim, fluazinam, iprodiona e tiofanato metílico no antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009. ....	57
15.	Interferência dos princípios ativos captana, carbendazim, fluazinam, iprodiona e tiofanato metílico no antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> , através da medida do crescimento vegetativo do patógeno (cm) Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009. ....	57
16.	Redução no crescimento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> pela produção de metabólitos voláteis por <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (2009).	61
17.	Redução no crescimento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> pela volatilização dos princípios ativos captana, carbendazim, fluazinam, iprodiona e tiofanato metílico. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (2009). ....	62

18.	Contraste ortogonal das médias de crescimento vegetativo de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> submetido a diferentes tratamentos para avaliação da interferência do princípio ativo captana na produção de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp . Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (2009). .....	63
19.	Contraste ortogonal das médias de crescimento vegetativo de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> submetido a diferentes tratamentos para avaliação da interferência do princípio ativo carbendazim na produção de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp . Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (2009). .....	64
20.	Contraste ortogonal das médias de crescimento vegetativo de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> submetido a diferentes tratamentos para avaliação da interferência do princípio ativo fluazinam na produção de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp . Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (2009). .....	66
21.	Contraste ortogonal das médias de crescimento vegetativo de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> submetido a diferentes tratamentos para avaliação da interferência do princípio ativo iprodiona na produção de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp . Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (2009). .....	67
22.	Contraste ortogonal das médias de crescimento vegetativo de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> submetido a diferentes tratamentos para avaliação da interferência do princípio ativo tiofanato metílico na produção de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp . Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (2009). .....	68
23.	Atividade enzimática (U) de quitinases, glucanases e proteases nas culturas de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2010. ....	70

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Curvas de regressão $y=A*2^{(-B*x)}$ ajustada aos pontos experimentais relativos ao efeito das diferentes concentrações de captana sobre o crescimento vegetativo de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009. ....	37
2. Curvas de regressão $y=A+B*x$ ajustada aos pontos experimentais relativos ao efeito das diferentes concentrações de tiofanato metílico sobre o crescimento vegetativo de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009. ....	39
3. Curvas de regressão $y=A+B*x$ ajustada aos pontos experimentais relativos ao efeito das diferentes concentrações de captana sobre a esporulação de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009. ....	42
4. Curvas de regressão $y=A+B*x+C*x^2+D*x^3$ ajustada aos pontos experimentais relativos ao efeito das diferentes concentrações de tiofanato metílico sobre a esporulação de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009. ....	44
5. Colônias de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> (controle) e <i>Trichoderma</i> spp. em confronto direto para teste de antagonismo <i>in vitro</i> . Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009. ....	51
6. Curvas de regressão $y=A1*exp(-x/t1)+y0$ ajustada aos pontos experimentais relativos ao efeito das diferentes concentrações dos princípios ativos iprodiona e tiofanato metílico sobre o crescimento vegetativo de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> . Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009.	54
7. Antagonismo entre <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> em confronto direto com princípios ativos <i>in vitro</i> . Superior: Controle, captana, tiofanato metílico; Inferior: Carbendazim, iprodiona e fluazinam. Segue a ordem para todos os isolados. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009. ....	60

8.	Diâmetro das colônias de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> submetido a diferentes tratamentos para avaliação da interferência do princípio ativo captana na produção de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009. ....	63
9.	Diâmetro das colônias de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> submetido a diferentes tratamentos para avaliação da interferência do princípio ativo carbendazim na produção de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009. ....	65
10.	Diâmetro das colônias de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> submetido a diferentes tratamentos para avaliação da interferência do princípio ativo fluazinam na produção de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009. ....	66
11.	Diâmetro das colônias de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> submetido a diferentes tratamentos para avaliação da interferência do princípio ativo iprodiona na produção de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009. ....	67
12.	Diâmetro das colônias de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> submetido a diferentes tratamentos para avaliação da interferência do princípio ativo tiofanato metílico na produção de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009. ....	69
13.	Detecção de sideróforos em filtrados de cultura dos isolados T04 (A), T16 (B), T20 (C), TH11 (D) e TV21 (E). a – meio contendo captana, b – isolado de <i>Trichoderma</i> , c – controle. A mudança na coloração do meio em relação ao controle indica a produção de sideróforos. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2010. ....	74

## 1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) tem especial importância no Brasil, não somente pelo país ser o maior produtor e consumidor mundial, com cerca de 3 milhões de toneladas produzidas em aproximadamente 4 milhões de hectares cultivados, mas também por ser um dos principais alimentos protéicos na dieta do brasileiro. O feijoeiro comum é uma planta exigente em nutrientes, muito sensível a fatores climáticos extremos como alta ou baixa umidade do solo, alta ou baixa temperatura do ar, além de ser conhecido como planta muito suscetível a pragas e doenças. A própria arquitetura da planta é deficiente e tem, por exemplo, um sistema radicular limitado. Pesquisas realizadas nos últimos anos, em especial sobre manejo de cultura e melhoramento, projetaram o feijão como uma cultura economicamente viável, cultivada em extensas áreas na época seca, em especial quando se aplica alta tecnologia como cultivares melhoradas, preparo adequado do solo, controle efetivo de ervas daninhas, doenças e pragas e técnicas avançadas de irrigação.

A ocorrência de doenças é uma das principais causas da redução da produtividade do feijoeiro. Essas doenças podem ser de origem fúngica, bacteriana, virótica, assim como as incitadas por nematóides. Entre as principais doenças fúngicas, encontra-se a mancha angular, a antracnose, a ferrugem, o oídio, o mofo branco, as podridões radiculares de fusarium e rhizoctonia, a murcha de fusarium, a podridão do colo e, mais recentemente, o carvão e a sarna.

Culturalmente, o controle químico é o mais empregado contra patógenos e os fungicidas só perdem em vendas para os herbicidas, correspondendo a US\$ 1.089,522 no Brasil. São classificados como fungicidas os produtos químicos capazes de prevenir ou controlar a infecção de tecidos de plantas vivas por fungos fitopatogênicos. Esses produtos atuam matando (fungicidas), inibindo a germinação ou crescimento (fungistáticos) ou inibindo a formação de esporos (antiesporulantes) nos fungos. O Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) apresenta 154 registros de fungicidas com uso aprovado nas lavouras de feijão e um fungicida microbiológico a base de *Trichoderma harzianum* para o controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* e *Rhizoctonia solani*.

O controle biológico de doenças, como prática comercial, é mais recente em relação ao controle químico, e vem demonstrando eficiência para diversos tipos de patógenos. *Trichoderma* spp. é bastante estudado em controle biológico, antagonista de patógenos de solo inclusive daqueles que formam estruturas de resistência difíceis de serem atacadas por antagonistas, como os escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*.

A utilização de práticas de controle integrado, através da associação de fungicidas e fungos de ação antagonista é um método eficaz e seguro. O emprego de produtos químicos e biológicos na cultura vem sendo utilizado, entretanto, a falta de informações sobre as formas de aplicação e as concentrações dos princípios ativos nos produtos comerciais dificulta a eficiência do controle integrado. Alguns fungicidas podem afetar o crescimento vegetativo, a viabilidade e a conidiogênese dos fungos antagonistas, alterando os mecanismos de ação ou mesmo sua composição genética, inviabilizando essa prática no controle de fitopatógenos.



Dessa forma, o sucesso da utilização de espécies de *Trichoderma* para o controle biológico, associadas aos produtos utilizados no controle químico, requer a existência de compatibilidade entre o agente biocontrolador e o produto químico utilizado. Nesse sentido, faz-se necessário uma avaliação da compatibilidade de *Trichoderma* spp. e princípios ativos de fungicidas comerciais aplicados na cultura do feijão no Brasil.

O estado de Goiás tem destaque nacional na produção de feijão. O cultivo do feijão está presente em vários municípios goianos. Nessa região vem sendo implantado o controle integrado, principalmente para o controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, patógeno com maior incidência na região. Assim, a presente pesquisa objetiva avaliar o efeito de princípios ativos de fungicidas comerciais registrados para a cultura do feijão em características e mecanismos de ação do fungo antagonista, *Trichoderma* spp.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Controle biológico de doenças de plantas

Baker & Cook (1983) definem controle biológico como: “A redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, esta provocada por um patógeno ou parasita nos seus estados de atividade ou dormência, por um ou mais organismos, realizada naturalmente ou através da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas”.

O controle biológico, ou biocontrole, pode ser alcançado através de práticas de manejo para favorecer antagonistas nativos e através da introdução de microrganismos selecionados. A utilização de antagonistas pode aumentar a eficiência do controle, reduzir a quantidade de defensivos agrícolas utilizados, e, por consequência, reduzir o custo final de produção. Porém, o sucesso do biocontrole depende da natureza das propriedades antagonistas e dos mecanismos de ação do hiperparasita (Melo, 1998). A eficiência do controle biológico pode ser demonstrada através de inúmeras pesquisas, envolvendo o uso de bactérias, fungos e vírus, como patógenos controlados pelos antagonistas. Tais pesquisas apresentam resultados satisfatórios na grande maioria, como por exemplo, na redução de fusariose em plantas de pimenta-do-reino com bactérias endofíticas (Benchimol *et al.*, 2000), controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiros com isolados de estreptomicetos

(Gava *et al.*, 2002), estirpes de *Bacillus thuringiensis* no controle de insetos (Praça, 2004).

Um dos mais promissores agentes de biocontrole de fungos fitopatogênicos é o fungo *Trichoderma* sp.. Segundo Melo (1998), espécies do gênero *Trichoderma* são eficientes no controle de agentes causadores de diferentes grupos de doenças em plantas como: *Rhizoctonia solani*, *Pythium* (tombamento de plântulas); *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Sclerotium*, *Phytophthora*, *Thielaviopsis*, *Sclerotinia*, *Gaeumannomyces* (podridões de sementes, raízes e caules); *Fusarium*, *Verticillium* (murchas vasculares); *Cercospora*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Ventura* (manchas e queimas foliares); *Nectria* (cancros do caule); *Botrytis*, *Monilinia*, *Mucor*, *Penicilium*, *Rhizopus* (podridões de frutos) e *Heterobasidium*, *Chondrostereum* (declínios de árvores).

### **2.1.1 *Trichoderma* sp.**

O fungo *Trichoderma* sp. corresponde a fase anamórfica do gênero *Hypocrea* que pertence ao filo Ascomycota (Agrios, 1997). As espécies de *Trichoderma* geralmente são encontradas como componentes da microflora em quase todos os tipos de solos, especialmente os orgânicos, incluindo a camada de húmus das florestas, solos agrícolas no campo e em pomares. Podem viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos (Roiger *et al.*, 1991). Esse fungo tem como característica morfológica um micélio, inicialmente de coloração branca e de crescimento rápido. Com o desenvolvimento, o mesmo torna-se cotonoso e compacto com tufo verde escuro, devido à coloração e a quantidade de conídios. Os conídios são unicelulares, de forma subglobosa, ovóide, elipsóide ou elíptico-cilíndrica, com textura lisa ou rugosa e coloração hialina para verde-amarelado até verde-escuro, sendo a última

mais comum. Tem uma forma de esfera, no ápice das fiálides. As fiálides têm forma de cantil com o centro dilatado e o ápice afilado, solitárias ou em grupos, hialinos, formando um ângulo com os conidióforos. Os conidióforos são muito ramificados, solitários ou em tufos compactos, geralmente em formato cônico ou piramidal. Normalmente mostram-se eretos, formando um ângulo reto com a hifa vegetativa. As áreas conidiais apresentam-se em forma de faixas concêntricas de coloração verde (Melo, 1991).

*Trichoderma* sp. é um micoparasita necrotrófico eficaz no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos, incluindo aqueles com estruturas de resistência consideradas difíceis de serem atacadas por microrganismos. Sucesso maior tem sido demonstrado com o uso de espécies de *Trichoderma* para controle de patógenos presentes no solo, como: *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* sp. e *Pythium* sp. (Laranjeira *et al.*, 1996).

Reis *et al.* (1995) selecionaram isolados de *Trichoderma* sp. para o controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* e avaliaram o potencial de 41 isolados de *Trichoderma* sp., aplicados na forma de pó biológico em solo natural, para o controle da murcha do feijoeiro. Como resultado três isolados de *Trichoderma* sp. (TN-31, TN63, TN-10) apresentaram redução de até 55% da severidade da doença, mostrando-se mais eficientes do que o fungicida benomil no tratamento de sementes. Após a realização dos experimentos, procedeu-se a identificação dos isolados mais promissores para o biocontrole, sendo TN-63 identificado como *T. viride* e TN-31 como *T. aureoviride*. O mesmo procedimento foi seguido por Ethur *et al.* (2001), que testaram doze isolados de *Trichoderma* spp. e selecionaram três isolados com maior potencial antagonico sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. Lucon *et al.* (2009) selecionaram e identificaram isolados de *Trichoderma* sp. para o controle de

*Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepinos. De 490 isolados testados por esses autores, 12 foram selecionados, pois proporcionaram mais de 85% de redução na doença em casa de vegetação. Os isolados promissores foram identificados como *Trichoderma hamatum* (IB08, IB30, IB60), *Trichoderma harzianum* (IB34, IB35), *Trichoderma atroviride* (IB13), *Trichoderma spirale* (IB16, IB24) e *Trichoderma asperellum* (IB44). Três dos isolados testados não puderam ser identificados.

Além de patógenos presentes no solo, diversos trabalhos têm documentado o parasitismo de *Trichoderma* sp. a uma vasta gama de fungos fitopatogênicos (*Armillaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Verticillium* sp., *Venturia* sp., *Endothia* sp., *Phytophthora* sp., *Rhizopus* sp., *Diaporthe* sp., *Fusicladium* sp., *Botrytis* sp., *Poria monticola*, *Stereum purpureum*) (Melo, 1998). Entre os patógenos estudados com potencial de controle com *Trichoderma* sp., encontra-se o causador da mancha preta do citros, *Guignardia citricarpa*. Rodrigues (2006) sugere a utilização de *Trichoderma* sp. no controle da doença, já que os isolados de *Guignardia citricarpa* mostraram resistência a carbendazim. Quando 96 isolados do antagonista foram testados, obteve-se resultado semelhante ao encontrado para o fungicida piraclostrobina (0,5; 1 e 2 mg i.a. /mL), que ainda é a melhor forma de controle da doença.

### **2.1.2 Interações entre *Trichoderma* sp. e fitopatógenos**

Estudos indicam que as interações microbianas podem apresentar caráter neutro, benéfico ou detrimental (Bettiol, 1991), e são elas que determinam o equilíbrio ecológico entre determinados microrganismos em um habitat (Henis & Chet, 1975). As interações envolvidas no controle biológico de fitopatógenos são determinadas pelos mecanismos que o agente de controle desenvolve para atuar

como antagonista. Esses mecanismos podem ser divididos em competição por nutrientes, antibiose, micoparasitismo, competência rizosférica e indução de resistência na planta (Papavizas, 1985; Melo, 1991; Howell, 2003; Benítez *et al.*, 2004). O conhecimento da natureza desses mecanismos é determinante para potencializar o controle biológico de doenças em plantas (Blakeman, 1985).

O mecanismo de competição pode ser entendido como a interação entre dois ou mais organismos empenhados em uma mesma ação, como crescer e buscar nutrientes. A escassez de nutrientes é a causa mais comum para a morte de microrganismos, sendo a competição por nutrientes uma característica importante para o controle biológico de fitopatógenos (Chet *et al.*, 1997). Muitos fungos filamentosos capturam ferro e, quando este é pouco disponível, podem excretar compostos de baixo peso molecular como, por exemplo, os sideróforos (Eisendle *et al.*, 2004). Algumas espécies de *Trichoderma* são eficientes produtores de sideróforos que capturam o ferro do ambiente, indisponibilizando o uso deste por outros fungos (Chet & Inbar, 1994).

Segarra *et al.* (2009) comprovou que o isolado T34 de *Trichoderma asperellum* atua no controle de murcha de fusarium em tomate através da produção de sideróforos, reduzindo também a toxicidade de Fe(III) na planta. A produção de sideróforos também foi relatada por Guimarães (2008), para o isolado de *Trichoderma koningii*, apresentando intensa coloração amarelo-avermelhada em meio de cultura.

O mecanismo referente à produção de metabólitos antifúngicos, conhecido como antibiose, pode ser definido como a interação entre microrganismos na qual um ou mais metabólitos de baixo peso molecular são produzidos por um dos organismos e têm efeito danoso sobre o outro (Bettiol, 1991). Esses metabólitos podem atuar na

inibição do crescimento ou germinação e também em nível celular pela inibição das atividades do microrganismo, podendo ser letais a este. Muitas espécies do gênero *Trichoderma* produzem metabólitos tóxicos não voláteis que impedem o crescimento de muitos fitopatógenos. Dentre esses destacam-se o ácido harzianico, alameticinas, tricholinas, *peptaibol*, 6-pentil- $\alpha$ -pirona, massoilactona, viridina, gliovirina, glisopreninas, ácido heptelídico, entre outros (Benítez *et al.*, 2004). Em geral, isolados de *Trichoderma virens*, eficientes como biocontroladores, são capazes de produzir gliovirina (Harman, 2000).

Vinale *et al.* (2008) avaliaram a produção de metabólitos secundários de *Trichoderma harzianum* (T22, T39) e *Trichoderma atroviride* (A6). A produção de 6PP (6-pentil- $\alpha$ -pirona), T39butenolida, harzianopiridona, anthraquinona, harzianolida e T22azaphilona. Com exceção de 6PP, os compostos mostraram diferentes níveis de antibiose sobre os patógenos *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia solani* e *Pythium ultimum*. Em casa de vegetação, os pesquisadores observaram redução na severidade da doença causada por *Leptosphaeria maculans* em *Brassica napus*, quando as plantas foram tratadas com os isolados testados. A maior redução na severidade da doença ocorre quando há maior produção de harzianopiridona, anthraquinona e harzianolida. O trabalho de Reino *et al.* (2008) apresenta uma ampla revisão sobre a produção de metabólitos secundários por *Trichoderma* sp.

A antibiose também está relacionada com a produção de metabólitos voláteis. Dennis & Webster (1971a, b, c) demonstraram que isolados de *Trichoderma* spp. foram capazes de produzir metabólitos voláteis e não voláteis, com efeito inibitório sobre o crescimento de vários fungos. Entre os metabólitos voláteis há gases, como: etileno e cianeto de hidrogênio (Campbell, 1989), acetaldeído, acetona, etanol e

dióxido de carbono (Tamimi & Hutchinson, 1975), que afetam o crescimento microbiano.

O mecanismo de produção de enzimas hidrolíticas faz parte de um processo chamado parasitismo, que é caracterizado como o fenômeno de um microrganismo parasitar o outro (Bettiol, 1991). Para fungos, o micoparasitismo apresenta-se como um processo complexo que envolve uma seqüência de eventos, incluindo o reconhecimento, ataque, penetração e posterior morte do hospedeiro (Harman *et al.*, 2004). Espécies de *Trichoderma* podem exercer o biocontrole parasitando vários fungos fitopatogênicos. Esse mecanismo é realizado pela presença de enzimas hidrolíticas como as quitinases, glucanases e proteases que degradam a parede celular (Harman *et al.*, 2004). Em uma relação de micoparasitismo ocorrem, por parte do agente biocontrolador, modificações morfológicas, como a formação de apressório que servem para penetrar no hospedeiro (Benítez, *et al.*, 2004). Após a penetração são introduzidas enzimas capazes de degradar a parede celular que irão proporcionar a entrada da hifa do biocontrolador no lúmen do fungo parasitado e posteriormente extraindo seu conteúdo celular (Howell, 2003).

A parede celular serve de barreira às ações exercidas pelos microrganismos, sendo considerada como o ponto inicial das interações envolvidas no processo de antagonismo entre fungos. Os fungos têm parede celular constituída principalmente por quitina e  $\beta$ -1,3-glucanas, possuindo em menor quantidade proteínas,  $\beta$ -1,6-glucanas e outros polissacarídeos (Bartinicki-Garcia, 1968). Nessa interação as glucanases, proteases líticas e quitinases são capazes de hidrolisar componentes da parede celular de microrganismos e, por isso, apresentam atividade lítica sobre leveduras e fungos (Selitrenikoff, 2001). Benhamou & Chet (1993) descreveram que inicialmente o *Trichoderma* spp. promove uma desorganização na estrutura da



parede celular do fitopatógeno e um conseqüente desequilíbrio osmótico interno levando a uma retração da membrana plasmática e agregação no citoplasma. Na interação do *Trichoderma* spp. com *Sclerotium rolfii* foi observado uma retração e agregação do citoplasma e quebra de vacúolos do fitopatógeno (Benhamou & Chet, 1996). Já o estudo realizado por Benhamou & Chet (1997), mostrou uma interação entre as hifas de *Trichoderma* spp. e *Pythium ultimum*, o micoparasita produziu glucanases, celulasas e antibióticos propiciando a sua invasão nas células do hospedeiro. Marcello (2008) estudou a expressão de exo- $\beta$ -1,3-glucanase em *Trichoderma asperellum*. Sua pesquisa mostrou que a seqüência gênica da enzima produzida tem elevada afinidade com outras exo- $\beta$ -1,3-glucanase e que durante a interação entre *Trichoderma asperellum* e *Rhizoctonia solani* ocorre maior expressão do gene responsável pela expressão dessa enzima.

