

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

ASPECTOS DA INTERAÇÃO ARROZ-*Trichoderma* spp. EM SOLOS ALAGADOS

Marcus André Kurtz Almança
Engenheiro Agrônomo/UFSM

Tese apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia
Área de Concentração Fitossanidade

Porto Alegre (RS), Brasil
Dezembro de 2008

(Página de homologação e ficha catalográfica: a serem inseridos)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por todos os momentos vividos durante o doutorado, pela força nos momentos de dificuldade e angústia, mas principalmente pelos ótimos momentos, abençoados com vitórias e conquistas.

À minha família, meu pai José Moacir, minha mãe Celeni e meus irmãos Leonardo e Karin que com certeza sem eles não teria chegado nem perto das conquistas que tive. Vocês são a base de tudo.

À Josana Rodrigues por todos os momentos que vivemos juntos, pelo apoio e pela companhia durante esta fase da minha vida.

À Profa. Aida Matsumura pela amizade, atenção, orientação e apoio incondicionais, em todos os momentos ao longo destes anos. Obrigado pela amizade acima de tudo e pelos grandes ensinamentos.

Ao Prof. João Lúcio de Azevedo, que apesar do pouco convívio, muitos ensinamentos puderam ser aprendidos.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Fitossanidade, em especial ao Prof. Valmir Duarte.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Fitopatológica, Isabel, Rita, Priscila, Márcia, Alexandre e Precila, pelo convívio, troca de idéias, matezitos e “discussões acirradas”. Obrigado pela amizade.

Aos demais colegas do Departamento de Fitossanidade.

As amigas Paula, Tatiana, Thanise, Fabiane, pela companhia, conversas e apoio durante o curso. Obrigado pela amizade.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Departamento de Fitossanidade e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio neste trabalho e oportunidade de desenvolvimento intelectual.

ASPECTOS DA INTERAÇÃO ARROZ-*Trichoderma* spp. EM SOLOS ALAGADOS¹

Autor: Marcus André Kurtz Almança
Orientadora: Aida Terezinha Santos Matsumura
Co-Orientador: João Lúcio de Azevedo

RESUMO

Espécies de *Trichoderma* são bastante estudadas atualmente para o controle biológico de fitopatógenos habitantes do solo e para a promoção de crescimento de plantas. Entretanto, cada vez mais se busca conhecer o comportamento deste antagonista em diferentes ambientes e os possíveis mecanismos envolvidos na sua interação com as plantas e os fitopatógenos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de isolados de *Trichoderma* spp. em ambiente alagado, cultivado com diferentes cultivares de arroz e os possíveis mecanismos que podem estar envolvidos nesta interação. Em todo o trabalho foram utilizados seis isolados de *Trichoderma* spp. e sete cultivares de arroz. Foram analisadas a sobrevivência em solo sob inundação, emergência, massa seca e altura de plantas de diferentes cultivares de arroz, além da produção de protease, AIA e sideróforos. Verificou-se que os isolados de *Trichoderma* spp. testados sobreviveram em solo sob inundação e ainda aumentaram a sua população nestas condições. Os isolados THAR e TSP2 proporcionaram efeito negativo na emergência das plantas das cultivares 416 e 418. Quanto à altura somente o isolado TSP2 foi superior a testemunha na cultivar 421. Entretanto, houve diferença significativa entre os isolados nas cultivares 418 e 420. Na variável peso seco houve diferença entre os isolados, mas nenhum foi superior a testemunha na cultivar 416. Na comparação das cultivares quando tratadas com o mesmo isolado, observou-se que na emergência de plantas, houve diferença na testemunha e no isolado TSP2. Para altura de plantas houve diferença das cultivares dentro dos tratamentos e também na testemunha. Para peso seco somente houve diferença na testemunha. Todos os isolados produziram sideróforos, com a mesma intensidade de cor. Quanto à produção de AIA, três dos cinco isolados testados produziram este composto, com destaque para o isolado TARV. Todos os isolados testados produziram proteases, porém houve diferença entre isolados no diâmetro da colônia. Conclui-se que *Trichoderma* spp. é capaz de sobreviver em solo sob inundação e também apresenta um comportamento diferenciado com cultivares de arroz. Além disto, os isolados testados produzem compostos que podem estar envolvidos nos mecanismos de controle de fitopatógenos e promoção de crescimento de plantas de arroz.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (60 p.) Dezembro, 2008.

ASPECTS OF INTERACTION RICE-*Trichoderma* spp. IN PADDY SOILS²

Author: Marcus André Kurtz Almança
Adviser: Aida Terezinha Santos Matsumura
Co-Adviser: João Lúcio de Azevedo

ABSTRACT

Trichoderma spp. are extensively studied for the biological control of soil borne plant pathogens and to promote growth of plants. However, it is necessary to keep studying the behavior of the antagonist in different environments and the possible mechanisms involved in its interaction with plants and plant pathogens. The purpose of this study was to evaluate the survival ability of isolates of *Trichoderma* spp. in an flooded environment with different rice varieties and the possible mechanisms that acting in this interaction. Six *Trichoderma* spp. isolates and seven rice cultivars were used in this experiments. The survival in paddy soil, plant emergency, dry weight and height of different rice cultivars of rice in addition to the production of protease, IIA and siderophores by the strains were evaluated. We observed that the isolates of *Trichoderma* spp. tested survived in paddy soil and also increased the population in these conditions. The isolates THAR and TSP2 caused negative effect on the emergence of the plants of cultivars 416 and 418. As for the height alone the isolate TSP2 was higher than control in cultivar 421. However, there was a significant difference between the isolates in the cultivars 418 and 420. In variable dry weight there was difference only between isolates, but none was higher than the control in cultivar 416. In the comparison of cultivars when treated with the same isolate, it was observed that in emergence of plants there was a difference in the control and in isolate TSP2. For height of plants there was a difference of cultivars within the treatments and also in control. For dry weight only difference was alone in control. All isolates produced siderophores, with the same intensity of color. As for the production of IIA, three of the five isolates tested produced this compound, with an emphasis on the isolate TARV. All isolates produced proteases, but there was difference between isolates in colony diameter. So it appears that *Trichoderma* spp. is able to survive in paddy soil and also presents a different behavior with cultivars of rice. In addition, it isolates the producing compounds that may be involved in the mechanisms of control of plant pathogens and promote growth of rice plants.

² Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (60 p.) December, 2008.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 A cultura do arroz.....	4
2.2 <i>Trichoderma</i> spp.	8
2.2.1 Enzimas líticas.....	11
2.2.2 Metabólitos bioativos.....	15
2.2.3 Promoção de crescimento.....	17
2.2.4 Competição por nutrientes.....	20
2.2.5 Disponibilização de nutrientes.....	22
2.2.6 Fatores ambientais que afetam a ação de <i>Trichoderma</i> spp.	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e cultivares de arroz.....	25
3.2 Identificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	25
3.3 Sobrevivência de <i>Trichoderma</i> spp. em solo alagado com lâmina de água.....	26
3.4 Comportamento de cultivares de arroz inoculadas com isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	28
3.5 Produção de ácido indol acético por isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	29
3.6 Produção de protease por isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	30
3.7 Produção de sideróforos por isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1 Identificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	32
4.2 Sobrevivência de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em solo alagado	32
4.3 Interação <i>Trichoderma</i> spp. e plantas de arroz.....	35
4.4 Produção de AIA, sideróforos e atividade proteásica por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. como possíveis mecanismos envolvidos na promoção de crescimento.....	42
5 CONCLUSÕES.....	50
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Espécies de <i>Trichoderma</i> dos respectivos isolados utilizados nos experimentos. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2007.....	32
2. População de <i>Trichoderma</i> spp. em solo sob irrigação por inundação, com lâmina de água, comparando todos os tratamentos testados. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2007.....	33
3. População de <i>Trichoderma</i> spp. em solo sob irrigação por inundação, com lâmina de água, comparando a média dos tratamentos que continham plantas de arroz com aqueles que não continham. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2007.....	33
4. Emergência de plantas de arroz, cultivares IRGA 409, 410, 416, 417, 418, 420 e 421, inoculadas com três bioformulados à base de <i>Trichoderma</i> spp. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2006.....	36
5. Altura de plantas de arroz, cultivares IRGA 409, 410, 416, 417, 418, 420 e 421, inoculadas com três bioformulados à base de <i>Trichoderma</i> spp. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2006.....	39
6. Massa seca da parte aérea de plantas de arroz, cultivares IRGA 409, 410, 416, 417, 418, 420 e 421, inoculadas com três bioformulados à base de <i>Trichoderma</i> sp. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2006.....	40
7. Produção de ácido indol acético (AIA) por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2007.....	43
8. Produção de sideróforos por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2007.....	44
9. Atividade proteásica de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2007.....	48

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Vista geral do experimento em casa de vegetação, mostrando a disposição dos tratamentos com e sem plantas de arroz. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2007.....	26
2. Visualização da lâmina de água mantida sobre o solo das unidades experimentais 15 dias após a emergência das plantas, nos vasos com e sem plantas de arroz. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2007.....	27
3. Unidade experimental com indicação onde foi realizada a aplicação de <i>Trichoderma</i> spp. e onde foram realizadas as coletas de solo. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2007.....	27
4. Bandejas plásticas contendo copos com mesmo bioformulado aplicado via semente em arroz. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2006.....	29
5. Placas de Petri com colônias de <i>Trichoderma</i> spp. mostrando o nível populacional nas amostras de solo coletadas no final do experimento. Placas destacadas pelo retângulo vermelho referem-se as testemunhas. Demais placas referem-se aos tratamentos com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. com e sem plantas de arroz. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2007.....	34
6. Crescimento de <i>Trichoderma</i> sp. sobre sementes de arroz, (A) semente de arroz que não germinou e (B) semente de arroz germinada. Setas vermelhas indicam o crescimento de <i>Trichoderma</i> sp. e seta verde indica caulículo da planta de arroz. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2006.....	38
7. Produção de sideróforos por isolado de <i>Trichoderma</i> spp., frascos com coloração azul significa resultado negativo (testemunha) e de coloração amarelo-avermelhada (isolado THAR). Porto Alegre, RS, UFRGS. 2007.....	45

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é afetado por diversas doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides ou de origem fisiológica e, mais recentemente por vírus. As doenças fúngicas têm mostrado maior importância, com destaque para a brusone causada por *Magnaporthe grisea*. Nos últimos anos outras doenças fúngicas tem adquirido importância como a queima e a mancha das bainhas causadas respectivamente por *Rhizoctonia solani* e *Rhizoctonia oryzae*, a mancha das glumas causada por vários fungos e a mancha parda causada por *Cochliobolus miyabeanus*. Além dessas, a virose conhecida como enrolamento do arroz aumenta cada vez mais sua importância no estado do Rio Grande do Sul.

O controle biológico muitas vezes é tratado como a interação do patógeno com o antagonista. No entanto, é essencial considerarmos nesta interação o hospedeiro, as condições ambientais e a amplitude de outros microrganismos que interagem, inclusive microrganismos não-patógenos.

Para o controle de algumas dessas doenças, como a queima das bainhas, a mancha das bainhas e o enrolamento do arroz, têm sido estudado o uso de *Trichoderma* spp. que é um fungo de ocorrência natural na maioria dos solos, sendo esse o seu ambiente preferencial de crescimento e desenvolvimento, suas características de antagonismo são melhor expressadas nesse ambiente.

Os mecanismos de ação utilizados por *Trichoderma* spp. para o biocontrole de fitopatógenos baseiam-se na competência rizosférica, através da competição por nutrientes e espaço, na antibiose através da produção de antibióticos, no parasitismo ou

hiperparasitismo através da produção de enzimas líticas da parede celular, como quitinases, glucanases, celulases e proteases e na indução de resistência. Adicionalmente a exploração de características de biocontrole de doenças de arroz, a introdução de microrganismos específicos no ambiente pode proporcionar efeitos benéficos nas plantas. Inúmeros relatos têm demonstrado esta estimulação no crescimento e desenvolvimento das plantas.

Espécies de *Trichoderma* são conhecidas por suas habilidades em controlar fungos fitopatogênicos. Entretanto, este antagonista tem apresentado ainda uma habilidade de promover o crescimento de plantas através da disponibilização de nutrientes, produção de fatores de crescimento, aumento da capacidade de obtenção de nutrientes no solo, competição por nutrientes, indução de resistência e competência rizosférica, que está relacionada com a habilidade do microrganismo se estabelecer na rizosfera das plantas e estar sujeito às influências do ambiente e competição com outros microrganismos. Porém, muitos destes mecanismos ainda não estão bem esclarecidos para *Trichoderma* spp. e quais deles atuam em determinadas interações fungo-planta.

Apesar de muitos trabalhos já terem sido realizados com *Trichoderma* spp., pouco se conhece da interação deste microrganismo com plantas de arroz e possivelmente nada se conhece da interação deste fungo com diferentes cultivares desta espécie. Então, neste trabalho buscou-se entender a interação de *Trichoderma* sp. e plantas de arroz, e possíveis mecanismos que podem estar envolvidos nesta interação.

Para tanto, nesta pesquisa foram formuladas as seguintes hipóteses para as espécies de *Trichoderma* sp.: (a) são capazes de sobreviver em ambiente sob alagamento; (b) apresentam interações diferenciadas com plantas de arroz e (c) apresentam mecanismos que podem estar envolvidos na interação com plantas e patógenos.

Em vista disso, para testar as hipóteses formuladas acima, foram definidos os seguintes objetivos: (a) identificar as espécies dos isolados de *Trichoderma*; (b) inocular *Trichoderma* sp. em solo sob alagamento, mantendo lâmina de água constante; (c) testar os

diferentes isolados de *Trichoderma* sp. em combinação com diferentes cultivares de arroz;

(d) verificar a produção de sideróforos, proteases e ácido indol acético pelos diferentes isolados de *Trichoderma* sp.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma gramínea anual originária da Ásia. Atualmente é cultivada em todos os continentes do mundo, com exceção da Antártida, desde 53 °N até 40 °S a partir da linha do Equador. Em regiões tropicais, a semeadura é realizada até 2.400 m acima do nível do mar. Devido às condições de irrigação, requeridas pela maioria das lavouras, estas tendem a concentrar-se em regiões de terras baixas ou várzeas, próximas a fontes hídricas, como por exemplo, rios e lagos (Grist, 1965; Chandler, 1984).

No mundo, o arroz destaca-se como sendo de grande importância, pois é considerado um dos cereais mais consumidos pela população. Aproximadamente metade da população mundial tem o arroz como alimento básico, sendo mais relevante em países em desenvolvimento e nos países asiáticos. O consumo mundial de arroz foi em torno de 340 milhões de toneladas no ano de 2001, representando cerca de 56 Kg *per capita*.ano⁻¹. No Brasil, a produção concentra-se nos estados da região sul, principalmente Rio Grande do Sul (RS) e Santa Catarina (SC), pois, nessa região produziu-se de 8,5 milhões de toneladas enquanto a produção brasileira foi de 12,1 milhões de toneladas, no ano de 2007. O RS é considerado o maior produtor de todos os estados, com uma produção de, aproximadamente, 7,3 milhões de toneladas de arroz em uma área de 1,06 milhão de hectares e um rendimento médio de 7.361 Kg.ha⁻¹, no ano de 2007 (FAO, 2003; Conab, 2008).

O arroz é cultivado, no sul do Brasil (RS e SC), através de seis tipos básicos de sistemas, que se diferenciam quanto à forma de preparo do solo, de semeadura e manejo da água. Devido a essas diferenças, são denominados convencional, plantio direto, pré-germinado, mix (variação do sistema pré-germinado), transplante de mudas e cultivo mínimo. No RS, 42% da área são cultivados com sistema convencional, 38% com cultivo mínimo, 12% com pré-germinado e mix e, 8% com plantio direto. A época de semeadura mais adequada é de início de agosto até início de janeiro, variando conforme a região dos estados de SC e RS. As condições climáticas mais adequadas para o desenvolvimento da cultura são temperaturas variando de 24 °C a 30 °C e alta radiação solar, além da disponibilidade hídrica proporcionada pela irrigação (IRGA, 2005).

