

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM AGROECOLOGIA

ODENILSON DE DEUS RIBEIRO LIMA

EFEITO DE ISOLADOS DE *Bacillus* spp. E *Trichoderma* spp. NO CRESCIMENTO DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* AGENTE CAUSAL DA FUSARIOSE DO TOMATEIRO.

São Luis – MA
2012

ODENILSON DE DEUS RIBEIRO LIMA

Engenheiro Agrônomo

EFEITO DE ISOLADOS DE *Bacillus* spp. E *Trichoderma* spp. NO CRESCIMENTO DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* AGENTE CAUSAL DA FUSARIOSE DO TOMATEIRO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agroecologia.

Orientador (a): Prof^ª. Dra. Antonia Alice Costa Rodrigues.

São Luis – MA

2012

ODENILSON DE DEUS RIBEIRO LIMA

EFEITO DE ISOLADOS DE *Bacillus* spp. E *Trichoderma* spp. NO CRESCIMENTO DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* AGENTE CAUSAL DA FUSARIOSE DO TOMATEIRO.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Antonia Alice Costa Rodrigues (Orientadora)

Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

Prof. Dr. Flávio Henrique Reis Moraes (1^º examinador)

Centro Universitário do Maranhão (UNICEUMA)

Prof^ª. Dra. Maria Rosangela Malheiros Siva (2^º examinador)

Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

Dedico

A minha mãe, Osita Maria (*in memoriam*), por uma vida
inteira dedicada aos estudos e ao bem-estar dos filhos!

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por mais uma etapa concluída e pela força para perseverar em um momento de tanta dor.

À Universidade Estadual do Maranhão, por meio da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, pelas oportunidades, experiências e apoio.

À FAPEMA e a toda sua equipe de funcionários, sempre muito atenciosos e prestativos.

À minha mãe, **Osita Maria**, por todo o incentivo na minha formação ética e profissional, pela criação amorosa, pelos ensinamentos de fé, por ter me ouvido em momentos em que eu só precisava conversar.

À minha orientadora, Professora **Antonia Alice**, pela generosidade, ensinamentos, compreensão, por ter acreditado em mim.

Aos meus colegas do Laboratório de Fitopatologia da UEMA, pela ajuda, companheirismo e pelos momentos de alegria juntos.

Ao meu colega de laboratório, **Leonardo Goes**, pelo seu apoio imprescindível e pela troca de conhecimentos.

Ao professor **Flávio Henrique** do UNICEUMA, pela ajuda, ensinamentos e pela disponibilidade sempre que solicitado.

Aos alunos do UNICEUMA, **Ronny** e **Márcio**, pela troca de ensinamentos e disponibilidade.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Agroecologia da UEMA.

Ao Professor **Cláudio Belmino** pela simpatia e profissionalismo.

À Professora **Rosangela Malheiros**, pela atenção, disponibilidade e contribuições neste trabalho.

A todos os funcionários da UEMA, pela simpatia e por um dia-a-dia tão descontraído.

Aos amigos **Marcelo, Robson, João Ramon, Roberto, André, Laudicéia** e **Willame**, pelo carinho, atenção, pela ajuda profissional, por momentos tão divertidos, e por estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis.

Ao meu primo **Leonardo Aguiar**, por ser sempre tão atencioso e carinhoso comigo.

Aos meus familiares pelo incentivo e carinho.

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	11
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL	13
1. O Hospedeiro: <i>Solanum lycopersicon</i> L.	14
2. O Patógeno: <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> Snyder & Hansen.....	15
3. A doença: Fusariose.....	17
4. Biocontrole com utilização de <i>Bacillus</i> sp.....	19
5. Biocontrole com utilização de <i>Trichoderma</i> spp.....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
CAPÍTULO 2- AÇÃO ANTIFÚNGICA <i>in vitro</i> DE ISOLADOS DE	
<i>Bacillus</i> spp. SOBRE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	31
Resumo	32
Abstract	33
Introdução	34
Material e Métodos	35
Resultado e Discussão.....	37
Conclusão.....	43
Referências Bibliográficas	43
CAPÍTULO 3- AVALIAÇÃO <i>in vitro</i> DE ISOLADOS DE	
<i>Trichoderma</i> spp. SOBRE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	47

Resumo.....	48
Abstract.....	49
Introdução.....	50
Material e Métodos.....	51
Resultados e Discussão.....	54
Conclusão.....	59
Referências Bibliográficas.....	59
ANEXOS.....	63
NORMAS- CAPÍTULO 1- REVISTA CAATINGA	
NORMAS- CAPÍTULO 2- REVISTA CAATINGA	

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Avaliação da inibição do crescimento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> pelo método do círculo por isolados de <i>Bacillus</i> spp. São Luis, 2012.....	38
TABELA 2 - Médias de inibição do crescimento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> submetidos a produtos metabólitos de diferentes isolados de <i>Bacillus</i> spp. São Luis, 2012.....	41
TABELA 1 - Crescimento micelial e percentual de ocupação em placa de isolados de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> pareados com <i>Trichoderma</i> spp.....	54
TABELA 2 - Crescimento Micelial e Percentual de Ocupação em Placa de isolados de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> submetidos aos metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp.....	56
TABELA 3 - Crescimento Micelial e Percentual de Inibição de isolados de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> submetidos aos metabólitos não voláteis de <i>Trichoderma</i> spp.....	58

RESUMO

EFEITO DE ISOLADOS DE *Bacillus* spp. E *Trichoderma* spp. NO CRESCIMENTO DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* AGENTE CAUSAL DA FUSARIOSE DO TOMATEIRO.

Autor: Odenilson de Deus Ribeiro Lima

Orientador: Prof^a. Dra. Antonia Alice Costa Rodrigues

RESUMO – Entre as doenças de maior importância econômica que afetam o tomateiro, destaca-se a Fusariose, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. A deficiência no controle desta doença, associada às condições ambientais favoráveis ao fungo, inviabilizam o cultivo econômico do tomate no Estado do Maranhão. Neste contexto, sistemas de produção alternativos podem ser importantes em reduzir os impactos ambientais e sociais. Objetivou-se neste trabalho avaliar o antagonismo e os metabólitos produzidos por *Bacillus* no controle micelial *in vitro* e o efeito biocontrolador de *Trichoderma* spp. contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Para a avaliação do antagonismo de *Bacillus* a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, foi realizado o pareamento de fungo e bactéria *in vitro* pelo Método do Círculo. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com 11 tratamentos e cinco repetições. No método para detecção dos metabólitos secretados pelos isolados de *Bacillus*, foi realizado o cultivo em meio líquido (BD), durante 15 dias. Após esse período, adicionou-se Ágar, que após autoclavagem, foi vertido em placas de Petri, o patógeno foi cultivado e avaliado ao décimo dia. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com 11 tratamentos e seis repetições. Para avaliação do antagonismo de *Trichoderma* spp. a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, foi realizado o pareamento de culturas. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 11 tratamentos e cinco repetições. Na produção de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp., foi utilizada a técnica das placas sobrepostas. Foram utilizados dez isolados de *Trichoderma* spp., e cada tratamento constou de um isolado mais testemunha, com cinco repetições. Na produção de metabólitos não voláteis, foi utilizada a técnica da membrana filtrante. No delineamento experimental, os tratamentos foram dispostos num desenho inteiramente casualizado compreendendo cinco repetições. As diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste de Tuckey a 5 %. No experimento avaliando o antagonismo a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* com a utilização de *Bacillus*, todos os isolados diferiram estatisticamente da testemunha, com destaque aos isolados B12 (*Bacillus* sp.), B41 (*Bacillus cereus*), B22' (*Bacillus pentothenicus*), B45 (*Bacillus cereus*), B47 (*Bacillus cereus*) e B25 (*Bacillus pumilus*) que induziram as menores médias de diâmetro da colônia do patógeno. Para o estudo da inibição do crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* pelo caldo agarizado autoclavado com dez isolados de *Bacillus* spp., cinco isolados diferiram estatisticamente da testemunha são eles: B35 (*B. pumilus*), B47 (*Bacillus cereus*), B22' (*B. pentothenicus*), B12 (*Bacillus* sp.) e B41 (*B. cereus*) sendo os dois últimos tratamentos que apresentaram os menores diâmetros de colônia do fitopatógeno com 2,89 e 3,81 cm, respectivamente. Todos os isolados se diferenciaram da testemunha quanto à ação antagônica de *Trichoderma*, mostrando eficiência na inibição do crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, porém não houve diferença significativa entre os isolados. Através da técnica das placas sobrepostas, os isolados que apresentaram o melhor resultado foram T7 e T8, os quais inibiram 24,5 % do crescimento micelial do patógeno, destacando-se dos demais, mesmo assim essa inibição não foi inferior a

50 %, sendo então, os isolados classificados como ineficientes. Com relação à avaliação do efeito de metabólitos não voláteis, os isolados que apresentaram os melhores resultados foram T3, T10, T11, T12, T13, e T14, diferenciando-se dos demais, destacam-se os isolados T12 e T14 por apresentarem percentual de inibição superior a 50 %, sendo estes isolados também classificados como moderadamente eficientes.

Palavras-chave: Controle Biológico, Fusariose, *Bacillus*, *Trichoderma* spp., antagonismo, metabólitos

ABSTRACT

**EFFECT OF ISOLATED *Bacillus* sp. AND *Trichoderma* spp. ON GROWTH OF
Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* CAUSAL AGENT OF THE TOMATO
FUSARIOSIS.**

Autor: Odenilson de Deus Ribeiro Lima

Orientador: Prof^a. Dra. Antonia Alice Costa Rodrigues

ABSTRACT – Among the most economically important diseases affecting tomato stands out Fusariosis, caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. The deficiency in controlling this disease, associated with environmental conditions favorable to the fungus, unfeasible economic tomato cultivation in the state of Maranhão. In this context, alternative production systems may be important in reducing the environmental and social impacts. The objective of this study was to evaluate the quality of antagonism and metabolites produced by different species of *Bacillus* *in vitro* mycelial control and biocontrol effect of *Trichoderma* spp. against *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. For evaluation of antagonistic *Bacillus* on *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* was performed pairing of fungus and bacteria *in vitro* method by Circle. The experimental design was a completely randomized design with 11 treatments and five replications. In the method for detection of products secreted by *Bacillus* metabolites were prepared 200 ml portions of BD (Potato Dextrose) in Erlenmeyer flasks, and those discs transferred to PDA medium containing the bacterium (*Bacillus* spp.) Remaining in camera 15 days BOD. After this period there was added 3 g of agar per vial, being autoclaved broth and poured into Petri dishes. In the center of the plates were placed in culture dishes pathogen being evaluated at the tenth day. The experimental design was completely randomized with six replications and 11 treatments. For evaluation of antagonistic *Trichoderma* spp. on *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* was performed pairing of cultures. The experimental design was a completely randomized design with 11 treatments and five replications. In the production of volatile metabolites of *Trichoderma* spp. Was used the technique of overlapping plates. We used ten isolates of *Trichoderma* spp., and each treatment consisted of a single most control, with five repetitions. In the production of non-volatile metabolites, we used the membrane filter technique. In the experiment, the treatments were arranged in a completely randomized design with five replicates. Differences between means were determined by the Tukey test at 5 %. In the experiment evaluating the antagonism to *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* with the use of *Bacillus*, all isolates were statistically different from control with emphasis on isolated B12 (*Bacillus* sp.), B41 (*Bacillus cereus*), B22 '(*Bacillus pentothenicus*), B45 (*Bacillus cereus*), B47 (*Bacillus cereus*) and B25 (*Bacillus pumilus*) that induced the lowest average colony diameter of the pathogen. To study the inhibition of mycelial growth of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* by agar sterilized by ten isolates of *Bacillus* spp., five isolates differed significantly from the control they are: B35 (*B. pumilus*), B47 (*Bacillus cereus*), B22 '(*B. pentothenicus*), B12 (*Bacillus* sp.) and B41 (*B. cereus*) the latter two treatments that showed the best results of the pathogen colony diameters with 2.89 and 3.81 cm, respectively. All

isolates differ from the control on the antagonistic action of *Trichoderma*, showing efficient in inhibiting the mycelial growth of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, but there was no significant difference among the isolates. Through the technique of overlapping plates, the isolates that showed the best results were T7 and T8, which inhibited 24.5 % of mycelial growth of the pathogen, standing out from the others, yet this inhibition was not less than 50 %, and then, the isolates classified as inefficient. Regarding the assessment of the effect of metabolites not volatéis, isolates that showed the best results were T3, T10, T11, T12, T13, and T14, differing from the others, stand out isolates T12 and T14 for presenting percentage greater than 50% inhibition, and these isolates also classified as moderately effective.

Keywords: Biological Control, Fusariose, *Bacillus*, *Trichoderma* spp., Antagonism, metabolites

Capítulo I

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

1. O hospedeiro

O tomateiro, *Solanum lycopersicon* L., pertence à família das Solanaceae, e apesar de ser uma planta herbácea e perene, porém é cultivada como uma planta anual. A espécie cosmopolita de tomate cultivada tem por centro primário de origem, o estreito território limitado pelo Equador, Chile, Oceano Pacífico e Cordilheira dos Andes, tendo como centro secundário, o México, onde passou a ser cultivado e melhorado (FILGUEIRA, 2003).

A cultura de tomate é a terceira com maior volume de produção no Brasil. São comercializadas anualmente cerca de 3 milhões de toneladas, das quais 80 % estão nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e Goiás. No Brasil, a safra de 2011 no mês de junho foi de 4.425.274 toneladas, já a safra 2012, correspondente ao mesmo mês, foi de 4.008.054, com uma variação negativa de 9,43 %. Com relação à área plantada, houve também uma variação negativa de 9,23 % (IBGE, 2012). No entanto, a produção global duplicou nos últimos 20 anos, sendo um dos principais fatores para a expansão da cultura, o crescimento do consumo, reforçado pela procura por alimentos mais saudáveis (SIMÃO; RODRÍGUEZ, 2008). A região Nordeste destaca-se como a quarta maior produtora de tomate do país, com uma produção de 611.764 toneladas. Dentre os estados do Nordeste, o Maranhão ocupa a 6ª posição na produção de tomate com 4.739 toneladas em 228 hectares de área plantada (IBGE, 2011).