As quitinases pertencem a um vasto grupo de glicosídeos. Em geral, as quitinases catalisam a degradação da quitina e agem frequentemente como endoquitinases, produzindo quito-oligossacarídeos de 2-6-N-acetilglicosamina (Stintzi *et al.*, 1993). Vários microrganismos são capazes de crescer sobre quitina e secretar quitinases para usar a quitina como fonte decarbono (Wang *et al.*, 2002). As quitinases também podem exercer funções como indução de defesa em plantas contra fitopatógenos, com as Proteínas Relacionadas com a patogênese, como a RP-3 (Theis & Stahl, 2004).

Glucanos são o segundo maior componente da parede celular dos fungos. As enzimas glucanases hidrolisam diferentes tipos de glucanos, sendo consideradas como potentes proteínas antifúngicas (Theis & Stahl, 2004). Estudos têm demonstrado que as glucanases inibem a germinação de esporos ou o crescimento de fungos fitopatogênicos em sinergismo com as quitinases (El-Katatny *et al.*, 2001). As

glucanases também participam dos processos de defesa das plantas e a  $\beta$ -1,3 glucanase é caracterizada como PR-2 dentro da planta (Linthorst *et al.*, 1990).

É comum a produção de proteases por fungos filamentosos (Howell, 2003). As proteases estão envolvidas na degradação de proteínas da parede celular de fungos. Segundo Howell (2003), no controle de *Botrytis cinerea* por *Trichoderma harzianum* sobre folhas de feijoeiro, as proteases apresentam importante papel, já que quebram as enzimas hidrolíticas dos patógenos em cadeias de peptídeos e/ou aminoácidos e, por meio disso, destroem a capacidade do patógeno de atacar a célula da planta.

A combinação de enzimas hidrolíticas e antibióticos resulta no aumento da atividade antagonista. Howell (2003) relatou os efeitos sinérgicos entre uma endoquitinase de *Trichoderma harzianum* e gliotoxina, e também entre enzimas hidrolíticas e *peptaibols* sobre a germinação de *Botrytis cinerea*. Segundo Wiest *et al.* (2002), *peptaibols* e enzimas hidrolíticas atuam sinergicamente na inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos.

## **2.2 Controle químico de doenças de plantas**

O controle químico de doenças de plantas é feito através de vários tipos de produtos, que são comumente denominados agrotóxicos. O grupo mais importante de pesticidas utilizados para o controle de doenças de plantas é o dos fungicidas (Kimati, 1995; Souza & Dutra, 2003). Os fungicidas são agentes de controle de doenças de plantas causadas por fungos. Neste grupo estão também os compostos que interferem em processos específicos de infecção ou ativam mecanismos de defesa das plantas, ao invés de atuar diretamente sobre o patógeno (Ghini & Kimati, 2002).

O uso de fungicidas para a proteção de plantas desenvolveu-se lenta e empiricamente, muito antes da comprovação de que as doenças de plantas eram causadas por microrganismos. Somente por volta de 1700 é que surgiram relatos de várias substâncias utilizadas com sucesso no controle de doenças (Mizubuti & Maffia, 2006). O início da aplicação de fungicidas em larga escala para o controle de doenças de plantas está vinculado à descoberta da calda bordalesa por Millardert em 1882, em Bordeaux, França (Ghini & Kimati, 2002). A facilidade de aplicação e os resultados imediatos obtidos tornaram os fungicidas amplamente difundidos em diversas culturas. Porém, o uso contínuo de fungicidas sistêmicos pode promover a classificação de populações de fungos fitopatogênicos resistentes que não são controlados pelo fungicida que anteriormente era eficaz, colocando em risco a eficiência do método (Ghini & Kimati, 2002), além de contaminação ambiental e humana (Rodrigues, 2003; Oliveira-Silva *et al.*, 2003).

Os fungicidas constituem um grupo com propriedades químicas e ação biológica muito variáveis, podendo envolver vários princípios de controle em função da natureza do produto, da época e do método de aplicação e do estágio de desenvolvimento epidemiológico da doença (Kimati, 1995). São classificados em grupos definidos pela estrutura química dos princípios ativos e mecanismo de ação sobre os fungos.

Batista *et al.* (2002) executaram testes de fungitoxicidade *in vitro* sobre dois isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae*, com o objetivo de selecionar fungicidas para o controle desta doença. Os fungicidas e as doses utilizadas foram: benomil (0,5 g i.a./L); tiofanato metílico (1,4 g i.a. /L); procloraz (0,675 g i.a./L) e carbendazim (0,5 g i.a./L). Os fungicidas procloraz, benomil e carbendazim apresentaram níveis elevados de redução do crescimento micelial e esporulação dos

isolados do fitopatógeno, enquanto tiofanato metílico não apresentou efeito satisfatório.

Os fungicidas são agrupados de acordo com o seu modo de ação, através de sua atividade e efeito e pelo mecanismo de ação, que se refere aos processos bioquímicos do alvo biológico (fungo) que sofrem interferência pela ação dos fungicidas aplicados sobre a planta (Zambolim et al., 2007). Os grupos relacionados abaixo se referem aos fungicidas selecionados para os experimentos, descrevendo seus modos de ação sobre os patógenos relacionados.

### **2.2.1 Grupo das dicarboximidas**

#### **2.2.1.1 Hidantoína**

Os fungicidas desse grupo interferem na respiração, bloqueando a atividade da enzima NADH citocromo c redutase no processo respiratório. As dicarboximidas também apresentam alguma interação com o núcleo celular. Esses grupo de fungicidas pode suprimir a formação de escleródios. Três gêneros, *Botrytis*, *Sclerotinia* e *Monilia* são particularmente sensíveis a esse princípio ativo, devido a características de suas membranas. O efeito é basicamente preventivo. Os dicarboximidas inibem a germinação de esporos, promovem a ramificação, intumescimento e lise de hifas, levando a inibição do crescimento micelial dos fungos (Zambolim et al., 2007).

Um princípio ativo pertencente a esse grupo é o iprodiona [C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>] 3-(3,5-diclorophenyl)-N-isopropyl-2,4-dioximidazolidine-1-carboximide. Iprodiona é considerado um fungicida de largo espectro, aplicado via pulverização aérea

preventiva (Dutra & Souza, 2003). Iprodiona (Rovral SC) é recomendando para controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijão (AGROFIT, 2008).

### 2.2.1.2 Ftalimidas

Os fungicidas deste grupo, quando no interior da célula fúngica, reagem preferencialmente com enzimas que contém grupos sulfidríla, podendo também reagir com aminoácidos que possuam esse mesmo radical. Estes fungicidas podem também inibir a síntese de enzimas que não possuam grupos sulfidríla. Os fungicidas desse grupo promovem efeito protetor contra ampla gama de patógenos, sendo utilizados extensivamente em tratamento de raízes (imersão) e no tratamento de sementes (Zambolim *et al.*, 2007).

O princípio ativo captana [C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>S] (N-trichloromethylthio)cyclohex-4-ene-1,2-dicarboximide) pertencente a esse grupo é utilizado no tratamento de sementes (Ribeiro, 2008). Possui ação no núcleo da célula, o que pode explicar seus efeitos genéticos de instabilidade mitótica e segregação somática (Souza & Dutra, 2003). Segundo Dhingra *et al.* (1980), é o mais seguro entre todos os fungicidas não mercuriais, podendo ser utilizado como pó seco e como pasta fluída para sementes da maioria das culturas, sendo particularmente eficiente contra patógenos causadores de podridões.

Captana (Captan SC) é recomendado para o controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Penicillium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*, *Aspergillus* spp. e *Alternaria* spp. em feijão (AGROFIT, 2008).

### 2.2.2 Grupo dos benzimidazóis

O princípio ativo carbendazim [C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>] methyl benzimidazol-2-ylcarbamate é um fungicida sistêmico que atua inibindo o desenvolvimento do tubo germinativo, a formação do apressório e o crescimento micelial, e pertence ao grupo dos benzimidazóis. Possui ação protetora, curativa e sistêmica contra um grande número de patógenos. É absorvido pelas raízes e partes verdes das plantas, movendo-se no sentido ascendente (Souza & Dutra, 2003).

Os benzimidazóis apresentam alta afinidade pelas proteínas tubulinas, destruindo a mitose na metáfase, atacando a fusão mitótica. A falha na separação do novo núcleo resulta na morte da célula. A formação dos microtúbulos é distorcida não ocorrendo a divisão do núcleo e a consequente separação (Hewitt, 1998). Técnicas de biologia molecular têm confirmado que  $\beta$ -tubulina é o sítio alvo desses fungicidas (Fujimura *et al.*, 1990). Os benzimidazóis são altamente seletivos, apesar da natureza conservada das  $\beta$ -tubulinas em todos os organismos eucarióticos. A base da seletividade é ainda desconhecida, mas provavelmente depende de diferenças estruturais nos sítios de ligação dos microtúbulos. A utilização ampla dos benzimidazóis deve-se a sua alta atividade sistêmica contra um grande número de ascomicetos, fungos mitospóricos e basidiomicetos. Constituem, possivelmente, o mais importante grupo de fungicidas sistêmicos utilizados comercialmente (Zambolin *et al.*, 2007).

O fungicida comercial Derosal 500 SC (benzimidazol) é recomendado para o controle de *Fusarium pallidoroseum* e *Colletotrichum lindemuthianum* no cultivo do feijão (AGROFIT, 2008).

### 2.2.3 Grupo do tiofanato – Precursor de benzimidazol

Atua igualmente aos benzimidazóis, na formação de  $\alpha$ -tubulina para formação dos microtúbulos que fazem parte do citoesqueleto, durante a metáfase no processo de mitose. Supõe-se que os fungicidas desse grupo (como benomil e tiofanato metílico) quando absorvidos pelas raízes, liberam gradualmente o MBC (carbamato de metil 2-benzimidazol ou carbendazim) a ser translocado para as folhas (Souza & Dutra, 2003).

Tiofanato metílico [C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>] dimethyl 4-4'-(0-phenylene)bis(3-thioallophanato) interfere na síntese de DNA ou processos de divisão celular ou nuclear, tem como base a tiuréia, contendo um núcleo aromático. Para atuar como fungicida depende da sua conversão a um anel benzimidazole (Souza & Dutra, 2003). É recomendado no controle de patógenos fúngicos de plantas e tem amplo espectro de ação em diversas culturas. Um exemplo, o produto comercial Metiltiofan é recomendado contra *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum lindemuthianum* na cultura do feijão (AGROFIT, 2008).

### 2.2.4 Grupo da fenilpiridinilamida

O princípio ativo fluazinam [C<sub>13</sub>H<sub>4</sub>C<sub>12</sub>F<sub>6</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>] – 3-chloro-N-(3-chloro-5-trifluoromethyl-2-pyridyl)-alfa-alfa-alfa-trifluoro-2,6-dinitro-p-toluidine, possui ação eficaz contra patógenos resistentes a fungicidas dos grupos fenilamidas, benzimidazóis e dicarboximidas. Atua como potente desacoplador da fosforilação oxidativa (Souza & Dutra, 2003). Sua eficiência foi comprovada por Komyoji *et al.* (1995) para doenças causadas por espécies de *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Pseudoperonospora*, *Pycularia*, *Sclerotinia* e *Venturia*. Na cultura do

feijão, o produto comercial Frowncide 500 SC é recomendado no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* (AGROFIT, 2008).

### **2.3 Controle integrado de doenças de plantas**

O controle de doenças de plantas é definido como redução na incidência ou severidade da doença (National Research Council, 1968) e para isso, utiliza-se de técnicas culturais, biológicas, químicas, genéticas e físicas. Nas décadas de 50 e 60, surgiu o conceito de controle integrado de pragas, cuja característica é empregar com maior amplitude as táticas de controle de pragas e patógenos (Zambolim & Junqueira, 2009). De acordo com Stern *et al.* (1959), entende-se por controle integrado, “o controle aplicado de pragas que combina e integra os controles químico e biológico”. Com o passar dos tempos o conceito tornou-se mais abrangente, até chegar à definição adotada pela FAO (1968): “Controle integrado é definido como um sistema de manejo de organismos nocivos que utiliza todas as técnicas e métodos apropriados da maneira mais compatível possível para manter as populações de organismos nocivos em níveis abaixo daqueles que causam injúria econômica”. Uma vantagem da interação entre fungicida e antagonista parece ser o controle inicial de patógenos pelo fungicida e a habilidade do antagonista de desenvolver e persistir nas raízes, reduzindo a infecção dos patógenos, mais tarde, no desenvolvimento de plantas (Luz, 2003).

O uso de agentes de controle biológico em campo, juntamente com a aplicação de fungicidas vem se tornando um hábito entre os produtores rurais, entretanto o efeito provocado pelos químicos na ação desses microrganismos antagonísticos ainda vêm sendo estudado e necessita de especial atenção. Muiño *et al.* (2001) desenvolveram uma pesquisa com agrotóxicos e fertilizantes utilizados na



cultura do tabaco, onde constataram que Benomil, Zineb, Thiram, Mancozeb, Dimethoato, Lamdaciolotrina, Trifluralina, Napropamida e Propacloro apresentaram algum grau de toxicidade sobre isolados de *Trichoderma* spp.. Pandolfo (2007) demonstrou que isolados de *Trichoderma* sp. apresentaram baixa sensibilidade aos produtos Stratego e Vitavax-Thiram, enquanto Derosal 500 SC, Derosal Plus, Nativo e Opera foram os mais tóxicos ao antagonista.

Pereira *et al.* (1996) testaram tratamentos com e sem vermicomposto, com e sem solarização, com e sem o herbicida EPTC (*S*-etil-dipropilcarbamiato) ou com e sem o fungicida procimidone e com a incorporação de *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis*, no controle integrado de *Sclerotinia sclerotiorum*, diretamente sobre escleródios do patógeno em casa de vegetação. Com esse trabalho, os pesquisadores concluíram que a utilização do herbicida EPTC antecipa a germinação dos escleródios, provocando um estresse que aumenta a colonização e infecção pelo antagonista. Nesse tratamento, 96% dos escleródios estavam infectados, apresentando uma taxa de 83% no controle.

Howell (2007) testou o tratamento de sementes de algodão utilizando fungicidas Baytan, Chloroneb 65 WP, Deltacoat AD, Dividend, Maxin, Nuflow M, Vitavax, Vitavax Plus, PCNB e Vortex com isolados de *Trichoderma virens*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma harzianum* e um híbrido entre *Trichoderma virens* e *Trichoderma koningii*. Embora os fungicidas possam ser tóxicos para os isolados de antagonistas em laboratório, o que pode inibir sua atividade antagonística *in vivo*, os químicos sistêmicos podem ser absorvidos pela germinação das sementes e o agente de controle biológico protegido pelo látex que reveste os grãos. Tanto para patógenos de pré e pós-emergência a combinação que resultou em maior controle da doença foi Chloroneb e qualquer um dos isolados de *Trichoderma* spp. indicando que

o mecanismo utilizado para controlar a fase de pré-emergência em sementes de algodão pode ser comum entre o gênero. Deltacoat AD também foi eficiente no controle do damping-off, entretanto, como sua composição tem 30% de chloroneb, o efeito pode ser devido a esse princípio ativo.

O controle de doenças utilizando agrotóxicos e biopesticidas em uma estratégia eficiente de manejo integrado pode reduzir o volume e o número de aplicações dos produtos químicos, minimizando os impactos provocados ao meio ambiente, saúde e resíduos no produto a ser consumido. O trabalho de Conway (1997) é um exemplo de controle integrado bem sucedido que resultou na redução da dose aplicada do produto químico CGA 173506 pela metade quando utilizado com *Laetisaria arvalis* para controle de *Rhizoctonia solani* em alecrim. Wang *et al.*, (2005) também concluíram que a aplicação de dois isolados de *Trichoderma* sp. (T1 e T13) com baixas dosagens de fludioxonil controlaram *Fusarium* sp. em cultivo de *Echinacea* spp. em casa de vegetação.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Fitopatológica, Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, localizado em Porto Alegre.

O Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT, 2010), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento recomenda o fungicida Captan SC (captana) e um fungicida microbiológico a base de *Trichoderma harzianum* como indicados para o controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. O fungicida microbiológico é registrado para o controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* e *Rhizoctonia solani* na cultura do feijão, entretanto, considerando a maior incidência de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em relação à *Rhizoctonia solani* na região de Goiás, esse patógeno foi selecionado para os testes *in vitro* realizados durante esse trabalho.

Para os experimentos *in vitro* foram testados fungicidas selecionados através da indicação dos produtores, como produtos comumente aplicados na cultura do feijoeiro, para controle de doenças, entre elas, murcha de fusarium e mofo branco, doenças economicamente importantes, empregados em manejo integrado com espécies de *Trichoderma*. Pode-se verificar a relação desses fungicidas na Tabela 1.

Os valores múltiplos apresentados na Tabela 2. serão utilizados para a apresentação dos resultados. Todos os experimentos *in vitro* foram realizados com cinco repetições para cada tratamento.

TABELA 1.	Fungicidas comerciais empregados nos testes de sensibilidade de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008.
-----------	--

<i>Nome comercial</i>	<i>Nome químico IUPAC</i>	<i>Princípio ativo</i>	<i>Grupo químico</i>	<i>Concentração</i>	<i>Classe toxicológica</i>	<i>Classe ambiental</i>	<i>Dose recomendada</i>
Captan SC	N-(trichloromethylthio)cyclohex-4-ene-1,2-dicarboximide	Captana	Dicarboximida	480 g/L	I- produto extremamente tóxico	III- produto perigoso	300 mL/ 100 kg de semente
Derosal 500 SC	Methylbenzimidazo 1-2-ylcarbamate	Carbendazim	Benzimidazol	500 g/L	III- produto mediamente tóxico	III- produto perigoso	100 mL/ 100 kg de semente
Frownicide 500 SC	3-chloro-N-(3-chloro-5-trifluoromethyl-2-pyridyl)- $\alpha$ - $\alpha$ -trifluoro-2,6-dinitro-p-toluidine	Fluazinam	Fenilpiridinilamina	500 g/L	II- produto altamente tóxico	I- produto altamente perigoso	1 L/ha
Rovral SC	3-(3,5-dichlorophenyl)-N-isopropyl-2,4-dioxoimidazolidine-1-carboximide	Iprodiona	Dicarboximida	500 g/L	IV- produto pouco tóxico	III- produto perigoso	1,5 L/ha
Metiltiofan	Dimethyl-4,4'-phenylene)bis(3-thioallophanate	Tiofanato metílico	Precursor de benzimidazol	700 g/kg	III – produto mediamente tóxico	III- produto perigoso	400 L/ha (70 g/100 L de água)

Fonte: AGROFIT, 2008

### **3.1 Obtenção dos antagonistas e do patógeno**

#### **3.1.1 Obtenção de *Trichoderma* sp.**

Os isolados de *Trichoderma* sp. T04, TH11, T16, e TV21 foram gentilmente cedidos pela ICB BIOAGRITEC LTDA., isolados previamente de solo de lavouras de feijão do estado de Goiás. Os isolados TH11 e TV21 foram previamente identificados como *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride* respectivamente, pela Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia Madail Santin e Dr<sup>a</sup> Márcia Eloísa da Silva.

O isolado T20 foi obtido a partir de um escleródio de *Sclerotinia sclerotiorum* coletado em uma lavoura de feijão irrigado, com histórico da doença (mofo-branco) localizada na cidade de Formosa, GO. Para isso, o escleródio foi submetido a desinfecção pela imersão em álcool 70% durante um minuto e, após, em hipoclorito de sódio (NaClO 2%) durante três minutos, com posterior lavagem em água destilada esterilizada. O escleródio foi inoculado em meio de cultura BDA e mantido em câmara de crescimento, com temperatura de  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  até que se observasse o crescimento fúngico. As colônias obtidas (*Sclerotinia sclerotiorum* e *Trichoderma* sp.) foram repicadas em meio BDA até que estivessem axênicas (cultura pura) e a colônia de *Trichoderma* sp. foi selecionada para utilização nesse trabalho.