No Brasil, o arroz é afetado por diversas doenças causadas por fungos e nematóides ou de origem fisiológica (Ribeiro & Sperandio, 1998) e, mais recentemente por vírus (Maciel *et al.*, 2002). As doenças fúngicas têm mostrado maior importância, com destaque para a brusone causada por *Magnaporthe grisea* (T.T.Hebert) Yaegashi & Udagawa. Nos últimos anos outras doenças fúngicas tem adquirido importância como a queima e a mancha das bainhas causadas respectivamente por *Rhizoctonia solani* Kuhn e *Rhizoctonia oryzae* Ryker & Gooch, a mancha das glumas causada por vários fungos e a mancha parda causada por *Cochliobolus miyabeanus* Ito & Kuribayashi (*Bipolaris oryzae* Breda de Haan) (Bedendo & Prabhu, 2005; Ribeiro & Sperandio, 1998; IRGA, 2005). Além dessas, a virose conhecida como enrolamento do arroz aumenta cada vez mais sua importância no estado (Maciel *et al.*, 2002; Maciel *et al.*, 2005).

O agente causal da doença queima das bainhas no arroz, é o fungo *Rhizoctonia solani* Kühn, um habitante do solo de grande importância fitopatogênica (Cubeta & Vilgalys, 1997). A fase sexual, ou teleomórfica, é *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (Sneh *et al.*, 1991).

A queima das bainhas está entre as doenças mais importantes da cultura do arroz e em condições favoráveis com o uso de cultivares mais suscetíveis e locais onde o patógeno está bem distribuído, os danos podem variar de 5% a 50% (Webster & Gunnell, 1992; Rodriguez *et al.*, 1999). A sucessão com soja também favorece o desenvolvimento desta doença (Ribeiro & Sperandio, 1998).

Os sintomas, em forma de manchas nas plantas, geralmente aparecem nos estádios de perfilhamento e florescimento, período de maior suscetibilidade da cultura, até a maturação dos grãos (Misra *et al.*, 1994; Ribeiro & Sperandio, 1998; Fedearroz, 2000), dificilmente ocorrendo em plantas jovens. Inicialmente, os sintomas são observados em colmos e bainhas, próximo ao nível da lâmina de água. Sob condições mais favoráveis, como baixa luminosidade, temperaturas em torno de 30°C e alta umidade relativa do ar (perto de 95%), há uma rápida expansão do fungo em direção às partes superiores da planta, podendo afetar as lâminas foliares, o caule e as panículas, além de plantas vizinhas (Webster & Gunnell, 1992; Rodriguez *et al.*, 1999).

A doença pode causar seca parcial ou total das folhas, além de provocar acamamento das plantas (Bedendo & Prabhu, 2005). Quando o ataque da doença é mais severo, atingindo a folha bandeira, pode haver pouco enchimento dos grãos, principalmente os da fração inferior da panícula (Webster & Gunnell, 1992; Misra *et al.*, 1994), fazendo com que haja uma diminuição do peso dos grãos e um aumento da quantidade de grãos estéreis (Fedearroz, 2000). Em torno de seis dias após o aparecimento dos primeiros sintomas ocorre a formação de escleródios na superfície ou próximo ao tecido infectado e estes são facilmente destacados do tecido após sua maturação (Webster & Gunnell, 1992).

A doença causada pelo fungo *Rhizoctonia oryzae* (Ryker & Gooch, 1938) (fase teleomórfica = *Waitea circinata* Warcup & Talbot) apresenta uma importância menor quando comparada com a queima das bainhas (Webster & Gunnell, 1992). No Brasil, em especial no Rio Grande do Sul, essa doença tornou-se mais importante com a introdução

das cultivares americanas, que atualmente são todas suscetíveis (Ribeiro & Sperandio, 1998).

Os sintomas, semelhantes aos da queima das bainhas, em forma de lesões ou manchas, aparecem na parte mediana das bainhas, geralmente na altura da água de irrigação (Ryker & Gooch, 1938).

O enrolamento do arroz, causado por *Rice stripe necrosis virus* (RSNV), é também conhecido como *entorchamiento*, e foi primeiramente descrito na Costa do Marfim, África, na metade dos anos 70 (Louvel & Bidaux, 1977). Entretanto, o primeiro relato na América do Sul é do ano de 1969 (Restrepo, 1969), na Colômbia, quando foram verificadas plantas com sintomas semelhantes àqueles descritos por Louvel & Bidaux (1977). Segundo Morales *et al.* (1995) até o ano de 1991, quando foram verificados os mesmos sintomas, acrescido da ocorrência de plantas com listras necróticas e cloróticas nas folhas, o enrolamento do arroz não mostrou importância nas regiões orizícolas da Colômbia. Após o ano de 1991, o patógeno disseminou-se nas principais regiões produtoras de arroz na Colômbia. Segundo os mesmos autores, duas vias importantes de disseminação do vetor e, conseqüentemente do patógeno, são o transporte de solo e de água contaminados, aderidos em implementos agrícolas e sementes, para onde não há ocorrência da doença. No Brasil, a primeira ocorrência dessa doença foi verificada na safra 2001/02, na Depressão Central do Rio Grande do Sul, no município de Dona Francisca (Maciel *et al.*, 2002).

Segundo Pardo & Muñoz (1994), as perdas causadas pelo enrolamento do arroz podem chegar até 20% da produção. No Brasil, Maciel *et al.* (2005) verificaram que as perdas podem chegar a 30% de produtividade.

Os sintomas característicos do enrolamento do arroz são a presença de listras cloróticas nas folhas, retorcimento de folhas e de panículas (em forma de zig-zag), plantas com aspecto de roseta e plântulas mortas (Louvel & Bidaux, 1977; Morales *et al.*, 1999).

Para o controle deste patógeno e de seu vetor, as estratégias buscadas têm sido a

obtenção de cultivares resistentes, adequação das doses de adubação de base e de cobertura, uso de agentes de biocontrole e adequação da época de semeadura (Morales, 2001; Almança, 2005; Maciel *et al.*, 2005). O controle químico não tem apresentado resultados satisfatórios de controle (Maciel *et al.*, 2005).

2.2 *Trichoderma* spp.

As espécies de *Trichoderma* correspondem à fase anamórfica do gênero *Hypocrea* sp., que pertence ao filo Ascomycota (Agrios, 1997), sendo esse gênero o mais pesquisado entre os fungos com potencial de antagonismo a fitopatógenos. A classificação de *Trichoderma* spp. é bastante discutida e com certas diferenças para alguns pesquisadores. Entretanto, segundo Gams & Bissett (1998), são descritas as seguintes espécies: *Trichoderma harzianum* Rifai, *Trichoderma hamatum* (Bon.) Bain., *Trichoderma viride* Pers., *Trichoderma aureoviride* Rifai, *Trichoderma koningii* Oudemans, *Trichoderma pseudokoningii* Rifai, *Trichoderma longibrachiatum* Bissett, *Trichoderma polysporum* (Link: Fr.) Rifai, *Trichoderma atroviride* P. Karsten, *Trichoderma crassum* Bissett, *Trichoderma fasciculatum* Bissett, *Trichoderma fertile* Bissett, *Trichoderma minutisporum* Bissett, *Trichoderma oblongisporum* Bissett, *Trichoderma pubescens* Bissett, *Trichoderma spirale* Bissett, *Trichoderma strictipile* Bissett, *Trichoderma strigosum* Bissett, *Trichoderma tomentosum* Bissett, *Trichoderma virens* Bissett, *Trichoderma citrinoviride* Bissett, *Trichoderma reesei* E.G. Simmons, *Trichoderma ghanense* Dói, Abe & J. Sugiyama e *Trichoderma saturnisporum* Hammill. Dentre estas espécies, *T. harzianum* tem sido a espécie mais estudada, entretanto, as espécies *T. koningii*, *T. viride*, *T. hamatum* e *T. pseudokoningii* também têm sido estudadas (Melo, 1998).

Por ser um fungo de ocorrência natural na maioria dos solos, sendo este o seu ambiente preferencial de crescimento e desenvolvimento, suas características de antagonismo são mais bem expressadas neste ambiente. *Trichoderma* spp. têm mostrado

melhor eficiência de controle em fitopatógenos dos gêneros *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Fusarium*, *Pythium*, entre outros. Esta eficiência deve-se a capacidade desse antagonista inviabilizar as estruturas de resistência dos patógenos, como por exemplo, escleródios, microescleródios, esporos e clamidósporos, que em geral são difíceis de serem degradados, assim como seu micélio (Melo, 1991; Melo, 1996).

Os mecanismos de ação utilizados por *Trichoderma* spp. para o biocontrole de fitopatógenos baseiam-se na competência rizosférica, através da competição por nutrientes e espaço, na antibiose através da produção de antibióticos, no parasitismo ou hiperparasitismo através da produção de enzimas líticas da parede celular, como quitinases, glucanases, celulases e proteases e indução de resistência (Papavizas, 1985; Melo, 1991; Yedidia *et al.*, 2000; Howell, 2003). Além disso, esse antagonista tem habilidade de promover o crescimento de plantas através de disponibilização de nutrientes, produção de fatores de crescimento, entre outros (Harman, 2000).

Em diversos trabalhos tem sido verificada a eficiência de isolados de *Trichoderma* spp., entretanto, não se tem esclarecida qual ou quais modos de ação estão tendo maior participação no antagonismo. D'Ambra & Mutto (1986) verificaram que o fungo *T. harzianum* foi capaz de parasitar e destruir os cistosoros de *Polymyxa betae* Keskin, reduzindo com isto, a penetração do vetor nas raízes de beterraba e, conseqüentemente, podendo haver uma menor incidência de doença (*Beet necrotic yellow vein virus*). Almança (2005) verificou que isolados de *Trichoderma* spp. foram eficientes na redução significativa dos sintomas de enrolamento de arroz em casa de vegetação, tanto pela ação dos isolados separadamente quanto pela combinação de três isolados juntos no mesmo bioformulado. Em lavoura de arroz com irrigação por inundação, não foi observada redução dos sintomas da doença, utilizando os mesmos isolados nas doses de 2 e 4 Kg.ha⁻¹. Entretanto, Rodriguez *et al.* (1999), obtiveram redução significativa, de 29 a 37%, da incidência de queima das bainhas, *R. solani*, utilizando doses de 5 e 10 Kg.ha⁻¹ de *T. harzianum*.

Brewer & Larkin (2005) verificaram redução significativa na incidência e na severidade causada por *R. solani* em plantas de batata tratadas com *Trichoderma* spp., quando comparadas as não tratadas. Também, Lewis & Lumsden (2001) obtiveram resultados que mostraram a eficiência de um isolado de *T. hamatum* no controle de *R. solani*, porém na redução de tombamento em mudas de pepino e pimentão.

McLean *et al.* (2005) observaram que um isolado de *T. atroviride* foi significativamente superior na redução do número de plantas de cebola atacadas por *Sclerotium cepivorum* Berck., quando comparado a testemunha sem aplicação. Menendez & Godeas (1998) observaram uma redução significativa de plantas de soja mortas por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary quando tratadas com *T. harzianum* (BAFC 742) tanto em casa de vegetação quanto em nível de campo.

A densidade de inóculo do patógeno é um fator importante no biocontrole, entretanto, a eficiência de um isolado de *T. koningii* no controle de *S. cepivorum* em plantas de cebola foi a mesma, independente da quantidade de escleródios/grama de solo e da quantidade do antagonista aplicada (Metcalf *et al.*, 2004).

Com toda a utilização de *Trichoderma* spp. em sistemas agrícolas que sabidamente utilizam defensivos agrícolas, geralmente em grandes quantidades, trabalhos tem mostrado a possibilidade de utilização desse antagonista juntamente com esses produtos. Wang *et al.* (2005) perceberam que o fungicida fludioxonil não inibiu o crescimento de *Trichoderma* sp. Verificou ainda, que a eficiência do antagonista no controle de podridão das raízes de *Echinacea* sp., causada por *Fusarium* sp, foi a mesma, tanto aplicada de forma isolada como em conjunto com o fungicida, sendo essa melhor que somente o fungicida. Entretanto, esses pesquisadores observaram que fludioxonil+metalaxil+difenoconazole e difeconazole apresentaram percentagem de inibição de até 100% conforme a dose testada. Outros autores também têm verificado a inibição de crescimento de *Trichoderma* spp., tanto por fungicidas quanto por herbicidas e inseticidas (Muiño *et al.*, 2001; Santos *et al.*,

2005; Veloso *et al.*, 2005).

Entretanto, em outros trabalhos já se tem verificado ou se tem fortes indícios de quais possíveis mecanismos de ação estão exercendo maior importância na interação planta-patógeno-*Trichoderma* spp.

2.2.1 Enzimas líticas

As várias espécies de *Trichoderma* têm a capacidade de produção de uma grande quantidade de enzimas, vários autores citados por Lorito (1998) descrevem a produção de quitinases, β -N-acetilhexosaminidase, N-acetil- β -galactosaminidase, β -1,3-glucanase, β -1,6-glucanase, α -amilase, celulase, lipase, mananase, xilanase, urease, RNase, pectinase, pectinaliase, lacase, peroxidase e proteases, sendo que no biocontrole as enzimas líticas de parede celular dos microrganismos são de extrema importância, pois conferem capacidade de parasitismo de fitopatógenos ao antagonista (Melo,1996). Segundo Elad *et al.* (1982), tem sido verificada a produção de diferentes níveis de enzimas hidrolíticas por isolados de *T. harzianum* quando expostos a micélio de distintos patógenos no solo, por isso verifica-se a habilidade de diferentes isolados de *T. harzianum* no controle dos respectivos patógenos. O nível e diversidade de enzimas produzidas são variáveis conforme o isolado de *Trichoderma* e a fonte de carbono disponível para atividade das enzimas (El-Katatny *et al.*, 2000).

As enzimas degradadoras de quitina, um homopolímero de N-acetil-D-glucosamina extremamente abundante na natureza, são conhecidas de maneira geral por enzimas quitinolíticas ou quitinases. Em um mesmo organismo, uma grande quantidade de enzimas pode ser encontrada, assim como diferentes níveis de atividades dessas enzimas podem ocorrer. Enzimas quitinolíticas têm sido encontradas em *T. harzianum*, *T. aureoviride*, *T. atroviride*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum*, *T. viride*, *T. pseudokoningii*, *T. minutisporum*, *T. hamatum* e *T. reeseii*, sendo que os maiores estudos são em *T. harzianum* (Lorito, 1998).

O mecanismo de indução para produção de enzimas quitinolíticas por *Trichoderma* spp. é em muitas situações bastante especulado. Aparentemente, não é somente um mecanismo de indução que ocorre, e a atividade quitinolítica pode ser induzida por estímulos específicos, como reconhecimento de lecitinas, contato com o substrato, formação de quitoooligômeros ou uma interação específica com outros microrganismos ou, por estímulos não-específicos, como luz, esporulação, estresse por falta de nutrientes ou antagonismo. Somado a isso, pouco ou nada se conhece sobre os mecanismos de indução em *Trichoderma* spp. em ambiente natural (Lorito, 1998).

Trichoderma spp. produz durante o parasitismo quitinases e β -1,3-glucanases, sendo essas, enzimas-chave para esse processo. A alta atividade dessas enzimas pode ser correlacionada com o grau de eficiência do biocontrolador *in vivo* (El-Katatny *et al.*, 2001). Lorito *et al.* (1993) verificou uma relação direta entre a atividade antifúngica de enzimas líticas de *Trichoderma* sp. e o controle *in vitro* de *Botrytis cinerea* Pers.. Entretanto, Zimand *et al.* (1991) não verificaram correlação entre o nível de quitinase e β -1,3-glucanase produzido por *T. harzianum* e a eficiência no controle biológico do patógeno. Dal Soglio *et al.* (1998) observou que a presença de maior atividade de endoquitinase em filtrado de *T. harzianum*, quando comparado a filtrados de *R. solani* e de raízes de soja. Quando as sementes de soja foram tratadas com *T. harzianum* houve uma maior atividade de endoquitinase na rizosfera dessas plantas.