Taxonomicamente, o tomateiro pertence à classe Dicotyledoneae, ordem Tubiflorae e família Solanaceae. Originalmente, de acordo com Linnaeus, o tomateiro foi inicialmente integrado ao gênero *Solanum*, recebendo a denominação *Solanum lycopersicon* L.. Entretanto, em 1754, Miller, reclassificou essas plantas, criando um novo gênero denominado *Lycopersicon*, renomeando o tomateiro cultivado como *Lycopersicon esculentum* Mill. (ALVARENGA, 2004). Contudo, estudos baseados em técnicas moleculares utilizando DNA mitocondrial, demonstraram que os tomateiros e as espécies do gênero *Solanum*, tais como as batatas, estão muito relacionados filogeneticamente, apoiando desta forma à inclusão dessas espécies novamente dentro do gênero *Solanum*, retornando para a nomenclatura inicialmente proposta por Linnaeus (*S. lycopersicon* L.), gerando muitas divergências entre botânicos adeptos à taxonomia clássica e adeptos de técnicas mais modernas (PERALTA; SPOONER, 2000).

Naturalmente, o tomateiro tem o crescimento em forma de arbusto. Em consequência de sua região de origem, o tomateiro, como toda planta da família Solanaceae, é sensível à variação extrema de temperaturas. Com excesso de calor, há abortamento ou inibição da floração. Em temperaturas próximas a 0 °C ocorre a morte das folhas. Em consequência dessa especificidade, as variedades de tomate são melhoradas visando o local, a forma de cultivo e sua finalidade para o consumo (CAMARGO et al., 2006).

2. O Patógeno: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen

Os fungos são microrganismos causadores do maior número de doenças na tomaticultura. Cerca de 15 % dos custos de produção do tomate são atribuídos ao uso de fungicidas no combate de doenças causadas por este grupo de patógenos. Os fungos de solo, particularmente, são mais difíceis de serem controlados, requerendo medidas integradas de manejo de doenças (LOPES; REIS; BOITEUX, 2005). A fusariose do tomateiro é causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C Snyder & H.N. Hansen, e ocorre em todas as regiões do Brasil. Na década de 70, nas áreas em que o cultivo já estava estabelecido por um período mais longo, era comum a destruição de 100 % das plantas cultivadas ou a redução drástica do período de colheita, devido à morte prematura das plantas, pela ocorrência de patógenos (REIS; LOPES, 2007).

O gênero *Fusarium* compreende espécies habitantes do solo e de substratos orgânicos, estando amplamente distribuídos em todo o mundo (BURGESS, 1981). Possuem ampla gama de hospedeiros, incidindo tanto na parte vegetativa como reprodutiva, causando podridões de raízes, murchas vasculares, amarelecimento e necrose foliar (EDEL et al., 1997). O fungo sobrevive no solo na forma de clamidósporos (estruturas de resistência) e em restos culturais. A identificação das espécies de *Fusarium*, tradicionalmente baseada em características culturais, morfológicas (conidióforos, conídios e clamidósporos), e, mais recentemente, através da produção de micotoxinas, tem gerado controvérsias em relação à identificação das espécies (ALEXOPOULOS et al., 1996). *Fusarium oxysporum* é uma das espécies de maior variabilidade dentro do gênero *Fusarium*, possuindo populações patogênicas e não patogênicas, *formae speciales* (f. sp.) para um único, e para grupo de hospedeiros (BAAYEN et al., 2000). Esse fungo é disseminado pelas sementes, tanto externamente como internamente. Embora seja predominantemente um fungo de solo, a baixa taxa de transmissão pela semente deve ser observada, tendo em vista que, se essa semente for

lançada em solo não contaminado, pode levar ao surgimento da doença nessas áreas (GOULART, 1998; CASSETARI NETO; MACHADO, 2000).

Em hortaliças, fungos habitantes do solo, tais como *Fusarium oxysporum*, em suas diversas formas especializadas, causam problemas em todo o mundo (REIS; LOPES, 2007). Esta espécie pertence atualmente ao filo Ascomycota, classe Ascomycetes e ordem Hypocreales. Espécies fitopatogênicas distribuídas dentro do gênero *Fusarium*, dentre as quais *F. oxysporum*, tem sua fase teleomórfica desconhecida, sendo uma espécie grupo composta de dezenas de espécies que necessitam ser claramente definidas e separadas de maneira adequada (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Fusarium oxysporum é um saprófita ativo, abundante no solo e matéria orgânica, sendo algumas *forma specialis* fitopatogênicas específicas a determinados hospedeiros. Sua habilidade saprofítica torna possível a sobrevivência em solos durante o período de colheita, em restos de plantas infectadas. Em plantas, o micélio dos fungos invade o tecido vascular e, junto com os conídios, bloqueiam o xilema, evitando, desse modo, o movimento de água. Se uma quantidade suficiente de vasos for bloqueada, ocorre o sintoma mais característico, a murcha (MONTEIRO et al., 2004). Das formas especializadas de *F. oxysporum*, uma das mais importantes em hortaliças no Brasil tem sido a espécie *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc.), causadora da Fusariose do tomateiro (REIS; LOPES, 2007). O agente causal da Fusariose do tomateiro recebeu inicialmente a denominação *Fusarium oxysporum* Achal. subsp. *lycopersici* Sacc., em 1886. Em 1935 foi denominado de *Fusarium lycopersici* Sacc., e novamente classificado no mesmo ano, recebendo a denominação de *Fusarium bulbigenum* (Cke. e Mass.) Wr. e Reinking. Finalmente, o nome do patógeno foi reclassificado e fixado como *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C Snyder & H.N. Hansen, em 1940 (VALE et al., 2000).

O fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* apresenta micélio septado, colônias pouco coloridas inicialmente, mas com a idade tornam-se amarelas, e sob determinadas condições, adquire cor rosa pálida ou coloração purpúrea (VALE et al., 2000). Nesta espécie são produzidos dois tipos de esporos assexuais: microconídios, macroconídios, além de estruturas de resistência chamadas clamidósporos (AGRIOS, 2005). Os microconídios são produzidos abundantemente em fiálides simples, apresentando formato oval a elipsóide, ligeiramente curvado e sem septos, medindo 5,5-14,5 μm x 2-3,5 μm (média 5,7 x 2,6 μm). Os macroconídios são esparsos a abundantes, produzidos em conidióforos ou na superfície de esporodóquios, apresentando formato fusiforme e pontiagudo nas extremidades, com as paredes finas, e três a cinco septos, medindo 23,5-36 μm x 3,5-5,5 μm (média 31,2 x 39 μm).

Os clamidósporos apresentam paredes espessas, duplas e rugosas, formato globoso e podem ser formados isolados ou nas extremidades de conidióforos ou intercalados nas hifas, ou nos macroconídios, constituindo as estruturas de resistência (NELSON; TOUSSOUN; MARASAS, 1983; LESLIE; SUMMERELL, 2006). É comum aparecer macroconídios na superfície das plantas mortas pelo patógeno, formando agrupamentos semelhantes aos esporodóquios (AGRIOS, 2005).

Os clamidósporos de *F. oxysporum* podem ter uma ou duas células (KUROZAWA; PAVAN, 2005). Estas estruturas são resultantes da transformação das hifas, medindo de 7-11 µm (VALE et al., 2000). Clamidósporos são considerados estrutura de resistência do patógeno e podem permanecer viáveis no solo na ausência do hospedeiro por anos. Por isso é importante ressaltar a adoção de medidas que impeçam a entrada do fungo, em áreas que a Fusariose ainda não foi constatada (COSTA; ZAMBOLIM; VENTURA, 2007).

3. A doença Fusariose:

A cultura do tomateiro está sujeita a várias doenças que podem limitar sua produção. Muitas destas só podem ser controladas eficientemente quando é adotado um adequado programa de manejo integrado, envolvendo o uso de variedades resistentes e a adoção de medidas de exclusão, erradicação e proteção (KUROZAWA; PAVAN, 2005). Cerca de 200 doenças de causas bióticas e abióticas são conhecidas afetando a tomaticultura em todo mundo. Várias destas doenças podem ocorrer ao mesmo tempo, resultando em grandes danos e prejuízos ao agricultor, podendo assim limitar a produção.

A Fusariose do tomateiro ocorre em todos os estados brasileiros, causando drástica redução na colheita, morte prematura das plantas ou destruição de todas as plantas (JULIATTI, 2001). A Fusariose pode se manifestar em qualquer estágio de desenvolvimento do tomateiro, mas, é mais comum em plantas no início de florescimento e frutificação (KUROZAWA; PAVAN, 2005). Em corte transversal no caule e raízes da planta doente, observa-se uma descoloração vascular que evidencia a presença do patógeno (NELSON, 1981). Os sintomas manifestados em mudas produzidas em viveiros são o clareamento das nervuras das folhas e curvamento dos pecíolos. No campo, o sintoma mais típico é o amarelecimento das folhas, geralmente a partir das mais velhas, em plantas em início de frutificação (VALE et al., 2004). Como consequência do avanço sistêmico do fungo, através do xilema, o amarelecimento progride para as folhas mais novas, sendo seguido de murcha da

planta nas horas mais quentes do dia, até que a murcha se torna irreversível (VALE et al., 2000). O escurecimento dos tecidos vasculares infectados é mais intenso na base do caule, sendo uma característica marcante, embora não exclusiva da doença. A planta quando infectada, também pode apresentar crescimento retardado (LOPES; REIS; BOITEUX, 2005).

O desenvolvimento da doença é favorecido por temperaturas entre 21°C e 33°C, sendo a ótima, a 28°C. Plantas cultivadas em solos ácidos, pobres, com pouca água e deficientes em cálcio, tendem a serem mais afetadas (KUROZAWA; PAVAN, 2005). Solos com alta infestação de nematoides também podem contribuir para o aumento da severidade da doença em alguns casos, em função dos ferimentos causados nas raízes, que servem de porta de entrada para o patógeno (LOPES; REIS; ÁVILA, 2003).

Nenhuma medida de controle químico é efetiva e economicamente viável no controle da Fusariose do tomateiro (BLANCARD, 1996). Medidas de erradicação, como a queima dos restos culturais para diminuir a quantidade de inóculo, seriam relevantes se todos os produtores a adotassem concomitantemente, o que na maioria das vezes não ocorre nas regiões produtoras de tomate (VALE et al., 2004). Nas áreas onde a Fusariose ainda não ocorre, o manejo pelo princípio da exclusão, visando o impedimento da entrada do patógeno na área de cultivo, é o mais importante (COSTA; ZAMBOLIM; VENTURA, 2007). Em áreas onde o patógeno já se encontra estabelecido, um dos métodos mais eficazes de controle de perdas, causadas pelo fungo, é o controle genético, através do plantio de cultivares resistentes (REIS et al., 2005). Apesar de ser considerada destrutiva e de ocorrência generalizada, a Fusariose vem-se tornando secundária para a tomaticultura, graças ao desenvolvimento de cultivares com altos níveis de resistência (LOPES; REIS; ÁVILA, 2003). No entanto, faz-se necessária a busca por outros métodos de controle dessa doença, sendo o controle biológico, através do tratamento de sementes e pulverizações em plantas, uma alternativa viável. O controle biológico é definido como a redução do inóculo ou da atividade deletéria de um patógeno, através de um ou mais organismos que não o homem, porém com a participação ativa deste (MARIANO, 2000).

O inóculo do patógeno em questão inclui suas estruturas vegetativas e reprodutivas, enquanto que a sua atividade deletéria envolve o crescimento, capacidade infectiva, virulência, agressividade e colonização do hospedeiro, dentre outros atributos responsáveis pelo desenvolvimento da doença. Os organismos empregados em controle biológico, também chamado de agentes de controle biológicos ou antagonistas, interferem na sobrevivência ou atividades deletérias dos patógenos, através de diversos mecanismos de ação, e podem agir, também, aumentando a resistência da planta hospedeira.

O controle biológico é uma medida econômica, ambientalmente segura e geralmente de fácil aplicação pelo produtor, sendo amplamente empregado dentro de um manejo ecológico de doenças. No manejo ecológico de doenças, o objetivo é a redução da capacidade de patógenos causarem perdas significativas na produção, evitando-se desequilíbrios ambientais, ao mesmo tempo em que se procura reduzir a dependência de insumos aos agroecossistemas, tornando o processo de produção menos oneroso. Pode ocorrer de maneira espontânea, ou como resultado da manipulação pelo homem, sendo condicionado por mecanismos de controle biológicos ligados aos patógenos, aos hospedeiros ou ao meio ambiente, bem como por aspectos culturais dos agricultores e demais agentes de desenvolvimento (SOGLIO, 2004).

Atualmente, a agricultura sustentável busca o manejo adequado dos recursos naturais, evitando a degradação ambiental, de forma a satisfazer as necessidades atuais e das gerações futuras. Um dos objetivos é a redução do uso dos agroquímicos, o que implica no maior uso dos processos biológicos nos sistemas agrícolas, e menos usos de insumos, como pesticidas (ZAMBOLIM, 2000).

O controle químico de diversas doenças de plantas é feito através do uso de fungicidas, mas a ausência de especificidade e os riscos à saúde humana, e ao ambiente, apresentados por este tipo de defensivo agrícola, acentuam a necessidade de novas formas de controle, principalmente o controle biológico através de microrganismos, como vírus, bactérias e outros (ALVES, 1998).

4. Biocontrole com utilização de *Bacillus* sp.

Os gêneros de bactérias antagonistas de maior prevalência são as *Pseudomonas* do grupo fluorescentes (*P. putida* e *P. fluorescens*), *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. e representantes da família Enterobacteriaceae (CAMPOS SILVA et al., 2008). Em especial, o gênero *Bacillus* spp. se destaca por apresentar uma multiplicidade de mecanismos antagonísticos. Apresentam longa manutenção e sobrevivência em nichos ecológicos específicos, com grande versatilidade nos mecanismos de ação para driblar as defesas dos fitopatógenos.

Dentre os gêneros mais utilizados em biocontrole de doenças de plantas, destaca-se o *Bacillus* com grande vantagem em relação a outros agentes de biocontrole, devido a sua capacidade de formar esporos, os quais são tolerante ao calor e ao frio, bem como às condições extremas de pH, à defensivos, fertilizantes e ao tempo de estocagem. Essas

vantagens permitem a utilização deste microrganismo na formulação de produtos mais estáveis e viáveis e, sua aplicação no tratamento por via foliar (BACKMAN et al., 1997; KLOEPER et al., 1989), outra vantagem do gênero *Bacillus* se deve ao seu rápido crescimento em meio líquido e à ausência de patogenicidade da maioria das espécies (SHODA, 2000).