#### **3.1.2 Obtenção de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli***

O patógeno utilizado, *Fusarium oxysporum* (Schlecht) f.sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder, pertence à micoteca do Laboratório de Microbiologia Fitopatológica. O isolado (FOP10) foi obtido de uma planta de feijão, coletada no município de Formosa/GO, apresentando sintomas de escurecimento de raiz e

amarelecimento das folhas, típicos de murcha de fusarium. O isolado foi previamente identificado pela Dr<sup>a</sup> Márcia Eloísa da Silva e Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia Madail Santin.

O patógeno foi selecionado para os testes *in vitro* pelos precedentes de sua importância na cultura do feijão e recomendação de produtos químico e biológico, conforme explicitado na revisão bibliográfica. Quanto ao isolado, foi selecionado por apresentar características patogênicas em experimentos prévios em casa de vegetação.

### **3.2 Interferência dos princípios ativos no desenvolvimento de *Trichoderma spp.***

O efeito dos fungicidas sobre *Trichoderma spp.* foi avaliado através da mensuração do crescimento vegetativo e esporulação dos isolados do antagonista na presença dos princípios ativos selecionados. Para isso, foi preparada uma solução estoque super-concentrada para cada princípio ativo em água destilada esterilizada. A solução estoque dos fungicidas foi adicionada ao meio de cultura BDA acidificado com ácido láctico (3 gotas/100 mL) em cinco diferentes concentrações (um quarto e metade da concentração do produto comercial, a concentração do produto, o dobro e quatro vezes essa concentração). Para o cálculo da concentração final desejada no meio, foi considerado o volume de meio e a dose do produto, recomendada pelo fabricante (Tabela 2.).

Em seguida, o meio de cultura foi vertido em placas de Petri. A testemunha consistiu na inoculação dos isolados em meio de cultura BDA acidificado. A inoculação de *Trichoderma spp.* foi feita com discos de micélio de 0,8 cm de diâmetro, previamente cultivados, no centro da placa. As placas foram mantidas em câmara B.O.D. a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotofase de 12 horas. A medida do diâmetro das colônias

foi efetuada a após decorridos três dias da inoculação, momento em que a testemunha apresentou crescimento máximo na placa de Petri (9 cm).

TABELA 2.	Relações das concentrações de princípio ativo dos fungicidas comerciais empregados nos testes de sensibilidade de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008.
-----------	--

Princípio ativo	Solução estoque	Concentração do Princípio Ativo (ppm)				
		0,25	0,5	1	2	4
Captana	10	0,360	0,720	1,440	2,880	5,760
Carbendazim	3	0,125	0,250	0,500	1	2
Fluazinam	150	8,440	16,880	33,750	67,500	135
Iprodiona	3	0,126	0,253	0,506	1,012	2,025
Tiofanato metílico	2	0,043	0,085	0,170	0,340	0,680

Fonte: AGROFIT, 2008

Também foi avaliada a interferência *in vitro* de fungicidas no desenvolvimento dos isolados testados através da contagem de esporos após sete dias da inoculação, a partir do preparo de suspensão de esporos e contagem em câmara de Neubauer. A suspensão de esporos foi preparada em tubos de ensaio com 10 mL de solução de “Tween 80” (0,1% de “tween 80” em água destilada, com posterior autoclavagem e armazenamento em refrigerador a 4°C), colocando dois discos de meio com 0,8 cm de diâmetro, contendo conídios e micélio das margens das colônias (colônias avaliadas para crescimento vegetativo). Em seguida, os tubos foram mantidos sob agitação por 10 minutos.

Para que haja uma padronização nos testes realizados, os resultados obtidos foram submetidos à análise matemática desenvolvida por Alves *et al.* (1998) que se baseia nos valores médios em porcentagem de esporulação e crescimento micelial das colônias. Dessa forma, calculam-se esses valores percentuais com relação à testemunha (100%), aplicando-se em seguida, para cada produto estudado, a fórmula:



$T = 20 (CV) + 80 (ESP)/100$ , onde T é o valor corrigido do crescimento vegetativo e esporulação para classificação do produto; CV é a porcentagem de crescimento vegetativo com relação à testemunha; e, ESP é a porcentagem de esporulação com relação a testemunha. Com os valores de T calculados, procede-se à comparação com os limites estabelecidos na Tabela 3.

TABELA 3.	Valores de T para a classificação do efeito de princípios ativos de fungicidas comerciais sobre <i>Trichoderma</i> spp. de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2008.
-----------	--

<i>Valores de T</i>	<i>Classificação do produto</i>
0 a 30	Muito tóxico
31 a 45	Tóxico
46 a 60	Moderadamente tóxico
> 60	Compatível

Fonte: Alves *et al.*, 1998.

Para verificar o efeito dos princípios ativos que inibiram o crescimento vegetativo de *Trichoderma* spp. foi estabelecido um teste de viabilidade dos isolados testados, com a transferência do disco inoculado no meio suplementado com os princípios ativos para uma placa de Petri com meio BDA. As placas foram então incubadas em câmara de crescimento a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , durante cinco dias, para verificar o efeito fungicida ou fungistático dos princípios ativos.

### **3.3 Avaliação de *Trichoderma* spp. em confronto direto com *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli***

Discos de micélio, de 0,8 cm de diâmetro de cada isolado de *Trichoderma* sp. e do isolado de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* foram inoculados em lados opostos da placas de Petri contendo meio de cultura BDA acidificado. As placas

foram mantidas em câmara B.O.D. a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotofase de 12 horas. A testemunha consistiu da inoculação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* na ausência de *Trichoderma* spp. As placas de Petri foram incubadas durante sete dias e então, a colônia do patógeno foi medida com o auxílio de uma régua milimetrada.

### **3.4 Avaliação do efeito dos princípios ativos no desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli***

Um disco de 0,8 cm de micélio de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* foi inoculado no centro de uma placa de Petri com meio de cultura BDA acidificado suplementado com fungicidas, como descrito na Tabela 2. As placas foram mantidas em câmara B.O.D. a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotofase de 12 horas. A testemunha consistiu da inoculação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em meio de cultura BDA acidificado. A mensuração do crescimento das colônias do patógeno foi realizada após sete dias de inoculação. Este experimento foi realizado em triplicata.

### **3.5 Avaliação da interferência dos princípios ativos nos mecanismos de ação de *Trichoderma* spp.**

#### **3.5.1 Confronto direto**

Discos de micélio, de 0,8 cm de diâmetro de cada isolado de *Trichoderma* sp. e do isolado de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* foram inoculados em lados opostos da placas de Petri contendo meio de cultura BDA acidificado, suplementado com os fungicidas comerciais na concentração do produto comercial, que corresponde à dose de aplicação recomendada pelo fabricante (Tabela 1.). As placas foram mantidas em câmara B.O.D. a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotofase de 12 horas. A Testemunha consistiu da inoculação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* na ausência de

*Trichoderma* spp. e na realização dos confrontos em meio de cultura sem a suplementação com os princípios ativos testados. As placas de Petri foram incubadas durante sete dias e então, a colônia do patógeno foi medida.

### 3.5.2 Metabólitos voláteis

Os experimentos de avaliação da produção de metabólitos voláteis foram realizados de acordo com a metodologia de Dick & Hutchinson (1966) através da inoculação de um disco de 0,8 cm de diâmetro contendo micélio dos isolados de *Trichoderma* sp. em meio de cultura BDA acidificado suplementado com os fungicidas, na concentração do produto comercial. E no centro de outra placa, contendo meio BDA acidificado, inoculou-se um disco do mesmo tamanho contendo micélio de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. O fundo de ambas as placas foram sobrepostos invertidos e selados com plástico filme. Todos os tratamentos estão relacionados na Tabela 4. Após, as placas foram mantidas em uma temperatura de  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  em câmara B.O.D. com fotofase de 12 horas durante sete dias. Após a realização do experimento, o diâmetro das colônias de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* foi mensurado.

TABELA 4.	Tratamentos realizados para avaliação da produção de metabólitos voláteis por <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (2009).
-----------	---

Placa de Petri 1	Placa de Petri 2
Meio de cultura BDA + <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i>	Meio de cultura BDA
Meio de cultura BDA + <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i>	Meio de cultura BDA suplementado com os princípios ativos
Meio de cultura BDA + <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i>	Meio de cultura BDA e isolados de <i>Trichoderma</i> spp.
Meio de cultura BDA + <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i>	Meio de cultura BDA suplementado com os princípios ativos e isolados de <i>Trichoderma</i> spp.

### 3.5.3 Produção de enzimas hidrolíticas

A produção de enzimas hidrolíticas foi determinada em meio líquido, com o objetivo de detectar e quantificar a produção de quitinases, glucanases e proteases produzidas pelos isolados de *Trichoderma* spp.

#### 3.5.3.1 Atividade quitinásica e glucanásica

A análise da atividade quitinásica e glucanásica foi baseada no método de Miller (1959), medindo a liberação de açúcares redutores a partir da hidrólise de quitina coloidal e da laminarina, respectivamente, pelo uso de ácido dinitrosalicílico (DNS).

Primeiramente, os isolados de *Trichoderma* foram crescidos em meio de cultura Mandel & Reese (1960) modificado (peptona bacteriológica 0,1%; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2%; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,14%; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,03%; uréia 0,03%; glicose 3%; CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,03%; micélio seco de *Cylindrocladium gracile* 0,5%; 100µL de solução de elemento traço, pH 6,0) suplementado com os fungicidas na concentração do produto comercial (Tabela 1.) durante cinco dias, sob agitação orbital (150 rpm) em câmara de crescimento a 28±2° C. O micélio seco do patógeno foi adicionado ao meio para estimular a produção de enzimas pelo antagonista.

Para produção desse meio, o micélio seco de *Cylindrocladium gracile*, identificado pela Dr<sup>a</sup>. Isabel Cristina Padula Paz, foi obtido pela colocação de 3 discos de 0,8 cm de meio BDA contendo micélio do fungo em frascos de Erlenmeyer contendo 100mL de meio BD (batata 200g; dextrose 20g; 1000 mL água destilada e deionizada), incubados durante sete dias com agitação orbital (150 rpm). Após, o micélio produzido foi filtrado em papel Whatman n°1, seco em estufa a 70°C e triturado.

Para análise da atividade quitinásica e glucanásica 2 mL do meio de cultura foram centrifugados durante 10 minutos a 1400 rpm. Posteriormente, foram colocados em tubos de ensaio, 100 µL de amostra (sobrenadante do meio de cultura previamente centrifugado) e 550 µL de tampão citrato de sódio 50 mg/mL pH 4,8 e, após homogeneização, colocados em banho-maria a 50°C. Em seguida, 250 µL de quitina coloidal 0,5% foram adicionados para avaliação da atividade quitinásica, e, 250 µL de laminarina 0,5% para avaliação da atividade glucanásica, também à temperatura de 50°C, e incubados por uma hora.

Após esse período, adicionou-se 1 mL de DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico 10,6 g; NaOH 19,8 g; 1416 mL de água destilada, dissolução a quente com posterior adição de 7,6 g de fenol (fundido a 50°C) e 8,3 g de metabissulfito de sódio) ainda no banho-maria, seguido da adição de 100 µL de glicose 0,5 mg/mL. Em seguida, a solução foi fervida por cinco minutos e, após resfriar, foram acrescentados 2 mL de água destilada e a leitura em espectrofotômetro  $\lambda = 545$  nm pode ser realizada. Os controles basearam-se na realização da leitura em espectrofotômetro das amostras contendo apenas com o meio suplementado com o fungicida e dos isolados em meio sem a suplementação com os fungicidas.

Para determinação da atividade enzimática foi preparada uma curva de calibração com glicose nas concentrações de 0,0; 0,05; 0,1; 0,2; e 0,3 mg/mL.

Uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde à liberação de 1 µmol de glicose/mL/min.

### **3.5.3.2 Atividade proteásica**

A determinação da atividade proteásica foi baseada no método de Sarath *et al.* (1989) utilizando Azocaseína 2% como substrato. Os isolados de *Trichoderma* spp.

foram crescidos em meio de cultura de Mandel & Reese (1960), modificado e suplementado com os fungicidas na concentração do produto comercial (Tabela 1.) durante cinco dias, sob agitação orbital (150 rpm) em câmara de crescimento a  $28\pm 2^\circ$  C. Os isolados foram inoculados durante cinco dias. Primeiramente, o substrato foi dissolvido em água destilada e centrifugado a 14000 rpm, pelo período de 10 min. Em seguida, foram colocados em tubo Eppendorf (de 1,5 mL) 150  $\mu$ L da amostra (sobrenadante do meio de cultura), juntamente com 250  $\mu$ L de azocaseína, misturado e incubado em banho-maria a  $25^\circ$  C por 30 min. O ácido tricloroacético 10% foi adicionado para cessar a reação, deixando descansar por 15 min. Decorrido esse período, foi centrifugado a 14000 rpm, por 5 min. Depois o sobrenadante foi transferido para outro tubo Eppendorf contendo 1,4 mL de NaOH 1M.

Um branco para cada amostra foi realizado, adicionando os mesmos reagentes da reação anterior na seguinte ordem: 1<sup>o</sup>: 150  $\mu$ L de Tampão Fosfato pH 6,2 (solução I: 31,2 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  em 1000 mL de água destilada; solução 2 II: 35,6 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  em 1000 mL de água destilada; solução final: 920 mL da solução I e 80 mL da solução II); 2<sup>o</sup>: 150  $\mu$ L da amostra; 3<sup>o</sup>: 1,2 mL de ácido tricloroacético; 4<sup>o</sup>: 250  $\mu$ L de substrato; 5<sup>o</sup>: depois o sobrenadante foi transferido para outro tubo Eppendorf contendo 1,4 mL de NaOH 1M. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro  $\lambda = 440$  nm.

Uma unidade da atividade proteásica (U) é definida como sendo a quantidade de enzima requerida para produzir uma absorbância de 1 unidade em 30 minutos a  $\lambda = 440$  nm e a  $25^\circ\text{C}$ .

O controle baseou-se na realização da leitura em espectrofotômetro apenas com o meio suplementado com o fungicida e a realização do experimento em meio sem a suplementação com os fungicidas.

### 3.5.4 Competição por nutrientes

#### 3.5.4.1 Produção de sideróforos

Para determinar a competição por nutrientes foi avaliada a produção de sideróforos pelos isolados de *Trichoderma* spp., através da técnica universal para detecção de sideróforos proposta por Schwyn & Neilands (1987). Inicialmente, todos os materiais utilizados para o desenvolvimento dos ensaios foram lavados com HCl 6M e, após, imersos em água deionizada por período de 8 horas e enxaguados em água deionizada.

O antagonista foi cultivado em meio de cultura BD, suplementado com captana na concentração do produto comercial (Tabela 1.) O princípio ativo foi selecionado devido à recomendação do MAPA para o controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*.

Os isolados foram incubados por cinco dias. Após o período de incubação, foram retirados 0,5 mL do sobrenadante do antagonista e que foram centrifugados por 10 minutos, a 14000 rpm, em tubo Eppendorf. Em seguida, acrescentou-se 0,5 mL da solução indicadora de cromo azurol S (CAS). O preparo da solução de CAS foi realizado da seguinte maneira: 1º: preparou-se uma solução com a mistura de 6 mL de solução de HDTMA (brometo de hexadeciltrimetilamônio) 10 mM a 30 mL de água; 2º: sob agitação foram acrescentados 1,5 mL de solução férrica ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1 mM preparada em HCl 0,01N) e 7,5 mL de solução de cromo azurol S 2 mM; 3º: separadamente, foram dissolvidos 4,307 g de piperazina anidra em 20 mL de água e depois de dissolvido por completo foi acrescida de 6,25 mL de HCl; 4º: então, foi adicionado à solução de piperazina o restante dos componentes já preparados e o volume completado para 100 mL. O mesmo foi realizado sem a

presença do fungicida para verificar se há mudança na detecção da produção de sideróforos.

A mudança de cor da mistura de sobrenadante-indicador de azulada para amarelo-avermelhado, em um prazo de 15 minutos, indica a produção de sideróforos pelo antagonista.

### **3.6 Análise estatística**

Os valores médios foram analisados usando os programas estatísticos SAS 9.1, SASM-AGRI versão 3.2.4 e ORIGIN 7.0 Os resultados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA). Os resultados expressos em valores contínuos que seguiram a normalidade foram analisados por ANOVA, seguidos pelo pós-teste de Tukey (5%) para comparação entre as médias. Os demais resultados foram avaliados por regressão e pelo método de contraste ortogonal.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Interferência dos princípios ativos no desenvolvimento de

#### *Trichoderma spp.*

Os princípios ativos captana, carbendazim, fluazinam, iprodiona e tiofanato metílico exerceram efeitos variáveis sobre o crescimento vegetativo e esporulação dos isolados testados, *T. harzianum* (TH11), *T. viride* (TV21) e *Trichoderma sp.* (T04, T16 e T20). A utilização de testes *in vitro* para determinar a toxicidade de um princípio ativo sobre um microrganismo tem a vantagem de expor ao máximo o microrganismo à ação do produto químico, o que não ocorre em condições de campo, quando diversos fatores interferem no contato direto entre eles. Assim, quando um princípio ativo é considerado compatível em laboratório espera-se que o mesmo ocorra no campo. Já quando um princípio ativo é considerado tóxico *in vitro*, nem sempre indica sua elevada toxicidade em campo, mas sim a possibilidade de ocorrência de danos dessa natureza (Moino Jr. & Alves, 1999).

O crescimento vegetativo dos isolados T04, TH11, T16, T20 e TV21 foi medido três dias após a inoculação dos isolados, momento em que o controle apresentou crescimento máximo em placa de Petri.

O princípio ativo captana interferiu no crescimento vegetativo de T04, TH11, T16, T20 e TV21 nas diferentes concentrações do princípio ativo em relação ao controle (Tabela 5.). Hatvani *et al.* (2006) observaram efeito inibitório de captana

sobre o crescimento vegetativo de *Trichoderma harzianum* (T66) e *Trichoderma viride* (T122). Os autores calcularam a dose mínima inibitória com efeito sobre os isolados testados como 100µg/mL.

TABELA 5.	Análise da variância do efeito de diferentes concentrações de captana sobre o crescimento vegetativo de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009.
-----------	--

<i>Causa da variação</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Tratamentos	29	938,307	32,355	139,925	Significativo 1%
Resíduos	120	27,748	0,231		

Ainda considerando apenas o princípio ativo captana, é possível observar certa relação entre o aumento da concentração do produto com a diminuição do crescimento vegetativo (Figura 1.). As concentrações referentes a duas e quatro vezes a concentração do produto comercial foram mais prejudiciais ao desenvolvimento dos isolados. O mesmo fato é observado por Resende *et al.* (2005), que constataram que o efeito inibitório de captana sobre o crescimento micelial de *Trichoderma harzianum* em meio BDA aumenta proporcionalmente ao aumento na concentração do produto.

Para o isolado T16 não foi possível relacionar o decréscimo no crescimento vegetativo com o aumento da concentração do princípio ativo, já que para esse isolado a concentração múltipla de 0,5 mostrou maior toxicidade a esse isolado em relação aos demais.