Menendez & Godeas (1998) observaram que um isolado de *T. harzianum* foi eficiente no controle de *S. sclerotiorum* em plantas de soja em casa de vegetação e campo. Em teste *in vitro* esse mesmo isolado produziu quitinases, induzidas pela presença de quitina, micélio e escleródios de *S. sclerotiorum* no meio de cultura.

Além da produção direta de enzimas por *Trichoderma* spp., Yedidia *et al.* (2000) verificaram que raízes de plantas de pepino tratadas com *T. harzianum* (T-203) foram induzidas a uma produção de 2,6 mais quitinases que as plantas não tratadas.

As enzimas quitinolíticas de *T. harzianum* podem apresentar ainda, interações sinérgicas com proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR), com metabólitos e antibióticos de *Trichoderma* spp. e de outros microrganismos, com fungicidas químicos e com outros microrganismos (Di Pietro *et al.*, 1993; Lorito, 1998).

Juntamente com as enzimas quitinolíticas outro sistema enzimático importante é o das glucanases. Essas enzimas estão envolvidas na degradação de glucanas, homopolímeros de D-glicose ligados em α ou β configurações, que constituem a parede celular e polissacarídeos extracelulares de diversos microrganismos. O arsenal de enzimas β -glucanolíticas de *Trichoderma* consiste de endo e exoglucanases que catalisam sinergicamente a degradação de β -glucanas até oligômeros (Benitez *et al.*, 1998).

As β -glucanases de *T. harzianum* foram investigadas, sendo observada a presença de uma β -1,3-glucanase de 78 kDa, sendo específica para ligações β -1,3 com ação exo. Foram verificadas ainda a presença de três β -1,6-glucanases, tendo duas delas 51 e 43 kDa, específicas para ligações β -1,6 com ação endo (De La Cruz *et al.*, 1995). Diversas outras glucanases com diferentes atividades catalíticas, pesos moleculares e especificidades de substrato tem sido encontradas no sobrenadante de culturas de *T. harzianum* (Benitez *et al.*, 1998). É importante salientar que como o espectro de quitinases, o de β -1,3-glucanases produzidas por isolados de *T. harzianum* varia significativamente (El-Katatny *et al.*, 2000).

Quanto ao substrato, β -1,3-glucanase de *T. harzianum* apresentou especificidade a polissacarídeos com ligações β -1,3, entretanto, a atividade em micélio seco de *R. solani* (9,9%) e *S. rolfsii* (8,7%), foi relativamente baixa quando comparadas com a atividade em laminarina (100%) (El-Katatny *et al.*, 2001). Já, Menendez & Godeas (1998) verificaram que uma β -1,3-glucanase de *T. harzianum* mostrou atividade de 28 e 58% em micélio e escleródios de *S. sclerotiorum*, quando comparados a laminarina (100%).

Assim, como ocorre com quitinases, em diversas situações a produção de β -1,3-

glucanases é correlacionada com a capacidade antagônica de *Trichoderma* spp. (Lorito *et al.*, 1993; El-Katatny *et al.*, 2000). Entretanto, em trabalho de Zimand *et al.* (1991) não foi verificada correlação entre a produção de β -1,3-glucanase e a eficiência de biocontrole de cinco isolados de *T. harzianum*. Ezziyyani *et al.* (2004) verificaram que em meio BDA enriquecido com laminarina houve um maior efeito antagônico de *T. harzianum* sobre *Phytophthora capsici* Leonian, devido ao aumento da atividade de β -1,3-glucanases e, talvez de outras enzimas também.

Além da produção de β -1,3-glucanases, isolados de *T. harzianum* também são capazes de induzir a produção dessas enzimas em raízes de plantas de pepino (Yedidia *et al.*, 2000).

A produção de proteases é bastante comum entre os fungos, dentre eles, *Trichoderma* spp. é um produtor bem conhecido (Elad & Kapat, 1999). A atividade e os mecanismos que controlam a síntese e secreção das enzimas extracelulares são fortemente influenciados por fatores ambientais como a disponibilidade de substrato.

As proteases também são enzimas que estão envolvidas no processo de micoparasitismo, um dos mecanismos de biocontrole por microrganismos. Entretanto, a produção de proteases pode também ser importante de outra forma no controle biológico, com a ação destas enzimas na degradação de proteínas envolvidas no processo de parasitismo do fitopatógeno na interação com a planta (Elad & Kapat, 1999).

Proteases estão envolvidas na degradação de proteínas da parede celular dos fungos. Segundo Howell (2003), no controle biológico de *B. cinerea* por *T. harzianum*, sobre folhas de feijoeiro, as proteases apresentam importante papel. As proteases quebram as enzimas hidrolíticas dos fitopatógenos em cadeias de peptídeos e/ou aminoácidos e, por meio disso, destroem a capacidade do patógeno de atacar a célula da planta. Também, sua importância tem sido reforçada com o isolamento de novas proteases super-expressadas a partir de isolados de *T. harzianum* (Suárez *et al.* 2004 *apud* Benítez *et al.*, 2004). O isolado T39 de

T. harzianum produziu proteases sobre folhas de feijão na presença de *B. cinerea*, inibindo a germinação e inativando as enzimas produzidas pelo patógeno, conseqüentemente reduzindo a doença (Elad & Kapat, 1999).

Em isolados do gênero *Trichoderma* as proteases são relacionadas ao controle de fungos fitopatógenos e a atividade proteolítica de *T. viride* já foi observada no biocontrole de *S. rolfsii* em solo autoclavado (Elad & Kapat, 1999) e também de *B. cinerea* (Silva-Ribeiro, 2001).

A atividade e os mecanismos que controlam a síntese e secreção das enzimas extracelulares são fortemente influenciadas por fatores ambientais, como a disponibilidade de substrato.

2.2.2 Metabólitos bioativos

Os metabólitos produzidos por microrganismos podem ser divididos em primários e secundários, conforme a sua importância na participação do crescimento e na reprodução desses microrganismos. *Trichoderma* spp. produz uma grande quantidade de metabólitos secundários, sendo que uma parte deles são compostos com ação antibiótica, tanto com atividade antifúngica como antibacteriana. Ainda, esses compostos antimicrobianos produzidos por *Trichoderma* spp. podem ser voláteis e não voláteis (Howell, 1998; Sivasithamparam & Ghisalberti, 1998).

Os compostos antimicrobianos produzidos por *Trichoderma* spp. constituem um grupo diverso no que diz respeito a estruturas e funções, tendo sido relacionados ao biocontrole, porém, não são responsáveis isoladamente pelo sucesso ou pelo fracasso do biocontrole (Howell, 1998).

A atividade antibiótica de *Trichoderma* spp. pode ser devida a compostos não voláteis, como trichodermina e peptídeo antibiótico, obtidos de extratos de culturas e também por compostos voláteis, de maneira geral chamadas de pironas, que conferiam um

forte cheiro de coco (Howell, 1998). Ghisalberti *et al.* (1990) também verificaram ação antibiótica dessas pironas, que conferem o odor, contra patógenos.

Melo & Faull (2000) estudando o antagonismo *in vitro* de isolados de *Trichoderma* sp. contra *R. solani*, observaram que os metabólitos antifúngicos de isolados de *T. koningii* mostraram eficiência bastante superior aos isolados de *T. harzianum*, enquanto no teste de parasitismo de escleródios, *T. harzianum* inibiu a germinação em 72% e *T. koningii* em 42%.

Trichorzianinas, produzidas por *T. harzianum* também já foram verificadas como eficientes na redução do crescimento micelial de *S. rolfsii*. Gliotoxina e viridina, produzidas por *T. virens*, têm sido observadas inibindo o crescimento micelial, a formação de esporângios e mobilidade de zoósporos de *Phytophthora* spp. e suprimindo o crescimento micelial e germinação de escleródios de *R. solani* e *S. rolfsii* (Howell, 1998).

Lifshitz *et al.* (1986) verificaram que o controle de *Pythium* spp. por *T. harzianum* e *T. koningii* foi devido a produção de fatores tóxicos na espermosfera de ervilha, o que inibiu o crescimento do patógeno. Lumsden *et al.* (1992) verificaram uma atividade supressiva de *T. virens* sobre *R. solani* e *Pythium ultimum* Trow, devido a produção de gliotoxina. Corroborando com isso, Wilhite *et al.* (1994) observaram que mutantes de *T. virens*, deficientes na produção de gliotoxina, foram menos eficientes no controle de *Pythium* sp.

Entretanto, em alguns casos não é somente a antibiose e o micoparasitismo que são necessários para a eficiência do biocontrole. Howell *et al.* (2002) e Howell (2002) verificaram que mutantes de *T. virens*, deficientes no micoparasitismo e na produção de gliotoxina, mostraram a mesma eficiência no controle de *P. ultimum* e *R. solani*, quando comparados ao não mutado.

2.2.3 Promoção de Crescimento

A rizosfera ou zona próxima das raízes das plantas no solo é uma área com

atividades biológicas bastante ativas, com efeitos diretos importantes sobre as plantas como, por exemplo, sobre a nutrição das mesmas (Salgado *et al.*, 1999). Na rizosfera encontram-se diversos microrganismos que podem promover o crescimento vegetal, e proteger o sistema radicular da infecção por patógenos, estando incluído nesse grupo o fungo *Trichoderma* sp. Assim, esse fungo, além de apresentar potencial como biocontrolador de patógenos, pode ter a capacidade de promover o crescimento vegetal e mostrar competência rizosférica, quando próximo das raízes das plantas (Harman, 2000).

A promoção de crescimento proporcionada por microrganismos pode ocorrer através da produção de hormônios vegetais, da disponibilização de nutrientes, da absorção e translocação de minerais e do controle de patógenos (Melo, 1996; Bano & Musarrat, 2003; Bottini *et al.*, 2004). Já, a competência rizosférica é relacionada com a habilidade do microrganismo se estabelecer na rizosfera das plantas e estar sujeito as influências do ambiente e competição com outros microrganismos (Harman, 1992).

Vale ressaltar, que *Trichoderma* spp. pode estar presente no córtex das raízes, semelhante a micorrizas, e também somente na parte externa das raízes, caracterizando a competência rizosférica propriamente dita (Windham *et al.*, 1986; Kleifeld & Chet, 1992; Yedidia *et al.*, 1999; Weiler, 2004; Pandolfo *et al.* 2005). Além disso, a presença de *Trichoderma* sp. já foi verificada em raízes de plantas de milho, mesmo quando o fungo foi aplicado juntamente fungicida, captan e fludioxonil, no tratamento de sementes (Resende *et al.*, 2004). Weiler (2004) também observou que os fungicidas oxicloreto de cobre e iprodione, aplicados no sistema *floating* de fumo, não afetaram a presença de *Trichoderma* sp. nas raízes das plantas tratadas.

A promoção de crescimento proporcionada por *Trichoderma* sp. pode ser devida a produção de fatores de crescimento ou hormônios, controle de fitopatógenos menos importantes, disponibilização e aumento na eficiência de utilização de nutrientes e, até mesmo a competência rizosférica (Windham *et al.*, 1986; Kleifeld & Chet, 1992; Altomare

et al., 1999; Harman, 2000). Entretanto, a maioria dos trabalhos não tem determinado ao certo qual fator ou fatores estão atuando na promoção de crescimento.

Recentemente, foi verificado que mudas de fumo, em sistema *floating*, tratadas com *Trichoderma* sp. apresentaram uma maior altura, diâmetro de caule, peso seco da parte aérea e das raízes (Weiler, 2004). Windham *et al.* (1986), em estudo com plantas de tomate e fumo, verificaram um aumento significativo do número de plantas emergidas, peso seco de raiz e peso seco da parte aérea.

Além, do aumento da altura e área foliar em plantas de pimentão e do aumento do peso seco em pepino, Kleifeld & Chet (1992) observaram uma maior percentagem de germinação quando sementes de feijão, rabanete, tomate, pimentão e pepino foram tratadas com *T. harzianum*. Semelhante a isso, Chang *et al.* (1986) verificaram que a aplicação de *T. harzianum* antecipou a germinação de sementes de pimentão em dois dias e proporcionou diferenças significativas no peso seco de pimentão, pepino e tomate, quando comparados à testemunha. Esses autores também perceberam que um aumento de 10^4 para 10^6 esporos/g de solo na aplicação do fungo resultou em um aumento significativo no peso seco e na altura de planta de pepino. Em outro estudo verificou-se um acréscimo significativo da massa verde nas plantas de tomate tratadas com *T. harzianum*, porém esse mesmo resultado não foi obtido em plantas de batata (Salgado *et al.*, 1999). Resende *et al.* (2004) observaram apenas um aumento da matéria seca de raízes, sem verificar efeito na matéria seca de parte aérea e na altura de plantas de milho.

Ezziyyani *et al.* (2004) observaram que o filtrado de *T. harzianum* apresentou efeito negativo no desenvolvimento das radículas e nenhum efeito no número de sementes germinadas de pimentão, em meio de cultura. Entretanto, quando micélio e esporos do fungo foram aplicados no solo houve um aumento da germinação das sementes e do peso seco das plantas, comparadas à testemunha.

Quanto ao possível efeito de isolados de *Trichoderma* spp. sobre nutrientes

presentes no solo, Harman (2000) verificou que plantas de milho com nível máximo de nitrogênio (240 Kg N.ha⁻¹), com e sem *T. harzianum* (T-22), não diferenciaram quanto a produção de grãos e silagem. Entretanto, quando níveis menores de nitrogênio foram utilizados, observou-se diferenças entre as plantas tratadas com T-22 e as não tratadas, sendo que nas plantas não tratadas o máximo de colheita foi obtido com 240 Kg N.ha⁻¹ e nas tratadas esse mesmo valor foi obtido com 160 Kg N.ha⁻¹.

Entre as substâncias reguladoras do crescimento das plantas, o ácido indol acético, uma auxina natural comumente encontrada nas plantas, apresenta efeito positivo no crescimento das raízes que possibilita que a planta tenha acesso a uma maior quantidade de nutrientes no solo (Vessey, 2003).

Os tecidos radiculares são especialmente sensíveis as diferentes concentrações de AIA e podem ser bastante afetados por fontes externas deste regulador de crescimento. Estes teores exógenos de AIA na região radicular das plantas podem causar efeito negativo quando em excesso. Este efeito negativo pode ser minimizado por microrganismos que degradem esta auxina e proporcionem melhores condições para o desenvolvimento radicular.

Gravel *et al.* (2007) testaram, entre outros microrganismos, um isolado de *Trichoderma* sp. no aumento de produção de plantas de tomate. Os autores verificaram que o isolado testado foi capaz de aumentar tanto o número total de frutos quanto o número de frutos comercializáveis, além do aumento nas raízes e parte aérea da planta. Esta promoção de crescimento pode ser explicada pela capacidade deste isolado de *Trichoderma* sp. em produzir ácido indol acético. Ainda, a produção de ácido indol acético foi maior quando o fungo foi crescido em meio líquido contendo triptofol, quando comparado aos meios contendo triptofano ou triptamina.

Além da capacidade de produção de AIA por este isolado, foi observado que este fungo é capaz também de degradar AIA. Gravel *et al.* (2007) verificaram que a adição de

AIA exógeno na rizosfera das plantas de tomate provocou uma inibição do crescimento quando na ausência de *Trichoderma* sp. Este fato de altas concentrações de AIA na rizosfera resultar uma inibição do crescimento radicular e não a uma promoção do crescimento de raízes, já havia sido observado por Xie *et al.* (1996).

2.2.4 Competição por nutrientes

A competição por nutrientes com fitopatógenos, inclusive com aqueles de menor importância, pode proporcionar condições ambientais favoráveis às plantas e com isto promover seu crescimento e desenvolvimento. Uma das estratégias de competição por nutrientes bastante utilizada e estudada, principalmente por bactérias, é a produção de sideróforos.