Grande parte da pesquisa envolvendo controle biológico pelo gênero *Bacillus*, enfatiza a espécie *Bacillus subtilis* Ferdinand Cohn, que é tipicamente uma rizobactéria, que se associa às folhas formando biofilme com características ecológicas de simbiose (ASAKA; SHODA, 1996; DAVEY; O'TOOLE, 2000; KILIAN et al. , 2000; GARDENER, 2004) . É tida como uma das espécies biocontroladoras mais eficazes por apresentar atividade biológica contra uma série de microrganismos causadores de doenças de plantas, o que pode ser atribuído, em grande parte, à produção de lipopeptídicos ativos (ASAKA; SHODA, 1996; KILIAN et al., 2000; KONDOH et al., 2001; BERNAL et al., 2002; BAIS et al., 2004; GARDENER, 2004) , bem como à habilidade de colonizar a planta.

O gênero *Bacillus* pertence ao Domínio Bactérias, Classe Bacilli, Família Bacillaceae, gram positiva (MADIGAN et al., 2004). O potencial antagonístico de bactérias foi estudado em vários trabalhos de controle biológico de doenças em plantas (BETTIOL; KIMATI, 1990). Ao verificar a inibição do crescimento micelial de *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc por *B. subtilis*, Nascimento (2009) notou que, com o aumento da concentração da solução, onde isolados de *B. subtilis* foram multiplicados, no meio de cultura, houve um aumento na porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Pyricularia oryzae* Cav., ocorrendo diferenças entre os isolados do antagonista. Hassni et al (2007), em estudos de microorganismos que inibem *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, constataram que isolados de *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., e *Rahnella aquatilis* foram capazes de induzir reações de defesa em plantas sem causar mortalidade de mudas.

Diversas espécies de *Bacillus* são citadas como produtoras de antibióticos, podendo secretar metabólitos comercialmente importantes como enzimas aminolíticas e enzimas proteolíticas (BETTIOL; GHINI, 1995). Lazzaretti et al (1994) estudando o antagonismo de *B. subtilis* aos principais patógenos associados a sementes, observaram a alta capacidade dos metabólitos produzidos por *B. subtilis* de inibirem os fungos patogênicos associados às sementes de feijão e trigo.

No Brasil, utilizam-se produtos à base de *B. thuringiensis* para controle de cerca de 30 pragas de importância agrícola, porém a área total em que esses produtos são aplicados corresponde a 150.000 hectares. As principais limitações são o elevado custo, a concorrência

com produtos químicos e a falta de investimento dos setores públicos e privados, no desenvolvimento e formulação desses produtos (POLANCZYK; ALVES, 2003). Neste aspecto, Gelernter e Schwab (1993) e Navon (2000) afirmam que diversos fatores limitam a utilização dos biopesticidas: o seu custo, que na maioria das vezes é superior ao dos inseticidas químicos; a baixa persistência em campo da maioria das formulações; o baixo espectro de ação, a ineficácia contra pragas de solo e endofíticas.

5. Biocontrole com utilização de *Trichoderma* spp.

Os fungos do gênero *Trichoderma* sp. Person são de grande importância econômica para a agricultura, uma vez que são capazes de atuarem como agentes de controle de doenças de várias plantas cultivadas, atuam como promotores de crescimento e indutores de resistência de plantas à doença (MOHAMED; HAGGAG, 2006). Algumas linhagens desses fungos vêm recebendo grande atenção da pesquisa, também, por sua versatilidade de ação. Estas são capazes de produzir enzimas que degradam paredes celulares de outros fungos e produzem também substâncias antifúngicas (antibióticos), apresentam diversidade de estratégias de sobrevivência que as tornam altamente competitivas no ambiente, e extraordinária capacidade de proliferação na rizosfera (MELO, 1996, RESENDE et al., 2005). Ademais, certos isolados se mostram resistentes aos fungicidas, característica que os fazem potenciais agentes biorremediadores (RESENDE et al., 2005). A literatura disponível demonstra que os fungos desse gênero possuem amplas possibilidades para aplicação, tanto no biocontrole de patógenos foliares, quanto de patógenos habitantes do solo (LOUZADA et al., 2004).

No controle biológico de doenças causadas por patógenos de solo, os fungos são os principais agentes antagônicos. Micoparasitas como fungos do gênero *Trichoderma*, pertencentes à família Hypocreaceae, o qual forma estruturas de sobrevivência como os clamidósporos, têm sido considerados eficazes no biocontrole de fitopatógenos, principalmente de fitopatógenos que apresentam estruturas de resistência consideradas difíceis de serem atacadas, como esporos, escleródios, clamidósporos e microesclerócios (MELO, 1996). No Brasil, existem diversos produtos comerciais à base de *Trichoderma*, como: Trichodermil, possuindo como ingrediente ativo, o *T. harzianum*, que atua sobre vários patógenos de diferentes culturas, como no controle de *Rhizoctonia solani* Kühn, em arroz; e Tricovab a base de *T. stromaticum*, utilizado no controle de *Moniliophthora* (= *Crinipellis*) *perniciosa* (Stahel), causador da vassoura-de-bruxa do cacauero. Segundo Ramirez et al.

(1995), o gênero *Trichoderma* foi descrito em 1794 para quatro espécies de fungos, e em 1969 foi novamente classificado por Rifai, para nove espécies (RIFAI, 1969). Atualmente, mais de 150 espécies são conhecidas, a maioria delas descritas antes do ano 2000. Antes de 1969, quase todas as espécies de *Trichoderma* relatadas na literatura foram identificadas como *T. viride*, porém hoje essa espécie é conhecida como oriunda do Hemisfério Norte (SAMUELS, 2012).

De acordo com Melo (1991), as espécies de *Trichoderma* apresentam características sobrepostas, o que torna difícil a classificação de isolados. Esse gênero pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Euascomycetes, Ordem Hyproceales, Família Hypocreaceae (KRUGNER; BACCHI, 1995). *Trichoderma* é tido como um fungo saprófita que apresenta frutificações de duas naturezas, a forma teleomórfica ou sexuada, e frutificações assexuadas ou clonais, a forma anamórfica. Habitualmente, para cada espécie existe uma forma anamórfica e uma forma teleomórfica (FIGUEIREDO, 2007).

O gênero *Trichoderma* é caracterizado por possuir conidióforos hialinos muito ramificados e não verticilados, fiálides individuais ou em grupo, conídios unicelulares, hialinos, ovóides e formados de pequenos ramos terminais (KUBICEK; HARMAN, 2002). Os conidióforos não são bem definidos e os conídios tendem a acumular-se dentro de massas pulvinadas (SAMUELS, 2012).

Fungos do gênero *Trichoderma* podem atuar por diferentes mecanismos de ação, como: antibiose, parasitismo, competição e indução de resistência (MELO, 1998). A determinação desses efeitos depende de muitas interações que ocorrem no solo entre *Trichoderma* spp., raízes da planta e outros microrganismos (ASKEW; LAING, 1993, PORRAS et al., 2007).

A antibiose é definida como uma interação entre organismos na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo tem um efeito danoso sobre o outro (BETTIOL, 1991). Algumas espécies de *Trichoderma* produzem metabólitos tóxicos voláteis e não-voláteis, que impedem a colonização através de microrganismos antagonizados; tais como ácido harzianico, alameticinas, tricholinas, antibióticos, 6- pentil - pirano, massoilactona, viridinas, gliovirinas, glisopreninas, ácido heptelidico e outros que já foram descritos.

Micoparasitismo é o fenômeno que consiste em um microrganismo parasitar o outro. Os micoparasitas atacam hifas e estruturas de reprodução e sobrevivência dos patógenos de plantas, reduzindo a infecção e o inóculo do patógeno. O Micoparasitismo não deve ser confundido, portanto, como a Micopredação, a qual envolve ataque, penetração e morte do fungo antagonizado (VINALE et al., 2008). *Trichoderma* spp. podem atuar em

biocontrole direto, infectando uma série de fungos fitopatogênicos através da ação de enzimas como quitinases, glucanases e proteases (HARMAN, 2004). O micoparasitismo realizado por *Trichoderma* ocorre sobre vários fungos, inclusive *Fusarium oxysporum*, com o enrolamento de hifas, sítios de penetração, invasão de hifas e crescimento intracelular por isolados de *T. longibrachiatum* (MELO, 1991). Já Sivan; Chet (1989) comprovaram que o isolado T-35 de *T. harzianum*, embora tenha produzido β -1, 3- glucanase e quitinase, micoparasitando *R. solani* e *Pythium aphanidermatum* (Eds.) Fitz, não apresentou a mesma ação sobre *F. oxysporum*, sendo que a interferência deve ter ocorrido em função da atuação das proteínas da parede celular do patógeno que devem ter interferido na ação das enzimas, aumentando sua resistência à lise.

A competição é um processo de interação entre dois ou mais organismos, comprometidos na mesma ação. A competição entre microrganismos ocorre principalmente por nutrientes, espaço e oxigênio (BETTIOL, 1991; BAKER, DICKMAN, 1993) e, mesmo sendo um mecanismo importante, e extremamente difícil de ser comprovado, o que não ocorre com a antibiose e o micoparasitismo (HARMAN, 2000). Segundo Harman et al. (2004), *Trichoderma* sp. compete pelos exsudatos liberados pelas sementes no processo de germinação que estimulam a germinação de propágulos de fungos fitopatogênicos. De acordo com Howell (2003), a competição é uma das principais características de isolados de *Trichoderma*, usados como agentes de biocontrole, pois somente assim terão capacidade de se desenvolver na rizosfera. No caso do controle da Fusariose do tomateiro, o agente de biocontrole precisa ser altamente competitivo pra estabelecer-se no solo e impedir a ação do patógeno.

A indução dos sistemas de defesa da planta é um outro mecanismo utilizado por agentes de biocontrole, como *Trichoderma* spp. Esse processo ocorre quando as plantas expostas a um agente indutor, tem seus mecanismos de defesa ativados, não apenas no sítio de indução como também em outros locais dele distantes, de forma mais ou menos generalizada (ROMEIRO, 1999).

Amorim; Itamar (1999) testaram a ação conjunta de isolados de *T. harzianum* e *T. koningii*, e de uma suspensão de rizobactérias contendo *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens* e *Bacillus subtilis* em raízes de mudas de *Citrus* sp, que foram transplantadas para substratos pré-infestados com *Phytophthora nicotianae* (= *parasitica*) Dastur e *Phytophthora citrophthora* (Sm. & Sm.) Leonian. O tratamento controlou os dois patógenos.

Na estratégia de controle biológico clássico, enquanto os fungicidas possuem um efeito temporário e necessitam de repetidas aplicações durante o ciclo das culturas, os agentes

de controle biológico são capazes de se estabelecer, colonizar e dispersar no ecossistema (ÁVILA et al., 2005). Entretanto, o aspecto mais importante a ser considerado, qualquer que seja a estratégia utilizada, é que esses agentes biológicos constituem alternativa viável para diminuir o potencial de inóculo de patógenos habitantes do solo, sem trazer danos ao meio ambiente (MELLO et al., 2007).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5.ed. San Diego: Academic Press, 2005. 635.p.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MINS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Micology**. 4. ed. Estados Unidos: J. W. & Sons. Inc. 1996.
- ALVARENGA, M. A. R.; Origem, botânica e descrição da planta. In: ALVARENGA, M. A. R. et al. (Eds.) **Tomate: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras: Editora UFLA, 2004. p. 15-18.
- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ. 1998. 1163 p.
- AMORIM, E. P. R.; ITAMAR, S. D. Efeito da associação de antagonistas no controle de *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* em plantulas de citrus. **Summa Phytopathologica.**, p. 335-338. 1999.
- ASAKA, O.; SHODA, M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 62, 4081-4085, 1996.
- ASKEW, D. J.; LAING, M. D. Anadapted selective medium for the quantitative isolation of *Trichoderma* species. **Plant Pathology.**, p. 686-690, 1993.
- BAAYEN, R. P.; O'DONNELL, K.; BONANTS, P. J. M.; CIGELNIK, E.; KROON, L. P. N. M.; ROEBROECK, E. J. A.; WAALWIJK, C. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic *formae speciales* causing wilt and rot disease. **Ecology and Population Biology.**, v. 90, n. 8, p. 891-900, 2000.
- BAIS, H.P.; FALL, R.; VIVANCO, J.M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. **Plant Physiology**, 134, p. 307-319, 2004.
- BAKER, R.; DICKMAN, M. B. **Biological control with fungi**. In: METTING JR; F.B. (Ed.) Soil Microbial Ecology: applications in agricultural and environmental management. New York: Dekker, p. 275-305, 1993.
- BACKMAN, P. A.; WILSON, M. and MURPHY, J. F. **Bacteria for biological control of plant diseases**. In- *Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control*, Eds. N. A. Rechcigl and J. E. Rechcigl. Boca Rota : CRC Press. pp. 95-109, 1997.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustred genera of imperfect fungi (3a ed)**. Minneapolis: Burgess Publishing Company,. 1972.
- BERNAL, G.; ILLIANES, A.; CIAMP, L. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. With antibiotic activity against plant pathogenic agents. **Electronic Journal of Biotechnology**, 2002.
- BETTIOL, W. , KIMATI , H. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal da brusone do arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 25, p.1165-1174, 1990.

BETTIOL, W. , KIMATI , H. Seleção de microrganismo antagonicos a *Pyricularia oryzae* Cav. Para controle do Brusone do arroz (*Oryza sativa* L.) **Summa Phytopathologica**, v. 15, p. 257-266, 1989.

BETTIOL, W.; GHINI, **Controle Biológico**. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. São Paulo: Ceres, 1995. P.717-728.

BETTIOL, W. (Org.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Brasília: EMBRAPA. p. 1-5, 1991.

BURGUESS, L. W. General ecology of the fusaria. In: NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; COOK, R. J. (Eds). **Fusarium disease, biology and taxonomy**. University Park/ London: Pennsylvania University Press, 1981.

CAMARGO, A. M. M. et al. Cadeia produtiva de tomate industrial no Brasil: resenha da década de 1990, produção regional e perspectivas. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.36, n.11, p. 8-20, 2006.

CAMPOS SILVA, J.R.; SOUZA, R.M.; ZACARONE, A.B.; SILVA, L.H.C.P.; CASTRO, A.M.S. Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. tomato, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, p.1062-1072, 2008.

CASSETARI NETO, D.; MACHADO, A.Q. **Doenças do algodoeiro: Diagnose e Controle**. Cuiabá: [s.n.], 2000. 47p.

COSTA, H.; ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A. Doenças de hortaliças que se constituem em desafio para o controle. In: ZAMBOLIM, L. et al. (Eds.). **Manejo integrado de doenças e pragas: hortaliças**. Viçosa: Editora UFV, 2007. p.319-336.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial biofilm: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Review**, n. 64, p. 847-67, 2000.