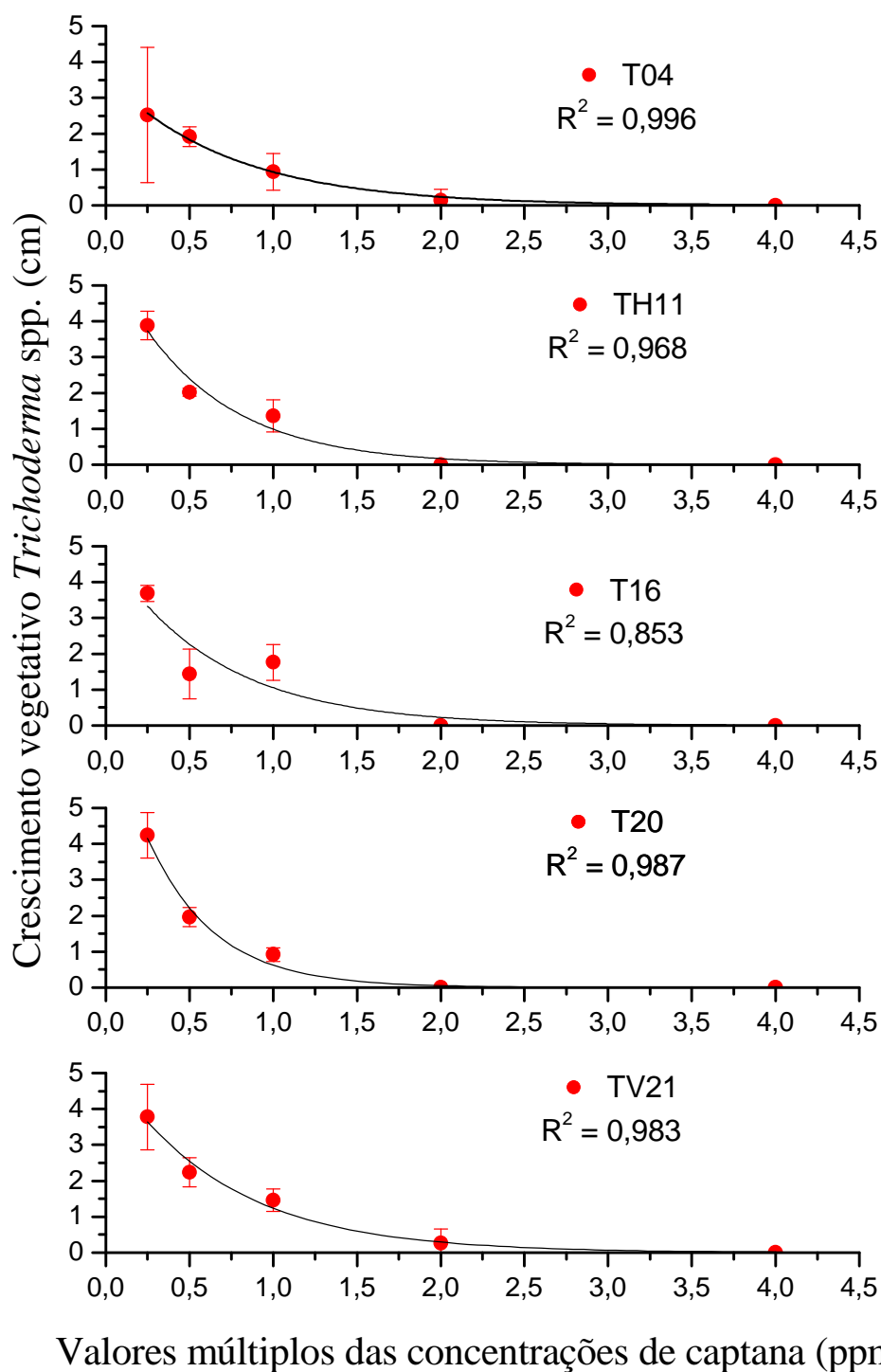


FIGURA 1.	Curvas de regressão $y=A*2^{(-B*x)}$ ajustada aos pontos experimentais relativos ao efeito das diferentes concentrações de captana sobre o crescimento vegetativo de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009.
-----------	---

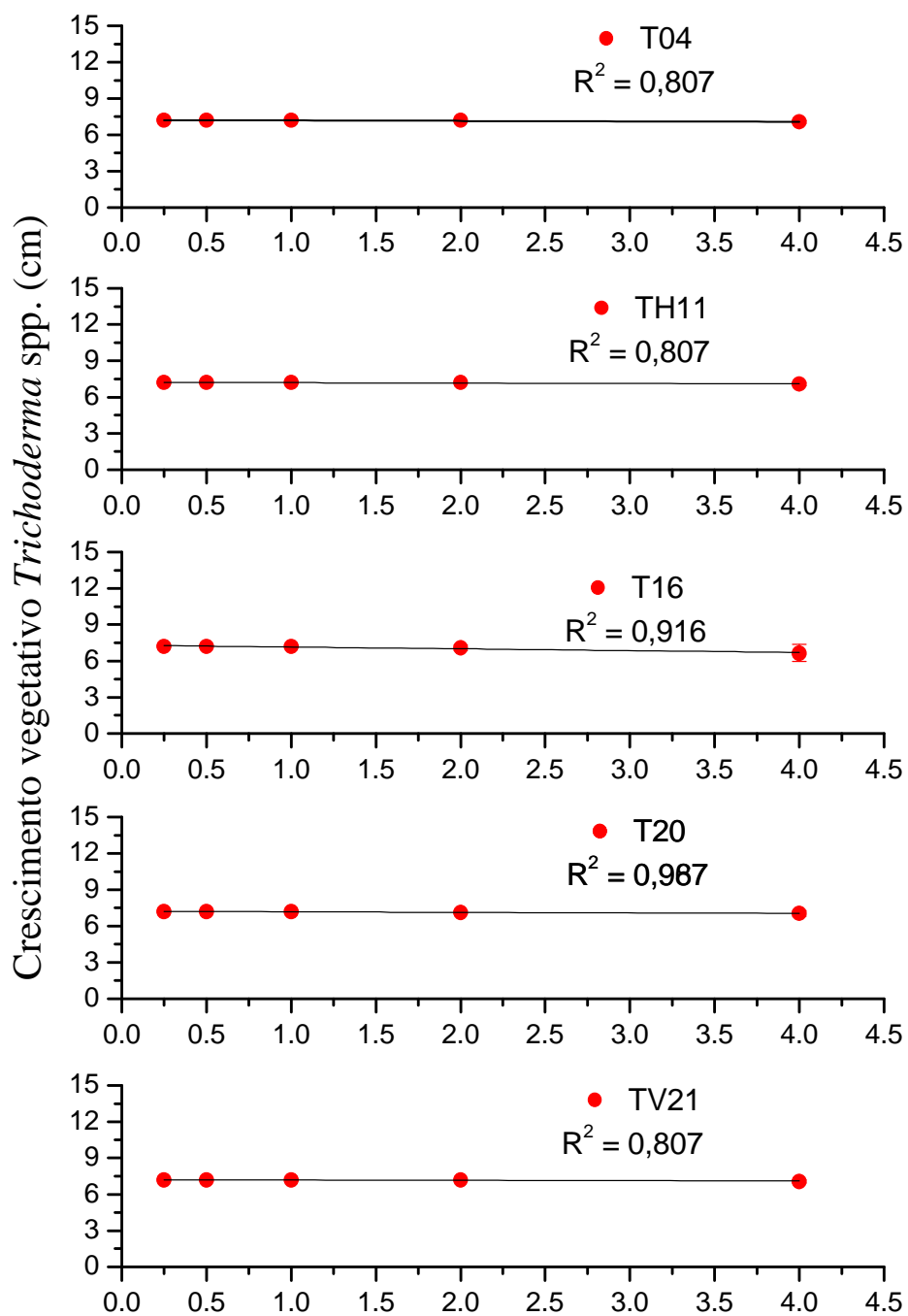
O crescimento vegetativo dos isolados de *Trichoderma* spp. não foi afetado pelo princípio ativo tiofanato metílico (Tabela 6.)

<i>Causa da variação</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Tratamentos	29	1,670	0,058	1,562	Significativo 1%
Resíduos	120	2,639	0,022		

As concentrações de tiofanato metílico testadas não interferiram no crescimento vegetativo dos isolados T04, TH11 e TV21.

É possível observar que os valores do crescimento vegetativo de *Trichoderma* spp. se mantiveram constantes, sem sofrer interferência das concentrações múltiplas de 0,25; 0,5; 1 e 2 do princípio ativo.

A partir da concentração múltipla 2, os isolados de *Trichoderma* spp. começaram a apresentar capacidade reduzida em crescer vegetativamente. Nos isolados T16 e T20 foi possível constatar que a partir dessa concentração é possível estabelecer uma relação linear no decréscimo no crescimento vegetativo desses isolados (Figura 2.).



Valores múltiplos das concentrações de tiofanato metílico (ppm)

FIGURA 2.

Curvas de regressão  $y=A+B*x$  ajustada aos pontos experimentais relativos ao efeito das diferentes concentrações de tiofanato metílico sobre o crescimento vegetativo de *Trichoderma* spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009.

Já os princípios ativos carbendazim, fluazinam e iprodiona inibiram completamente o crescimento vegetativo de todos os isolados testados. O princípio ativo carbendazim é citado por diversos pesquisadores como tóxico a *Trichoderma* sp., mesmo em concentrações baixas do produto (Silva *et al.*, 1999; Malathi *et al.*, (2002); Hetong, *et al.*, 2008; Nallathambi *et al.*, (2009). Em geral, as pesquisas demonstram que *Trichoderma* não é resistente aos fungicidas do grupo dos benzimidazóis, fato que poderia estar relacionado com a forma de ação desse fungicida sobre a estrutura das  $\beta$ -tubulinas.(Zambolim *et al.*, 2007), estruturas que podem apresentar-se mais sensíveis em *Trichoderma* sp.. Fluazinam também provocou grande inibição no crescimento vegetativo de *Trichoderma* sp. quando testado na concentração de 100 mg/L por May & Kimati (2000). Quando se trata de iprodiona, Silva *et al.* (1999) perceberam inibição acima de 55% no crescimento vegetativo (a partir da concentração 1  $\mu$ g/mL) e na esporulação (na concentração 2,5  $\mu$ g/mL) de *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride*. Os autores ainda constataam que *Trichoderma harzianum* é mais resistente ao princípio ativo do que *Trichoderma viride*.

A capacidade dos isolados de *Trichoderma* spp. esporularem em meio de cultura suplementado com princípios ativos de fungicidas comerciais foi avaliada após sete dias da inoculação dos fungos.

A variância nos valores da esporulação dos isolados T04, TH11, T16, T20 e TV21 na presença do princípio ativo captana podem ser observados na Tabela 7.

TABELA 7.	Análise da variância do efeito de diferentes concentrações de captana sobre a esporulação de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009.
-----------	---

<i>Causa da variação</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Tratamentos	29	505539,9	17432,410	4,309	Significativo 1%
Resíduos	120	485432,1	4045,265		

Quando inoculados com suplementação de captana, os isolados aumentaram significativamente sua capacidade de esporulação, diferenciando-se de todos os demais tratamentos. De modo geral, os isolados aumentaram de forma linear o número de esporos de acordo com o aumento na concentração. Apenas o isolado T16 não segue a tendência linear em aumentar o número de esporos produzidos com o aumento da concentração do princípio ativo (Figura 3).

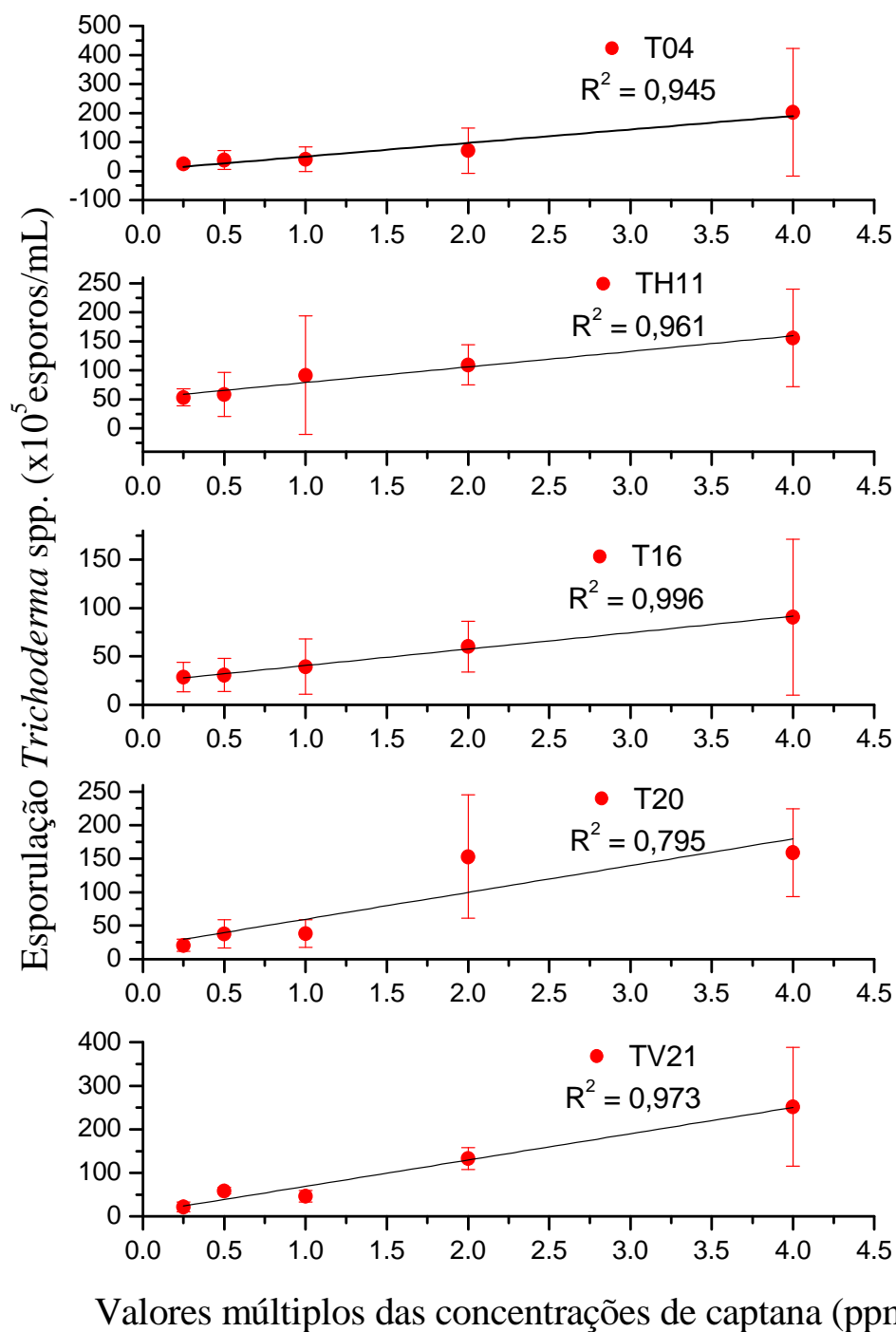


FIGURA 3.	Curvas de regressão $y=A+B*x$ ajustada aos pontos experimentais relativos ao efeito das diferentes concentrações de captana sobre a esporulação de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009
-----------	--

Quando avaliada a capacidade dos isolados de *Trichoderma* spp. esporularem na presença de tiofanato metílico, a variância pode ser observada na Tabela 8.



TABELA 8.	Análise da variância do efeito de diferentes concentrações de tiofanato metílico sobre a esporulação de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009.
-----------	--

<i>Causa da variação</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Tratamentos	29	73584,748	2537,405	2,771	Significativo 1%
Resíduos	120	109882,6	915,689		

Os isolados aumentaram sua capacidade de esporular com o aumento da concentração do princípio ativo, até o ponto em que esse aumento na concentração passa a provocar a redução na capacidade dos isolados esporularem. Apenas o isolado T04 não segue o modelo cúbico para a produção de esporos, já que a concentração múltipla de 0,5 é capaz de aumentar a capacidade dos isolados esporularem em relação a concentração seguinte (Figura 4).

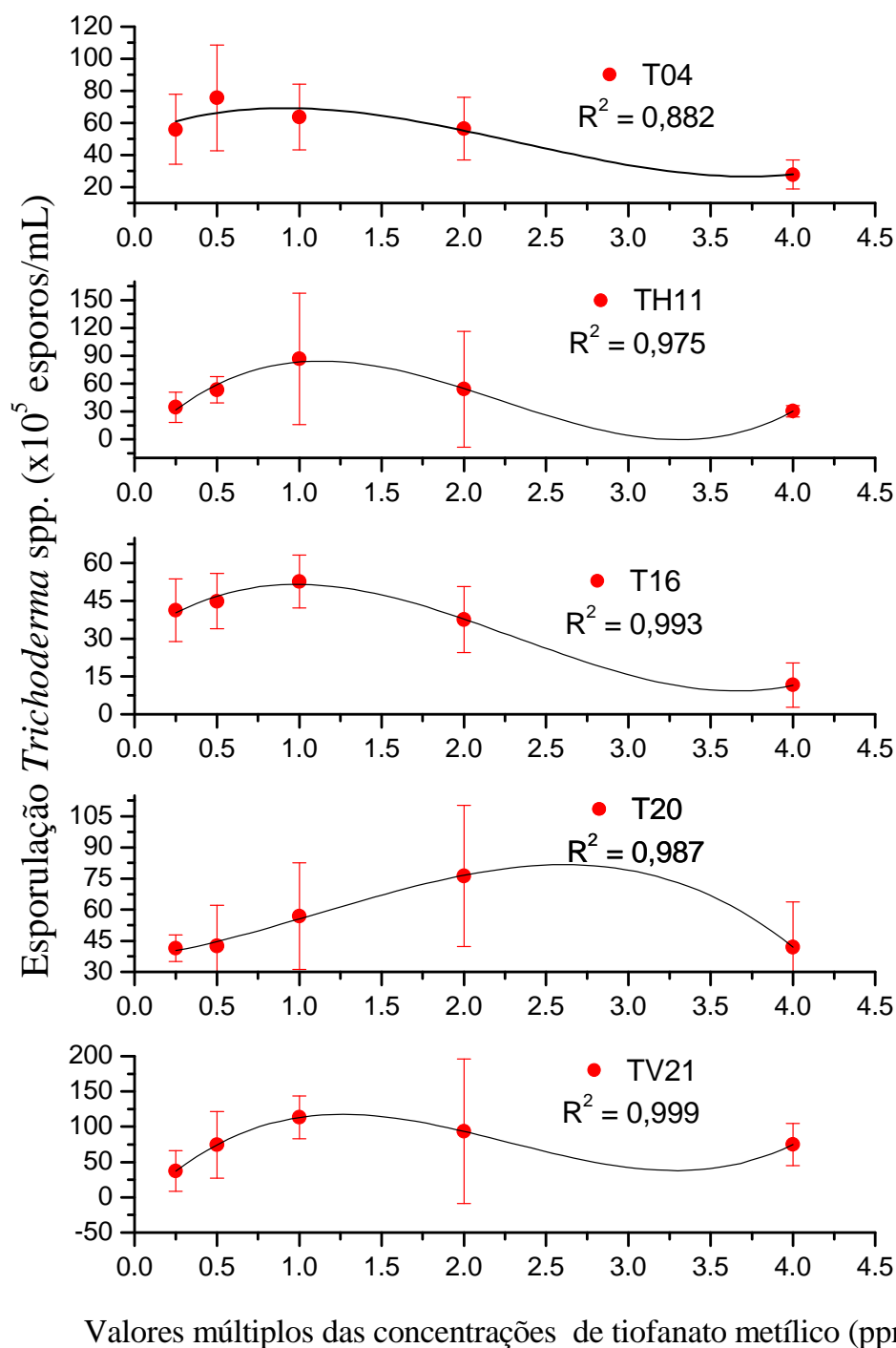


FIGURA 4. Curvas de regressão  $y=A+B*x+C*x^2+D*x^3$  ajustada aos pontos experimentais relativos ao efeito das diferentes concentrações de tiofanato metílico sobre a esporulação de *Trichoderma* spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009

Como os princípios ativos carbendazim, fluazinam e iprodiona afetaram o crescimento vegetativo de todos os isolados testados, não foi possível observar a

formação de esporos dos mesmos. Pandolfo (2007) relata o efeito antiesporulante do princípio ativo fluazinam, embora não tenha ocorrido inibição total do crescimento micelial de *Trichoderma* sp. na presença do princípio ativo.

O princípio ativo carbendazim mostrou efeito fungicida sobre T04, TH11, T16, T20, TV21, enquanto fluazinam e iprodiona mostraram efeito fungistático, já que foram posteriormente recuperados em meio de cultura BDA (Tabela 9.). Pandolfo (2007) recuperou os isolados de *Trichoderma* sp. (T4R, TSV) e o produto comercial PCT de raízes de plantas cujas sementes foram tratadas com carbendazim, indicando que o resultado *in vitro* pode não ser confirmado *in vivo*, como relatado anteriormente. A frequência de recuperação indica que um maior tempo de observação do que o realizado nesse ensaio pode apresentar diferentes resultados para o crescimento vegetativo dos mesmos isolados, para os princípios ativos fluazinam e iprodiona.

TABELA 9.	Frequência (%) de recuperação dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. de meios de cultura suplementados com carbendazim, fluazinam e iprodiona. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009.
-----------	--

	<i>T04</i>	<i>TH11</i>	<i>T16</i>	<i>T20</i>	<i>TV21</i>
<b>Carbendazim</b>					
0,25	0	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
<b>Fluazinam</b>					
0,25	100	100	100	100	100
0,5	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100
4	100	100	60	80	100
<b>Iprodiona</b>					
0,25	100	100	100	100	100
0,5	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100
4	100	80	100	80	100

O equilíbrio entre as fontes de C, N, P, vitaminas e micronutrientes na composição do meio de cultura são fatores decisivos para o crescimento e esporulação de microrganismos (Silva & Melo, 1999). O gênero *Trichoderma* apresenta bons resultados de crescimento vegetativo e esporulação em meio de cultura batata-dextrose-ágar. Como os princípios ativos dos fungicidas comerciais são adicionados ao meio de cultura, alterando as fontes de C e N, principalmente, a assimilação desses compostos pelo fungo pode não estar ocorrendo, causando uma situação de estresse, fazendo com que o mesmo aumente sua esporulação como forma de garantir sobrevivência ou mesmo tornando o meio tóxico, reduzindo ou impedindo o seu crescimento micelial e esporulação.