Sideróforos são definidos como compostos orgânicos de baixo peso molecular (0,5 a 1,5 Kda) produzidos por muitos fungos e bactérias. Quelantes de alta afinidade atuam solubilizando o íon férrico no ambiente e o transportando através da bicamada lipídica para dentro da célula, logo, disponibilizando este metal para o metabolismo do produtor (Renshaw *et al.*, 2002) e por isto sendo um fator de competição por nutrientes.

A adaptação a locais com disponibilidade baixa de ferro, possibilitou que os microrganismos desenvolvessem moléculas para enfrentar esta situação adversa. Este sistema consiste de dois mecanismos básicos: (a) secreção de sideróforos quelantes de ferro com baixo peso molecular (500 a 1000 Da) e (b) presença de moléculas receptoras de membrana que se liguem aos sideróforos e façam o transporte para dentro da célula (Kundu *et al.*, 2008).

Embora existam variações estruturais entre os diferentes tipos de sideróforos, a maioria deles pode ser dividida em duas principais classes, os hidroxamatos e os catecolatos (fenolatos).

De acordo com Neilands (1984) os sideróforos do tipo catecolatos são produzidos

somente por bactérias, enquanto que os do tipo hidroxamatos são produzidos tanto por bactérias quanto por fungos. Entretanto, já foi relatada a produção de fenolatos por basidiomicetos que causam podridão em madeira (Jellison *et al.*, 1991).

Existe um grande número de agentes de biocontrole, principalmente bactérias em que a atividade de sideróforos tem sido bastante pesquisada. No entanto, o papel e as interações dos sideróforos em fungos biocontroladores ainda não são bem entendidos. As diversas funções dos sideróforos para os fungos ainda necessitam ser mais bem estudadas. Primeiramente, os sideróforos extracelulares seriam utilizados para captura de ferro em ambientes desfavoráveis, enquanto que os sideróforos intracelulares serviriam como armazenamento deste nutriente (Vittone, 2008).

Os sideróforos fúngicos não variam tanto quanto os sideróforos bacterianos quanto a sua estrutura, sendo sua síntese e secreção amplamente reguladas por fatores ambientais (Renshaw *et al.*, 2002). Os sideróforos do tipo hidroxamato apresentam extrema afinidade por Fe (III) e tem algumas classes como ferricromos, coprogens e fusariminas. Além disso, os microrganismos tendem a secretar estas diferentes estruturas quelantes de ferro, conforme as diferentes situações ambientais (Vittone, 2008).

Quanto à liberação dos sideróforos no ambiente, não se tem ainda um esclarecimento se esse processo ocorre de maneira passiva, devido à alta concentração deste composto intracelularmente, ou ativa. Já o transporte do Fe (III) para dentro da célula requer gasto de energia e geralmente o complexo sideróforo-ferro é específico para o fungo. Contudo, alguns microrganismos apresentam mais de um mecanismo de transporte do complexo sideróforo-ferro (Renshaw *et al.*, 2002).

Muitas funções fisiológicas do ferro ainda não estão esclarecidas. No entanto, é sabido que o Fe (II) serve como fonte de elétrons para organismos que oxidam Fe e o Fe (III) serve como receptor de elétrons para organismos redutores (Weber *et al.*, 2006). O Fe também apresenta importância como cofator de algumas enzimas, sendo componente

estrutural essencial da proteína ferricromo, e como componente de proteínas mitocondriais (Vittone, 2008).

Uma característica importante na competição com os outros microrganismos presentes no ambiente é a capacidade de seqüestrar com eficiência o ferro no solo. Isto é dependente de fatores como: (a) tipo do sideróforo produzido; (b) concentração de sideróforo produzido e (c) propriedade de ligação com o metal do sideróforo produzido (Vittone, 2008).

Embora os sideróforos produzidos por *Trichoderma* spp. não estejam ainda bem caracterizados, já foi observado que este antagonista produz tanto sideróforos do tipo catecolato quanto do tipo hidroxamato. Esta característica de competição pela produção de sideróforos é bastante importante em ambientes onde a fonte de nutrientes, neste caso o ferro, é limitada (Vittone, 2008).

Anke *et al.* (1991) verificaram que *Trichoderma* sp. produz sideróforos do tipo hidroxamato, mesmo tipo produzido e relatado por Neilands (1984). Jellison *et al.* (1991) detectaram que isolados de *Trichoderma* sp. também são capazes de produzir sideróforos do tipo fenolatos. Então, em ambientes com teor limitado de ferro na rizosfera estes isolados têm uma maior capacidade de competição, pois é sabido que fenolatos tem maior eficiência para ligação ao ferro.

2.2.5 Disponibilização de nutrientes

A disponibilidade de nutrientes pode também ser um fator para promover o crescimento de plantas. Altomare *et al.* (1999) mostraram que um isolado de *T. harzianum* teve habilidade para solubilizar nutrientes a partir de compostos como rochas de fosfato, óxido de manganês, óxido de ferro e zinco metálico, e isso, em parte, participaria no maior crescimento das plantas. Alguns pesquisadores citam que essa solubilização seria devida à liberação de ácidos orgânicos e conseqüente acidificação do meio, porém, os autores não

verificaram um aumento da presença desses ácidos nos testes realizados.

Yedidia *et al.* (2001) verificaram que plantas de pepino tratadas com *T. harzianum* (T-203) apresentaram um incremento significativo no peso seco, comprimento de brotações e área foliar, comparadas a testemunha. Nesse mesmo trabalho, em cultivo hidropônico, raízes de plantas de pepino inoculadas com T-203 apresentaram aumento significativo de cobre, fósforo, ferro, zinco, manganês e sódio. Foram verificados também teores maiores de zinco, fósforo e manganês nas brotações.

2.2.6 Fatores ambientais que afetam a ação de *Trichoderma* spp.

Alguns fatores do ambiente podem afetar a ação antagônica e de promoção de crescimento de *Trichoderma* spp. das plantas, dentre eles a umidade, a disponibilidade de nutrientes, o pH, a temperatura e a textura do solo. A importância da umidade do solo na eficiência de *Trichoderma* spp. é variável conforme a espécie em questão. De modo geral, em condições de solo bastante seco e extremamente úmido, esta atividade é reduzida, tendo como condições mais adequadas solos ligeiramente úmidos a úmidos (Liu & Baker, 1980; Melo, 1996). Eastburn & Butler (1991) observaram que a atividade saprofítica de *Trichoderma* sp. foi melhor com o aumento da umidade, com condições ótimas entre 18 a 24% de umidade, exceto em condições de solo saturado de água. Weiler (2004) observou que isolados de *Trichoderma* sp. estiveram presentes na rizosfera de plantas de fumo mesmo com o substrato mantido com saturação de água. Almança (2005) verificou em solo saturado com água, que os isolados de *Trichoderma* sp. foram eficientes no controle do complexo *Polymyxa graminis*-RSNV.

Os níveis de pH também influenciam o parasitismo de *Trichoderma* sp. Em geral, esse fungo é favorecido por valores mais baixos, ou seja, pH ácido (Chet & Baker, 1980; Papavizas, 1985). Chet & Baker (1981), verificaram incremento da supressividade às doenças do solo com pH de 5,1 quando comparado com pH perto de 8,0, consequência de

um favorecimento do desenvolvimento de *Trichoderma* sp., além de outros fungos.

A temperatura é outro fator que influencia bastante a atividade de *Trichoderma* sp., no entanto, há diferenças entre as espécies. Há trabalhos que mostram a presença de *T. pseudokoningii*, de *T. harzianum* e de *T. viride* em ambientes com faixas de temperatura de 10 a 25 °C (Johnson *et al.*, 1987). Harman *et al.* (1981), verificaram que *Trichoderma* spp. apresentou um melhor crescimento na faixa de temperatura de 18 a 27 °C, sendo nessa mesma faixa de temperatura a maior eficiência de controle de *R. solani* em plantas de rabanete.

A disponibilidade de nutrientes no solo pode, de maneira geral, afetar o estabelecimento e o antagonismo de *Trichoderma* sp. Hubbard *et al.* (1983), ratificaram que *T. hamatum*, apresentou dificuldades em se desenvolver em solo com baixo teor de ferro, sendo devido à ação da bactéria *Pseudomonas* sp., que produz substâncias quelantes, indisponibilizando esse nutriente aos microrganismos. Isto evidencia o cuidado que se deve ter com os antagonistas de interesse. Entretanto, como já comentado anteriormente, isolados do gênero *Trichoderma* são capazes de produzir sideróforos que garantiriam uma capacidade de competição em ambientes com limitação deste nutriente.

Finalmente, para uma melhor obtenção de isolados de *Trichoderma* spp. candidatos a agentes de biocontrole e promotores de crescimento seria interessante isolá-los de plantas e solo onde deseja-se utilizá-lo posteriormente, pois, é nessas condições de temperatura, umidade e disponibilidade de nutrientes que estão mais adaptados (Howell, 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados de *Trichoderma* spp. e cultivares de arroz

Os isolados THAR, TPSK, TSP1, TARV TVIR (da rizosfera de plantas de arroz) e TSP2 (da rizosfera de planta de fumo) de *Trichoderma* spp. foram obtidos da micoteca do Laboratório de Microbiologia Fitopatológica do Departamento de Fitossanidade. Os isolados THAR, TVIR e TSP2 mostraram em testes anteriores eficiência, em casa de vegetação, para o controle do complexo enrolamento do arroz (Almança, 2005).

Para produção do bioformulado os fungos foram pré-cultivados em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) por 3 dias em câmara climática BOD com temperatura de 28 °C e fotoperíodo de 12 h. A partir das colônias do fungo, foi preparada uma suspensão aquosa de esporos de 50 mL, com concentração de 10^7 esporos/mL para inoculação do arroz descascado e autoclavado, 250 g por saco plástico de 2 L. A incubação foi nas mesmas condições utilizadas para o meio BDA, porém o período foi até a total colonização do arroz.

3.2 Identificação dos isolados de *Trichoderma* spp.

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram cultivados em meio de cultura BDA utilizando as mesmas condições ambientais citadas no item anterior. Posteriormente, os fungos foram visualizados em microscópio óptico para observação e medição das estruturas para diferenciação das espécies. As medidas e características obtidas foram colocadas na chave interativa *on line* para identificação de espécies de *Trichoderma* proposta por

Samuels *et al.* (2007).

A identificação também foi realizada seguindo a chave de identificação de Gams & Bissett (1998). Esta baseia-se na identificação da forma e do diâmetro de conídios, tipo de ramificação dos conídios e das fiáides e produção de pigmentos no meio de cultura.

3.3 Sobrevivência de *Trichoderma* spp. em solo alagado com lâmina de água

O experimento foi instalado na casa de vegetação do Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Figura 1). O delineamento experimental utilizado foi de blocos inteiramente casualizados onde foram distribuídos os tratamentos, combinando três isolados de *Trichoderma* spp. THAR, TVIR, TSP2 e a mistura destes três isolados (MIX) com e sem presença de plantas de arroz da cultivar IRGA 417, por ser uma das mais cultivadas no RS. Além disto, foi utilizado um tratamento somente com plantas de arroz e um controle sem plantas e sem *Trichoderma* spp. Os bioformulados, na dose de 0,05 g/vaso, foram aplicados diretamente no solo no centro do vaso, na profundidade de 3 cm independente da presença de semente de arroz nesta profundidade.



FIGURA 1. Vista geral do experimento em casa de vegetação, mostrando a disposição dos tratamentos com e sem plantas de arroz. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2007.

O solo utilizado no experimento foi obtido da Estação Experimental do Arroz do IRGA, em Cachoeirinha, RS de área onde é cultivado arroz. O solo foi acondicionado em vasos de 8 L com 5 Kg de solo em cada vaso. A partir de 15 dias da emergência, as plantas foram mantidas com lâmina de água constante (Figura 2). Para isto, foram realizadas irrigações regularmente mantendo uma lâmina de água de 5 cm. As condições de cultivo foram de fotoperíodo de 12 h e temperatura de $25 \pm 10^{\circ}\text{C}$.



FIGURA 2. Visualização da lâmina de água mantida sobre o solo das unidades experimentais 15 dias após a emergência das plantas, nos vasos com e sem plantas de arroz. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2007.

Para avaliação da população do fungo foram realizadas duas coletas de solo a uma distância de 5 cm do local de semeadura (Figura 3), uma delas três dias (1ª Época) após a semeadura e a outra 45 dias após a primeira coleta (2ª Época).

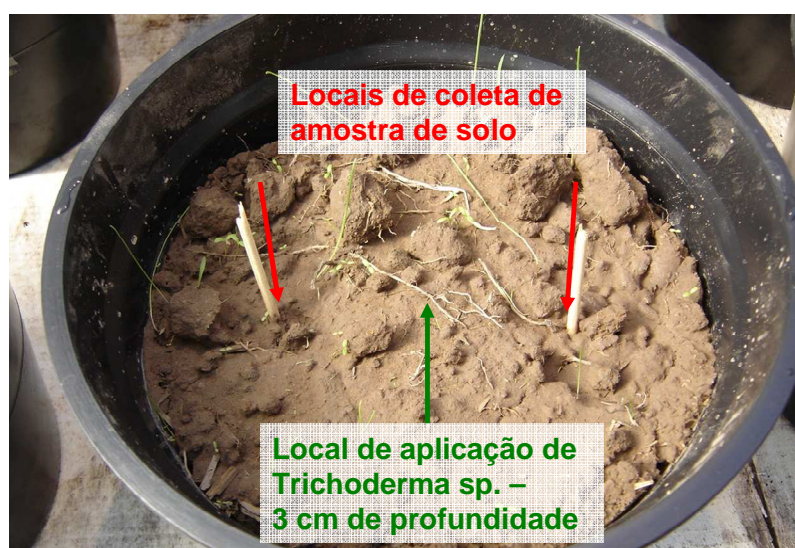


FIGURA 3. Unidade experimental com indicação onde foi realizada a aplicação do bioformulado de *Trichoderma* sp. e onde foram realizadas as coletas de solo. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2007.

A partir das amostras de solo foram retiradas alíquotas com volume de 10 mL de solo e diluídas em 90 mL de água destilada esterilizada (ADE). A seguir realizou-se diluições sucessivas de 1mL da solução de solo em 9 mL de ADE, até diluição 10^{-3} . Desta diluição foi retirada uma alíquota de 0,2 mL para plaqueamento em meio de cultura BDA, incubado a 28 °C e fotoperíodo de 12 h pelo período de 2 a 4 dias conforme o isolado em questão. Esse tempo foi variado para possibilitar a contagem das colônias.

Para todos os resultados foi realizada análise da variância e teste Tukey (5%) para comparação de médias. O programa estatístico utilizado foi o SPSS 15.0 para Windows.

3.4 Comportamento de cultivares de arroz inoculadas com isolados de *Trichoderma* spp.

O experimento foi instalado em câmara de crescimento do Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Neste experimento foram utilizados os isolados THAR, TVIR e TSP2 e as sementes das cultivares IRGA 409, 410, 416, 417, 418, 420 e 421, obtidas no programa de melhoramento da Estação Experimental do Arroz, IRGA, Cachoeirinha, RS. Os tratamentos, com três repetições, foram obtidos com a combinação dos isolados de *Trichoderma* spp. e das cultivares de arroz, além das cultivares sem a presença do fungo.

Para aplicação do bioformulado as sementes foram umedecidas e misturadas com cada bioformulado conforme o tratamento, na dose de 20 Kg/ha, tomando como base na semeadura de 120 Kg de semente/ha.

As condições de crescimento na câmara foram de temperatura de 24 ± 5 °C e fotoperíodo de 14 h. Cinco sementes foram colocadas em copos plásticos de 200 mL com substrato esterilizado, com duas partes de vermiculita e uma parte de areia, colocado em copos plásticos de 200 mL. Cada conjunto de copos contendo sementes tratadas com o mesmo bioformulado foi colocado em uma bandeja plástica (Figura 4). As irrigações foram realizadas com água destilada para manter uma lâmina de água de 1 a 2 cm dentro da

bandeja.