EDEL, V.; STEINBERG, C.; GAUTHERON, N.; ALABOUVETTE, C. Populations of non pathogenic *Fusarium oxysporum* associated with roots of four plant species compared to soilborne populations. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, p. 693-697, 1997.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2. ed. Viçosa: UFV, p. 193-214, 2003.

FIGUEIREDO, M. B., Disponível em: <<http://www.geocities.com/~esabio/>>. Acesso em jul de 2007.

GARDENER, B.B.M. Ecology of *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore forming bacteria. **Phytopathology**, n. 94, v. 11, p. 1245-1248, 2004.

GELERNTER, W.; SCHWAB, G. E. Transgenic bacteria, viruses, algae and other microorganisms as *Bacillus thuringiensis* toxin delivery systems. In: ENTWISTLE, P. F.;

CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.) *Bacillus thuringiensis*, na ambiental biopesticide: theory and practice. Chichester: John Willey, cap. 4, p. 89-104, 1993.

GOULART, A.C.P. Tratamento de sementes de algodão com fungicidas para o controle do tombamento causado por *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p. 247, 1998.

HARMAN, G. E. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature**, v. 2, p. 43-56, 2004.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol – changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v. 84, p. 377-392, 2000.

HASSNI, M. El, HADRAMI, A El, DAAYF, F., CH'Erif, BARKA, M. E. A., HADRAMI, I. E. L. Biological control of bayoud disease in date palm: Selection of microorganisms inhibiting the causal agent and inducing defense reactions. **Environmental and Experimental Botany** v.59, p. 224–234, 2007.

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

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. SIDRA. **Tomate**. Produtividade de 2011. Disponível em: [http:// www.ibge.com.br](http://www.ibge.com.br). Acesso em: 10 de abr. de 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **SIDRA 2012**: Sistema de recuperação automática. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2012. Disponível em: <[http:// www.sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br)>. Acesso em: 27 jul. 2012.

JULIATTI, F. C. Manejo integrado de fungos fitopatogênicos. *In*: SILVA, L. H. C. da P.; CAMPOS, J. R.; NOJOSA, G. B. de A. **Manejo integrado: doenças e pragas em hortaliças**. Lavras, Minas Gerais: UFLA, 2001.

KILIAN, M.; STEINER, V.; JUNGE, H.; SCHMIEDEKNECHT, G.; HAIN, R. FZB21. *Bacillus subtilis* – mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. **Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer** , 1, p. 172-93, 2000.

KONDOH, M.; HIRAL, M.; SHODA, M. Integrated biological and chemical control of Damping-off using *Bacillus subtilis* 1XB14-c 53 and Flutolami 1 . **Journal of Biosciencia and Bioengieer ing**, n. 91, v. 2, 173-177, 2001.

KLOEPPER, J. W. ; LIFSHITZ, R. ; ZABLOTOWICZ, R. M. Freelifving bacterial inocula for enhancing crop produc t i v i t y. **Trends in Biotechnology**, v.7, p.39-44, 1989.

KRUGNER, T. L.; BACCHI, L. M. A. Fungos. *In*: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Eds.) **Manual de Fitopatologia**. v. 3. ed. São Paulo: Agronomica Ceres, p. 46-95, 1995.

KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. *Trichoderma* & *Gliogladium*: basic biology, taxonames and genetcs, London: **Taylor & Francis LTD**. 2002, 278p.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. P. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H. et al. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 607- 626.

LAZZARETTI, E.; MENTEN, J. O. M.; BETTIOL, W. *Bacillus subtilis* antagônicos aos principais patógenos associados a sementes de feijão e trigo. **Fitopatologia Venezuelana**. Maracay, n.7, p. 42-46, 1994.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Ames: Blackwell, 2006. 388 p

LOPES, C. A.; REIS, A.; BOITEUX, L. S. Doenças fúngicas. In: LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. (Eds.). **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005. p. 19-51.

LOPES, C. A.; REIS, A; ÁVILA, C. Principais doenças do tomate para mesa causadas por fungos, bactérias e vírus. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 24, n. 219, p. 66-78, 2003.

LOUZADA, G. A.; LOBO JUNIOR, M.; MARCHÃO, R. L.; BALBINO L. C. Efeito da rotação de culturas sobre *Fusarium* spp. e atividade microbiológica em uma área de integração lavoura-pecuária., 2009. **Disponível (online)** <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/embrapaintegracaolavourapecuaria>. Acesso em: ago. de 2012.

MADIGAN, M. T.; MARTINHO, J. M.; PAKER, J. M. **Microbiologia de Brock**. 10ª Ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MARIANO, R. L. R. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Editora Universitária - UFPE, 171 p., 2000.

MELO, I. S. **Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas**. In: BETTIOL, W. (org.) Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPDA, p. 135-156. 1991.

MELO, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revista Anual Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.4, n.1, p.261-295, 1996.

MELO, I. S. **Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos**. (Eds.) Controle biológico. Jaguariuna: EMBRAPA, 1998.

MELLO, S.C.M., ÁVILA, Z.R., BRAÚNA, L.M., PÁDUA, R.R.; GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Fitosanidad**, n.11, v. 1, p. 3-9, 2007.

MOHAMED, H.A.L.A.; HAGGAG, W.M. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. **Braz. J. Microbiol**, n. 37, v. 2, p. 181-191, 2006.

MONTEIRO, A. C. et al. Crescimento e esporulação de *Verticillium lecanii* sob diferentes fatores ambientais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 6, p. 561-565, jun. 2004.

NASCIMENTO, I. O. Isolamento, identificação e seleção de *Bacillus* spp. para o biocontrole de fitopatógenos do arroz. **Dissertação** (Mestrado em Agroecologia) Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2009. 109p.

NAVON, A. *Bacillus thuringiensis* application in agriculture. In: CHARLES, J. F.; DELECLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.) **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p 355-367, 2000.

NELSON, P. E. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In: MACE, M. E.; BELL, A. A.; BECKMAN, C.H. (Eds.). **Fungal wilt diseases of plants**. New York: Academic Press, 1981. p. 51-80.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. **Fusarium species: an illustrated manual for identification**. University Park: The Pennsylvania State University Press, 1983. 193 p.

PERALTA, I. E.; SPOONER, D. M. Classification of wild tomatoes: a review. **Kurtziana**, Córdoba, v. 28, n.1, p. 45-54, 2000.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociência**, Montividéu, v. VII, p. 1 – 10, 2003.

PORRAS, M.; BARRAU, C.; ARROYO, F.T.; SANTOS, B.; BLANCO, C.; ROMERO, F. Reduction of *Phytophthora cactorum* in strawberry fields by *Trichoderma* spp. and soil solarization. **Plant Disease**, n. 91, St. Paul, p. 142-146, 2007.

RAMIREZ, I. S. et al. *Trichoderma harzianum* (Cepa A34): un biopreparado de amplio espectro para micopatologías del tomate y del pimiento. Habana: INISAV, (CID-INISAV Boletín Técnico, 4), 36p, 1995.

REIS, A.; LOPES, C.A. Principais fungos de solo em hortaliças: epidemiologia e manejo. In: ZAMBOLIM, L. et al. (Eds.). **Manejo integrado de doenças e pragas: hortaliças**. Viçosa: Editora UFV, 2007. p.189-191.

REIS, A.; COSTA, H.; BOITEUX L. S.; LOPES C. A. First report *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, n. 4, p. 426-428, 2005.

REZENDE, J. A. M.; MARTINS, M. C. **Doenças do Mamoeiro**. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Eds.) Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. Sao Paulo: Agronomica Ceres, v.2, p. 435-443, 2005.

RIFAI, M. M. A Revision of The Genes *Trichoderma*. **Mycological Papers**, n. 116, p. 1-55, 1969.

ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Vicosã: Ed. UFV, (Caderno Didático no 56), 45p, 1999.

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

SAMUELS, G.J. *Trichoderma*: A review of biology and systematic of the fungus. **Mycological Research**, 100, 923-925, 2012.

SIMÃO, R.; RODRÍGUEZ, T. D. M. Evolução da Produção de tomate de mesa no estado de Rondônia. **Anais XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural**, 2008.

SHODA, M. Bacterial control of plant diseases. **J Biosci Bioeng**, n. 89, p. 515-521, 2000.

SOGLIO, F. K. D. Manejo de doenças na perspectiva da transição agroecológica. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. (Eds.). **Manejo Ecológico de Doenças de Plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC, p. 293, 2004.

VALE, F. X. R. et al. Doenças causadas por fungos em tomate. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H. (Eds.). **Controle de doenças de plantas: hortaliças**. Viçosa: Editora UFV, p. 699-756, 2000.

VALE, F. X. R. et al. Manejo integrado das doenças do tomateiro: epidemiologia e controle. In: ALVARENGA, M. A. R. (Ed.). **Tomate: produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia**. Lavras: Editora UFLA, p. 249-253, 2004.

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

ZAMBOLIM, L. (ED.). **Manejo Integrado: doenças, pragas e plantas daninhas**. Viçosa: UFV, 2000.

Capítulo II

AÇÃO ANTIFÚNGICA *in vitro* DE ISOLADOS DE *Bacillus* sp. SOBRE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

1 **AÇÃO ANTIFÚNGICA *in vitro* DE ISOLADOS DE *Bacillus* sp. SOBRE *Fusarium***
2 ***oxysporum* f. sp. *lycopersici*.¹**

3
4 ODENILSON DE DEUS RIBEIRO LIMA², ANTONIA ALICE COSTA RODRIGUES²

5
6
7 **RESUMO** – Objetivou-se avaliar o antagonismo exercido por diferentes espécies de *Bacillus*
8 no controle micelial *in vitro* contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Para a avaliação do
9 antagonismo de dez isolados de *Bacillus* a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, foi realizado o
10 pareamento entre fungo e bactéria pelo Método do Círculo. Foram utilizados meio líquido
11 BD (Batata-Dextrose), e transferidos discos de meio BDA contendo a colônia dos isolados de
12 *Bacillus*, permanecendo durante 15 dias em câmara BOD. Após esse período, adicionou-se
13 Ágar, que após autoclavagem, foi vertido em placas de Petri. No centro das placas foram
14 colocados discos de cultura do patógeno. O delineamento experimental adotado foi o
15 inteiramente casualizado com 11 tratamentos e seis repetições. De acordo com os resultados,
16 foi verificado que todos os isolados diferiram estatisticamente da testemunha. Os isolados
17 B12 (*Bacillus* sp.), B41 (*Bacillus cereus*), B22' (*Bacillus pentotheticus*), B45 (*Bacillus*
18 *cereus*), B47 (*Bacillus cereus*) apresentaram as menores médias de diâmetro da colônia. Para
19 o estudo da inibição do crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* pela produção
20 de metabólitos termoestáveis, cinco isolados diferiram estatisticamente da testemunha são
21 eles: B35 (*B. pumilus*), B47 (*Bacillus cereus*), B22' (*B. pentotheticus*), B12 (*Bacillus* sp.) e
22 B41 (*B. cereus*), sendo os dois últimos tratamentos, os que apresentaram os menores
23 diâmetros de colônia do fitopatógeno, com 2,89 e 3,81 cm, respectivamente. Os isolados
24 B12 e B41 foram capazes de inibir 67,88 % e 57,66 % do *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.
25 Esses resultados ressaltam a possibilidade de utilização dos isolados do gênero *Bacillus* no
26 combate à Fusariose.

27
28
29 **Palavras-Chave:** *Solanum lycopersicon* L, Antagonismo, *Bacillus* spp.

30
31
32

33 ANTIFUNGAL ACTION OF *Bacillus* sp. ON *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, in
34 *vitro*.

35

36 **ABSTRACT** - This study aimed to assess the quality of antagonism and metabolites
37 produced by different species of *Bacillus* in the control mycelia *in vitro* against *F. oxysporum*
38 f. sp. *lycopersici*. For evaluating the antagonism of *Bacillus* spp. *F. oxysporum* f. sp.
39 *lycopersici* was performed pairing of fungus and bacteria *in vitro* by the Method of the Circle.
40 The experimental design was completely randomized with 11 treatments and five repetitions.
41 In the method for detection of metabolic products secreted by *Bacillus* spp. were prepared 200
42 ml portions BD (Potato Dextrose) in Erlenmeyer flasks, and these discs transferred PDA
43 media containing bacteria (*Bacillus* spp.) and remained for 15 days in BOD camera. After this
44 period, was added 3 g of agar in each flask, and autoclaved broth and poured into Petri dishes.
45 In the center of the plates were placed discs culture of the pathogen being evaluated on the
46 tenth day. The experimental design was completely randomized with 11 treatments and six
47 repetitions. According to the results in experiment based on the method of the circle through
48 the antagonism of ten isolates of *Bacillus* spp. *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, at 10 days
49 showed that all treatments were statistically different from control. Special mention to strains
50 B12 (*Bacillus* sp.), B41 (*Bacillus cereus*), B22' (*Bacillus pentothenicus*), B45 (*Bacillus*
51 *cereus*), B47 (*Bacillus cereus*) that exhibited the lowest average diameter of the colony. To
52 study the inhibition of mycelial growth of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* by antibiotics
53 secreted in broth agar autoclaved for ten isolates of *Bacillus* spp., five differ statistically from
54 the control they are: B35 (*B. pumilus*), B47 (*B. cereus*), B22' (*B. pentothenicus*), B12
55 (*Bacillus* sp.) and B41 (*B. cereus*) the latter two treatments showed the best results of the
56 pathogen colony diameters and 3.81 to 2.89 cm, respectively. B12 and B41 Isolates showed
57 that their antibiotic products were able to inhibit 67.88 % and 57,66 % of *F. oxysporum* f. sp.
58 *lycopersici*. These results highlight the possibility of using isolates of the genus *Bacillus* in
59 the fight against Fusarium wilt in tomato.

60

61 **Keywords:** *Solanum lycopersicon* L., Antagonism, *Bacillus* spp.

62

63

64

65

66 INTRODUÇÃO

67

68 O tomateiro (*Solanum lycopersicon* L.) tem a sua origem na zona andina da América do
69 Sul e pertence à família das Solanáceas. É amplamente difundido no Brasil, e apresenta
70 grande importância comercial, tanto para o consumo *in natura* quanto para industrialização
71 (FILGUEIRA, 2000; ALVARENGA, 2004).