Para determinar a forma de interferência de cada princípio ativo sobre os isolados T04, TH11, T16, T20 e TV21, os resultados foram organizados seguindo a

metodologia de Alves *et al.* (1998), que indica o grau de toxicidade dos agrotóxicos sobre microrganismos benéficos (Tabela 10.).

O princípio ativo captana interferiu no crescimento micelial dos isolados testados, reduzindo significativamente este parâmetro em relação ao controle (Figura 1.), entretanto, a esporulação não diferiu para os isolados e concentrações testadas (Figura 3.). Dessa forma, este fungicida foi considerado compatível aos isolados testados, de acordo com a metodologia aplicada, que considera além do crescimento vegetativo a esporulação como um fator importante para a determinação da toxicidade de agrotóxicos sobre organismos benéficos. Dessa forma, percebeu-se que o cálculo da toxicidade baseia-se na esporulação na presença de captana. Seguindo a tendência de que o fungicida aumenta a esporulação com o aumento da concentração do produto comercial testada, os isolados T04 e TV21 mostraram sensibilidade na concentração 120 g/L do fungicida, já que para essas concentrações a esporulação não foi elevada. Os fungicidas metalaxil, carboxim-thiram, chlorotalonil, captana, propamocarb e himexazol não interferiram no desenvolvimento de *Trichoderma* sp., sendo indicados por May & Kimati (2000) como produtos compatíveis para serem recomendados em manejo integrado. Resende *et al.* (2004) não encontraram indícios de toxicidade de captana e fludioxonil, na dosagem recomendada para sementes de milho, ao isolado testado de *Trichoderma harzianum*. Entretanto, é importante considerar que os mecanismos de ação das espécies de *Trichoderma* dependem do contato entre o antagonista e os patógenos (HOWELL, 2003; BENÍTEZ *et al.*, 2004), o que pode ser prejudicado pela ação do princípio ativo captana, já que o mesmo reduziu significativamente o crescimento micelial dos isolados testados.

Tiofanato metílico foi compatível com todos os isolados, nas concentrações testadas. O crescimento vegetativo e a esporulação (Figura 2. e Figura 4.) dos

isolados não diferiram significativamente nas diferentes concentrações, apresentando crescimento vegetativo máximo em placa após três dias de incubação (Figura 2.). Por seu espectro antifúngico, os fungicidas com o princípio ativo tiofanato se assemelham aos benzimidazóis. Segundo Picinini (1994), os fungicidas com base na tiuréia dependem de sua conversão a um anel benzimidazol (metil benzimidazol carbamato – MBC ou etil benzimidazol carbamato – EBC) para atuarem como fungicidas. Nesse processo de transformação dos sub-produtos químicos de tiofanato metílico, os isolados de *Trichoderma* spp. testados podem apresentar desenvolvimento de resistência, mesmo quando testados com altas concentrações do princípio ativo. Zambolim *et al.* (2007) descrevem o alto risco de resistência ao tiofanato metílico, com casos relatados para muitas espécies de fungos, já que existem vários alvos de mutação para esse princípio ativo. O fato de os isolados de *Trichoderma* spp. testados apresentarem um crescimento vegetativo e esporulação significativamente maior na presença do tiofanato metílico (precursor de benzimidazol) do que de carbendazim (benzimidazol) indicando a ocorrência de isolados resistentes a este princípio ativo, também foi descrito por Sartorato (2006) para *Colletotrichum lindemuthianum* e por Santos *et al.* (2006) para *Didymella bryoniae*. Os demais princípios ativos, por não possibilitarem o crescimento vegetativo e esporulação no período dessa avaliação foram classificados como muito tóxicos aos isolados T04, TH11, T16, T20 e TV21.

TABELA 10. Compatibilidade de princípios ativos de fungicidas comerciais e isolados de *Trichoderma* spp. Segundo Alves *et al.* (1998). Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009.

	<b>T04</b>	<b>TH11</b>	<b>T16</b>	<b>T20</b>	<b>TV21</b>
<b>Captana</b>					
0,25	MDT	C	C	C	T
0,5	C	C	C	C	C
1	C	C	C	C	C
2	C	C	C	C	C
4	C	C	C	C	C
<b>Carbendazim</b>					
0,25	MT	MT	MT	MT	MT
0,5	MT	MT	MT	MT	MT
1	MT	MT	MT	MT	MT
2	MT	MT	MT	MT	MT
4	MT	MT	MT	MT	MT
<b>Fluazinam</b>					
0,25	MT	MT	MT	MT	MT
0,5	MT	MT	MT	MT	MT
1	MT	MT	MT	MT	MT
2	MT	MT	MT	MT	MT
4	MT	MT	MT	MT	MT
<b>Iprodiona</b>					
0,25	MT	MT	MT	MT	MT
0,5	MT	MT	MT	MT	MT
1	MT	MT	MT	MT	MT
2	MT	MT	MT	MT	MT
4	MT	MT	MT	MT	MT
<b>Tiofanato metílico</b>					
0,25	C	C	C	C	C
0,5	C	C	C	C	C
1	C	C	C	C	C
2	C	C	C	C	C
4	C	MDT	C	C	C

Onde: C – compatível, MDT – moderadamente tóxico, T – tóxico, MT – muito tóxico

#### 4.2 Avaliação do potencial antagônico de *Trichoderma* spp. sobre

##### *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*

Todos os isolados foram igualmente eficientes na redução do crescimento vegetativo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (Tabela 11. e Tabela 12.).

TABELA 11.	Análise da variância do potencial antagonístico de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> . Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009.
------------	---

<i>Causa da variação</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Tratamentos	5	24,827	4,965	9,491	Significativo 1%
Resíduos	24	12,556	0,523		

TABELA 12.	Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. a <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> . Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009.
------------	---

Tratamento	Crescimento vegetativo de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> (cm)
Controle	4,38a
T04	1,90b
TH11	1,72b
T16	2,40b
T20	2,36b
TV21	1,82b

CV=29,765

Médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si (Tukey 5%).

As colônias dos isolados cresceram sobre as colônias de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* e possivelmente parasitando-os (Figura 5.). Esses resultados concordam com os de Ethur *et al.* (2001) que selecionou isolados de *Trichoderma* com potencial para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* pelo crescimento sobre as colônias do patógeno. O teste indica a possibilidade de uso dos isolados T04, TH11, T16, T20 e TV21 no controle da murcha de fusarium. Martins-Corder & Melo (1998) selecionaram entre 20 isolados de *Trichoderma* sp. os mais promissores para controle de *Verticillium dahliae*. Para isso, os autores utilizaram a escala de Bell (1982), que determina notas para a forma como o antagonista atua sobre o patógeno (1- antagonista cresce por toda a placa de Petri. 2 – antagonista cresce sobre 2/3 da placa, 3 – antagonista e patógeno crescem até a metade da placa, 4 – patógeno cresce



sobre 2/3 da placa, 5 – patógeno cresce por toda a placa de Petri). Com esses resultados, foram selecionados dois isolados de *Trichoderma koningii* (CNP311A e TW6) e dois isolados de *Trichoderma viride* (Tal-1, T15P), que reduziram significativamente o crescimento micelial de *Verticillium dahliae* em testes de antagonismo *in vitro*.

Usando-se dessa metodologia, todos os isolados testados durante o teste de antagonismo *in vitro* com *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* podem ser classificados pela nota 1 – antagonista cresce por toda a placa de Petri, indicando que os isolados T04, TH11, T16, T20 e TV21 são promissores para o emprego em estratégias de manejo integrado.

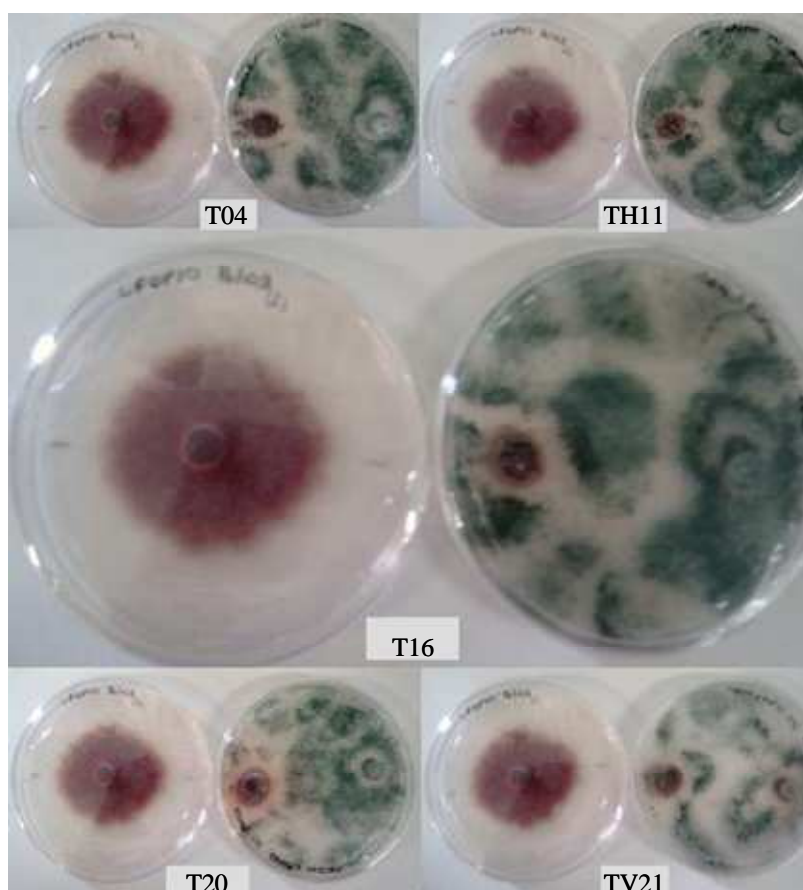


FIGURA 5.	Colônias de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> (controle) e <i>Trichoderma</i> spp. em confronto direto para teste de antagonismo <i>in vitro</i> . Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009.
-----------	---

O antagonismo de *Trichoderma* spp. é explicado pela produção de antibióticos de amplo espectro, tais como gliotoxina, viridina, trichodermina, suzucacilina, alameticina e dermatina, que têm a capacidade de inibir o crescimento de outros fungos (Dennis & Webster, 1971c). Os primeiros trabalhos científicos provando a produção de antibióticos por *Trichoderma* spp. foram realizados por Weidling (1934), que conseguiu identificar gliotoxina e viridina.

#### **4.3 Avaliação do efeito dos princípios ativos no desenvolvimento de**

##### *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*

Entre as doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), a murcha ou amarelecimento, causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, se destaca como uma das mais importantes, já que causa redução na produtividade em até 80% (Echandi, 1967). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) recomenda para o controle da murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*) o fungicida Captan SC (captana). Outros fungicidas, embora não registrados para o patógeno, podem reduzir desenvolvimento da doença. A Tabela 13. apresenta a análise da variância dos resultados obtidos *in vitro*, utilizando cinco concentrações do produto comercial (Tabela 2) sobre *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*.

TABELA 13.	Análise da variância do efeito de diferentes concentrações dos princípios ativos captana, carbendazim, fluazinam, iprodiona e tiofanato metílico sobre o crescimento vegetativo de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> . Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009.
------------	---

Causa da variação	GL	SQ	QM	F	P
Tratamentos	25	260,335	10,413	530,879	Significativo 1%
Resíduos	52	1,02	0,019		

O experimento comprovou a eficiência desse produto na inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, para todas as concentrações testadas. Coutinho *et al.* (1999) comprovaram a redução no número de patógenos em sementes de feijão tratadas com captana. O princípio ativo reduziu aproximadamente 15% a incidência de *Fusarium graminearum* em sementes de trigo, mostrando comportamento semelhante ao da testemunha no trabalho desenvolvido por Garcia Júnior *et al.* (2008). Além de patógenos, Pinkoski *et al.*, (1993) relatam a inibição total no desenvolvimento de *Rhizobium phaseoli* quando o produto foi aplicado na dose recomendada pelo fabricante.

Além de captana, os princípios ativos fluazinam e carbendazim inibiram completamente o crescimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. Pandolfo (2007) também relata a inibição total no crescimento do mesmo patógeno por carbendazim e inibição parcial quando testado com fluazinam. Komyoji *et al.* (1995), estudando as propriedades biológicas de fluazinam, definiram o EC<sub>90</sub> para *Fusarium oxysporum* nas “formae speciales” *cucumerinum* e *raphani* como >100 ppm.

Os princípios ativos iprodiona e tiofanato metílico não inibiram o crescimento do patógeno (Figura 6.).

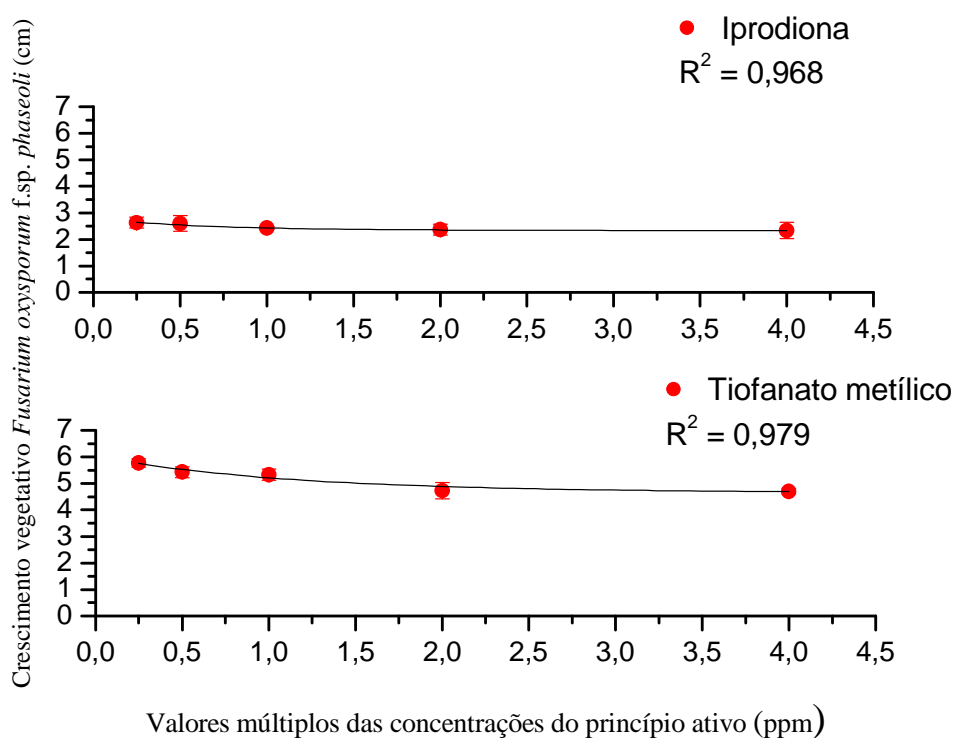


FIGURA 6.	Curvas de regressão $y=A1*\exp(-x/t1)+y0$ ajustada aos pontos experimentais relativos ao efeito das diferentes concentrações dos princípios ativos iprodiona e tiofanato metílico sobre o crescimento vegetativo de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> . Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009.
-----------	--

O princípio ativo iprodiona reduziu o crescimento vegetativo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* mas não completamente, em todas as concentrações testadas. O desenvolvimento do patógeno diminui exponencialmente com o aumento da concentração do produto comercial. Pereira *et al.* (2002) estudando a fungitoxicidade de iprodiona sobre o crescimento micelial de fungos que se associam com sementes de arroz, também observaram o fato de que com o aumento da concentração do produto ocorre a redução do crescimento micelial do patógeno.

Concentrações mais altas de tiofanato metílico (múltiplos 2 e 4) também reduziram o crescimento do patógeno. A partir dessas concentrações, o princípio ativo reduz exponencialmente o crescimento do patógeno. As demais concentrações

não interferiram no crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. O princípio ativo foi testado no controle de *Botrytis cinerea* por Kimura *et al.* (2001). Nesse estudo o patógeno não foi sensível ao tiofanato metílico, apresentando altíssimo EC<sub>50</sub> (>1000). O produto também provocou redução na germinação de conídios. Entretanto, o mesmo princípio ativo foi eficiente no controle de *Fusarium graminearum* (Garcia Júnior *et al.*, 2008).

O teste com os fungicidas comprovou a eficiência do produto comercial recomendado pelo MAPA e indica os fungicidas carbendazim e fluazinam como bons controladores do patógeno *in vitro*. A alta sensibilidade do patógeno a esses princípios ativos é explicada, já que esses fungicidas não têm sido utilizados especificamente para o controle da murcha de fusarium e a acumulação de mutantes resistentes em populações fúngicas depende, entre outros fatores, da pressão de seleção exercida pela frequência de aplicação do fungicida (Kendall & Hollomon, 1998).

#### **4.4 Avaliação da interferência dos princípios ativos nos mecanismos de ação de *Trichoderma* spp.**

O mercado de substâncias químicas utilizadas para o controle de pragas e doenças é vasto. Entre as diferentes classes de produtos químicos, os fungicidas se destacam em número e variedade. Entretanto, as conseqüências da sua utilização não são apenas benéficas a cultura. Muitos compostos químicos são tóxicos ao homem e animais e, contaminam o ambiente, além de acarretarem diminuição do potencial de controle biológico (Loureiro *et al.*, 2002).

Para que se desenvolva uma tecnologia que possibilite a combinação de diferentes métodos de controle, é importante a realização de estudos sobre seus

efeitos associados. No caso do controle biológico, a avaliação dos efeitos dos diversos produtos químicos que são comumente utilizados no campo sobre os agentes de biocontrole é de fundamental importância. Esses estudos têm como finalidade determinar a compatibilidade entre os produtos químicos e o agente de biocontrole e, se possível, estabelecer as concentrações adequadas para cada caso (Mello *et al.*, 2003).

#### **4.4.1 Confronto direto**

Entre os principais mecanismos de ação que permitem as espécies de *Trichoderma* sejam utilizadas como biocontroladoras de fitopatógenos estão a competição por espaço e nutrientes no substrato, antibiose, micoparasitismo, produção de enzimas hidrolíticas e competência rizosférica (Infante *et al.*, 2009). O crescimento micelial do antagonista é um fator determinante para a eficiência do controle biológico, já que o contato (direto ou indireto) entre o antagonista e o patógeno é responsável pela ativação desses mecanismos. Por essa razão, os testes de antagonismo são eficientes para a seleção de isolados promissores ao controle biológico (Mariano, 1993). O teste de antagonismo ainda permite mensurar o crescimento micelial, bem como os tipos de interação, como hiperparasitismo, formação de clamidósporos, dentre outros (Faria *et al.*, 2002). Dessa forma, se os princípios ativos de fungicidas comerciais interferem na capacidade antagonística de *Trichoderma* spp. sua eficiência no controle biológico pode estar comprometida, pela não ativação dos mecanismos de ação. A análise da variância dos resultados é apresentada na Tabela 14.

TABELA 14.	Análise da variância do efeito dos princípios ativos captana, carbendazim, fluazinam, iprodiona e tiofanato metílico no antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009.
------------	---

Causa da variação	GL	SQ	QM	F	P
Tratamentos	25	344,853	13,794	6,377	Significativo 1%
Resíduos	104	224,956	2,163		

Os resultados da interação entre patógeno e antagonista na presença dos princípios ativos são apresentados na Tabela 15. podem ser observado na Figura 7.

TABELA 15.	Interferência dos princípios ativos captana, carbendazim, fluazinam, iprodiona e tiofanato metílico no antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> , através da medida do crescimento vegetativo do patógeno (cm) Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009.
------------	---

	T04	TH11	T16	T20	TV21
Controle	4,5ab	4,5ab	4,5ab	4,5ab	4,5ab
Captana	0c	0c	0c	0c	0c
Carbendazim	3,34abc	4,84ab	4,12ab	3,4 abc	5,18a
Fluazinam	2,54abc	3,28 abc	3,12 abc	3,62ab	2Abc
Iprodiona	1,62bc	1,58bc	1,58bc	1,62 bc	1,82 abc
Tiofanato metílico	2,38 abc	4,74ab	4,8ab	3,08 abc	2,24 abc

CV= 58,469

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

O princípio ativo captana não possibilitou o crescimento vegetativo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro*. Dessa forma, podemos afirmar que a redução no crescimento vegetativo do patógeno ocorre pela ação do produto químico e não pela ação do antagonista ou do tratamento combinado entre antagonista e princípio ativo.