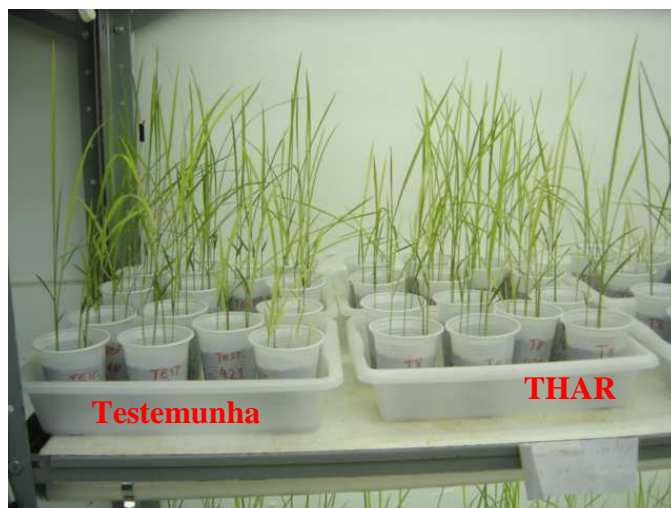


FIGURA 4. Bandejas plásticas contendo copos com mesmo bioformulado aplicado via semente. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2007.

No experimento foi avaliada a emergência de plântulas 20 dias após a semeadura. Para as avaliações de altura e peso seco da parte aérea de plantas, 30 dias após a semeadura, as plantas foram retiradas e lavadas. Para a medida de altura foi utilizada régua de 30 cm e para a secagem foi utilizada estufa a 60 °C até peso constante.

Para todos os resultados foi realizada análise da variância e teste Tukey (5%) para comparação de médias, no programa estatístico SPSS 15.0 para Windows.

3.5 Produção de ácido indol acético por isolados de *Trichoderma* spp.

Para avaliação da produção de ácido indol acético (AIA) foram utilizados os isolados de *Trichoderma* spp. THAR, TPSK, TARV, TVIR e TSP2, previamente cultivados em meio de cultura BDA por três dias em câmara climática para B.O.D. com temperatura de 28 °C e fotoperíodo de 12 h. A partir destas colônias foram retirados discos de 8,0 mm contendo micélio e hifas do fungo e, repicados em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio Batata-Dextrose (BD), sendo adicionados 500 µg/mL de triptofano. A incubação foi sob agitação de 150 rpm em sala climatizada com temperatura de 26 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h, por cinco dias. A filtração do meio foi realizada com algodão hidrófilo

branco em funil plástico.

Do filtrado de cultura foi retirado uma alíquota de 1,5 mL e adicionado 1,5 mL de reagente de Salkowsky [H_2SO_4 – 150 mL; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,5 M) – 7,5 mL; água destilada – 250 mL (Patten & Glick, 2002)]. Após 20 min de reação no escuro foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Beckman DU 65) no comprimento de 530 nm. A concentração de AIA na amostra foi determinada pela curva de calibração preparada com AIA nas concentrações de 0, 1, 2, 4, 6, 10 e 16 $\mu\text{g/mL}$.

Foi realizado análise da variância e teste Tukey (5%) para comparação das médias dos resultados obtidos. O programa estatístico utilizado foi o Sanest.

3.6 Produção de protease por isolados de *Trichoderma* spp.

Os isolados de *Trichoderma* spp. para este teste foram os mesmos utilizados no teste para produção de AIA, assim como o cultivo prévio em BDA.

A partir de colônias axênicas, os fungos foram repicados em meio MM: nitrato de sódio – 6 g, fosfato diácido de potássio monobásico – 1,5 g, cloreto de potássio – 0,5 g, sulfato de magnésio – 0,5 g, sulfato de ferro II – 0,01 g, sulfato de zinco – 0,01 g, glicose – 10 g, ágar – 20 g, água destilada – 1000 mL. A esse meio foi adicionada, após autoclavagem, uma solução de leite em pó (10 g/100 mL de água destilada) aquecida em banho-maria por 10 min. Após, as placas foram incubadas a 28 °C em câmara climática por três dias. Para evidenciar o halos na superfície do meio as placas mantidas sob refrigeração de 4 °C por 1 dia. Como não foi observada a presença dos halos, porém houve crescimento das colônias a avaliação foi realizada pela medição do diâmetro da colônia.

Foi realizado análise da variância e teste Tukey (5%) para comparação das médias dos resultados obtidos. O programa estatístico utilizado foi o Sanest.

3.7 Produção de sideróforos por isolados de *Trichoderma* spp.

Os isolados utilizados neste experimento foram THAR, TPSK, TSP1, TARV e

TVIR. Toda a vidraria utilizada para o desenvolvimento dos ensaios foi imersa em mistura sulfocrômica (HCl 6M) por 48 h e enxaguada seguidas vezes em água deionizada.

Empregou-se a técnica universal para detecção de sideróforos desenvolvida por Schwyn & Neilands (1987). Os microrganismos a serem testados foram cultivados, por cinco dias sob agitação orbital, em meio batata-dextrose (BD). Como controle utilizou-se o meio sem inoculação do microrganismo. As células foram precipitadas por centrifugação e 1 mL do sobrenadante foi misturado a 1 mL da solução indicadora de cromo azurol S (CAS). A solução de CAS foi preparada misturando-se 6 mL de solução de HDTMA 10 mM e 30 mL de água. Foram acrescentados sob agitação, 1,5 mL de solução férrica ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM preparada em HCl 0,01N e 7,5 mL de solução de cromo azurol S 2 mM. Separadamente foram dissolvidos 4,307 g de piperazina anidra em 20 mL de água que depois de dissolvida foi acrescida de 6,25 mL de HCl. Esta solução foi adicionada ao restante dos componentes já preparados, e o volume completado para 100 mL.

A mudança de cor da mistura de sobrenadante-indicador de azulada para amarelo-avermelhado no período de 15 min indicou a produção de sideróforos pelos fungos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação dos isolados de *Trichoderma* spp.

Com as características verificadas em cada isolado cultivado em meio de cultura BDA foi possível fazer a identificação citada na Tabela 1.

TABELA 1. Espécies de *Trichoderma* dos respectivos isolados utilizados nos experimentos. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2007.

Isolado	Espécie
THAR	<i>Trichoderma harzianum</i>
TPSK	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>
TSP1	<i>Trichoderma</i> sp.
TARV	<i>Trichoderma aureoviride</i>
TVIR	<i>Trichoderma viride</i>
TSP2	<i>Trichoderma</i> sp.

4.2 Sobrevivência de isolados de *Trichoderma* spp. em solo alagado

Para que haja um efetivo biocontrole de fitopatógenos e/ou uma promoção de crescimento das plantas por parte do fungo, quando este é colocado no solo, é importante que haja crescimento de suas hifas e produção de estruturas de reprodução. Para tanto, numerosos fatores bióticos e abióticos podem reduzir o crescimento e estabelecimento destes microrganismos (Knudsen & Bin, 1990; Bae & Knudsen, 2005).

Na 1ª época de avaliação, no momento do estabelecimento da lâmina de água, a população de *Trichoderma* spp. não diferenciou-se entre os isolados, nem mesmo em relação as testemunhas com e sem plantas de arroz (Tabela 2).

TABELA 2. População de *Trichoderma* spp. em solo sob irrigação por inundação, com lâmina de água, comparando todos os tratamentos testados. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2007.

Tratamento	Isolado ¹	Semente	10 ² UFC/g de <i>Trichoderma</i>	
			1 ^a Época	2 ^a Época
1	THAR	IRGA 417	0,771 ^{ns}	24,066 cd*
2	TVIR	IRGA 417	1,404	25,266 cd
3	TSP2	IRGA 417	1,290	18,466 de
4	MIX ²	IRGA 417	0,914	31,200 bcd
5	THAR	-	0,477	38,066 abc
6	TVIR	-	0,501	49,666 a
7	TSP2	-	0,815	37,466 abc
8	MIX	-	0,836	43,066 ab
9	-	IRGA 417	0,398	3,333 e
10	-	-	0,555	2,666 e

¹ A dose de bioformulado de cada tratamento com *Trichoderma* spp. foi de 0,05 g/vaso. ² Mistura dos isolados THAR, TVIR e TSP2. ^{ns} Médias não diferem entre si pelo teste Tukey (5%). * Médias seguidas pela letra não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

Esta ausência de diferença significativa também é observada quando comparamos agrupando os tratamentos (Tabela 3) que continham *Trichoderma* spp. + plantas de arroz, somente *Trichoderma* spp., somente planta de arroz e o controle. Vale ressaltar que o solo utilizado no experimento não foi esterilizado para que o comportamento dos isolados fosse observado em condições ambientais próximas da realidade de uma lavoura de arroz.

TABELA 3. População de *Trichoderma* spp. em solo sob irrigação por inundação, com lâmina de água, comparando a média dos tratamentos que continham plantas de arroz com aqueles que não continham. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2007.

Tratamento	Descrição	UFC/g de <i>Trichoderma</i>	
		1 ^a Época	2 ^a Época
1	<i>Trichoderma</i> +Arroz ¹	2,708 ^{ns}	24,750 b*
2	<i>Trichoderma</i> ²	1,830	42,067 a
3	Arroz ³	1,633	3,333 c
4	Controle ⁴	2,333	2,667 c

¹ *Trichoderma*+Arroz = com aplicação de *Trichoderma* spp., isolados THAR, TVIR, TSP2, MIX e cultivar IRGA 417. ² Média dos tratamentos 6, 7, 8, 9 e 10 (Tabela 1). ³ Arroz = sem aplicação de *Trichoderma* spp. com plantas de arroz, cultivar IRGA 417. ⁴ Controle = sem aplicação de *Trichoderma* spp. e sem plantas de arroz. * Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste Tukey (5%). ^{ns} Médias não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

Nos resultados da 2ª época de avaliação, 45 dias após a primeira, foi possível verificar um aumento significativo da população quando comparamos todos os isolados testados (Tabela 2 e Figura 5), diferentemente dos resultados da 1ª época. Todos os tratamentos que continham *Trichoderma* spp. diferiram do tratamento com planta de arroz e o controle (Tabela 2).

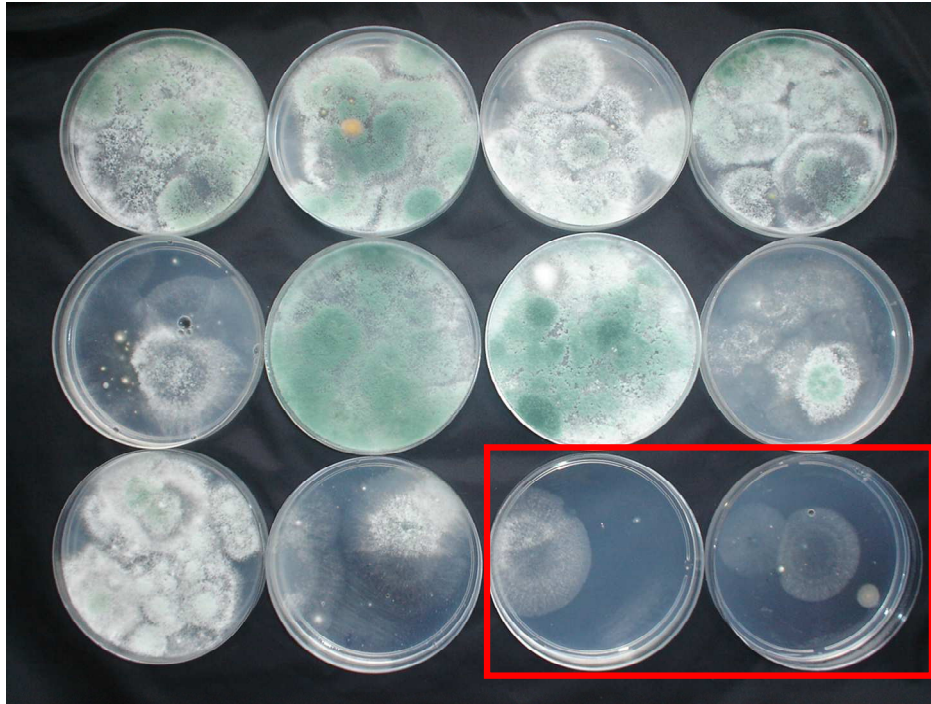


FIGURA 5. Placas de Petri com colônias de *Trichoderma* spp. mostrando o nível populacional nas amostras de solo coletadas no final do experimento. Placas destacadas pelo retângulo vermelho referem-se as testemunhas. Demais placas referem-se aos tratamentos com isolados de *Trichoderma* spp. com e sem plantas de arroz. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2007.

De maneira geral os isolados THAR, TVIR, TSP2 e MIX apresentaram um aumento na população, independente da presença de planta de arroz. Outra diferença verificada foi em relação ao isolado TSP2, que na presença de plantas de arroz apresentou uma população menor do que quando estava somente no solo. Essa diferença pode ser devido à adaptação dos isolados as plantas presentes no ambiente, pois o isolado TSP2 é oriundo de plantas de fumo, e pode não ter uma interação com as plantas de arroz semelhante aos isolados THAR e TVIR, que são oriundos destas plantas (Tabela 2).

Na Tabela 3, a comparação dos tratamentos agrupados onde, diferentemente da 1ª época de avaliação, nesta avaliação os tratamentos que continham somente *Trichoderma* spp. apresentaram população superior aos tratamentos com *Trichoderma* sp. + plantas de arroz e ambos tratamentos foram superiores ao tratamento somente com planta e ao controle. Esses resultados possibilitam deduzir que o fungo *Trichoderma* spp. é capaz de sobreviver em solo mesmo não tendo o ambiente de aerobiose que existe na rizosfera do arroz, e isto deve-se ao fato deste fungo ser anaeróbio facultativo.

Ainda, além dos isolados aumentarem sua população sob solo alagado, é possível verificar que o crescimento do fungo ocorre horizontalmente, pelo fato de que as coletas foram realizadas à 5 cm do local de inoculação do solo e/ou sementes.

Atualmente, são poucos os trabalhos na literatura que mostram a avaliação de *Trichoderma* spp. em ambiente com saturação da umidade do solo ou solo com irrigação por inundação. Rodriguez *et al.* (1999) não avaliaram o nível populacional de *T. harzianum* em solo alagado sob inundação, porém verificaram que um isolado deste fungo foi eficiente no controle de *R. solani* nestas condições e portanto, para isto houve um desenvolvimento da população do fungo. Weiler (2004) observou que isolados de *Trichoderma* sp. foram capazes de promover o crescimento de plantas de fumo em substrato saturado com água, o que não corresponde a um ambiente com lâmina de água, mas com excesso desta. Furuya *et al.* (2005) estudando o efeito de diversos fungos em plantas de arroz, obtiveram o isolamento de espécies de *Trichoderma* de lavouras com cultivo de arroz com irrigação por inundação.

4.3 Interação *Trichoderma* spp. e plantas de arroz

Na emergência de plantas observou-se uma resposta diferencial das cultivares testadas para o bioformulado TSP2 (Tabela 4). Pelo resultado da testemunha observou-se que as cultivares diferenciam-se entre si para a variável citada. No isolado TSP2 a cultivar 409 apresentou melhores resultados, porém neste caso foi igual às cultivares 410 e 418.

Estas três cultivares foram significativamente superiores a cultivar 416. As cultivares 417, 420 e 421 apresentaram resultado intermediário em relação às cultivares citadas anteriormente.

TABELA 4. Emergência de plantas de arroz, cultivares IRGA 409, 410, 416, 417, 418, 420, 421, inoculadas com três bioformulados à base de *Trichoderma* spp. Porto Alegre, RS, UFRGS, 2006.