72 Em 2011, o Brasil produziu 4,4 milhões de toneladas de tomate em 69.529 hectares de
73 área plantada, havendo um aumento tanto da produção, quanto na área plantada da cultura, em
74 relação ao ano de 2010. A região Nordeste destaca-se como a quarta maior produtora do
75 tomate do país, com uma produção de 611.764 toneladas. Dentre os estados do Nordeste, o
76 Maranhão ocupa a 6ª posição na produção de tomate com 4.739 toneladas, em 228 hectares de
77 área plantada (IBGE, 2011).

78 A cultura do tomateiro é afetada por diversas doenças de importância econômica, que
79 podem ser de origem bacteriana, fúngica, virótica ou causada por nematóides. Entretanto,
80 mais da metade das doenças infecciosas do tomateiro são causadas por fungos, sendo que
81 estes podem infestar todos os órgãos das plantas. Dentre as doenças mais preocupantes estão
82 aquelas causadas por fungos que atacam as plantas a partir do sistema radicular, destacando-
83 se a Fusariose causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen, que são
84 agrupados em três raças. As raças 1 e 2 são amplamente distribuídas no mundo, e a raça 3
85 apresenta uma distribuição geográfica mais restrita.

86 Há ocorrência de Fusariose em todos os estados brasileiros, causando redução da
87 colheita devido à morte prematura das plantas ou destruição de todas elas (JULIATTI, 2001).

88 O agente causal desta doença pode sobreviver no solo por longos períodos de tempo,
89 sendo o controle químico e o cultural pouco efetivo, o que pode limitar o plantio de tomate
90 em determinadas áreas (JONES, 1991; LOPES et al., 2003; REIS et al., 2004).

91 A deficiência de alternativa no controle da Fusariose, associada às condições ambientais
92 favoráveis ao fungo, inviabilizam o cultivo econômico do tomate no Estado do Maranhão,
93 exigindo assim a importação desta hortaliça de outros estados. Tal situação, onera os custos
94 ao produtor, diminuindo bastante a acessibilidade da população a este produto bastante
95 consumido pela sociedade. O que resulta em prejuízos, tanto para o produtor quanto para o
96 consumidor, refletindo de forma negativa na cadeia produtiva.

97 Diante do exposto, a utilização de microrganismos em sistemas agroecológicos tem sido
98 cada vez mais empregada no controle biológico de doenças de plantas, e com a crescente
99 preocupação da sociedade com o uso excessivo de agrotóxicos, contaminação da cadeia

100 alimentar e a pouca eficiência do controle químico para a Fusariose do tomateiro, objetivou-se
101 nesse trabalho, avaliar o antagonismo de isolados de *Bacillus* pela sua ação direta e pela ação
102 de seus metabólitos secundários sobre o agente causador da Fusariose do tomateiro.

103

104 MATERIAL E MÉTODOS

105

106 Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia localizado no Núcleo de
107 Biotecnologia Agronômica – NBA da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, Campus
108 de São Luís, durante o período de setembro de 2010 a agosto de 2012. Após isolamento e
109 confirmação da patogenicidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, os isolados foram
110 submetidos à três ensaios distintos que avaliaram a ação antagônica dos isolados de *Bacillus*.

111

112

113 **Obtenção, Isolamento e Teste de Patogenicidade de isolados de *F. oxysporum* f. sp. 114 *lycopersici* e *Bacillus* spp.**

115

116 Foram utilizados os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e de *Bacillus* spp. da
117 Micoteca “Prof^o Gilson Soares da Silva” – MGSS, do laboratório de Fitopatologia da UEMA,
118 preservados em solo autoclavado e meio de cultura BDA, respectivamente. Os isolados foram
119 selecionados e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-
120 Ágar (BDA), posteriormente foram repicados e transferidos para tubos de ensaio para
121 conservação de culturas puras.

122 Para o preparo do inóculo do patógeno, o isolado foi transferido para placas de Petri
123 contendo meio de cultura BDA e mantidas em condições ambientes por sete dias. Após esse
124 período, foi adicionado 20 mL de água destilada em cada placa e utilizando lâmina de vidro,
125 foi efetuada a raspagem das colônias, em seguida com o auxílio da câmara de Neubauer a
126 suspensão foi ajustada para 1×10^6 conídios.mL⁻¹ e inoculadas em plantas de tomateiro com
127 30 dias de idade. A avaliação foi efetuada através da incidência da Fusariose, para seleção do
128 isolado mais virulento.

129 As observações para avaliar a ação antagônica dos isolados de *Bacillus* ao *F. oxysporum*
130 f. sp. *lycopersici* foram realizadas com os seguintes testes *in vitro*.

131

132

133 **Avaliação do antagonismo de *Bacillus* a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in**
134 ***vitro*.**

135

136 Para o estudo do efeito antagonista de *Bacillus* spp. x *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*,
137 foi realizado um experimento *in vitro*, pelo Método do Círculo. Inicialmente, os isolados de
138 *Bacillus* spp. foram cultivados em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) por 48 horas
139 e o isolado de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* por sete dias, após este período de cultivo
140 transferiu-se assepticamente para placas de Petri com 9 cm de diâmetro contendo meio de
141 cultura BDA, um disco de 6,0 mm de diâmetro do fitopatógeno, colocando-os no centro da
142 placa. Com auxílio de uma alça de platina, inoculou-se a bactéria, na mesma placa formando
143 um círculo com diâmetro, aproximadamente de 5 cm. Para o tratamento controle ou
144 testemunha foi utilizado somente fitopatógeno cultivado em meio BDA, com fotoperíodo de
145 12 horas (MARIANO, 1993).

146 A avaliação foi efetuada ao décimo dia, pela inibição do crescimento micelial, para isso
147 foram efetuadas medições do diâmetro das colônias, em dois sentidos diametralmente
148 opostos, com auxílio de uma régua milimetrada, definindo-se uma média para cada colônia. O
149 delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com 11 tratamentos e
150 cinco repetições.

151 A percentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada pela fórmula de (P.I.C)
152 (MENTEN et al., 1976), onde:

$$153 \text{ PIC} = \frac{\text{Crescimento da testemunha} - \text{Crescimento tratamento}}{\text{Crescimento da testemunha}} \times 100$$

154

155

156

157 **Avaliação da produção de metabólitos termoestáveis produzidos por *Bacillus* spp.**
158 **a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.**

159

160 No método para detecção qualitativa de antibióticos (MDA), foram acondicionadas
161 porções de 200 ml de BD (Batata-Dextrose) em frascos de Erlenmeyer, e transferidos discos
162 de meio BDA contendo a bactéria (*Bacillus* spp.), com sete dias de idade. Os frascos
163 permaneceram durante 15 dias, sem agitação, a uma temperatura de $26 \pm 0,5$ °C, na presença
164 de luz. Após esse período, foram adicionadas 3 g de Ágar em cada frasco, e estes
165 autoclavados por 20 minutos a 120° C, e o caldo agarizado foi vertido em placas de Petri, de 9

166 cm de diâmetro. No centro das placas foram colocados discos de cultura de *F. oxysporum* f.
167 sp. *lycopersici* e mantidas por 15 dias a uma temperatura de $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de
168 12 horas, em BOD.

169 A avaliação do potencial de antagonismo foi realizada ao décimo dia medindo-se em
170 dois sentidos diametralmente opostos com auxílio de uma régua milimetrada, definindo-se
171 uma média para cada colônia. Os diâmetros das colônias do patógeno foram comparados com
172 a testemunha, cujo patógeno se desenvolveu em meio BDA. O delineamento experimental
173 adotado foi o inteiramente casualizado, 11 tratamentos e seis repetições.

174 A percentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada pela fórmula de (P.I.C)
175 (MENTEN et al., 1976), onde:

176

$$177 \quad \text{PIC} = \frac{\text{Crescimento da testemunha} - \text{Crescimento tratamento}}{\text{Crescimento da testemunha}} \times 100$$

178

179

180

181 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

182

183

184 **Avaliação do antagonismo de *Bacillus* spp a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici***
185 ***in vitro*.**

186

187 No experimento baseado no Método de Círculo através do antagonismo de 10 isolados
188 de *Bacillus* spp. a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, aos 10 dias observou-se que todos
189 mostraram efeito inibidor ao patógeno avaliado, ou seja, todos os tratamentos diferiram
190 estatisticamente da testemunha (Tabela 1).

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200 **Tabela 1.** Avaliação da inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f.sp.
 201 *lycopersici* pelo Método do Círculo por isolados de *Bacillus*. São Luís, 2012.

202

Tratamento	Diâmetro da colônia (cm)	PIC (%)
B35	6,90 b	11,53
B40	6,70 b	14,10
B16	6,60 b	15,38
B22	6,41 b	17,82
B47	4,57 cd	41,41
B45	4,49 cd	42,43
B22'	4,41 cd	43,46
B41	4,14 cd	46,92
B12	3,94 d	49,48
B25	4,79 c	38,58
Testemunha	7,80 a	-

203 *Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey,
 204 ao nível de 5% (p<0,5) de significância. CV(%) = 6,64. T= testemunha; B45, B41, B47=
 205 *B. cereus*; B35, B25= *B. pumilus*; B16= *B. macerans*; B22= *B. polymyxa*; B22'= *B.*
 206 *pentothenticus*; B12= *Bacillus* spp.; B40= *Bacillus* sp.

207

208 Os isolados B12 (*Bacillus* sp.), B41 (*Bacillus. cereus*), B22' (*Bacillus pentothenticus*),
 209 B45 (*Bacillus cereus*), B47 (*Bacillus cereus*) e B25 (*Bacillus pumilus*) induziram as menores
 210 médias de diâmetro da colônia do patógeno. Os isolados B35 (*Bacillus pumilus*), B40
 211 (*Bacillus* sp.), B16 (*Bacillus macerans*), B22 (*Bacillus polymyxa*) diferiram estatisticamente
 212 da testemunha, porém as médias de crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*
 213 foram maiores.

214 Pode-se afirmar com base nos resultados, que os isolados podem ter agido de diferentes
 215 formas ou mecanismos de ação contra o *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* como produção de
 216 compostos voláteis e antibióticos, de forma isolada ou com todas esses mecanismos. Na
 217 literatura, menciona-se que o gênero *Bacillus* pode produzir todos esses produtos antagônicos
 218 como os encontrados por Vieira-Júnior (2005), que verificou no bioensaio *in vitro* que *B.*
 219 *cereus* (UFV-75) foi capaz de produzir sideróforos, compostos voláteis, bacteriocinas e
 220 enzima quitinase. É fato estabelecido que enzimas como quitinases, celulasas e glucanases,

221 sejam sintetizadas por microrganismos também como mecanismos de antagonismo (DUFFY,
222 2003) e que, em muitas situações, esse mecanismo pode explicar, pelo menos em parte, o
223 controle biológico de enfermidades de plantas promovido por alguns agentes procariotas.

224 É importante notar que dentre esses isolados, a presença da espécie de *Bacillus cereus* é
225 marcante. Esta espécie tem sido descrita por vários autores como biocontroladora de doenças
226 de plantas. Vieira-Júnior (2005) avaliando 500 isolados de procariotas residentes do filoplano
227 do feijoeiro *in vitro*, constatou que o isolado UFV-75 (*Bacillus cereus*) foi capaz de inibir, a
228 germinação de conídios e crescimento micelial de todos os patógenos testados. Já
229 Nascimento (2009) no ensaio com dezoito isolados de *Bacillus* spp., no controle do
230 crescimento micelial de *Pyricularia grisea*, observou a promoção da inibição do crescimento
231 micelial de quinze isolados, aos quatorze dias, após o pareamento com destaque para os
232 isolados B41 (*B. cereus*), B33 (*B. polymyxa*), BSB1 (*B. lentus*), B6 (*Bacillus* sp.), B31 (*B.*
233 *pumilus*).

234 O gênero *Bacillus* apresenta grande potencial de uso no controle biológico de diversos
235 patógenos em diferentes culturas. Na cultura do milho, Shiomi (2007) observando o
236 antagonismo de bactérias endofíticas do milho como *B. subtilis* OG, *B. lentimorbus* e
237 *Streptomyces* sp. aos fungos de solo *Phytium aphanidermatum* (Eds.) Fitz, *Fusarium*
238 *moniliforme* (Sheld.), *Rhizoctonia solani* (Kühn) e *Sclerotium rolfsii* Sacc., e ao fungo foliar
239 *Exserohilum turcicum* (Pass.) K.J. Leonard & Suggs, constatou que, de forma geral, todos os
240 isolados selecionados apresentaram atividade antagônica aos patógenos desafiadores com
241 destaque as bactérias *Bacillus subtilis* OG e *Bacillus lentimorbus*. Na cultura do Mamoeiro,
242 Paz (2010) investigando o efeito fungistático de nove isolados de *Bacillus* contra
243 *Corynespora casicola* (Berk & Curt.) Wei., observou que o isolado Iso31 (*Bacillus cereus*)
244 apresentou o melhor resultado na inibição do crescimento micelial, com 63,36 %, através do
245 confronto no pareamento bactéria x fungo.

246 O antagonismo direto exercido contra fitopatógenos tem o envolvimento dos
247 mecanismos de antibiose, como a síntese de substâncias antimicrobianas, a competição por
248 espaço e nutrientes e a síntese de compostos voláteis (LEELASUPHAKUL et al., 2008).
249 Assim, Melo (2005) em ensaio *in vitro*, com bactérias endofíticas de mandioca frente ao
250 *Phytium aphanidermatum* a fim de escolher as melhores linhagens de bactéria concluiu que o
251 *B. pumilus* apresentou um potencial de biocontrole pelo confronto em meio agarizado. Em um
252 segundo ensaio, foram adicionados outros dois patógenos, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium*
253 *rolfsii*, e como resultado desta avaliação, apresentaram melhores atividades antagônicas, *B.*
254 *pumilus*, *B. cereus*, *B. antracis*. Estes resultados corroboram com os desta pesquisa, pois as

255 espécies de *B. pumilus* e *B.cereus* presentes neste experimento também apresentaram
256 atividade antagônica satisfatória.

257 O biocontrole ao *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* foi de 49,48 % de inibição do
258 crescimento micelial pelo isolado B12 de *Bacillus* spp. Resultados semelhantes foram obtidos
259 por Amorim; Melo (2002) estudando a ação antagônica de rizobactérias contra dois fungos
260 habitantes do solo, *Phytophthora nicotianae* (= *parasitica*) Dastur e *P. citrophthora* (Sm. &
261 Sm.) Leonian, em citros nos quais sete isolados bacterianos apresentaram atividade
262 antagônica à *Phytophthora* spp. dentre eles os mais significativos na inibição do crescimento
263 micelial aos desafiantes pertenciam ao gênero *Bacillus*. Acredita-se que os mecanismos de
264 ação dessas rizobactérias em controlar os fitopatógenos esteja relacionada à produção de
265 compostos tóxicos (antibiose) e de sideróforos (competição por ferro).