O tratamento combinado entre os isolados de *Trichoderma* spp. e o princípio ativo carbendazim possibilitou o crescimento de vegetativo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, indicando possível desenvolvimento de resistência no isolado, depois

de sucessivas repicagens na presença do princípio ativo. Carbendazim apresenta alto risco de resistência no patógeno para diversas espécies de fungos (Ghini & Kimati, 2002; Zambolim *et al.*, 2007), como relatado por Rodrigues *et al.* (2007) em um estudo com *Guignardia citricarpa* obtidos em áreas com elevada frequência de aplicação de fungicidas benzimidazóis. Esse fato pode ser observado pela medida micelial do patógeno com o princípio ativo e TV21. Nessa condição, além de inibir o crescimento do isolado de *Trichoderma viride*, o princípio ativo pode estar servindo como fonte de carbono disponível para o crescimento acelerado do patógeno, já que esse apresentou crescimento maior nessas condições em relação ao controle (Tabela 15.). Melo & Azevedo (1998) sugerem a utilização de fungicidas como fonte de carbono por diversos fungos.

Assim como ocorreu com carbendazim, há indícios do desenvolvimento de resistência do isolado de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* para o princípio ativo fluazinam. Quando o efeito do antagonista sobre o patógeno foi testado na presença do princípio ativo fluazinam e também iprodiona, mesmo com um reduzido crescimento de *Trichoderma*, houve inibição no desenvolvimento do patógeno em relação ao controle. Nesse caso, ou o patógeno é inibido pelo princípio ativo ou o princípio ativo presente no meio pode atuar como indutor da produção de metabólitos voláteis ou antibióticos pelos isolados de *Trichoderma* spp., já que não ocorre o contato entre os isolados do antagonista e o patógeno para que atuem as enzimas produzidas no mecanismo de micoparasitismo.

Uma das características das populações microbianas é a capacidade de adaptação à presença de produtos químicos no ambiente. Segundo Bollag & Liu (1990) e Rao *et al.* (1993) uma vez que os microrganismos estão expostos aos químicos, as moléculas estariam sujeitas a cinco possibilidades de transformação ou



inibição: a) biodegradação em que a molécula poderia servir como substrato de crescimento e energia; b) cometabolismo, em que o fungicida é transformado por reações metabólicas mas não serviria como fonte de energia aos microrganismos; c) polimerização ou conjugação, em que a molécula, ou seu intermediário, seria conjugado com outros compostos presentes naturalmente no solo; d) acumulação, em que a molécula seria incorporada e acumulada dentro dos microrganismos; e) efeitos secundários da atividade microbiana, em que o fungicida é transformado, por causa de mudanças no pH, reações redox e produtos reativos, entre outros, proporcionado pelos microrganismos.

Tiofanato metílico tem efeito sobre a ação antagonística dos isolados de *Trichoderma* spp. Quando esse princípio ativo foi adicionado ao meio de cultura, o crescimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* foi reduzido, com exceção do isolado T16, que não interferiu no desenvolvimento do patógeno no tratamento combinado com o princípio ativo. Como o princípio ativo não afeta o crescimento dos isolados de *Trichoderma* spp., como relatado no ítem 4.1, a inibição no crescimento do patógeno na presença de tiofanato estaria relacionada, principalmente, com a competição por espaço.

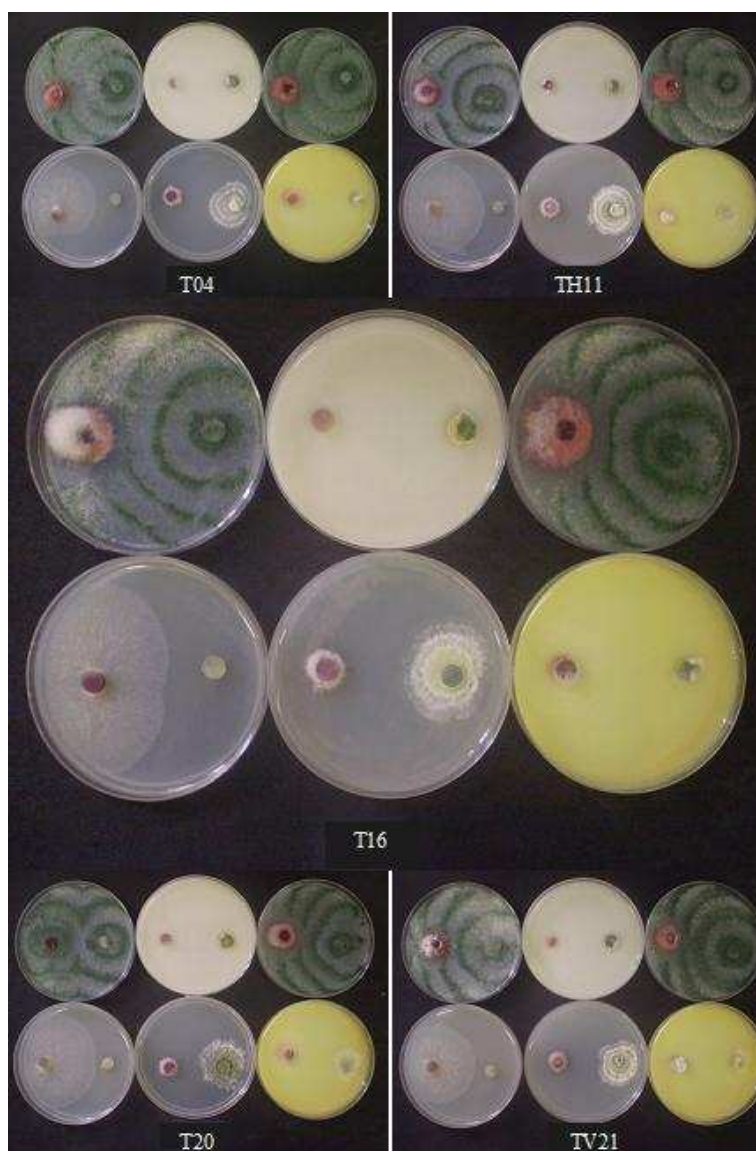


FIGURA 7.	Antagonismo entre <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> em confronto direto com princípios ativos <i>in vitro</i> . Superior: Controle, captana, tiofanato metílico; Inferior: Carbendazim, iprodiona e fluazinam. Segue a ordem para todos os isolados. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009.
-----------	---

#### 4.4.2 Metabólitos voláteis

Quando avaliada a produção de metabólitos voláteis pelos isolados de *Trichoderma* spp. T04, TH11, T16, T20 e TV21 na redução do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em relação ao controle, observou-se redução significativa no desenvolvimento do patógeno semelhante para todos os isolados

(Tabela 16.), confirmando a eficiência desse mecanismo no controle biológico. Lobo Junior & Abreu (2000) observaram os mesmos resultados quando a produção de metabólitos voláteis pelos isolados TR2- *Trichoderma viride*, T10- *Trichoderma aureoviride*, T15 – *Trichoderma koningii* e T26 - *Trichoderma pseudokoningii* foi testada para inibição do crescimento vegetativo de *Sclerotinia sclerotiorum*.

TABELA 16.	Redução no crescimento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> pela produção de metabólitos voláteis por <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (2009).
------------	--

<i>Isolados</i>	<i>Crescimento vegetativo de Fusarium oxysporum f.sp. phaseoli (cm)</i>
Controle	5,88a
T04	3,56b
TH11	3,64b
T16	4,08b
T20	3,34b
TV21	3,72b

CV: 13,360

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

Segundo Santos (2009) a volatilidade dos agrotóxicos no ambiente é muito variada, assim como sua tendência à perda atmosférica. Para avaliar como a volatilidade dos fungicidas interfere no desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, os princípios ativos captana, carbendazim, fluazinam, iprodiona e tiofanato metílico foram avaliados *in vitro*. Iprodiona e carbendazim não tiveram efeito sobre o crescimento vegetativo do patógeno, enquanto os outros princípios ativos reduziram o crescimento vegetativo do patógeno, mesmo na ausência do antagonista. Destaca-se o princípio ativo fluazinam, que reduziu aproximadamente 37% o crescimento do patógeno (Tabela 17.).

TABELA 17.	Redução no crescimento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> pela volatilização dos princípios ativos captana, carbendazim, fluazinam, iprodiona e tiofanato metílico. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (2009).
------------	--

<i>Princípio ativo</i>	<i>Crescimento vegetativo de Fusarium oxysporum f.sp. phaseoli (cm)</i>
Controle	5,88ab
Captana	4,98d
Carbendazim	5,52bc
Fluazinam	3,68e
Iprodiona	5,98a
Tiofanato metílico	5,32cd

CV=3,882

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

Conhecendo o efeito dos metabólitos voláteis dos isolados sobre o patógeno, bem como dos voláteis dos princípios ativos sobre eles foi possível fazer uma análise da interação dos produtos químicos com o agente de controle biológico mensurando a redução do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* pela produção de metabólitos voláteis.

Analisando cada princípio ativo separadamente, com a suplementação do meio de cultura com captana, observou-se que o controle (apenas *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*) apresentou maior crescimento vegetativo em relação aos demais tratamentos. Embora o princípio ativo tenha apresentado efeito sobre a produção de metabólitos voláteis dos isolados de *Trichoderma* spp. nos tratamentos em combinação, a ação isolada de *Trichoderma* spp. é mais eficiente na redução de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* (Tabela 18. e Figura 8.).

TABELA 18. Contraste ortogonal das médias de crescimento vegetativo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* submetido a diferentes tratamentos para avaliação da interferência do princípio ativo captana na produção de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (2009).

Contraste	Valor F	P>F
<i>Fusarium</i> vs. demais tratamentos	97,32	< 0,0001
Captana vs. tratamento combinado	18,24	< 0,0001
Captana vs. <i>Trichoderma</i> spp.	42,82	< 0,0001
<i>Trichoderma</i> vs. tratamento combinado	15,53	0,0003

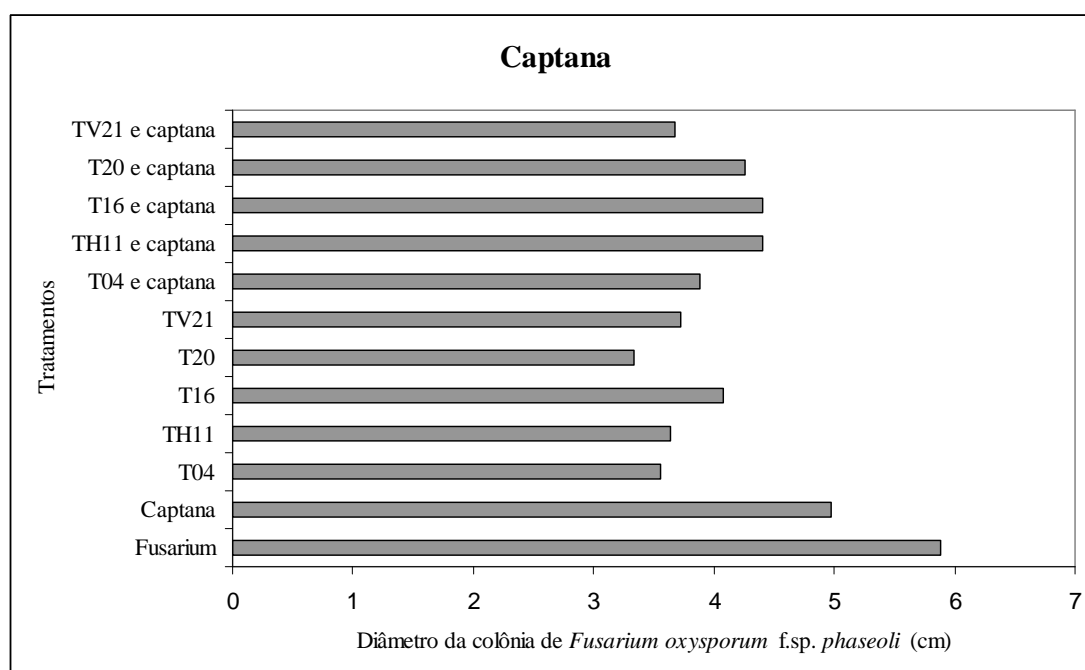


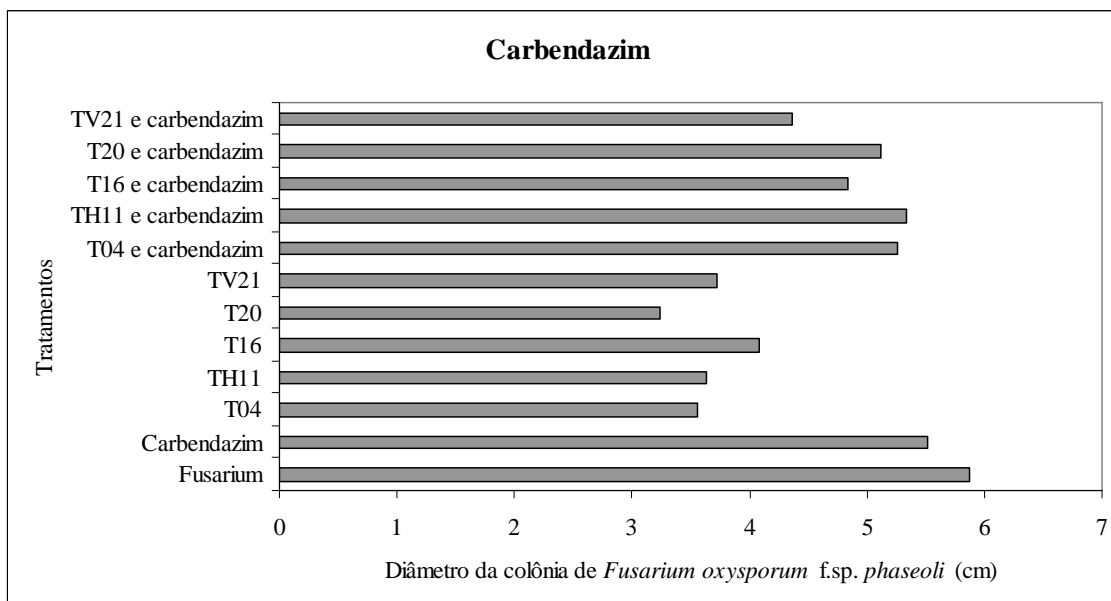
FIGURA 8. Diâmetro das colônias de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* submetido a diferentes tratamentos para avaliação da interferência do princípio ativo captana na produção de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009.

O princípio ativo carbendazim não interferiu significativamente no desenvolvimento do patógeno (Tabela 19.), entretanto, o princípio ativo interferiu na ação de *Trichoderma* spp., o que pode ser observado pelo menor efeito dos metabólitos voláteis produzidos pelos isolados de *Trichoderma* spp. combinados com o carbendazim. A inibição no crescimento vegetativo do patógeno foi semelhante ao mensurado em confronto apenas com carbendazim. Assim, não é seguro garantir se a inibição ocorre devido à ação do antagonista ou do fungicida.

Como o controle apresentou a maior média de crescimento vegetativo, é possível observar que todos os demais tratamentos apresentaram efeito na redução de crescimento vegetativo do patógeno (Tabela 19. e Figura 9.)

TABELA 19.	Contraste ortogonal das médias de crescimento vegetativo de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> submetido a diferentes tratamentos para avaliação da interferência do princípio ativo carbendazim na produção de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (2009).
------------	--

<i>Contraste</i>	<i>Valor F</i>	<i>P&gt;F</i>
<i>Fusarium</i> vs. demais tratamentos	49,99	< 0,0001
Carbendazim vs. tratamento combinado	4,83	0,0328
Carbendazim vs. <i>Trichoderma</i> spp.	78,31	< 0,0001
<i>Trichoderma</i> spp. vs. tratamento combinado	132,72	< 0,0001



<b>FIGURA 9.</b>	Diâmetro das colônias de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> submetido a diferentes tratamentos para avaliação da interferência do princípio ativo carbendazim na produção de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009.
------------------	--

Fluazinam foi o princípio ativo que em confronto com o patógeno mais inibiu seu crescimento (Tabela 20.). Quando foi avaliado o efeito do mesmo princípio ativo em combinação com os isolados de *Trichoderma* spp. na produção de metabólitos voláteis, foi possível observar que o crescimento do patógeno manteve-se reduzido, mostrando que fluazinam não tem efeito sobre a produção de metabólitos voláteis por *Trichoderma* spp. Quando comparada a medida do patógeno nos tratamentos apenas com *Trichoderma* spp. e no tratamento combinado é possível observar que esse último reduz ainda mais o crescimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (Tabela 20. e Figura 10.). Esse resultado indica que o fungicida presente no sistema pode estar liberando voláteis que atuam contra o patógeno, indicando a eficiência do consórcio *Trichoderma* spp. e fluazinam no controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, sem definir a efeito do princípio ativo no mecanismo de produção de metabólitos voláteis dos isolados de *Trichoderma* spp.

TABELA 20. Contraste ortogonal das médias de crescimento vegetativo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* submetido a diferentes tratamentos para avaliação da interferência do princípio ativo fluazinam na produção de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (2009).

<i>Contraste</i>	<i>Valor F</i>	<i>P&gt;F</i>
<i>Fusarium</i> vs. demais tratamentos	157,27	< 0,0001
Fluazinam vs. tratamento combinado	2,17	0,1470
Fluazinam vs. <i>Trichoderma</i> spp.	0,00	0,9513
<i>Trichoderma</i> spp. vs. tratamento combinado	5,99	0,0181

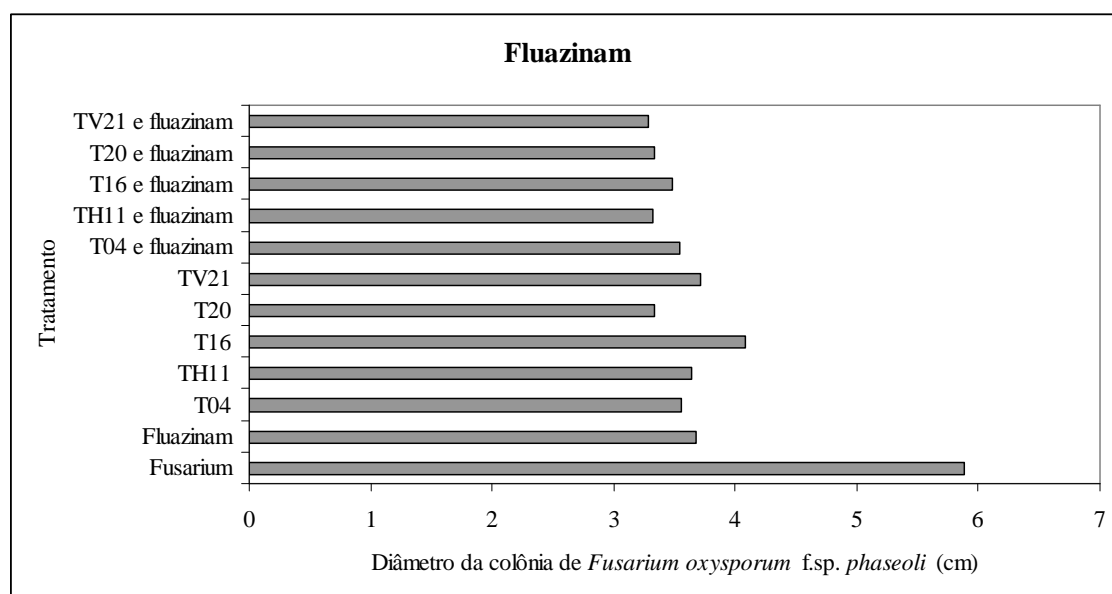


FIGURA 10. Diâmetro das colônias de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* submetido a diferentes tratamentos para avaliação da interferência do princípio ativo fluazinam na produção de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009.

O princípio ativo iprodiona não volatilizou a ponto de reduzir o crescimento vegetativo do patógeno (Tabela 21.). Em relação ao tratamento combinado, observou-se menor diâmetro nas colônias do patógeno em relação ao tratamento apenas com o princípio ativo. A maior redução ocorre no tratamento apenas com



*Trichoderma* spp., tanto quando comparado ao tratamento apenas com o princípio ativo como ao tratamento combinado (Tabela 21. e Figura 11.).