Cultivar	Emergência de plântulas (%)			
	Testemunha	THAR	TVIR	TSP2
IRGA 409	100,00 a A*	86,66 a A	93,33 a A	86,66 a A
IRGA 417	100,00 a A	80,00 a A	73,33 a A	73,33 ab A
IRGA 418	100,00 a A	73,33 a B	86,66 a AB	80,00 a AB
IRGA 410	93,33 ab A	66,66 a A	80,00 a A	86,66 a A
IRGA 416	93,33 ab A	53,33 a BC	86,66 a AB	33,33 b C
IRGA 421	93,33 ab A	66,66 a A	60,00 a A	73,33 ab A
IRGA 420	73,33 b A	80,00 a A	80,00 a A	46,66 ab A

* Médias seguidas de letras iguais, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste Tukey (5%).

Se compararmos os resultados do isolado TSP2 com os resultados da testemunha verificamos que em ambos os casos a cultivar 409 foi superior. Entretanto, a cultivar com menor emergência na testemunha foi a 420, enquanto que no tratamento com o isolado TSP2 foi a 416.

O efeito significativo dos bioformulados na emergência das plantas de cada cultivar, separadamente, foi observado para as cultivares 416 e 418 (Tabela 4). Para as cultivares 409, 410, 417, 420 e 421 não houve diferença significativa entre os tratamentos e os resultados não foram apresentados. Verificou-se que os tratamentos THAR e TSP2 causaram uma redução na emergência da cultivar 416, quando comparado à testemunha. O tratamento TVIR não diferiu da testemunha. No caso da cultivar 420, o bioformulado TSP2 proporcionou uma redução significativa da emergência quando comparado aos tratamentos THAR e TVIR. Nenhum dos tratamentos diferenciou-se da testemunha.

Ezziyyani *et al.* (2004), em experimento realizado com pimentão, observaram uma redução no comprimento das radículas de sementes em meio de cultura BDA com filtrado

de *T. harzianum*, quando comparado com a germinação das sementes somente em meio BDA. Entretanto, quando micélio e esporos do fungo foram aplicados no solo houve um aumento da germinação das sementes, comparada à testemunha. É importante destacar que o isolado THAR que provocou resultado negativo na emergência de plantas de arroz é *T. harzianum*, resultado semelhante ao observado por Ezziyyani *et al.* (2004) em sementes de pimentão.

Gliotoxina e viridina, dois antibióticos produzidos por *Trichoderma* sp., inibiram a germinação e o crescimento radicular de mostarda na concentração de 1 ppm, em experimento realizado em placas de Petri. No entanto, essa concentração não causou inibição da germinação de trevo vermelho e trigo, mostrando as diferenças de reação das plantas em relação a metabólitos produzidos por *Trichoderma* spp. (Wright *apud* Bailey & Lumsden, 1998). Porém, os efeitos fitotóxicos de gliotoxina e viridina são limitados quando comparados com suas atividades antifúngicas (Lumsden *et al. apud* Bailey & Lumsden, 1998). Diferente desses resultados, Windham *et al.* (1986) verificaram um aumento significativo do número de plantas de tomate e fumo emergidas, tratadas com *Trichoderma* sp. Também, Kleifeld & Chet (1992) observaram uma maior percentagem de germinação quando sementes de feijão, rabanete, tomate, pimentão e pepino foram tratadas com *T. harzianum*. Semelhante a isso, Chang *et al.* (1986) verificaram que a aplicação de *T. harzianum* antecipou a germinação de sementes de pimentão em dois dias.

O efeito negativo observado pode ser explicado pelo fato de que o bioformulado é produzido em grãos de arroz e de que o fungo esteja adaptado a crescer nesse substrato e acaba degradando a semente de arroz durante o processo de germinação, combinado com a falta de matéria orgânica e nutrientes no substrato utilizado, areia e vermiculita e com a dose elevada de bioformulado utilizada. Isso faz com que o fungo possivelmente utilize a semente de arroz como fonte de nutrientes. Nas Figuras 6A e B é possível verificar que houve um amplo crescimento de *T. harzianum* sobre sementes de arroz (indicado pelas

setas vermelhas), onde pela Figura 6A poderíamos supor que o fungo impossibilitou a germinação da semente. Entretanto, na Figura 6B o crescimento de *Trichoderma* sp. na semente é bastante semelhante e houve germinação e crescimento da planta (indicado pela seta verde).

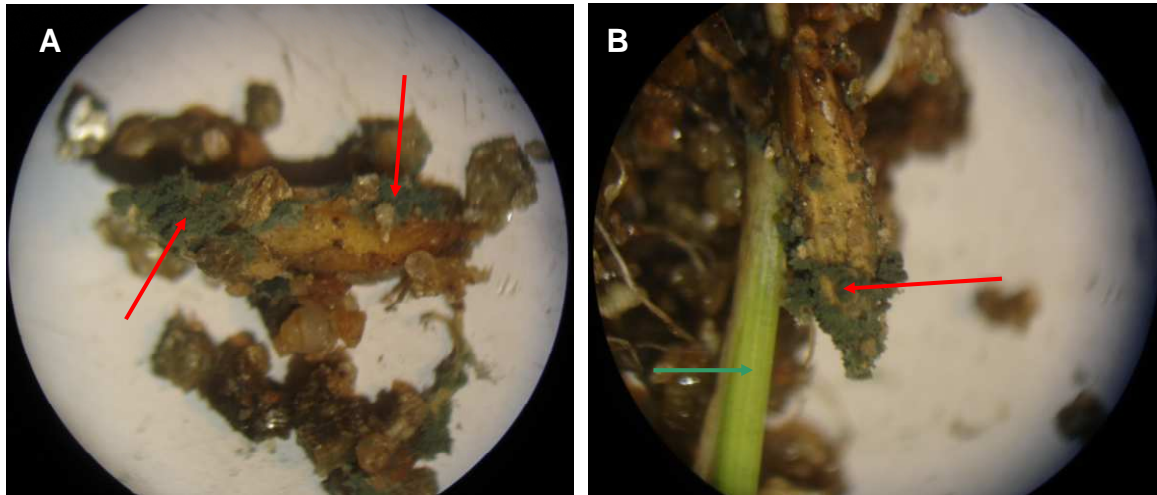


FIGURA 6. Crescimento de *T. harzianum* sobre sementes de arroz, (A) semente de arroz que não germinou e (B) semente de arroz germinada. Setas vermelhas indicam o crescimento de *T. harzianum* e seta verde indica caulículo da planta de arroz. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2006.

Quanto à altura de plantas, em todos os tratamentos houve comportamento diferenciado estatisticamente das cultivares de arroz, inclusive a testemunha. Na testemunha, as cultivares 409 e 418 foram superiores significativamente a cultivar 421. No tratamento THAR todas as cultivares apresentaram altura significativamente maior que a cultivar 420. Para o bioformulado TVIR a cultivar 409 foi novamente superior estatisticamente, quando comparada com as cultivares 410, 416, 420 e 421. O tratamento TSP2 proporcionou um melhor resultado na cultivar 418 que foi diferente estatisticamente das cultivares 409 e 410 (Tabela 5).

TABELA 5. Altura de plantas de arroz, cultivares IRGA 409, 410, 416, 417, 418, 420, 421, inoculadas com três bioformulados à base de *Trichoderma* spp. Porto Alegre, RS, UFRGS, 2006.

Cultivar	Altura de plantas (cm)			
	Testemunha	THAR	TVIR	TSP2
IRGA 409	25,63 a A*	24,69 a A	27,16 a A	21,39 bc A
IRGA 418	25,56 a AB	24,19 a AB	21,30 abc B	30,33 a A
IRGA 410	22,69 a A	23,60 a A	18,36 bcd A	21,09 bc A
IRGA 417	22,56 a A	18,30 ab A	21,89 ab A	24,56 ab A
IRGA 416	20,17 a A	22,63 a A	15,40 cd A	23,33 abc A
IRGA 420	18,26 ab A	12,10 b B	11,03 d B	13,40 c AB
IRGA 421	14,96 b B	20,16 ab AB	14,23 bcd AB	22,33 abc A

* Médias seguidas de letras iguais, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste Tukey (5%).

Quanto ao efeito dos diferentes tratamentos nas cultivares, para altura de plantas, verificou-se que as cultivares 409, 410 416 e 417 não apresentaram diferenças significativas para os tratamentos, por isso não estão apresentados na Tabela 5. Entretanto, para as cultivares 418, 420 e 421 observaram-se diferenças significativas (Tabela 5). Para nenhuma das cultivares houve diferença significativa dos tratamentos para a testemunha. As plantas da cultivar 418 tratadas com o bioformulado TVIR apresentaram altura inferior aquelas tratadas com o bioformulado TSP2.

Na cultivar 421 os resultados foram semelhantes aqueles observados na cultivar 418. As plantas tratadas com o isolado TSP2 foram superiores à testemunha, no entanto não diferiram das plantas tratadas com os demais isolados.

Corroborando com os resultados obtidos nesse trabalho, Resende *et al.* (2004) também não verificaram aumento significativo na altura de plantas de milho tratadas com *T. harzianum* em relação àquelas não tratadas.

Entretanto, os resultados obtidos por Weiler (2004) contrapõem-se, visto que, o autor observou que plantas de fumo tratadas com *Trichoderma* sp. apresentaram maior estatura que aquelas não tratadas, além de um maior diâmetro do caule. Porém, os resultados comentados acima, assemelham-se com os obtidos por Chang *et al.* (1986), onde os autores perceberam que um aumento de 10^4 para 10^6 esporos/g de solo na aplicação do

fungo resultou em um aumento significativo na altura de plantas de pepino. Yedidia *et al.* (2001) mostraram que plantas de pepino tratadas com *T. harzianum* (T-203) apresentaram um incremento significativo no comprimento de brotações e área foliar, quando comparadas à testemunha.

Nos resultados da variável massa seca da parte aérea, o comportamento das cultivares dentro de cada tratamento foi diferente daquele observado para altura de plantas. Não houve, em nenhum dos tratamentos comportamento estatisticamente diferente das cultivares. Entretanto, na testemunha foi possível observar diferença entre as cultivares, sendo que a cultivar 418 foi significativamente superior a cultivar 421 (Tabela 6). Como foi observada diferença apenas na testemunha, é possível considerar que os tratamentos com os isolados de *Trichoderma* spp. foram capazes de minimizar as diferenças de acúmulo de massa seca das cultivares, tornando-as com comportamento igual.

TABELA 6. Massa seca da parte aérea de plantas de arroz, cultivares IRGA 409, 410, 416, 417, 418, 420, 421, inoculadas com três bioformulados à base de *Trichoderma* spp. Porto Alegre, RS, UFRGS, 2006.

Cultivar	Peso seco da parte aérea (g x 10 ⁻²)			
	Testemunha	THAR	TVIR	TSP2
IRGA 418	2,413 a A*	1,838 a A	1,861 a A	2,491 a A
IRGA 416	1,895 ab AB	1,408 a AB	1,140 a B	2,033 a A
IRGA 410	1,786 ab A	2,130 a A	1,930 a A	1,566 a A
IRGA 409	1,500 ab A	1,888 a A	2,256 a A	1,316 a A
IRGA 420	1,428 ab A	0,866 a A	0,758 a A	0,975 a A
IRGA 417	1,426 ab A	1,027 a A	1,583 a A	1,350 a A
IRGA 421	1,178 b A	1,923 a A	1,041 a A	2,269 a A

* Médias seguidas de letras iguais, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste Tukey (5%).

Para efeito dos tratamentos dentro de cada cultivar, não foi observada diferença significativa nas cultivares 409, 410, 417, 418, 420 e 421. Na tabela 6, observa-se que para cultivar 416 o tratamento com o isolado TSP2 proporcionou um incremento de massa seca nas plantas quando comparado com o resultado proporcionado pelo isolado TVIR. Os

tratamentos TSP2 e THAR não diferenciaram-se da testemunha.

Assim como para altura de plantas, Weiler (2004) observou também um incremento de peso seco de parte aérea e raízes em plantas tratadas com isolados de *Trichoderma* sp., concordando com os resultados obtidos para a cultivar 416 (Tabela 6). Windham *et al.* (1986), em estudo com plantas de tomate e fumo, também verificaram um aumento significativo no peso seco de parte aérea e raízes. Kleifeld & Chet (1992) e Chang *et al.* (1986) também observaram um aumento do peso seco da parte aérea em plantas de pepino, pimentão e tomate. Yedidia *et al.* (2001) mostraram que plantas de pepino tratadas com *T. harzianum* (T-203) apresentaram um incremento significativo no peso seco.

Resultado contrário aos obtidos por esses autores e na cultivar 421, foi obtido por Resende *et al.* (2004) que, observaram apenas um aumento da matéria seca de raízes, sem verificar efeito na massa seca de parte aérea. Porém esse resultado corrobora com o obtido na cultivar 409.

Comparando os resultados obtidos neste trabalho com aqueles obtidos por Almança (2005), verifica-se que este autor observou que o isolado TVIR de *Trichoderma* sp. e a mistura dos isolados TVIR, THAR e TSP2 proporcionaram um aumento na altura das plantas. A massa seca das plantas somente foi afetada pelo isolado TVIR. Vale ressaltar que estes resultados foram obtidos em solo e com a presença do patógeno, diferentemente do atual experimento em que foi utilizada a semeadura em vermiculita + areia, sem a presença do patógeno e com uma dose mais elevada do microrganismo.

Furuya *et al.* (2005) observaram que no Japão tem sido verificado que mudas de arroz cultivadas em solo com média produtividade são afetadas por fungos que penetram nas raízes, mas não causam sintomas típicos. Dos fungos obtidos, 11,1% foram espécies do gênero *Trichoderma* e estas espécies apareceram em 19 dos 22 solos amostrados. Os autores observaram que um isolado de *T. harzianum*, assim como de *Gliocladium virens* Miller *et al.*, ocasionaram descoloração e inibição do desenvolvimento de raízes

secundárias. No entanto, não inibiu significativamente a elongação de raízes. Assim como no presente trabalho, Furuya *et al.* (2005) testaram a interação de *T. harzianum* com plantas de arroz em vermiculita e areia, ambiente pobre em matéria orgânica.

Vale ressaltar que a variação de resultados discutidos pode ser devido a que os mesmos foram obtidos em diferentes espécies de plantas cultivadas. Na literatura não se tem resultados que mostrem avaliação do efeito de isolados de *Trichoderma* sp. em plantas de arroz, portanto, a discussão dos resultados das cultivares dentro de cada tratamento ficou dificultada.

Para todas as variáveis analisadas observou-se um comportamento variado dos isolados de *Trichoderma* spp., demonstrando uma interação diferenciada deste microrganismo com as diferentes cultivares de arroz. Nestas interações também devemos levar em consideração que os isolados utilizados no trabalho são de diferentes espécies, o que também pode explicar os resultados encontrados.

Com isso, na possibilidade da elaboração de um produto comercial à base de *Trichoderma* spp. para a cultura do arroz, esse possivelmente deverá ser composto de diferentes isolados para possibilitar o uso em diferentes cultivares.

4.4 Produção de AIA, sideróforos e atividade proteásica por isolados de *Trichoderma* sp. como possíveis mecanismos envolvidos na promoção de crescimento

Uma das características dos fungos que podem participar do mecanismo de promoção de crescimento das plantas é a produção de AIA.

É possível verificar na Tabela 7 que três dos isolados testados produziram AIA, sendo que isolado TARV, *T. aureoviride*, diferenciou-se dos demais na produção deste hormônio vegetal. O isolado TSP2 também apresentou produção de AIA com valor menor somente que o isolado TARV.

TABELA 7. Produção de ácido indol acético (AIA) por isolados de *Trichoderma* spp. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2007.

Isolados <i>Trichoderma</i> spp.	AIA (μg AIA/mL)
TARV	19,499 a*
TSP2	6,527 b
TVIR	1,863 c
TPSK	0,000 c
THAR	0,000 c

* Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste Tukey (5%).

Gravel *et al.* (2007) verificaram a produção de ácido indol acético por um isolado de *T. atroviride*. No trabalho, os autores testaram a produção de AIA em três diferentes meios de culturas contendo os precursores triptofano, triptamina e triptofol.