266 Diversos autores têm verificado o potencial antagônico de *Bacillus* com bons resultados
267 de inibição ao crescimento dos fungos fitopatogênicos. Kupper et al. (2003) estudando 64
268 isolados de *Bacillus subtilis*, 4 isolados de *Bacillus* spp., e um isolado de *B. thuringiensis*,
269 quanto a sua atividade antagônica contra *Colletotrichum acutatum* Simmonds, observaram
270 que todos apresentaram efeito inibitório ao fungo avaliado. A mesma observação foi feita por
271 Furlani et al. (2007), em que todos os isolados de *Bacillus* sp. promoveram inibição de
272 crescimento micelial de *C. acutatum*, reforçando o potencial biocontrolador desse gênero de
273 bactérias.

274 Foi constatado, também, que *Bacillus* obtidos de culturas diferentes das testadas,
275 apresentaram resultados satisfatórios, como os encontrados por Pusey e Wilson (1984) em
276 experimento com pós-colheita, no qual houve o controle da podridão parda em diversos tipos
277 de frutas com a pulverização de isolados de *B. thuringiensis* e *B. subtilis*, o que mostra que
278 microrganismos isolados de uma espécie de hospedeiro podem realizar, de maneira efetiva,
279 controle de patógenos em diferentes espécies.

280

281 **Avaliação da produção de metabólitos termoestáveis mediados por *Bacillus* spp. a** 282 ***F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.**

283

284 No estudo da inibição do crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* pelos
285 antibióticos secretados em caldo agarizado por dez isolados de *Bacillus* spp., cinco diferiram
286 estatisticamente da testemunha são eles: B35 (*B. pumilus*), B47 (*Bacillus cereus*), B22' (*B.*
287 *pentothenicus*), B12 (*Bacillus* sp.) e B41 (*B. cereus*) sendo os dois últimos tratamentos que
288 apresentaram os menores diâmetros de colônia do fitopatógeno, com 2,89 e 3,81 cm ,

289 respectivamente (Tabela 2). Esses resultados indicam que os antibióticos presentes no caldo
 290 agarizado autoclavado são termoestáveis, ou seja, resistem a altas temperaturas sem perder as
 291 características antifúngicas, e que seu modo de antagonismo a outros microrganismos é
 292 principalmente a antibiose.

293 Resultados semelhantes obtiveram Santos et al. (1998), testando *B. subtilis* contra
 294 *Puccinia psidii* Winter, onde verificaram inibição de germinação de uredinósporos, tanto em
 295 caldo natural como autoclavado, considerando a termoestabilidade dos metabólitos
 296 produzidos por *B. subtilis*, independente da presença de células vivas.

297

298 **Tabela 2.** Médias da inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp.
 299 *lycopersici* submetidos à produtos metabólitos de diferentes isolados de *Bacillus* spp. São
 300 Luís, 2012.

301

Tratamento	Diâmetro da Colônia (cm)	PIC (%)
B35	7.51 bc	16,55
B16	8.66 a	3,77
B22	8.91 a	1,00
B45	8.91 a	1,00
B40	8.66 a	3,77
B25	8.20 ab	8,88
B47	6.73 cd	25,22
B22'	6.15 d	31,66
B41	3.81 e	57,66
B12	2.89 e	67,88
Testemunha	9.00 a	0

302 *Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey,
 303 ao nível de 5% ($p < 0,5$) de significância. CV(%) = 6,91. T= testemunha; B45, B41, B47=
 304 *B. cereus*; B35, B25= *B. pumilus*; B16= *B. macerans*; B22= *B. polymyxa*; B22'= *B.*
 305 *pentothenticus*; B12= *Bacillus* spp.; B40= *Bacillus* sp.

306

307 Os isolados B12 e B41 mostraram que seus produtos antibióticos foram capazes de
 308 inibir 67,88 % e 57, 66 %, respectivamente, o crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp.

309 *lycopersici*. Em trabalho realizado por Rollemberg (2008), para detecção de compostos
310 antifúngicos extracelulares termoestáveis, verificou-se que houve a produção de um composto
311 com essas características contra *Colletotrichum gloesporioides*, *C. acutatum* e *Glomerella*
312 *cingulata*. Furlani et al. (2007) obtiveram resultados contrários aos desta pesquisa, na qual
313 avaliando a inibição de crescimento de *Colletotrichum acutatum* em três condições diferentes,
314 caldo bacteriano, caldo bacteriano filtrado, e caldo bacteriano filtrado e autoclavado com
315 isolados de *B. subtilis*, não observou inibição ao crescimento do fitopatógeno em caldo
316 autoclavado.

317 No entanto, observação contrária foi constatado por Kupper et al (2009), investigando o
318 efeito dos metabólitos termoestáveis produzidos por *B. subtilis* na germinação de
319 *Colletotrichum acutatum* observaram que dos nove tratamentos de agente de controle, apenas
320 um isolado de *B. subtilis* não produziu metabólitos tóxicos termoestáveis em quantidades
321 suficientes para inibir a germinação do patógeno. Em um estudo anterior, Kupper et al. (2003)
322 avaliando 69 isolados de *Bacillus* spp., quanto à produção de metabólitos, verificaram com
323 exceção de dois isolados, que todos os outros tratamentos diferiram estatisticamente da
324 testemunha revelando que os metabólitos produzidos mostraram-se termoestáveis e
325 mantiveram suas atividades mesmo após autoclavagem.

326 Grande parte dos microrganismos envolvidos no controle biológico atua através de
327 antibiose, onde ocorre a interação entre organismos, um metabólito produzido por um deles
328 tem um efeito prejudicial sobre o outro. A produção de metabólitos pode resultar na completa
329 lise e dissolução da estrutura celular e independe do contato físico entre os microrganismos
330 (BETTIOL; GHINI, 1995), dessa forma, a busca por microrganismos antagonistas a fungos
331 fitopatogênicos tem aumentado (BENITEZ et al., 2004). Diversas espécies de *Bacillus* são
332 citadas como produtoras de antibióticos, podendo secretar metabólitos comercialmente
333 importantes, como enzimas aminolíticas e enzimas proteolíticas (BETTIOL; GHINI, 1995).

334 Gomes et al. (2001) selecionando e avaliando antagonistas para o controle biológico da
335 pinta-preta causada por *Cylindrocladium spathulatum* El-Gholl, observou a produção de
336 metabólitos por três isolados, sendo dois deles pertencente ao gênero *Bacillus*, já os outros
337 isolados pesquisados estimularam o crescimento do patógeno.

338 Os resultados desses experimentos dão indícios de que os isolados B12 (*Bacillus* sp.),
339 B41 (*B. cereus*) possam ser utilizados em experimentos de campo, devido à suas propriedades
340 antifúngicas já constada contra *Corynespora cassicola* (PAZ, 2010), *Pyricularia grisea*
341 (NASCIMENTO, 2009), e contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

342

343 **CONCLUSÃO**

344

345 No ensaio em que foi avaliado o antagonismo de isolados de *Bacillus* pelo Método do
346 Círculo, os isolados B12 (*Bacillus* spp.), B41 (*Bacillus cereus*), B22' (*Bacillus*
347 *pentothenicus*), B45 (*Bacillus cereus*) e B47 (*Bacillus cereus*), apresentaram as menores
348 médias de crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Os isolados B12
349 (*Bacillus* spp.) e B41 (*Bacillus cereus*) foram os mais eficientes na produção de metabólitos,
350 inibindo o crescimento micelial do *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, sendo a antibiose seu
351 principal mecanismo de ação.

352

353 **REFERÊNCIAS**

354

355 ALVARENGA, M. A. R.; Origem, botânica e descrição da planta. In: ALVARENGA, M. A.
356 R. et al. (Eds.) **Tomate: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia.**
357 Lavras: Editora UFLA, 2004. p. 15-18.

358

359 AMORIM, E.P. R.; MELO, I.S.; Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora*
360 *parasítica* e *Phytophthora citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de
361 citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.2, p.565-568, 2002.

362

363 BENITEZ, T., RINCON, AM, LIMON, MC, E CÓDON, AC. Biocontrol mechanisms of
364 *Trichoderma* strains. Int. **Microbiologia** v.7, p. 249-260. 2004

365

366 BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN, A. F.; KIMATI, H.;
367 AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos.** 3.ed. São Paulo:
368 Agronômica Ceres, p.717-728, 1995.

369

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

373

374 FILGUEIRA, F.A.R. **Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e**
375 **comercialização de hortaliças.** Viçosa: UFV, 2000, 421p.

376

- 377 FURLANI, A.C.F.A.; CAMARGO, M.; PANIZZI, R. de C.; PEREIRA, C. F. Atividade de
378 células, filtrado e autoclavado de *Bacillus* spp. como bioagentes de controle de
379 *Colletotrichum acutatum*. **Científica**, Jaboticabal, v.35, n. 2, p. 196-200, 2007.
- 380
- 381 GOMES, N. S. B.; JÚNIOR, A. G.; AUER, C.G.; Seleção de antagonistas para o controle de
382 *Cylindrocladium spathulatum* em erva-mate. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.43,
383 p.123-138. 2001.
- 384
- 385 IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. SIDRA. **Tomate**.
386 Produtividade de 2011. Disponível em: [http:// www.ibge.com.br](http://www.ibge.com.br). Acesso em: 10 de abr. de
387 2012.
- 388
- 389 JULIATTI, F. C. Manejo integrado de fungos fitopatogênicos. *In*: SILVA, L. H. C. da P.;
390 CAMPOS, J. R.; NOJOSA, G. B. de A. **Manejo integrado: doenças e pragas em hortaliças**.
391 Lavras, UFLA, p. 159- 220, 2001.
- 392
- 393 KUPPER, K.C., GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. de. Controle biológico de
394 *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia**
395 **Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 251-257, 2003.
- 396
- 397 KUPPER, K.C.; BELLOTTE, J.A.M.; GOES, A. de. Controle alternativo de *Colletotrichum*
398 *acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Revista Brasileira de**
399 **Fruticultura**, Jaboticabal, v.31, n.4, p. 1004-1015, 2009.
- 400
- 401 LEELASUPHAKUL, W.; HEMMANEE, P.; CHUENCHITT, S. Growth inhibitory properties
402 of *Bacillus subtilis* strains and their metabolite against the green mold pathogen (*Penicillium*
403 *digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Curitiba, v.48, p.113-
404 121, 2008.
- 405
- 406 LOPES, C. A.; REIS, A.; ÁVILA, A. C. de. Doenças do tomateiro para mesa causadas por
407 fungos, bactérias e vírus. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v.24. n.219, p. 66-78,
408 2003.
- 409

- 410 MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógeno
411 de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v.1, p. 369-409, 1993.
412
- 413 MELO, F.M.P. Atividade antifúngica de metabólitos secundários produzidos pelo endófito de
414 mandioca *Bacillus pumilus* MAIIM4a. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) Escola
415 Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005,
416 84p.
417
- 418 MENTEN, J.O.M.; MINUSSI, C.C.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas
419 no crescimento micelial de *Macrophominia phaseolina* (Tass.) Goid. “in vitro”.
420 **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.
421
- 422 NASCIMENTO, I. O. Isolamento, identificação e seleção de *Bacillus* spp. para o biocontrole
423 de fitopatógenos do arroz. **Dissertação** (Mestrado em Agroecologia) Universidade Estadual
424 do Maranhão, São Luís, 2009. 109p.
425
- 426 PAZ, D.S. da. Ação inibitória de extratos vegetais, óleo de nim, produtos abióticos e *Bacillus*
427 sobre *Corynespora casiiicola*, agente da mancha-alvo do mamoeiro. **Dissertação** (Mestrado
428 em Agroecologia) Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2010. 64p.
429
- 430 PUSEY, P. L.; WILSON, C. L. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by
431 *Bacillus subtilis*. **Plant Disease**, n. 68, St. Paul, p. 753-756, 1984.
432
- 433 REIS, A BOITEUX, L. S.; GIORDANDO, L. de B.; COSTA, H.; LOPES, C. A. **Ocorrência**
434 **de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 em tomate no Brasil e seleção de novas**
435 **fontes de resistência ao patógeno**. Brasília; Embrapa Hortaliças, 2004, 35 p.
436
- 437 ROLLEMBERG, C. L. Mancha das folhas da macieira: Caracterização fisiológica dos agentes
438 causais, controle biológico com bactérias residentes do filoplano e sensibilidade dos
439 antagonistas a fungicidas e inseticidas. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) Universidade
440 Federal do Paraná, Curitiba, 2008, 124p.
441
- 442 SANTOS, C.F.C., CASTRO, H.A., BETTIOL, W.; ANGELI JÚNIOR, A. Sensibilidade *in*
443 *vitro* de urediniosporos de *Puccinia psidii* a *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**.

444 Jaboticabal, v.24, n.2 p.183-185, 1998.

445

446 SHIOMI, H.F. Bioprospecção de bactérias endofíticas como agentes de biocontrole da
447 mancha de *Exserohilum turcicum* e como promotoras de crescimento de plantas de milho (*Zea*
448 *mays*). **Tese** (Doutorado em Agronomia) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
449 Filho, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu- SP, 2007, 57p.

450

451 VIEIRA JÚNIOR, J.R. Procariotas residentes do filoplano do feijoeiro como agentes de
452 biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. **Tese** (Doutorado), Universidade
453 Federal de Viçosa, Viçosa, 2005, 146p.