TABELA 21.	Contraste ortogonal das médias de crescimento vegetativo de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> submetido a diferentes tratamentos para avaliação da interferência do princípio ativo iprodiona na produção de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (2009).
------------	--

<i>Contraste</i>	<i>Valor F</i>	<i>P&gt;F</i>
<i>Fusarium</i> vs. demais tratamentos	43,51	< 0,0001
Iprodiona vs. tratamento combinado	24,36	< 0,0001
Iprodiona vs. <i>Trichoderma</i> spp.	96,77	< 0,0001
<i>Trichoderma</i> spp. vs. tratamento combinado	72,07	< 0,0001

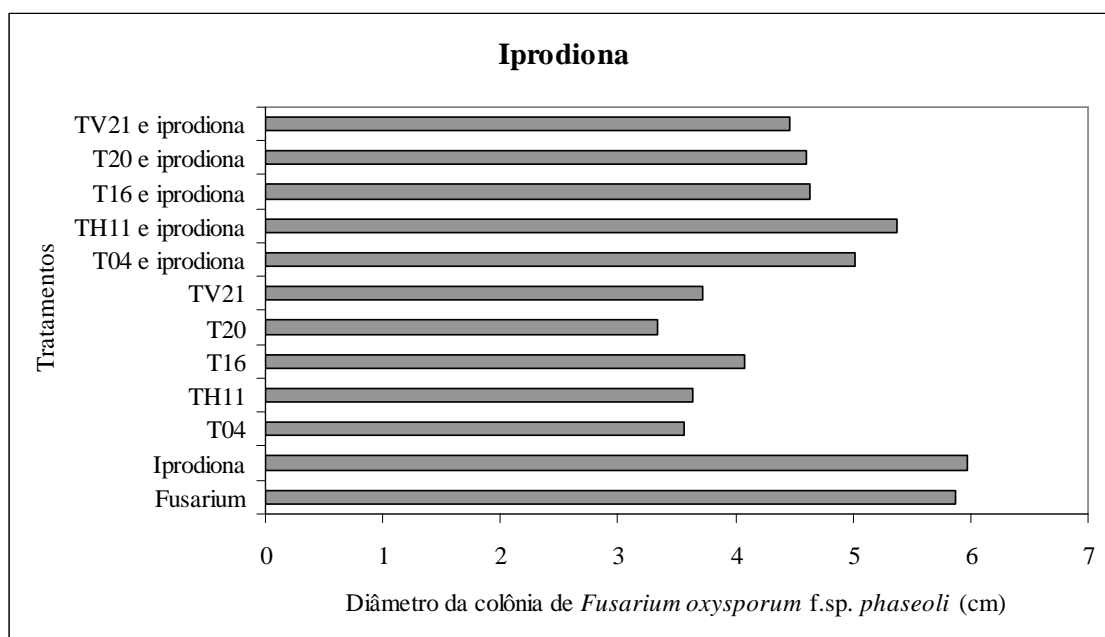
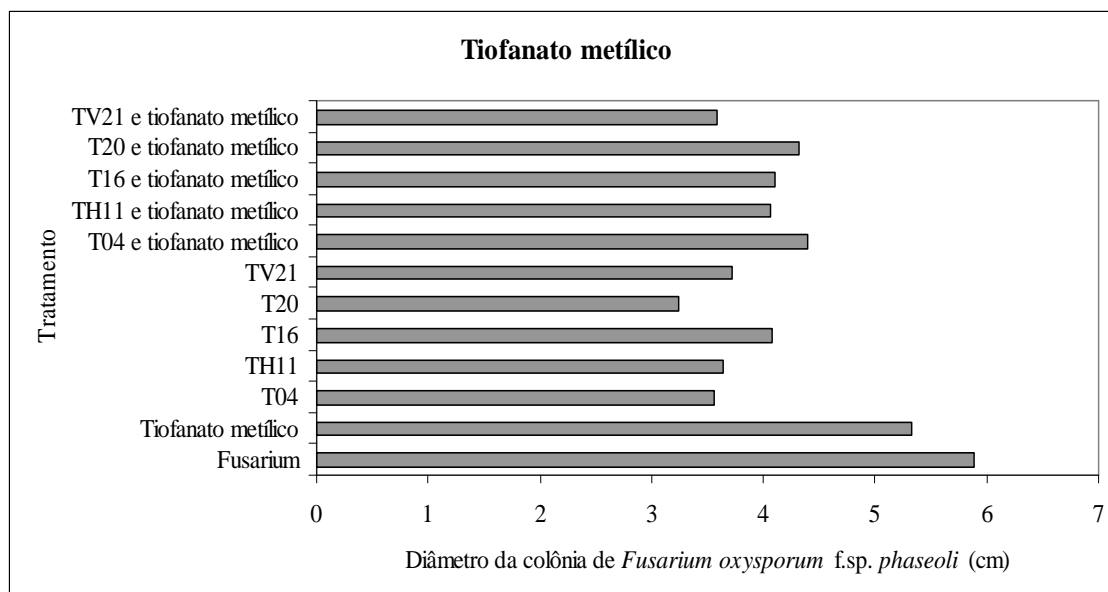


FIGURA 11.	Diâmetro das colônias de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> submetido a diferentes tratamentos para avaliação da interferência do princípio ativo iprodiona na produção de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009.
------------	--

Tiofanato metílico reduziu o crescimento vegetativo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (Tabela 22.). O tratamento combinado entre tiofanato metílico e os isolados de *Trichoderma* spp. mostrou-se mais eficiente na redução do crescimento vegetativo do patógeno em relação a presença apenas do princípio ativo, o que também ocorre quando considerado apenas o tratamento com os isolados. Se compararmos o tratamento combinado com o tratamento apenas com *Trichoderma* spp. é possível observar que a maior inibição do patógeno ocorre na ausência do princípio ativo, entretanto essa diferença é sutil (Tabela 22, Figura 12).

TABELA 22.	Contraste ortogonal das médias de crescimento vegetativo de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> submetido a diferentes tratamentos para avaliação da interferência do princípio ativo tiofanato metílico na produção de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp . Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (2009).
------------	--

<i>Contraste</i>	<i>Valor F</i>	<i>P&gt;F</i>
<i>Fusarium</i> vs. demais tratamentos	72,66	< 0,0001
Tiofanato metílico vs. tratamento combinado	28,25	< 0,0001
Tiofanato metílico vs. <i>Trichoderma</i> spp.	51,81	< 0,0001
<i>Trichoderma</i> spp. vs. tratamento combinado	10,63	0,0021



**FIGURA 12.** Diâmetro das colônias de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* submetido a diferentes tratamentos para avaliação da interferência do princípio ativo tiofanato metílico na produção de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2009.

#### 4.4.3 Produção de enzimas hidrolíticas

Todos os isolados de *Trichoderma* spp. produziram enzimas relacionadas ao micoparasitismo no controle biológico de fitopatógenos (Tabela 23.).

TABELA 23.	Atividade enzimática (U) de quitinases, glucanases e proteases nas culturas de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2010.
------------	---

Isolados	Atividade Enzimática (U)		
	Quitinase*	Glucanase*	Protease**
T04	868,6b	3407,2ns	0,66a
TH11	1152,6a	1312,3	0,46ab
T16	985,0ab	1326,4	0,24b
T20	996,6ab	1413,7	0,37ab
TV21	1047,9ab	1441,3	0,30ab

CV (quitinase)= 10,182; CV (glucanase)= 110,339; CV (protease)= 53,518  
 Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si e ns= não houve diferença entre os isolados pelo teste de Tukey 5%.

\* Uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde a liberação de 1µmol de glicose/mL/min

\*\* Uma unidade da atividade proteásica (U) foi definida como sendo a quantidade da enzima requerida para produzir uma absorvância de 1 unid/30 min, a 440 nm e a 25°C

Quando avaliada a produção de quitinase, o isolado TH11 apresentou maior produção da enzima do que os demais isolados, enquanto o isolado T04 apresentou a menor produção dessa enzima. Já para produção de glucanases foi semelhante para todos os isolados. O isolado T04 apresentou a maior produção de protease enquanto o isolado T16 apresentou a menor produção dessa enzima.

De Marco *et al.* (2003), avaliaram a produção de enzimas hidrolíticas por cepas de *Trichoderma*, com atividade antagonística contra *Crinipellis pernicioso*. A atividade enzimática de quitinase, N-acetilglicosaminidase, β-1,3-glucanase, celulase total endoglucanase, aril- β-glucosidase, β-glucosidase, protease e amilase aumentaram significativamente na presença dos respectivos substratos em meio de cultura sólido. Os melhores resultados foram encontrados pelos autores nos tempos de 72 e 120 horas de crescimento. Esse fato reforça que o tempo utilizado na

realização dos experimentos com os isolados T04, TH11, T16, T20 e TV21 pode ter garantido os valores da atividade enzimática detectados nesse experimento (120 horas).

Alguns fatores podem influenciar a produção dessas enzimas em microrganismos antagonistas. A composição do meio de cultura, o pH, a temperatura e agitação são alguns desses fatores (Fleuri & Sato, 2008). No experimento realizado com a suplementação do meio com os princípios ativos, não foi possível detectar a produção de enzimas. Como o método selecionado para a produção de quitinases e glucanases usa a mensuração da liberação de açúcares redutores a partir da hidrólise da quitina coloidal e da laminarina, respectivamente, a adição dos princípios ativos no meio de cultura pode ter inibido a produção das enzimas pelo isolado, ou mesmo, a presença de outros compostos químicos no meio pode ter provocado diferentes reações com o uso de ácido dinitrosalicílico (DNS). Não existem testes de interferência de princípios ativos na produção de enzimas hidrolíticas de *Trichoderma* spp. que pudessem confirmar a ineficiência do método ou que sugerissem outras metodologias para a detecção das enzimas.

#### **4.4.4 Competição por nutrientes**

Chin-a-Woeng *et al.* (2003) consideram que os microrganismos, para se multiplicarem, são altamente dependentes da disponibilidade de nutrientes prontamente utilizáveis e que a competição é muito grande em qualquer microbiota. Competir por nutrientes é uma das formas mais básicas e universais de antagonismo. Microrganismos que se multiplicam rapidamente e que são capazes de utilizar uma gama de nutrientes mais ampla têm mais chance de sobreviver e suplantar os competidores (Duffy *et al.*, 2003) e *Trichoderma* sp. apresenta essas características.

O ferro é um elemento importante e essencial na nutrição de plantas e microrganismos. Apesar de ser encontrado em abundância na natureza, parece não existir de forma prontamente disponível e assimilável para microrganismos (Romeiro, 2007). Microrganismos, notadamente fungos e bactérias, são capazes de contornar o problema da baixa disponibilidade de ferro pela produção de sideróforos. A produção de sideróforos já foi detectada em bactérias entéricas, bactérias patogênicas de humanos, animais, fungos, plantas, algas verdes e azuis, algas superiores, além de bactérias fixadoras de nitrogênio e leveduras (Benite *et al.*, 2002). Foi detectado também em fluídos biológicos (Shin *et al.*, 2001).

Alguns isolados de *Trichoderma* são eficientes produtores de sideróforos que capturam o ferro, não possibilitando o uso do nutriente por outros fungos (Chet & Inbar, 1994). Os isolados T04, TH11, T16, T20 e TV21 produziram sideróforos *in vitro*. A produção de sideróforos é indicada pela mudança colorimétrica que ocorre no meio contendo CAS (Figura 13.). Essa reação ocorreu também com o isolado T20, entretanto a coloração da amostra não correspondeu à coloração das demais, sendo cinza-azulado enquanto as demais são amarelo-avermelhado, indicando a possibilidade da produção de diferentes tipos de sideróforos pelos isolados de *Trichoderma* spp (Figura 13 Cb).

A maioria dos sideróforos pode ser classificada de acordo com a sua estrutura química em hidroxamatos ou fenóis-catecolatos. Outros grupos funcionais já foram descritos (Paz, 2005). Enquanto bactérias são capazes de produzir sideróforos de ambos os tipos, sideróforos do tipo hidroxamato são comumente sintetizados por fungos (Paz, 2005; Wilhite *et al.*, 2001). Entretanto, existem exceções, como os Zygomycetes que produzem a rizoferrina, um sideróforo tipo policarboxilato além de *Postia placenta*, *Gloephyllum trebeam* e *Candida albicans*, produtores de compostos

fenolatos (Paz, 2005). Não foram encontrados trabalhos apresentando a produção de outros tipos de sideróforos por *Trichoderma* sp.

Em relação ao experimento realizado em meio suplementado com o princípio ativo captana, não foi possível observar mudança na coloração da amostra em relação ao controle (Figura 13.). Esse fato indica que o fungicida, embora não seja considerado tóxico inibe a produção de sideróforos nos isolados de *Trichoderma* spp.

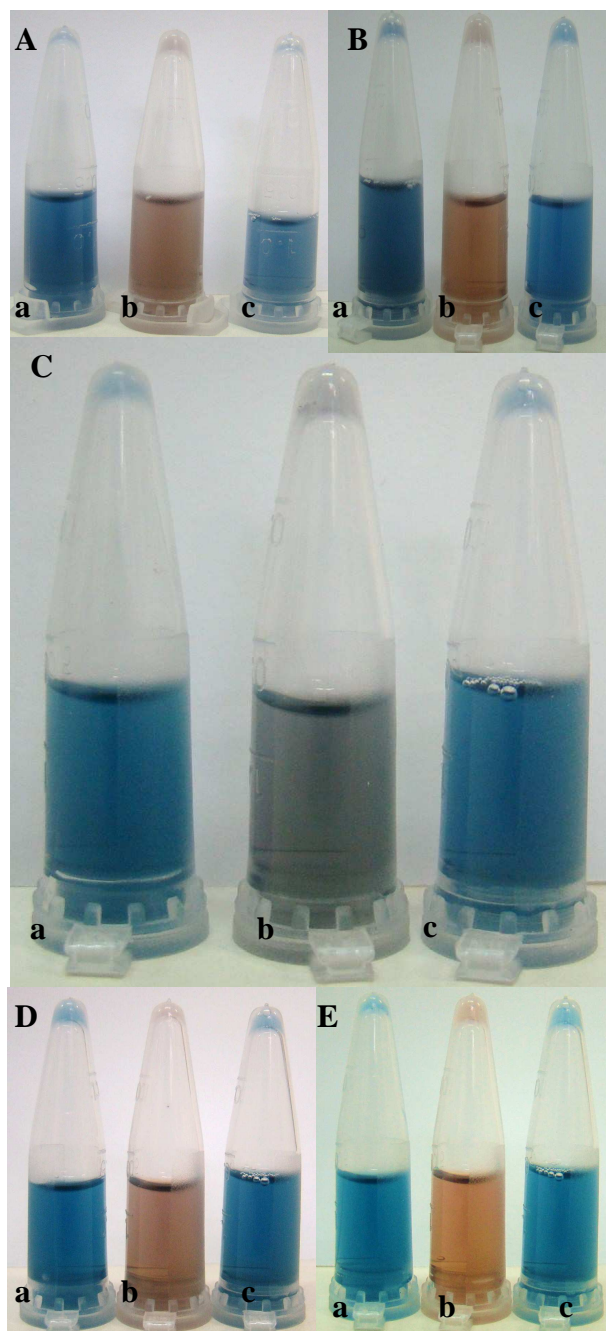


FIGURA 13. Detecção de sideróforos em filtrados de cultura dos isolados T04 (A), T16 (B), T20 (C), TH11 (D) e TV21 (E). a – meio contendo captana, b – isolado de *Trichoderma*, c – controle. A mudança na coloração do meio em relação ao controle indica a produção de sideróforos. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (UFRGS), 2010.

Os resultados indicam que os isolados testados são promissores para o controle biológico, atuam competindo por nutrientes e produzem sideróforos *in vitro*. Guimarães (2008) selecionou um isolado de *Trichoderma koningii*, produtor de



sideróforos, que apresentou bons resultados *in vitro* para o controle de *Guignardia citricarpa*.

A produção de sideróforos foi sensível à presença do princípio ativo captana, mostrando que esse princípio interfere nos mecanismos de produção de sideróforos de todos os isolados testados.

## 5 CONCLUSÕES

O estudo da compatibilidade entre os princípios ativos captana, carbendazim, fluazinam, iprodiona e tiofanato metílico com os isolados T04, TH11, T16, T20 e TV21 *in vitro* mostrou que os princípios ativos carbendazim, fluazinam e iprodiona foram muito tóxicos a todos os isolados, enquanto captana e tiofanato metílico mostraram-se compatíveis. Os isolados T04 e TV21 mostraram alguma sensibilidade na concentração 120 g/L de captana e TH11 na concentração 2800 g/kg de tiofanato metílico.

Os isolados de *Trichoderma* spp. testados mostraram efeito antagônico sobre *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. O patógeno foi completamente inibido pelos princípios ativos captana, carbendazim e fluazinam em todas as concentrações, enquanto iprodiona inibiu parcialmente o crescimento vegetativo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* e o mesmo efeito foi verificado nas concentrações acima da concentração recomendada para tiofanato metílico.

Apenas o princípio ativo iprodiona não interferiu na capacidade antagônica dos isolados testados.

A capacidade dos isolados de *Trichoderma* spp. produzirem metabólitos voláteis na presença de captana, carbendazim, fluazinam, não foi reduzida. Iprodiona reduziu a eficiência do controle através de metabólitos voláteis em conjunto com os isolados TH11, T16, T20 e TV21. O princípio ativo tiofanato

metílico reduziu a ação dos metabólitos voláteis de T04 e TV21. Fluazinam em conjunto com todos os isolados e tiofanato metílico em consórcio com TH11 apresentaram os melhores resultados para a inibição do crescimento do patógeno.

Todos os isolados produziram quitinases, glucanases, proteases e sideróforos.

Não foi possível realizar a detecção de quitinases, glucanases e proteases em meio suplementado com os fungicidas

O princípio ativo captana interfere na produção de sideróforos.

Dessa forma, é possível constatar que todos os isolados de *Trichoderma* spp. são afetados pelos princípios ativos testados o que compromete o seu potencial de biocontrole e recomendação de uso no campo, necessitando de mais estudos nesse sentido.

Sendo assim, até que se conheça a interferência dos princípios ativos testados sobre os isolados de *Trichoderma* spp. não se recomenda a utilização dos produtos comerciais à base de *Trichoderma* sp. em controle integrado com fungicidas que tenham esses princípios ativos.

## 6 PERSPECTIVAS

A aplicação concomitante de produtos químicos e produtos biológicos em campo pode ser determinante na eficiência do controle de doenças em plantas, já que a interferência dos princípios ativos nos isolados de antagonistas ou produtos comerciais não é conhecida. Há alguns anos vêm sendo desenvolvidas pesquisas que colaborem para o entendimento da forma de interação entre químicos e microrganismos, entretanto, a falta de padronização nos testes e a dificuldade de se aplicar o que ocorre no campo em um experimento *in vitro* não garante a confirmação dos resultados *in vitro* quando projetados ao campo.

Essa pesquisa possibilitou conhecer melhor a interferência de princípios ativos sobre isolados de *Trichoderma* spp. Os isolados T04, TH11, T16, T20 e TV21 mostraram-se promissores como antagonistas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*.

Entretanto, a ação de fungicidas sobre os mecanismos de ação desses isolados ainda não pode ser garantida, necessitando de novas pesquisas para confirmar a toxicidade dos princípios ativos captana, carbendazim, fluazinam, iprodiona e tiofanato metílico sobre *Trichoderma* spp. A falta de uma metodologia padronizada para os testes de toxicidade ainda dificultam a obtenção de um resultado conclusivo, principalmente para a detecção de enzimas hidrolíticas, utilizando reagentes específicos, que possibilitem reações enzimáticas mesmo em meios suplementados

com princípios ativos. Dessa forma, aumentam as possibilidades de repetir experimentos em diferentes condições e ambientes.

A sensibilidade de *Trichoderma* spp. também deve ser testada na presença de outros princípios ativos e a interferência desses em outros mecanismos de ação também podem ser estudados. Para se traçar um perfil dos isolados e espécies com maior compatibilidade com produtos químicos é importante que os isolados testados sejam identificados

Ainda, para complementar essa pesquisa, os isolados devem ser testados em casa de vegetação, na presença dos princípios ativos para que se observe o comportamento dos mesmos em condições adversas.

Depois de conhecidos os resultados *in vitro* e *in vivo*, poderá ser estabelecido um padrão para a aplicação de produtos biológicos em estratégias de manejo integrado.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 4.ed. Academic Press: San Diego, p. 635, 1997.

AGROFIT. Brasília. **Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários**. Contém informações institucionais, técnicas, notícias e publicações. Disponível em: [http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso :março de 2008

ALVES, S.B., MOINO Jr., A., ALMEIDA, J.E.M. **Produtos fitossanitários e entomopatógenos**. In: ALVES, S.B. (Ed.) Controle Microbiano de Insetos. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, p.217-267, 1998.

BACKER, K.F.; COOK, R.J. **Biological Control of Plant Pathogens**. 1974 In: COOK, R.J.; BACKER, K.F. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1983.

BARTINICKI-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. **Annual Review of Microbiology**, v.22, p.87-109, 1968.

BATISTA, D.C.; OLIVEIRA, S.M.A.; TAVARES, S.C.C.H.; LARANJEIRA, D.; NEVES, R.A.F.; SILVA, R.L.X. Efeitos de fungicidas inibindo o crescimento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae* e interferência com *Trichoderma* spp. **Summa Phytopathologica**, Recife, v.28, n.4, p.305-309, 2002.

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.

BENITE, A.M.C.; MACHADO, S.P.; MACHADO, B.C. Sideróforos: "uma resposta dos microrganismos". **Química Nova**, v.25, p. 1155-1164, 2002.