A maior produção de AIA por *T. atroviride* foi observada com o precursor triptofol, seguido da triptamina e por fim do triptofano. Comparando os resultados obtidos com triptofano, o isolado testado por Gravel *et al.* (2007) produziu uma quantidade de AIA (6,2 $\mu\text{g/mL}$) semelhante ao isolado TSP2 (6,527 $\mu\text{g/mL}$) e inferior ao produzido pelo isolado TARV (19,499 $\mu\text{g/mL}$). No entanto, a quantidade produzida pelo *T. atroviride* com meio de cultura com triptofol foi superior a todas encontradas nos dois trabalhos.

Robinson *et al.* (1998) verificando a produção de ácido indol acético por *Colletotrichum gloesporioides* (Penz.) Sacc. f. sp. *aeschynomene* puderam observar que este fungo apresenta provavelmente dois tipos de rotas biossintéticas para a produção de AIA. Além disso, observaram que a produção de AIA é dependente do precursor triptofano. No teste com diferentes teores de triptofano no meio de cultura foi possível observar que com zero de triptofano não houve produção de AIA e esta produção foi sendo aumentada com teores de triptofano mais elevados.

A competição por nutrientes na interação de microrganismos no solo pode ser evidenciada pela produção de sideróforos pelos envolvidos na interação dos microrganismos presentes neste ambiente.

Conforme pode ser observado na Tabela 8 não houve diferença nos resultados quanto à coloração do meio de cultura nos isolados testados. Na avaliação realizada não foi feita a quantificação direta dos sideróforos. Entretanto, pela troca de coloração de azul para vermelho-amarelada no meio de cultura que houve crescimento dos isolados de *Trichoderma* spp. é possível afirmar que a quantidade produzida por estes é semelhante. Na testemunha que continha meio de cultura sem crescimento fúngico e com os mesmos reagentes adicionados nos tratamentos não foi verificada a troca de coloração para amarelo-avermelhado (Figura 7).

TABELA 8. Produção de sideróforos por isolados de *Trichoderma* spp. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2007.

Isolados <i>Trichoderma</i> spp.	Resultado*
THAR	++
TPSK	++
TSP1	++
TARV	++
TVIR	++
Controle	-

*++: intensa coloração amarelo-avermelhado; +: moderada coloração amarelo-avermelhado; -: ausência de coloração amarelo-avermelhado.

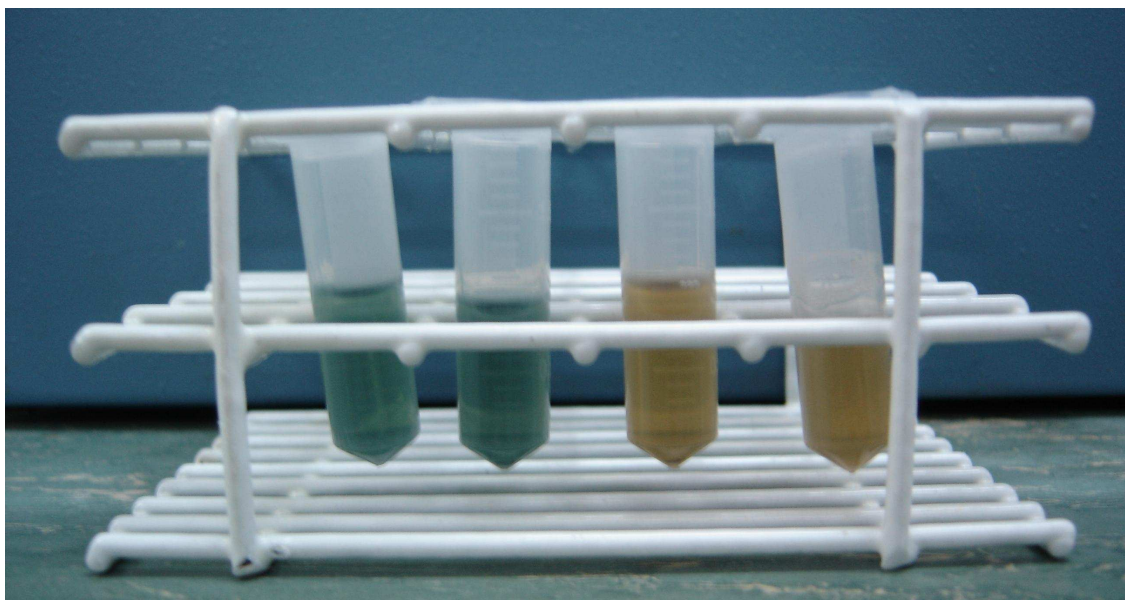


FIGURA 7. Produção de sideróforos por isolado de *Trichoderma* spp., frascos de coloração azul significa resultado negativo (testemunha) e de coloração amarelo-avermelhada (isolado THAR). Porto Alegre, RS, UFRGS. 2007.

Guimarães (2008) observou a produção de sideróforos por um isolado de *T. koningii* epifítico de bergamoteira, observando a troca de coloração do meio de cultura testado, produção semelhante a outros fungos filamentosos. Porém, este mesmo autor não verificou a produção de sideróforos por leveduras também epifíticas de bergamoteira.

A produção de sideróforos já foi observada por fungos endofíticos de cacaueteiro em meio de cultura sólido e líquido. Paz (2005) testou isolados de *T. viride*, *Nectria* sp., *Fusarium oxysporum* E.F. Sm. & Swingle e *Gliocladium catenulatum* Gilman & Abbott e observou que o isolado de *T. viride* apresentou maior reação de troca de cor o que indica uma maior produção de sideróforos do tipo hidroxamato em meio sólido. Porém, em meio líquido este isolado apresentou menor produção quando comparado aos demais fungos. Um dos possíveis fatores para este comportamento variado é que é sabido que fungos apresentam crescimento diferenciado em meios sólidos e líquidos (Nigane & Singh *apud* Paz, 2005) e também porque os sideróforos produzidos em meio líquido podem ser degradados ou complexados por outros metais antes de sua detecção.

Segundo Duffy & Défago (1999) a característica de produção de sideróforos pode

contribuir também para o biocontrole de doenças, com a redução da disponibilidade de ferro para os outros microrganismos e pelo possível aumento na biossíntese de compostos antimicrobianos pelo microrganismo produtor do sideróforo, pela participação do ferro nestas rotas. Então, os sideróforos quando produzidos em grande quantidade pelos fungos antagonistas, indisponibiliza o Fe^{3+} ao patógeno, o que leva a uma redução da doença e a uma promoção do crescimento das plantas. Adicionalmente, estes compostos quelantes de ferro podem atuar na indução de resistência das plantas contra fitopatógenos (Glick & Bashan, 1997).

Macagnan (2005) observou que os cinco isolados de *Streptomyces* testados em seu trabalho foram produtores de sideróforos do tipo hidroxamato. Também observou que a presença de Fe^{3+} no meio de cultura foi capaz de inibir a produção destes compostos, como já observado por Neilands (1995). Entretanto, apesar de ter sido observada a produção de sideróforos no meio de cultura, estes compostos não inibiram a germinação dos propágulos de *Crinipelis perniciosus* Stahel (Singer). Diferentemente do observado por Calvente et al. (1999) que verificaram a inibição na germinação de conídios e crescimento micelial por sideróforos produzidos por leveduras.

Vittone (2008) testando a expressão dos genes Tex 10, Tex 20 e Tex 21, envolvidos na produção de sideróforos, observou que estes genes foram expressados em condições de baixa disponibilidade de ferro. A expressão foi ausente quando o meio de cultura apresentava abundância de ferro. Este comportamento foi observado também quando foi avaliada a produção de sideróforos propriamente dita.

Até então foi discutido a produção de sideróforos por microrganismos em situações de aerobiose, condição da maioria dos sistemas de cultivos agrícolas. Entretanto, o arroz na região é cultivado em condições de anaerobiose, ou seja, solo irrigado sob inundação com lâmina de água permanente.

Nas condições normais de solo sob alagamento temos uma condição de anaerobiose

e redução na maior extensão do solo, com o nutriente ferro estando na forma de Fe^{+3} e disponível para as plantas de arroz e para os microrganismos. Entretanto, temos duas zonas em que há presença de oxigênio e, portanto uma condição de solo oxidado, o que quimicamente faz com que este nutriente fique na forma de Fe^{+2} e menos disponível para plantas e microrganismos (Vahl & Lopes, 1998). Nesta condição os microrganismos produtores de sideróforos, como os isolados de *Trichoderma* sp. testados neste trabalho, podem levar vantagem em relação aos patógenos e proporcionar condições favoráveis as plantas de arroz. A complexação de Fe^{+2} pelos sideróforos poderia ainda favorecer as plantas de arroz, pois teores altos de Fe^{+2} podem ser tóxicos e ainda podem reduzir a absorção de potássio.

A atividade proteásica é um importante mecanismo utilizado por fungos biocontroladores de fitopatógenos e promotores de crescimento, principalmente em combinação com enzimas como quitinases e glucanases (Howell, 2003).

No teste realizado para detecção de proteases deveria ter sido observada a formação de halos, se caso o fungo crescesse no meio de cultura onde a única fonte de carbono era a caseína. Entretanto, não foi observada a formação do halo, porém houve crescimento dos isolados de *Trichoderma* spp. Então a avaliação foi realizada medindo-se o diâmetro da colônia como indicativo da produção desta enzima, conforme já utilizado por Viterbo *et al.* (2002) e Paz (2005). Esta não formação de halo, apesar da utilização da fonte de carbono, pode estar relacionada à permanência de grande parte das enzimas extracelulares aderidas externamente na parede celular do fungo após a sua secreção (Barbosa *et al.*, 2001). Paz (2005) também observou a ausência de halo na avaliação da produção de enzimas quitinolíticas e glucanolíticas de *T. viride*.

Nos resultados apresentados na Tabela 9 observa-se que houve um comportamento variado dos isolados testados. O isolado TSP1 foi significativamente superior a todos os outros isolados, com exceção do TARV. Os isolados THAR, TPSK e TVIR não se

diferenciaram entre si, enquanto que o isolado TSP2 foi o que apresentou menor crescimento no meio de cultura, porém não foi significativamente inferior aos isolados THAR e TVIR.

TABELA 9. Atividade proteásica de isolados de *Trichoderma* spp. Porto Alegre, RS, UFRGS. 2007.

Isolados <i>Trichoderma</i> spp.	Atividade Proteásica (diâmetro da colônia – cm)
TSP1	5,775 a*
TARV	5,210 ab
TPSK	4,345 bc
THAR	4,005 cd
TVIR	3,890 cd
TSP2	2,950 d

* Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste Tukey (5%).

A ação de proteases é relacionada à inativação de enzimas hidrolíticas produzidas por fitopatógenos, como no caso de *B. cinerea* em plantas de feijão. Além disso, estas enzimas apresentam importância na degradação de proteínas da parede celular dos fitopatógenos que em combinação com a ação sobre as enzimas hidrolíticas, acabam reduzindo a capacidade de penetração do patógeno no seu hospedeiro (Rodriguez-Kabana *et al.*, 1978; Benitez *et al.*, 2004).

Paz (2005) detectou a produção de proteases somente em isolados de *G. catenulatum* e *T. viride* com eficiência de antagonismo já demonstrada contra *C. pernicioso*, onde possivelmente estas enzimas agem na inativação de enzimas e degradação da parede celular do patógeno. Esta atividade de degradação da parede celular de *T. harzianum* em *C. pernicioso* já foi observada por De Marco & Felix (2002).

Kamensky *et al.* (2003) observaram que a bactéria *Serratia plymuthica* (Dyar) Bergey foi capaz de produzir AIA em quantidades de 17 a 23 mg/L, resultado semelhante ao produzido pelo isolado TARV no presente trabalho. Além disso, os autores observaram

que esta bactéria apresentou atividade proteásica com formação de halo em torno da colônia pela degradação da caseína e também foi capaz de produzir sideróforos em meio líquido. Estas atividades foram relacionadas com a capacidade da bactéria em controlar *B. cinerea* e *S. sclerotiorum*.

Com estes resultados obtidos podemos fazer algumas relações com os resultados obtidos na interação das cultivares de arroz e os isolados de *Trichoderma* spp. O isolado TSP2 foi o que mais influenciou positivamente a massa seca e a altura das plantas, correlacionando com isto foi o que mais produziu AIA, com exceção do isolado TARV que não foi testado na interação com as plantas. Porém, o aumento populacional do isolado TSP2 quando testado em solo sob irrigação por inundação foi inferior as demais isolados testados.

O isolado TSP2 também proporcionou aumento de altura de planta e diminuição da incidência do enrolamento do arroz nos testes realizados por Almança (2005). Porém, este autor verificou que o isolado que apresentou melhor resultado no aumento da altura e massa seca de plantas e diminuição da incidência de enrolamento do arroz foi o TVIR.

5 CONCLUSÕES

1. Espécies de *Trichoderma* são capazes de sobreviver em condições de solo sob irrigação por inundação, o que torna-os com potencial para a utilização em estratégias de controle biológico para lavouras de arroz e cultivos com excesso de umidade no solo;

2. Espécies de *Trichoderma* possuem interação diferenciada com cultivares de arroz, isto possibilita uma utilização mais adequada dos diferentes isolados com as diferentes cultivares;

3. Os isolados testados produziram proteases, sideróforos e ácido indol acético, substâncias que podem estar envolvidas tanto no processo de promoção de crescimento quanto no controle de fitopatógenos na interação *Trichoderma* spp.-arroz-patógenos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É de suma importância que sejam realizados novos testes buscando identificar a função de cada uma das substâncias, sideróforos, proteases e ácido indol acético, na interação *Trichoderma* spp. Com por exemplo, buscando entender porque isolados que foram mais eficientes em trabalhos anteriores não apresentaram os maiores resultados de atividade proteásica no atual trabalho e também, se os isolados que foram maiores produtores de proteases poderão apresentar eficiência no controle de doenças e promoção de crescimento de plantas de arroz os isolados.

Outros trabalhos também são importantes de serem realizados como, testando diferentes quantidades de bioformulado aplicado no solo para tentar explicar as diferentes respostas das cultivares de arroz, buscando ajustar as doses mais adequadas para cada isolado; testando o efeito somente dos metabólitos de *Trichoderma* spp., através de ensaios com filtrados do fungo e o verificando outros possíveis mecanismos que podem estar envolvidos na interação *Trichoderma*-arroz-patógenos, produção de quitinases, glucanases, metabólitos voláteis e antibióticos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALMANÇA, M. A. K. **Trichoderma sp. no controle de doenças e na promoção do crescimento de plantas de arroz**. 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

ALTOMARE, C. *et al.* Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 7, p. 2926-2933, 1999.

ANKE, H. *et al.* Production of siderophores by strains of the genus *Trichoderma*. Isolation and characterization of the new lipophilic coprogen derivative palmitoyl coprogen. **Biomaterials**, London, v. 4, n. 3, p. 157-165, 1991.

BAE, Y. S.; KNUDSEN, G. Soil microbial biomass influence on growth and biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. **Biological Control**, Orlando, v. 32, p. 236–242, 2005.

BAILEY, B. A.; LUMSDEN, R. D. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. In: HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. (Ed.) **Trichoderma & Gliocladium**. London: Taylor & Francis, 1998. p.185-204.

BANO, N.; MUSARRAT, J. Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potencial biocontrol agent. **Current Microbiology**, New York, v. 46, p. 324-328, 2003.

BARBOSA, M. A. G. *et al.* Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, p. 98-104, 2001.

BEDENDO, I. P.; PRABHU, A. S. Doenças do arroz (*Oryza sativa* L.). In: KIMATI, H. *et al.* (Ed.) **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005. p.79-90.

BENÍTEZ, T. *et al.* Glucanolytic and other enzymes and their genes. In: KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. (Ed.) **Trichoderma & Gliocladium**. London: Taylor & Francis, 1998. p.101-128.

BENÍTEZ, T. *et al.* Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strain. **International Microbiology**, Barcelona, v. 7, n. 4, p. 249-260, 2004.

BOTTINI, R.; CASSÁN, F.; PICCOLI, P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 65, p. 497-503, 2004.