Capítulo III**AVALIAÇÃO *in vitro* DE ISOLADOS DE *Trichoderma*
spp. SOBRE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.**

32 **EVALUATION *in vitro* OF *Trichoderma* spp. ISOLATES ON *Fusarium oxysporum* f.**
33 ***sp. lycopersici*.¹**

34
35 ODENILSON DE DEUS RIBEIRO LIMA², ANTONIA ALICE COSTA RODRIGUES²

36
37
38 **ABSTRACT** - The objective of this study was to evaluate the antagonism and quality of
39 metabolites produced by *Trichoderma* spp. in controlling mycelial against *F. oxysporum* f. sp.
40 *lycopersici*. In pairing cultures, ten *Trichoderma* were evaluated in Petri dishes contending
41 PDA medium on which are placed discs of the pathogen and the antagonist and incubated at
42 room temperature for five days. The antagonism was assessed on a scale of classes 1 to 5. The
43 *in vitro* effect of volatile metabolites was evaluated in Petri dishes containing PDA medium
44 by the method of overlapping plates. We used ten isolates of *Trichoderma* spp., And each
45 treatment consisted of a single most control, with five repetitions. The antagonistic action
46 through the production of toxic metabolites was evaluated by membrane filtration. The
47 evaluation was made after seven days by measuring unidirectional growth of the pathogen.
48 The experimental design was completely randomized with five replicates. Differences
49 between means were determined by the Tukey test at 5%. All isolates differ from the control
50 on the antagonistic action of *Trichoderma*, showing very efficient in inhibiting the mycelial
51 growth of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, but there was no significant difference among the
52 isolates. Through the technique of overlapping plates, the isolates that showed the best results
53 were T7 and T8, which inhibited 24.5% of mycelial growth of the pathogen, standing out
54 from the others, yet this inhibition was not less than 50%, and Then, the isolates classified as
55 inefficient. Regarding the assessment of the effect of metabolites not volatéis, isolates that
56 showed the best results were T3, T10, T11, T12, T13, and T14, differing from the others,
57 stand out isolates T12 and T14 for presenting percentage greater than 50% inhibition, and
58 these isolates also classified as moderately effective.

59
60
61
62 **Keywords:** *Solanum lycopersicon* L., Antagonism, *Trichoderma* spp.

63

64 INTRODUÇÃO

65

66 O tomateiro, *Solanum lycopersicon* L., pertence à família das Solanaceae, e apesar de
67 ser uma planta herbácea e perene, porém é cultivada como uma planta anual. A espécie
68 cosmopolita de tomateiro é oriunda de um estreito território limitado ao norte pelo Equador e
69 ao sul pelo norte do Chile. Antes da colonização espanhola, o tomate foi introduzido no
70 México, onde passou a ser cultivado e melhorado (FILGUEIRA, 2003). Em 2011, o Brasil
71 produziu 4,4 milhões de toneladas de tomate em 69.529 hectares de área plantada, havendo
72 um aumento tanto da produção quanto na área plantada da cultura em relação ao ano de 2010.
73 A região Nordeste destaca-se como a quarta maior produtora do tomate do país, com uma
74 produção de 611.764 toneladas. Dentre os estados do Nordeste o Maranhão ocupa a 6º
75 posição na produção de tomate com 4.739 toneladas em 228 hectares de área plantada (IBGE,
76 2011).

77 Embora se reconheça o potencial da tomaticultura, sabe-se que esta cultura está sujeita à
78 ocorrência de doenças influenciadas por fatores, como o clima, a cultivar plantada, a
79 qualidade da semente, o tipo de solo, o manejo da cultura, dentre outros, além da escassez de
80 medidas eficientes para o controle de patógenos.

81 A cultura do tomateiro está sujeita a doenças que podem limitar sua produção. Muitas
82 destas só podem ser controladas eficientemente quando é adotado um adequado programa de
83 manejo integrado, envolvendo o uso de variedades resistentes e a adoção de medidas de
84 exclusão, erradicação e proteção (KUROZAWA; PAVAN, 2005). Cerca de 200 doenças de
85 causas bióticas e abióticas são conhecidas afetando a tomaticultura em todo mundo. Várias
86 destas doenças podem ocorrer ao mesmo tempo, resultando em grandes danos e prejuízos ao
87 agricultor, podendo assim limitar a produção.

88 A Fusariose é uma das doenças de maior importância econômica que afetam o
89 tomateiro. O uso de cultivares resistentes constitui o método mais eficaz de controle desta
90 doença, no entanto existem algumas limitações como o nível de resistência parcial, e quase
91 sempre não está disponível aos produtores, principalmente no estado do Maranhão.

92 Nos métodos clássicos de controle biológico, enquanto os fungicidas possuem um efeito
93 temporário e necessitam de repetidas aplicações durante o ciclo das culturas, os antagonistas
94 são capazes de se estabelecer, colonizar e dispersar no ecossistema (ÁVILA et al. 2005). No
95 entanto, o aspecto mais importante a ser considerado, independente da estratégia utilizada, é

96 que esses agentes biológicos constituem alternativa viável para reduzir o potencial de inóculo
97 de patógenos habitantes do solo, sem trazer danos ao ambiente (MELLO et al., 2007).

98 Os fungos do gênero *Trichoderma* são de grande importância econômica para a
99 agricultura, haja vista que são capazes de atuarem como antagonistas no controle de doenças
100 de várias plantas cultivadas, promotores de crescimento e elicitores de plantas a doenças
101 (MOHAMED; HAGGAG, 2006; FORTES et al., 2007). Algumas linhagens desses fungos
102 vêm recebendo grande destaque por sua versatilidade de ação. Estas linhagens produzem
103 enzimas que degradam paredes celulares de outros fungos e também substâncias antifúngicas
104 (antibióticos), apresentam diversidade de mecanismos de sobrevivência que as tornam
105 altamente competitivas no ambiente e excelente capacidade de proliferação na rizosfera
106 (MELO, 1996, RESENDE et al., 2004). Ademais, certos isolados se mostram resistentes aos
107 defensivos químicos, característica que os fazem potenciais agentes biorremediadores
108 (RESENDE et al., 2004). Vários autores demonstram que os fungos do gênero *Trichoderma*
109 possuem diversas possibilidades para aplicação, tanto no biocontrole de patógenos foliares,
110 quanto no de patógenos radiculares.

111

112 MATERIAL E MÉTODOS

113

114 Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia localizado no Núcleo de
115 Biotecnologia Agrônômica – NBA da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, Campus
116 de São Luís, durante o período de setembro de 2010 a agosto de 2012. Após isolamento e
117 teste de patogenicidade do *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, os isolados foram
118 submetidos à três ensaios distintos que avaliaram a ação antagônica dos isolados de
119 *Trichoderma* spp.

120

121 **Obtenção, Isolamento e Teste de Patogenicidade de isolados de *F. oxysporum* f. sp. 122 *lycopersici* e *Trichoderma* spp.**

123

124 Foram utilizados os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e de *Trichoderma* spp.
125 da Micoteca “Prof^o Gilson Soares da Silva” – MGSS, do laboratório de Fitopatologia/UEMA,
126 preservados em solo autoclavado e meio de cultura BDA, respectivamente. Os isolados foram
127 selecionados e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-

128 Ágar (BDA), posteriormente foram repicados e transferidos para tubos de ensaio para
129 conservação de culturas puras dos isolados.

130 Para o teste de patogenicidade de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, o isolado foi
131 transferido para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e mantidas em condições
132 ambientes por sete dias. Após esse período, foi adicionado 20 mL de água destilada em cada
133 placa e, utilizando-se lâmina de vidro, foi efetuada a raspagem das colônias, em seguida com
134 o auxílio da câmara de Neubauer, a suspensão foi ajustada para 1×10^6 conídios.mL⁻¹ e
135 inoculadas em plantas de tomateiro com 30 dias de idade. A avaliação foi efetuada através da
136 incidência da Fusariose, para seleção do isolado mais virulento.

137 As observações para avaliar a ação antagonística dos isolados de *Trichoderma* spp. ao *F.*
138 *oxysporum* foram realizadas com base nos seguintes teste *in vitro*.

139

140 **Ação antagonística *in vitro* dos isolados *Trichoderma* spp. a *F. oxysporum* f. sp. 141 *lycopersici* - Método do Pareamento das Culturas**

142

143 O antagonismo de dez isolados de *Trichoderma* contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*
144 foi avaliado pelo método de culturas pareadas, conforme descrito por Mello et al. (2007). O
145 pareamento foi realizado em placas de Petri contendo meio BDA, nas quais foram colocados
146 discos do patógeno e do antagonista e incubadas a temperatura ambiente, durante cinco dias.
147 Para cada tratamento foram aplicadas cinco repetições. As testemunhas consistiram de placas
148 contendo somente os isolados do patógeno. Foram observadas as características culturais dos
149 isolados de *Trichoderma* pareados com *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

150 De acordo com o crescimento em placa, o antagonismo foi enquadrado numa escala
151 com classes de 1 a 5, proposta por Bell et al. (1982) onde:

152 Classe 1 : o antagonista cobrirá a totalidade da superfície da placa;

153 Classe 2 : o antagonista cobrirá ao menos, 2/3 da superfície da placa;

154 Classe 3 : o antagonista cobrirá, ao menos, 50% da superfície da placa;

155 Classe 4 : o patógeno cobrirá, ao menos, 2/3 da superfície da placa;

156 Classe 5 : o patógeno cobrirá a totalidade da superfície, anulando o antagonista.

157

158 **Produção de metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. e o seu efeito sobre o 159 crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici***

160

161 Baseado no método de Bharat et al. (1980), foi estudado o efeito *in vitro* de metabólitos
162 voláteis de célula desses isolados de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *F.*
163 *oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Placas de Petri contendo meio BDA foram posicionadas umas
164 sobre as outras, sendo colocado previamente na parte inferior um disco de ágar de 5 mm do
165 antagonista e na parte superior o fitopatógeno. As placas foram vedadas com membrana
166 plástica e em seguida incubadas a 25° C, com fotoperíodo de 12 h por sete dias. Para a
167 testemunha utilizou-se apenas os discos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* tanto na parte
168 inferior quanto na parte superior. Foram utilizados dez isolados de *Trichoderma* spp., e cada
169 tratamento constou de um isolado mais testemunha. Para cada tratamento foram aplicadas
170 cinco repetições.

171

172 **Teste *in vitro* da ação antagônica dos isolados *Trichoderma* spp. a *F. oxysporum***
173 ***lycopersici*, através da produção de metabólitos**

174

175 A produção de substâncias tóxicas de dez isolados de *Trichoderma* spp. foi avaliada
176 após o crescimento dos isolados em meio líquido BD (200g de batata, 20g de dextrose, para
177 1000 ml de água), incubados por 72 horas a 26 °C. Após esse período, alíquotas desse meio
178 foram pré-filtradas em papel filtro esterilizado e, em seguida, filtradas através de membrana
179 com porosidade de 0,22 µm. Finalizando a filtragem, alíquotas desse meio foram depositadas
180 em quatro perfurações equidistantes, feitas com auxílio de furador de rolhas (Ø4 mm) em
181 meio BDA. Um disco do patógeno foi colocado no centro dessas placas e incubados a 26 °C.
182 A avaliação foi realizada após sete dias pela medição unidirecional do crescimento do
183 patógeno.

184 O tratamento somente contendo água destilada e esterilizada - ADE, confrontado com o
185 patógeno foi a testemunha. O crescimento radial do patógeno foi avaliado através da medição
186 unidirecional com uma régua graduada (mm). A percentagem de controle de cada
187 microagente foi calculada e correspondeu ao crescimento micelial do patógeno sob influência
188 do microrganismo em relação à testemunha. Foi considerada a percentagem de inibição do
189 crescimento radial do patógeno para classificar os agentes microbianos devido à variação no
190 desenvolvimento da testemunha de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Foram designados
191 eficientes (E) os microrganismos que inibiram de 80 a 100 % o crescimento radial do
192 patógeno. Aqueles que controlaram entre 51 a 79 % foram considerados moderadamente
193 eficientes (M). Aos que inibiram menos de 50 %, foi atribuída a categoria ineficientes (I)
194 (LINHARES et al., 1995).

195 No delineamento experimental, os tratamentos foram dispostos num desenho
 196 inteiramente casualizado compreendendo cinco repetições. As diferenças entre as médias
 197 foram determinadas pelo teste de Tuckey a 5 %.

198

199 RESULTADOS E DISCUSSÃO

200

201 Teste *in vitro* da ação antagônica dos isolados *Trichoderma* spp. a *F. oxysporum* f. 202 sp. *lycopersici* - Método do Pareamento das Culturas

203

204 Todos os isolados se diferenciaram da testemunha quanto à ação antagônica de
 205 *Trichoderma*, mostrando bastante eficiência na inibição do crescimento micelial de *F.*
 206 *oxysporum* f. sp. *lycopersici*, porém não houve diferença significativa entre os isolados
 207 (Tabela 1).

208 **Tabela 1.** Crescimento micelial e percentual de ocupação em placa de isolados de *F.*
 209 *oxysporum* f. sp. *lycopersici* pareados com *Trichoderma* spp.

Tratamento	Crescimento Micelial*	Ocupação de Placa (%)	Parasitismo**	Nota***
T3	65,5b	65	-	2
T6	58,9b	65	+	2
T7	62,2b	65	-	2
T8	63,3b	50	+	3
T9	66,7b	100	+	1
T10	62,2b	100	+	1
T11	63,3b	65	+	2
T12	65,5b	65	+	2
T13	63,3b	65	+	2
T14	66,7b	65	+	2
TEST.	100a	-	-	-

210 * As médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si. Foi
 211 aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

212 ** Sobreposição do antagonista sobre o patógeno.

213 *** Nota atribuída de acordo com Bell et al., 1982.

214 Embora todos os isolados tenha se diferenciado da testemunha, não foi possível
215 observar, no teste de culturas pareadas, isolados com desempenho superior à média, haja vista
216 que estatisticamente, todos os isolados de *Trichoderma* foram iguais. No entanto, na pesquisa
217 realizada por Dennis e Webster (1971), foi relatado que o nível de controle pode variar não
218 somente em dependência do isolado, mas sim das adaptações às condições bióticas e abióticas
219 específicas, dentro e entre espécies de *Trichoderma*. Esse desempenho necessita, portanto, ser
220 examinado em bioensaios conduzidos sob condições controladas de campo.

221 Com exceção dos isolados T3 e T7, todos apresentaram parasitismo positivo, este
222 resultado reforça dados obtidos por outros autores, evidenciando que, além do parasitismo
223 direto, outros mecanismos podem estar envolvidos na ação antagônica de fungos do gênero
224 *Trichoderma*, tais como competição e micopredação (BENHAMOU; CHET, 1996; FRAVEL,
225 2005).

226 Na tabela 1 estão apresentados os resultados obtidos de acordo com a Escala de Bell et
227 al., 1982, observou-se que as maiores percentuais de ocupação em placa foram alcançados
228 pelos isolados T9 e T10, recebendo nota 1, pois cobriram a placa com totalidade, indicando
229 uma ação antagônica superior aos demais isolados. Porém, todos os isolados ocuparam pelo
230 menos 50 % da superfície do meio de cultura, esporulando e, em alguns casos, sobrepondo a
231 colônia do patógeno, sugerindo uma ação micoparasita. No entanto, em trabalhos de Louzada
232 et al (2009), com a avaliação ao microscópio eletrônico de varredura de isolados de
233 *Trichoderma*, mostraram quem nem todos os isolados promoveram o hiperparasitismo dos
234 patógenos.