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

BENCHIMOL, R.L.; CHU, R.L.; MUTO, E.L.; DIAS-FILHO, R.Y.; BERNARDINO, M. Controle de fusariose em plantas de pimenta-do-reino com bactérias endofíticas: sobrevivência e respostas morfofisiológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35. n.7, 2000.

BENHAMOU, N.; CHET, I. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultrastructure and gold citochemistry of the mycoparasitic process. **Phytopathology**, v.83, n.10, p.1062-1071, 1993.

BENHAMOU, N.; CHET, I. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. **Phytopathology**, v.86, p.405-416, 1996.

BENHAMOU, N.; CHET, I. Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.2095-2099, 1997.

BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças do filoplano**. In: BETTIOL, W. (Ed.) Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, p. 33-52. 1991.

BLAKEMAN, J P. **Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control**. In: BIOLOGICAL control of the phylloplane. Annual Phytopathology Society, p. 6-30, 1985.

BOLLAG, J.M.; LIU, S.Y. Biological transformation processes of pesticides. In: CHENG, H.H. (Ed.). **Pesticides in the soil environment: processes, impacts and modeling**. Madison: Soil Science Society of American, 1990.

CAMPBELL, R. **Biological control of microbial plant pathogens**. C.U.P., 1989, 218p.

CHET, I.; INBAR, J. Biological control of fungal pathogens. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v 48, p.37 - 43, 1994.

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

CHIN-A-WOENG, T.F.C.; BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, B.J.J. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. **New Phytologist**, v.157, n.3, p.503-523, 2003.

CONWAY, K. E. Integration of Biological and Chemical Controls for *Rhizoctonia* Aerial Blight and Root Rot of Rosemary. **Plant Disease**, v.81, n.7, p. 795-798, 1997.

COUTINHO, W.M.; ARAÚJO, E.; MAGALHÃES, F.H.L. Efeitos de extratos de plantas anardiáceas e dos fungicidas químicos benomil e captan sobre a micoflora e qualidade fisiológica de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 23, n.3, p.560-568, 1999.

DHINGRA, O. D.; MUCHOVEJ, J. J.; CRUZ FILHO, J. J. **Tratamento de Sementes (Controle de Patógeno)**. Viçosa: Imprensa Universitária, 120 p., 1980.

DICK, C. M.; HUTCHINSON, S. A. Biological activity of volatile fungal metabolites. **Nature**, v. 211, n.51, p. 868, 1966.

DE MARCO, J.L.; VALADARES-INGLIS, M.C.; FÉLIX, R.C. Production of hydrolitic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom of cocoa. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.33-38, 2003.

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

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. 2- Production of volatile metabolites. **Transactions of the British Mycological Society**, v.57, pt.1, p.41-48, 1971. b

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

DUFFY, B.; SCHOUTEN, A.; RAAIJMAKERS, J.M. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. **Annual Review Phytopathology**, v.41, p.501-538, 2003.

ECHANDI, E. Amarillamento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) provocado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. **Turribalda**, v.17, n.4, p.409-410, 1967.

EISENDLE, M.; OBEREGGER, H.; BUTTINGER, R.; ILLMER, P.; HAAS, H. Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the Pac mediated ambient pH regulatory system in *Aspergillus nidulans*. **Eukarotic Cell**, v.3, p. 561-563, 2004.

EL-KATATNY, M.H; GUDEL, J.M.; ROBRA, K-H.; ENAGHY, M.A.; GUBITZ, G.M. Characterization of a chitinase and an ando-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifae T24 involved in control of phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. **Applied Microbiology and Biotecnology**, v.56, n.1-2, p.137-143, 2001.

ETHUR, L. Z.; CEMBRANEL, C. Z.; SILVA, A. C. F. Seleção de *Trichoderma* spp. visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 885-887, 2001.

F.A.O. **Report of the first session of the FAO**. Panel of experts on integrated pest control, 1968 In: ZAMBOLIM, L.; JUNQUEIRA, N. T. V. Manejo integrado de doenças da mangueira. Disponível em: [http://www.nutricaoeplantas.agr.br/site/ensino/pos/Palestras\\_William/Livromanga\\_pdf/12\\_\\_manejointegradodedoencaomangueira.pdf](http://www.nutricaoeplantas.agr.br/site/ensino/pos/Palestras_William/Livromanga_pdf/12__manejointegradodedoencaomangueira.pdf). Acesso em: dezembro, 2009.

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



FLEURI, L.F.; SATO, H.H. Estudo da influência de diferentes parâmetros na produção de enzimas líticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.2, p.299-310, 2008.

FUJIMURA, M.; OEDA, K.; INOUE, H.; KATO, T. Mechanism of action of N-phenyl-carbamates in benzimidazole-resistant *Neurospora* strains. In: GREEN, M.B. *et al.*, (Eds.). *Managing resistance to agrochemicals*. Washington: ACS, 1990.

GARCIA-JÚNIOR, D.; VECHIATO, M.H.; MENTEN, J.O.M. Efeito de fungicidas no controle de *Fusarium graminearum*, germinação, emergência e altura de plântulas em sementes de trigo. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.3, p.280-283, 2008.

GAVA, C.A.T.; PEREIRA, J. C.; FERNANDES, M.C.; NEVES, M.C.P. Seleção de isolados de estreptomicetos para controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37 n.10, 2002.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 78p., 2002.

GUIMARÃES, A. M. **Bioprospecção de Microrganismos Epifíticos de Tangerinas cv. Montenegrina para o Manejo da Mancha Preta dos Citros Causada por Guignardia citricarpa Kiely**. Mestrado em Fitotecnia (Dissertação). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 103 p., 2008.

HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol-changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v.84, n.4, p. 377-393, 2000.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews**, v.2, p. 3-56, 2004.

HATVANI, L.; MANCZINGER, L.; KREDICS, L.; SZEKERES, A.; ZSUZSANNA, A.; VÁGVÖLGYI, C. Production of *Trichoderma* strains with pesticide-polyresistance by mutagenesis and protoplast fusion. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 89, p. 387-393, 2006.

HENIS, Y.; CHET, I. **Microbiological control of plant pathogens**. *Advances in Applied Microbiology*, Madison, v. 19, p. 85-111, 1975.

HETONG, Y.; RYDER, M.; WENHUA, T. Toxicity of fungicides and selective medium development for isolation and enumeration of *Trichoderma* spp. in agricultural soils. **International Subcommittee on Trichoderma and Hypocrea Taxonomy**, 2008. Disponível em: [http://www.isth.info/methods/method.php?method\\_id=8](http://www.isth.info/methods/method.php?method_id=8). Acesso em junho de 2009.

HEWITT, H.G. *Fungicides in crop protection*. Wallingford: CAB International, 1998. 221p.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant disease: the history and evaluation of current concepts. **Plant Disease**, v.87, n.1, p.4-10, 2003.

HOWELL, C. R. Effect of Seed Quality and Combination Fungicide-*Trichoderma* spp. Seed Treatments on Pre- and Postemergence Damping-off in Cotton. **Phytopathology**, v.97, n.1, p. 66-71, 2007.

INFANTE, D.; MARTÍNEZ, B.; GONZÁLEZ, N.; REYES, Y. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. **Protección Vegetal**, v.24, n.1, p.14-21, 2009.

KENDALL, S.J., HOLLOMON, D.W. Fungicide resistance. In: HUTSON D.H., MIYAMOTO, J. (Eds.). **Fungicidal Activity**. New York. John Wiley & Sons, 1998.

KIMATI, H. **Doenças do feijoeiro** (*Phaseolus vulgaris* L.). In: GALLI, F. (Coord). Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos. 3.ed. São Paulo: Ceres, v.1, p.761-785, 1995.

KIMURA, M.K.; SOUZA, P.E.; CASTRO, H.A. Sensibilidade *in vitro* de *Botrytis cinerea* a fungicidas. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.5, p.1150-1160, 2001.

KOMYOJI, T.; SUGIMOTO, K.; MITANI, S.; MATSUO, N.; SUZUKI, K. Biological properties of a new fungicide, Fluazinam. **Pesticide Science**, v.20, p.129-135, 1995.

LARANJEIRA, D.; OLIVEIRA, S.M.A.; MENEZES, M.; NEVES, R. Efeito de diferentes substratos na esporulação de espécies de *Trichoderma*. **Summa Phytopathologica**, v.22, p.178-181, 1996.

LINTHORST, H.J.M.; MELCHERS, L.S.; MAYER, A.; VAN ROEKEL, J.S.C.; CORNELISSEN, B.J.C.; BOL, J.F. Analysis of gene families encoding acidic and basic *b*-1,3 glucanases of tobacco. **Proceeding of National Academy of Science of USA**, v.87, p.8756-8760, 1990.

LOBO-JÚNIOR, M.; ABREU, M.S. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.2, p.521-526, 2000.

LOUREIRO, E.S.; MOINO-JR., A.; ARNOSTI, A., SOUZA, G.C. Efeito de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemo sobre fungos entomopatogênicos. **Neotropical Entomology**, v.31, n.2, p.263-269, 2002.

LUCON, C. M. M.; KOIKE, C. M.; ISHIKAWA, A. I.; PATRÍCIO, F. R. A.; HARAKAVA, R. Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.3, p. 225-232, 2009.

LUZ, W. C. Avaliação dos Tratamentos Biológico e Químico na Redução de Patógenos em Sementes de Trigo. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.1, p. 93-95, 2003.

MALATHI, P.; VISWANATHAN, R.; PADNAMABAN, P.; MOHANRAJ, D.; RAMESH-SUNDER, A. Compatibility of biocontrol agents with fungicides against red rot disease of sugarcane. **Sugar Tech**, v.4, n.3 e 4, p. 131-136, 2002.

MANDEL, M.; REESE, E. T. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. **Journal of Bacteriological**, v.79, p. 816, 1960.

MARCELLO, C. M. **Avaliação da expressão e caracterização de uma exo- $\beta$ -1,3-glucanase envolvida no mecanismo de micoparasitismo de *Trichoderma asperellum***. Doutorado em Biologia Molecular (Tese). Universidade de Brasília, 89 p., 2008.

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

MARTINS-CORDER, M. P.; MELO, I. S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* KLEB. **Science agriculture**, v. 55, n. 1, 1998.

MAY, L.L.; KIMATI, H. Controle de *Phytophthora parasitica* com fungicidas e efeito desses produtos no crescimento micelial de *Trichoderma*. **Summa Phytopathologica**, v.26, n.1, p. 52-57, 2000.

MELO, I.S. **Potencialidade da utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas**. In: BETTIOL, W. (Org.) Controle Biológico de Doenças de Plantas. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, p. 7-23, 1991.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. Como isolar microrganismos degradadores de moléculas xenobióticas. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Microbiologia Ambiental**. EMBRAPA-CNPMA, 1997, 440p.

MELO, I.S. **Agentes Microbianos de controle de fungos fitopatogênicos**. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). Controle Biológico, Jaguariúna: EMBRAPA, v.1, 1998.

MELO, S.C.M., ÁVILA, Z.R.; OLIVEIRA, C.; HATANO, L.T. **Avaliação do efeito de pesticidas no crescimento de *Cercospora caricis***. Comunicado Técnico: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnológicos, 2003.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n. 3, p. 426 - 429, 1959.

MIZUBUTI, E. S. G.; MAFFIA, L. A. **Introdução à Fitopatologia**. Viçosa: Ed. UFV, 190 p., 2006.

MOINO-JR., A.; ALVES, S. B. Efeito de *Trichoderma* sp. no desenvolvimento de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsh.) Sorok. **Scientia Agrícola**, v.56, n.1, p. 217-224, 1999.

MUIÑO, B. L.; SÁENZ, M.; STEFANOVA, M.; PORRAS, A.; DIAZ, I. Compatibilidad de *Trichoderma* spp. con Plaguicidas y Fertilizantes en el Cltivo del Tabaco. **Fitossanidad**, v.5, n.2, p. 3-9, 2001.

NALLATHAMBI, P.; UMAMAHESWARI, U.; THAKORE, B. B. L.; MORE, T.A. Post-harvest management of ber (*Ziziphus mauritiana* Lamk) fruit rot (*Alternaria alternata* Fr. Keissler) using *Trichoderma* species, fungicides and their combinations. **Crop Protection**, v. 28, p. 525-532, 2009.

NATIONAL Research Council (Agricultural Board – Commitee on Plant and Animal Pests). **Plant Disease Development and Control**, 1968 In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. Manual de Fitopatologia, São Paulo: Agronômica Ceres, 919 p., 1995.

OLIVEIRA-SILVA, J. J.; ALVES, S. R.; DELLA ROSA, H. V. **Avaliação da exposição humana a agrotóxicos**. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. (Org.) É veneno ou é Remédio? agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 384 p., 2003.

PANDOLFO, J. D. **Associação de *Trichoderma* sp. e Fungicidas no Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli***. Mestrado em Fitotecnia (Dissertação). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 78 p., 2007.

PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potencial for biocontrol. **Annual Review Phytopathology**, v. 23, p. 23-54, 1985.

PAZ, I.C.P. **Atividade biológica de metabólitos produzidos por microrganismos endofíticos de cacauero (*Thebroma cacao* L.) e o controle biológico de *Crinipellis pernicioso***. Mestrado em Biotecnologia (Dissertação). Universidade de Caxias do Sul, 98p., 2005.

PEREIRA, J. C. R.; CHAVES, G. M.; ZAMBOLIM, L.; MATSUOKA, K.; SILVA-ACUÑA, R., DO VALE, F. X. R. Controle Integrado de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, n.2, p. 254-259, 1996.

PEREIRA, L.A.A.; COUTINHO, W.M.; MACHADO, J.C.; MAGALHÃES, F.H.L.; PENA, R.C.M. Fungitoxicidade *in vitro* de iprodione sobre o crescimento micelial de fungos que se associam a sementes de arroz. **Revista Brasileira de Sementes**, v.24, n.1, p.67-70, 2002.

PICININI, E. C. Fungicidas benzimidazoles. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 2, p. 357-409, 1994.

PINKOLSKI, P.I.; ROSSONI, E.M.M.; ROSITO, S.M. Estudo da influência de agrotóxicos sobre o desenvolvimento do *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Pesticidas**, v.3, n.3, p. 21-34, 1993.

PRAÇA, L.B. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepdoptera, Coleoptera, Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39. n.1, 2004.

RAO, P.S.C.; BELLIN, C.A.; BRUSSEAU, M.L. Coupling biodegradation of organic chemicals to sorption and transport in soil and aquifers: paradigms and paradoxes. In: LINN, D.M.; CARSKI, T.H.; BRUSSEAU, M.L. (Ed.). **Sorption and degradation of pesticides and organic chemicals in soil**. Madison, 1993.

REINO, J. L.; GUERRERO, R. F.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R.; COLLADO, I. G. Secondary metabolites from species of biocontrol agent *Trichoderma*. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 89-123, 2008.

REIS, A.; OLIVEIRA, S.M.A.; MENEZES, M.; MARIANO, R.L. Potencial de isolados de *Trichoderma* para biocontrole da murcha de fusarium do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v.21, n.1, p.16-20, 1995.

RESENDE, M.L., OLIVEIRA, J.A.; GUIMARÃES, R.M., VON PINHO, R.G., VIEIRA, A.R. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.4, p.793-798, 2004.

RESENDE, M. L.; PEREIRA, C. E.; OLIVEIRA, J. A.; GUIMARÃES, R. M. Qualidade de sementes de milho (*Zea mays*) tratadas com fungicidas e inoculadas com *Trichoderma harzianum*. **Ciência Agrônômica**, v. 36, n.1, p. 60-66, 2005.

RIBEIRO, V. V. **Efeitos de Fungicida e Produtos Naturais sobre o Desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* em Sementes de Caupi**. Doutorado em Agronomia (Tese). Universidade Federal da Paraíba, 90 p., 2008.

RODRIGUES, G. S. **Agrotóxicos e contaminação ambiental no Brasil**. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 279 p., 2003.

RODRIGUES, M. B. C. **Controle de *Guignardia citricarpa*, agente causal da Mancha Preta dos Citros**. Mestrado em Agronomia (Dissertação). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 68p., 2006

ROIGER, T.C.; JEFFERS, S.N.; CALDWELL, R.W. Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.43, n.4, p.353-359, 1991.

ROMEIRO, R.S. **Controle Biológico de Enfermidades de Plantas: fundamentos**. Viçosa: UFV, 2007, 269p.

SANTOS, G. R., et al. Resistência de *Didymella bryoniae* a fungicidas no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 476-482, 2006.

SANTOS, J.S. **Remediação de solos contaminados com agrotóxicos pelo tratamento com radiação gama**. Mestrado em ciências (Dissertação). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, 63p., 2009.

SARATH, G.; DE LA MOTTE, R.; WAGNER, F. W. **Protease assay methods**. In: BEYNON, R. J.; Bond, I. S. *Proteolytic assay: a practical approach*, Oxford: IRC Press, 1989.

SARTORATO, A. Sensibilidade “in vitro” de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* a fungicidas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 36, n. 3, p. 211-213, 2006.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47-56, 1987.

SEGARRA, G.; CASANOVA, E.; AVILÉS, M.; TRILLAS, I. *Trichoderma asperellum* Strain T34 Controls Fusarium Wilt Disease in Tomato Plants in Soilless Culture Through Competition for Iron. **Microbial Ecology**, 2009.

SELITRENNIKOFF, C.P. Antifungal proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.7, p.2883, 2001.

SHIN, S.H.; LIM, Y.; LEE, S.E.; YANG, N.W., RHEE, J.H. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. **Journal of Microbiology Methods**, v.44, p.89-95, 2001.

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

SILVA, A. C. F.; ROSA, C. R. E.; MELO, I. S. Sensibilidade de isolados de *Trichoderma* spp. a benomil e iprodione. **Ciência Rural**, v. 29, n. 3, p. 395-399, 1999.

SOUZA, P.E.; DUTRA, M.R. **Fungicidas no Controle e Manejo de Doenças de Plantas**. Lavras: UFLA, 2003.

STERN, V. M.; SMITH, R. F.; VAN DER BOSH, R.; HAGEN, K. S. The integrated control concept. **Hilgardia**, v. 28, p. 81-101, 1959.

STINTZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; KAUFFMANN, S.; GOEFFROY, P. Plant ‘pathogenesis related’ proteins and their role in defense against pathogens. **Biochemie**, v.75, n.8, p.687-706, 1993.

TAMIMI, K.M.; HUTCHINSON, S.A. Differences between the biological effects of culture gases from several species of *Trichoderma*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.64, pt.3, p.455-463, 1975.

THEIS, T.; STAHL, U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. **Cell Molecular Life Science**, v.61, n.4, p.437-455, 2004.

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

ZAMBOLIM, L.; VENÂNCIO, W. S.; OLIVEIRA, S. H. F. **Manejo da Resistência de Fungos a Fungicidas**. Viçosa: Ed. UFV, 168 p., 2007.

WANG, H.; CHANG, K.F.; HWANG, S.F.; TURNBULL, G.D.; HOWARD, R.J.; BLADE, S.F.; CALLAN, N.W. Fusarium root rot of coneflower seedlings and integrated control using *Trichoderma* and fungicides. **BioControl**, v.50, p.317-329, 2005.

WANG, S.L.; SHIH, I.L.; LIANG, T.W.; WANG, C.H. Purification and characterization of two antifungal chitinases produced by the *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a shrimp and crab shell powder medium. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.50, n.8, p.2241-2248, 2002.

WEIDLING, 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.

WIEST, A.; GRZEGORSKI, D. XU. B.; GOULARD, C.; REBUFFAT, S. EBBOLE, D.J.; BODO, B.; KENERLEY, C. Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 23, p. 20862-20868, 2002.

WILHITE, S.E.; LUMDSTEN, R.D.; STRANEY, D.C. Peptide synthetase gene in *Trichoderma virens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.5055-5062, 2001.

ANEXO I

TABELA 1.	Resultados do efeito dos princípios ativos captana, carbendazim, fluazinam, iprodiona e tiofanato metílico sobre os mecanismos de ação de <i>Trichoderma</i> spp. Laboratório de Microbiologia Fitopatológica (2009/2010).
-----------	--

	<i>Crescimento vegetativo</i>	<i>Esporulação</i>	<i>Confronto Direto</i>	<i>Produção de metabólitos voláteis</i>	<i>Produção de enzimas hidrolíticas</i>	<i>Produção de sideróforos</i>
Captana	Reduz	Aumenta	IND*	Reduz	NO**	Reduz
Carbendazim	Reduz	Reduz	IND	Reduz	NO	NO
Fluazinam	Reduz	Reduz	IND	IND	NO	NO
Iprodiona	Reduz	Reduz	IND	Reduz	NO	NO
Tiofanato metílico	Neutro	Aumenta/ Neutro	Neutro	Reduz	NO	NO

\*IND= indefinido; \*\*NO= não observado