BREWER, M. T.; LARKIN, R. P. Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. **Crop Protection**, Oxford, v. 24, p. 939-950, 2005.

CALVENTE, V.; BENUZZI, D.; SANZ DE TOSETTI, M. I. Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the post-harvest pathogen *Penicillium expansum*. **International Biodeterioration Biodegradation**, Barking, v. 43, p. 167-172, 1999.

CHANDLER, R. F. **Arroz en los trópicos**. San José: IICA, 1984. 304p.

CHANG, Y. *et al.* Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 70, n. 2, p. 145-148, 1986.

CHET, I.; BAKER, R. Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 70, n. 10, p. 994-998, 1980.

CHET, I.; BAKER, R. Isolation and biocontrol potencial of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, n. 3, p. 286-290, 1981.

CONAB - Central de Informações Agropecuárias. Brasília, 2008. **Contém informações sobre área plantada, produção e produtividade das principais culturas agrícolas do Brasil**. 2008. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=131>>. Acesso em: 15 set. 2008.

CUBETA, M. A.; VILGALYS, R. Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 4, p. 480-484, 1997.

D'AMBRA, V.; MUTTO, S. Parasitism of *Trichoderma harzianum* on cystosori of *Polymyxa betae*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 115, p. 61-71, 1986.

DAL SOGLIO, F. K. *et al.* Production of chitinolytic enzymes and endoglucanase in the soybean rhizosphere in the presence of *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*. **Biological Control**, Orlando, v. 12, p. 111-117, 1998.

DE LA CRUZ, J. *et al.* A novel endo- β -1,3-glucanase, BGN 13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 177, n. 23, p. 6937-6945, 1995.

DE MARCO, J.L. ; FÉLIX, C.R. Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease. **BMC Biochemistry**. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1472-2091/3/3>. (2002)

DI PIETRO, A. *et al.* Endochitinase from *Gliocladium virens*: isolation, characterization and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 308-313, 1993.

DUFFY, B. K.; DÉFAGO, G. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore

- biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2429-2438, 1999.
- EASTBURN, D. M.; BUTLER, E. E. Effects of soil moisture and temperature on the saprophytic ability of *Trichoderma harzianum*. **Mycologia**, Lawrence, v. 83, n. 1, p. 257-263, 1991.
- ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 28, p. 719-725, 1982.
- ELAD, Y.; KAPAT, A. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, p. 177-189, 1999.
- EL-KATATNY, M. H. *et al.* Production of chitinase and β -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 38, n. 3, p. 173-180, 2000.
- EL-KATATNY, M. H. *et al.* Characterization of a chitinase and an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, p. 137-143, 2001.
- EZZIYYANI, M. *et al.* *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). **Anales de Biología**, Murcia, v. 26, p. 35-45, 2004.
- FAO. International Rice Commission. **Contém informações consumo e produção de alimentos**. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: jul. 2003.
- FEDEARROZ. **Guia de reconocimiento y manejo de las principales enfermedades del arroz**. Colômbia: Fedearroz, 2000. 52p.
- FURUYA, H. *et al.* Deleterious effects of fungi isolated from paddy soils on seminal root of Rice. **Journal of General Plant Pathology**, Tokio, v. 71, p. 333-339, 2005.
- GAMS, W.; BISSETT, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. (Ed.) ***Trichoderma & Gliocladium***. London: Taylor & Francis, 1998. p.3-34.
- GHISALBERTI, E. L. *et al.* Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrones. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 121, p. 287-291, 1990.
- GLICK, B. R.; BASHAN, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnology Advances**, New York, v. 15, p. 353-378, 1997.
- GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R. J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 39, p. 1968-1977, 2007.

GRIST, D. H. **Rice**. London: Longman, 1965. 548p.

GUIMARÃES, A. M. **Bioprospecção de microrganismos epifíticos de tangerineiras cv. montenegrina para o manejo da mancha preta do citros causada por *Guignardia Citricarpa* Kiely**. 2008. 91 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

HARMAN, G. E.; CHET, I.; BAKER, R. Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seeds as a biocontrol agent. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, n. 5, p. 569-572, 1981.

HARMAN, G. E. Development and benefits of rhizosphere competent fungi for biological control of plant pathogens. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 15, p. 835-843, 1992.

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

HOWELL, C. R. The role of antibiosis in biocontrol. In: KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. (Ed.) **Trichoderma & Gliocladium v.2**. London: Taylor & Francis, 1998. p.173-184.

HOWELL, C. R. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, n. 2, p. 177-180, 2002.

HOWELL, C. R. *et al.* Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment *Trichoderma virens*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, p. 248-252, 2002.

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

HUBBARD, J. P.; HARMAN, G. E.; HADAR, Y. Effect of soilborn *Pseudomonas* sp. on the biological control agent, *Trichoderma hamatum*, on pea seeds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, n. 5, p. 655-659, 1983.

IRGA. **Arroz Irrigado: Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil**. Porto Alegre, 2005. 128p.

JELLISON, J. *et al.* The isolation and immunolocalization of iron-binding compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 35, p. 805-809, 1991.

JOHNSON, L. F. *et al.* Isolation of *Trichoderma* sp. at low temperatures from Tennessee and Alaska soils. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 71, n. 2, p. 137-140, 1987.

KAMENSKY, M. *et al.* Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 35, p. 323–331, 2003.

- KLEIFELD, O.; CHET, I. *Trichoderma harzianum* – interaction with plants and effect on growth. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 144, n. 2, p. 267-272, 1992.
- KNUDSEN, G. R.; BIN, L. Effects of temperature, soil moisture, and wheat bran on growth of *Trichoderma harzianum* from alginate pellets. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, p. 724-727, 1990.
- KUNDU, A.; CHAKRABORTY, M. R.; CHATTERJEE, N.C. Biocontrol of Wood Decay by *Trichoderma* spp. – Retrospect and Prospect. **Asian Journal of Experimental Sciences**, Jaipur, v. 22, n. 3, p. 373-384, 2008.
- LEWIS, J. A.; LUMSDEN, R. D. Biocontrol of damping-off of greenhouse-grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp. **Crop Protecion**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 49-56, 2001.
- LIFSHITZ, R. *et al.* Mechanism of biological control of preemergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, p. 720-725, 1986.
- LIU, S.; BAKER, R. Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 70, n. 5, p. 404-412, 1980.
- LORITO, M. *et al.* Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*. II: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiase. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 302-307, 1993.
- LORITO, M. Chitinolytic enzymes and their genes. In: KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. (Ed.) **Trichoderma & Gliocladium** London: Taylor & Francis, 1998. p.73-100.
- LOUVEL, D.; BIDAUX, J. M. Observation de nouveaux symptomes pathologiques sur des varietes precoces de riz em Cote-d'Ivoire. **Agronomie Tropicale**, Paris, v. 32, p. 257-261, 1977.
- LUMSDEN, R. D. *et al.* Isolation and localization of the antibiotic gliotoxin produced by *Gliocladium virens* from alginate prill soil and soilless media. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, p. 230-235, 1992.
- MACAGNAN, D. **Isolamento e seleção de bactérias endosporogênicas e do tipo actinomicetos visando o biocontrole da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) e da podridão-parda (*Phytophthora* spp.) do cacauero (*Theobroma cacao* L) e estudo dos mecanismos de antagonismo, ao fungo *Crinipellis pernicioso***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 109 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.
- MACIEL, J. L. N. *et al.* Ocorrência do vírus RSNV (*Rice stripe necrosis virus*) em lavouras de arroz do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO DA CADEIA PRODUTIVA DE ARROZ, 2002, Florianópolis. **Resumos ...** Florianópolis, 2002. p. 491-492.
- MACIEL, J. L. N. *et al.* Efeito do tratamento de sementes e adubação sobre os danos e incidência da virose do enrolamento do arroz. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 4, 2005, Santa Maria. **Resumos ...** Santa Maria, 2005. p.514.

- McLEAN, K. L. *et al.* Effect of formulation on the rizosphere competence and biocontrol ability of *Trichoderma atroviride* C52. **Plant Pathology**, Surrey, v. 54, p. 212-218, 2005.
- MELO, I. S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* sp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.) **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p.7-23.
- MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de planta. In: LUZ, W. C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 261-295, 1996.
- MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de. **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. p.262.
- MELO, I. S.; FAULL, J. L. Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* sp. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 1, 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em: 15 jul. 2004.
- MENENDEZ, A. B.; GODEAS, A. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* attacking soybean plants. Degradation of the cell walls of this pathogen by *Trichoderma harzianum* (BAFC 742). **Mycopathologia**, Den Haag, v. 142, p. 153-160, 1998.
- METCALF, D. A.; DENNIS, J. J. C.; WILSON, C. R. Effect of inoculum density of *Sclerotium cepivorum* on the ability of *Trichoderma koningii* to suppress white rot of onion. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 3, p. 287-291, 2004.
- MISRA, J. K. *et al.* Fungal Pathogens. In: MEW, T. W.; MISRA, J. K. (Ed.) **A manual of rice seed health test**. Manila: IRRI, 1994. p. 75-89.
- MORALES, F. J. *et al.* 'Entorchamiento': una nueva enfermedad vira del arroz en Colombia. **Ascolfi Informa**, Cali, v. 21, p. 52-54, 1995.
- MORALES, F. J. *et al.* Emergence and partial characterization of rice stripe necrosis virus and its fungus vector in South America. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, n. 7, p. 643-650. 1999.
- MORALES, F. J. El entorchamiento del arroz: un modelo para el manejo integrado de enfermedades virales. **Foro Arrocerero Latinoamericano**, Cali, v. 7, n. 1, p. 12-15, 2001.
- MUIÑO, B. L. *et al.* Compatibilidad de *Trichoderma* spp. con plaguicidas y fertilizantes em el cultivo del tabaco. **Fitosanidad**, Habana, v. 5, n. 2, p. 3-9, 2001.
- NEILANDS, J. B. Methodoly in siderophores. In: CHIMIACK, E. (Ed.). **Structure and bonding**. Berlim : Springer Verlag, 1984. p. 1-24.
- NEILANDS, J. B. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 270, n. 45, p. 26723-26726, 1995.
- PANDOLFO, J. D. *et al.* Interação entre raízes de plantas de arroz e *Trichoderma* sp. em nível de campo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 38., 2005, Brasília. **Resumos...** Brasília, 2005. p. 129.

- PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potencial for biocontrol. **Annual Review Phytopathology**, Saint Paul, v. 53, p. 23-54, 1985.
- PARDO, F.; MUÑOZ, D. Agente causal del entorchamiento en el cultivo del arroz en los Llanos Orientales. **Arroz**, Bogotá, v. 43, p. 16-22, 1994.
- PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. The role of bacterial indoleacetic acid in the development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 3795-3801, 2002.
- PAZ, I. C. P. **Atividade biológica de metabólitos produzidos por microrganismos endofíticos de cacauero (*Theobroma cacao* L.) e o controle biológico de *Crinipellis pernicioso***. 2005. 98 f. Dissertação (Mestrado) –Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2005.
- RENSHAW, J. C. *et al.* Fungal siderophores: structures, functions and applications. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 1123-1142, 2002.
- RESENDE, M. L. *et al.* Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 793-798, 2004.
- RESTREPO, A. Nueva enfermedad en el arroz. **Arroz**, Bogotá, v. 18, p. 19-20, 1969.
- RIBEIRO, A. S.; SPERANDIO, C. A. Controle de doenças. In: PESKE, S. T.; NEDEL, J. L.; BARROS, A. C. S. A. (Ed.) **Produção de arroz irrigado**. Pelotas: Universitária, 1998. p.301-349.
- ROBINSON, M.; RIOV, J.; SHARON, A. Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis in *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *Aeschynomene*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 5030–5032, 1998.
- RODRIGUEZ, H. A. *et al.* Alternativas para controlar el añublo de la vaina causado por *Rhizoctonia solani* en arroz. **Fitopatología Venezolana**, Maracay, v. 12, n. 1, p. 18-21, 1999.
- RODRIGUEZ-KABANA, R.; KELLEY, W. D.; CURL, E. A. Proteolytic activity of *Trichoderma viride* in mixed culture with *Sclerotium rolfsii* in soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 24, p. 487-490, 1978.
- RYKER, T. C.; GOOCH, F. S. *Rhizoctonia* sheath spot of rice. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 28, n. 4, p. 233-246, 1938.
- SALGADO, C. H. G. *et al.* Efecto de la aplicacion de *Trichoderma harzianum* R. sobre la composicion cuantitativa de bacterias, hongos y actinomicetos de la rizosfera de solanaceas y su influencia en el crecimiento vegetativo. **Investigaciones Agropecuarias: Produccion Producto Vegetal**, Bayamo, v. 14, n. 1-2, 1999.
- SAMUELS, G.J. *et al.* **Trichoderma Online**: Systematic Mycology and Microbiology Laboratory. Disponível em: <<http://nt.ars-rin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>> Acesso em: 20 out. 2007.

SANTOS, J. A. *et al.* Interferência de fungicidas no crescimento micelial de *Trichoderma viride*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 38, 2005, Brasília. **Resumos...** Brasília, 2005. p. 129.

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

SILVA-RIBEIRO, R.T. **Avaliação do potencial de cinco linhagens de *Trichoderma spp.* como agentes de controle biológico contra o fitopatógeno *Botrytis cinerea***. 2001. 81 f. Tese (Doutorado) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. (Ed.) ***Trichoderma & Gliocladium***. London: Taylor & Francis, 1998. p.139-192.

SNEH, B. *et al.* **Identification of *Rhizoctonia* species**. Saint Paul: APS Press, 1991. 133p.

VAHL, L. C.; LOPES, S. I. Nutrição de Plantas. In: PESKE, S. T.; NEDEL, J. L.; BARROS, A. C. S. A. (Ed.) **Produção de arroz irrigado**. Pelotas: Universitária, 1998. p.149-206.

VELOSO, J. L. *et al.* Efeito do Roundup (Glyphosate) sobre o crescimento micelial de *Trichoderma stromaticum*, “in vitro”. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 38., 2005, Brasília. **Resumos...** Brasília, 2005. p. 109.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 255, p. 571-586, 2003.

VITERBO, A. *et al.* Significance of lytic enzymes from *Trichoderma spp.* in the biocontrol of fungal plants pathogens. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 81, p. 549-556, 2002.

VITTONI, G. **Genetic and Functional Analysis of Siderophores in *Trichoderma virens***. College Station: Texas A&M University, 2008. 97 f. Tese (Doutorado) – Department of Plant Pathology, Texas A&M University, College Station, 2008.

WANG, H. *et al.* Fusarium root rot of coneflower seedlings and integrated control using *Trichoderma* and fungicides. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 50, p. 317-329, 2005.

WEBER, K. A.; ACHENBACH, L. A.; COATES, J. D. Microorganisms pumping iron: anaerobic iron oxidation and reduction. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, p. 752-764, 2006.

WEBSTER, R. K.; GUNNELL, P. S. **Compendium of Rice Diseases**. Davis: APS Press, 1992. 62p.

WEILER, C. A. **A interação Fumo-*Trichoderma sp.* no sistema *floating* de produção de mudas**. 2004. 42 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

WILHITE, S. E. *et al.* Mutational analysis of gliotoxin production by the biocontrol fungus *Gliocladium virens* in relation to suppression of Pythium damping-off. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 816-821, 1994.

WINDHAM, M. T. *et al.* A Mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* sp. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, n. 5, p. 518-521, 1986.

XIE, H.; PASTERNAK, J. J.; GLICK, B. R. Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indoleacetic acid. **Current Microbiology**, New York, v. 32, p. 67-71, 1996.

YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; CHET, I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 3, p. 1061-1070, 1999.

YEDIDIA, I. *et al.* Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. **Plant Physiology Biochemistry**, New Delhi, v. 38, p. 863-873, 2000.

YEDIDIA, I. *et al.* Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 235, p. 235-242, 2001.

ZIMAND, G.; ELAD, Y. CHET, I. Biological control of *Botrytis cinerea* by *Trichoderma* spp. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 19, p. 252-253, 1991.