235

236 **Antagonsismo de *Trichoderma* spp. a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Técnica das** 237 **Placas Sobrepostas**

238

239 Os dados do crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* foram registrados
240 de acordo com a Tabela 2. Através da técnica das placas sobrepostas foi possível avaliar o
241 efeito inibitório da produção de metabólitos dos isolados de *Trichoderma* spp. Os isolados T7
242 e T8 inibiram 24,5 % do crescimento micelial do patógeno, destacando-se dos demais, no
243 entanto, essa inibição não foi superior a 50 %, sendo então, os isolados classificados como
244 ineficientes de acordo com o critério proposto por Linhares et al. (1995).

245

246 **Tabela 2.** Crescimento Micelial e Percentual de Inibição de isolados de *F. oxysporum* f. sp.
 247 *lycopersici* submetidos aos metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp.

Tratamento	Crescimento Micelial*	Inibição (%)	Reação**
T3	4,8bc	15,8	I
T6	4,7bc	17,5	I
T7	4,3c	24,5	I
T8	4,3c	24,5	I
T9	4,55bc	20,0	I
T10	4,55bc	20,0	I
T11	4,7bc	17,5	I
T12	5,1abc	9,6	I
T13	5,2abc	8,8	I
T14	6,05a	NC	I
TEST.	5,7ab	-	-

248 * As médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si. Foi
 249 aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

250 ** Reação – Legenda: E = Eficiente (80 a 100 % de inibição sobre o crescimento radial do
 251 patógeno) M = Moderadamente eficiente (51 a 79 %) I = Ineficiente (menos de 50 %)
 252 (Linhares et al., 1995).

253

254 A produção de metabólitos voláteis dos dez isolados de *Trichoderma* spp. testados não
 255 apresentou o mesmo potencial antagônico que os isolados de *Trichoderma* estudos por
 256 Martins-Coder e Melo (1998), no antagonismo a *Verticillium dahliae* Kleb, e aos isolados de
 257 *Trichoderma harzianum* no controle de *Colletotrichum gloesporioides* (Penz.), em trabalhos
 258 de Santos et al. (2009).

259 O crescimento do fitopatógeno foi reduzido na presença de *Trichoderma* spp.,
 260 comparando com a testemunha, que ao quinto dia, já tomava quase 100 % da placa, o que está
 261 de acordo com Dennis e Webster (1971), os quais afirmaram que espécies de *Trichoderma*
 262 são eficientes produtoras de metabólitos voláteis que se propagam por difusão em meio de
 263 cultura. Esses autores explicam que os antibióticos voláteis atuam sobre os fungos suscetíveis
 264 através da inibição do crescimento micelial. Entre os metabólitos voláteis, há gases que
 265 afetam o crescimento microbiano.

266 Entre os efeitos provocados pelos antibióticos, podem ser observadas a redução ou
 267 paralisação do crescimento e esporulação, redução na germinação de esporos, além de
 268 distorções na hifa e endólise (BOMFIM et al., 2010). Os antibióticos são produtos do
 269 metabolismo secundário de seus produtores, e podem ser mais importantes na inibição de
 270 outros organismos do que a competição por nutrientes.

271 Todos os isolados testados quanto aos seus metabólitos voláteis apresentaram baixo
272 potencial inibidor do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, como
273 poder ser observado na Tabela 2. Dessa forma, foram classificados como ineficientes segundo
274 escala proposta por Linhares et al. (1995), já que não apresentaram inibição superior a 50 %,
275 sendo os metabólitos dos isolados T7 e T8 os que mais se aproximaram dessa faixa,
276 alcançando 24,5 % de inibição de crescimento em relação a testemunha.

277 Esse resultado, contudo, não deprecia o potencial antagônico de *Trichoderma* spp.
278 contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, uma vez que já foi evidenciado em trabalhos
279 anteriores, o potencial de biocontrole do parasitismo direto de outros isolados maranhenses
280 analisados. Sendo assim, os resultados obtidos contribuem para a utilização dos isolados de
281 *Trichoderma* como agentes de biocontrole, uma vez que foi verificada a presença de duas das
282 principais ferramentas de antagonismo em estudo, a antibiose e o micoparasitismo. Essas
283 ferramentas, quando em conjunto, atuam para aumentar a eficiência do agente de biocontrole.
284 A baixa inibição de crescimento dos isolados sugere que essa ferramenta seja utilizada como
285 complemento de outras técnicas de manejo de doenças de plantas, uma vez que o seu
286 desempenho possui a vantagem de ter um maior raio de ação, não necessitando do contato
287 direto entre fitopatógeno e agente de biocontrole.

288

289 **Teste *in vitro* da ação antagônica dos isolados *Trichoderma* spp. a *F. oxysporum*** 290 ***lycopersici*, através da produção de metabólitos**

291

292 Com relação à avaliação do efeito de metabólitos não voláteis, através técnica da
293 membrana filtrante, foi possível avaliar o efeito inibitório da produção de metabólitos não
294 voláteis dos isolados de *Trichoderma* spp. Os isolados que apresentaram os melhores
295 resultados foram T3, T10, T11, T12, T13, e T14, diferenciando-se dos demais, de acordo com
296 o teste de Tukey a 5 % de probabilidade, destacam-se os isolados T12 e T14 por apresentarem
297 percentual de inibição superior a 50 %, sendo estes isolados também classificados como
298 moderadamente eficientes de acordo com o critério proposto por Linhares et al. (1995),
299 Tabela 3.

300

301

302

303 **Tabela 3.** Crescimento Micelial e Percentual de Inibição de isolados de *F. oxysporum* f. sp.
 304 *lycopersici* submetidos aos metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp.

Tratamento	Crescimento Micelial*	Inibição (%)	Reação**
T3	7,5bc	16,7	I
T6	8,6a	4,5	I
T7	8,2ab	8,9	I
T8	8,9a	1,1	I
T9	8,9a	1,1	I
T10	6,7cd	25,5	I
T11	8,6a	4,5	I
T12	3,8e	57,8	M
T13	6,1d	32,2	I
T14	2,8e	68,9	M
TEST.	9,0a	-	-

305 * As médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si. Foi
 306 aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

307 ** Reação - Legenda: E = Eficiente (80 a 100 % de inibição sobre o crescimento radial do
 308 patógeno) M = Moderadamente eficiente (51 a 79 %) I = Ineficiente (menos de 50 %)
 309 (Linhares et al., 1995).

310

311 Os isolados T12 e T14 proporcionaram maior ação antagônica no crescimento do
 312 fitopatógeno, em comparação aos outros. A melhor ação antagônica nesses tratamentos poder
 313 ser resultado de uma maior produção de protease e cisteína, enzimas produzidas pelas
 314 espécies de *Trichoderma* que inativam a capacidade enzimática do fitopatógeno.

315 Ao compararmos os tratamentos com a testemunha foi observado que os isolados T6,
 316 T7, T8, T9 e T11 não foram eficientes, pois o patógeno cobriu quase que 100 % das placas.
 317 Os metabólitos não voláteis produzidos pelos antagonistas provocam um desenvolvimento
 318 micelial menos denso, reduzindo o tamanho da colônia do patógeno.

319 Entre os efeitos provocados pela antibiose, podem ser observados a redução ou
 320 paralisação do crescimento e esporulação, redução na germinação de esporos, além de
 321 distorções na hifa e endólise. Os antibióticos são produtos do metabolismo secundário de seus
 322 produtores, e podem ser mais importantes na inibição de outros organismos do que a
 323 competição por nutrientes.

324 Além de antibióticos, isolados de *Trichoderma* spp. produzem enzimas, como a
 325 celulase e hemicelulase, as quais degradam materiais lignocelulolíticos e causam danos à
 326 parede de células da fungos fitopatogênicos (MELO, 1996).

327 O antagonismo ocasionado pela produção de metabólitos secundários não voláteis,
 328 mesmo não apresentando amplo espectro de ação, é eficiente pelo contato direto destas

329 substâncias entre antagonista e fitopatígeno. A antibiose é o único mecanismo de ação
330 observado e evidenciado nesse tipo de bioensaio, pois a produção de metabólitos não leva em
331 consideração a ação direta de antagonista, e sim de produtos secundários do seu metabolismo.

332 Em trabalhos realizados por Sánchez et al. (2007), foi observado que o parasitismo de
333 *T. longibrachiatum* em *Thielaviopsis paradoxa* foi feito através da produção de enzimas
334 extracelulares que degradaram os constituintes da parede celular e de metabólitos difusíveis
335 não voláteis que também foram envolvidos no antagonismo por *Trichoderma* sp. No entanto,
336 a capacidade de biocontrole depende de vários outros fatores, além da antibiose, como a
337 micopredação, o micoparasitismo e a competição, sendo estes mecanismos verificados
338 somente com o confronto direto entre antagonista e fitopatígeno.

339

340 CONCLUSÃO

341

342 No primeiro bioensaio, em que foi avaliado o antagonismo de *Trichoderma* spp. pelo
343 Pareamento de Culturas, todos os isolados diferiram da testemunha, porém não houve
344 diferença estatística entre os isolados. No segundo bioensaio, avaliando o antagonismo pela
345 ação de metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma*, os isolados T7 e T8 inibiram
346 24,5% do crescimento micelial do patógeno. No terceiro bioensaio, avaliando o efeito
347 inibitório de metabólitos não voláteis, T3, T10, T11, T12, T13 e T14, diferenciando-se dos
348 demais, destacando-se T12 e T14, por apresentarem percentual de inibição superior a 50 %,
349 sendo estes isolados também classificados como Moderadamente Eficientes. O controle
350 biológico, através de introdução de antagonistas, pode ser considerado uma alternativa viável
351 para o controle de enfermidades de acordo com estudos *in vitro*.

352

353 REFERÊNCIAS

354

355 ÁVILA, Z.R., CARVALHO, S.S., BRAÚNA, L.M., GOMES, D.M.P.A., SILVA, M.C.F;
356 MELLO, S.C.M. **Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Sclerotium rolfsi***
357 **e *Sclerotinia sclerotiorum*.** Embrapa Recursos Genéticos, Brasília, 2005, 30p. (Boletim
358 Técnico de Desenvolvimento e Pesquisa 177).

359

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

362

363 BENHAMOU, N.; CHET, I. Parasitism de Sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma*
364 *harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. **Phytopathology** 86: p.
365 405-416, 1996.

366

367 BHARAT, R.; SINGH, V.N.; SINGH, D.B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of
368 *Aspergillus* spp.. **Plant and Soil**, v.57, p.131-135, 1980.

369

370 BOMFIM, M. P.; SÃO JOSÉ, A. B.; REBOUÇAS, T. N. H.; ALMEIDA, S. S. de; SOUZA, I.
371 V. B.; DIAS, N. O. Avaliação antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus*
372 *stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa phytopathol.**, Botucatu, v. 36, n. 1, Mar.
373 2010 .

374

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

378

379 FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e
380 comercialização de hortaliças. 2. ed. Viçosa: UFV, p. 193-214, 2003.

381

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

385

386 FRAVEL, D.R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Ann. Rev.**
387 **Phytopathol.** N. 43, p. 337-359, 2005.

388

389

390 IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. SIDRA. **Tomate.**
391 Produtividade de 2011. Disponível em: [http:// www.ibge.com.br](http://www.ibge.com.br). Acesso em: 10 de abr. de
392 2012.

393

394 KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. P. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H. et al. (Eds.).
395 **Manual de fitopatologia**: doenças de plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica
396 Ceres, v. 2, p. 607- 626, 2005.

397

398 LINHARES, A. I; MATSUMURA, A. T. S.; LUZ, V. C. Avaliação da Amplitude
399 Antagônica de Microrganismos Epífitas do Trigo sobre o Crescimento Radial de

- 400 *Dreschlera tritici-repentis*. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 1, nº. 3, p. 119-126, Set-
401 Dez., 1995.
- 402
- 403
- 404 LOUZADA, G.A.S.; CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; LOBO JÚNIOR, M.,
405 MARTINS, I.; BRAÚNA, L.M. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct
406 agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*, 2009.
407 **Disponível em:** <http://www.biotaneotropica.org.br>. Acesso em : jul. de 2012.
- 408
- 409 MARTINS-CORDER, M. P.; MELO, I. S. de. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. a
410 *Verticillium dahliae* Kleb. **Scientia Agricola** vol. 55 n. 1, Piracicaba Jan./Apr., 1998.
- 411
- 412 MELO, I. S. de. *Trichoderma* e *Gliocladium* como Bioprotetores de plantas. In: **Revisão**
413 **anual de patologia de plantas** . LUZ, W. C. (Ed.) Passo Fundo, RS, Gráfica Editora Pe.
414 Berthier, 1996. 415 p.
- 415
- 416 MELO, I.S. Agentes microbianos no controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S. e
417 AZEVEDO, J.L. (Eds.) **Controle Biológico**, v.1. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, p.17-67, 1998.
- 418
- 419 MELLO, S.C.M., ÁVILA, Z.R., BRAÚNA, L.M., PÁDUA, R.R.; GOMES, D. Cepas de
420 *Trichoderma* para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Fitosanidad** p. 3-9, 2007.
- 421
- 422 MOHAMED, H.A.L.A.; HAGGAG, W.M. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of
423 *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. **Braz. J. Microbiol**, v. 2, nº 37: p.
424 181-191, 2006.
- 425
- 426 RESENDE, M.L., OLIVEIRA, J.A., GUIMARÃES, R.M., VON, R.G.P; VIEIRA, A.R.
427 Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de
428 crescimento. **Cienc. Agrotec.** v. 4 nº 28: p. 793-798, 2004.
- 429
- 430 SÁNCHEZ, V.; REBOLLEDO, O.; PICASO, R.M.; CÁRDENAS, E.; CÓRDOVA, J.;
431 GONZÁLEZ, O.; SAMUELS, G. J. *In vitro* antagonismo of *Thielaviopsis paradoxa* by
432 *Trichoderma longibrachiatum*. **Mycopathologia** 163: p. 49-58, 2007.
- 433
- 434 SANTOS, R. L.; BOMFIM, M. P.; FUMES, L. A. A.; REBOUÇAS, T. N. H.; SÃO JOSÉ, A.
435 R. Produção de metabólitos por *Trichoderma harzianum* no controle *in vitro* de

436 *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) do maracujazeiro. In: **XLII Congresso Brasileiro de**
437 **Fitopatologia**, 2009, Rio de Janeiro. Triopica Plant Pathology, v. 34. p. 57, 2009.

438

439

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

ANEXOS