

Potencial antagonístico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*

Gisele Angélica de Souza Louzada¹, Daniel Diego Costa Carvalho¹, Sueli Corrêa Marques Mello^{2,4},

Murillo Lobo Júnior³, Irene Martins² & Leonardo Minaré Braúna²

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília – UnB,
CEP 70910-900, Brasília, DF, Brasil

²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,
Parque Estação Biológica, final W-5 norte, CP 02372, CEP 70770-900, Brasília, DF, Brasil

³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Arroz e Feijão,
Rod. GO-462, Km 12, Fazenda Capivara, Zona Rural,
CP 179, CEP 75375-000, Santo Antônio de Goiás, GO, Brasil

⁴Autor para correspondência: Sueli Corrêa Marques Mello, e-mail: smello@cenargen.embrapa.br

LOUZADA, G.A.S., CARVALHO, D.D.C., MELLO, S.C.M., LOBO JÚNIOR, M., MARTINS, I. & BRAÚNA, L.M. **Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*.** *Biota Neotrop.* 9(3): <http://www.biotaneotropica.org.br/v9n3/en/abstract?article+bn02509032009>.

Abstract: From 40 soil samples collected in the Rio Grande do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Goiás and Tocantins states, Brazil, a collection of 230 monosporic isolates of *Trichoderma* spp. was established using TSM selective media. In order to select efficient isolates for biological control, dual culture tests were carried out on PDA media at 20 °C for *Sclerotinia sclerotiorum* and at 25 °C for *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*. From the whole collection, 50 isolates presented antagonism against *F. solani* and 111 isolates to *S. sclerotiorum*. The antagonism against both pathogens was found in only 10% of the isolates. Scanning electron microscopy assessments with seven in vitro selected isolates showed that not all promoted hyperparasitism on the pathogens, suggesting the existence of other mechanisms of antagonism, as antibiosis or competition.

Keywords: *biological control, pathogen-antagonistic fungus interaction, culture collection of fungi.*

LOUZADA, G.A.S., CARVALHO, D.D.C., MELLO, S.C.M., LOBO JÚNIOR, M., MARTINS, I. & BRAÚNA, L.M. **Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*.** *Biota Neotrop.* 9(3): <http://www.biotaneotropica.org.br/v9n3/en/abstract?inventory+bn02509032009>.

Resumo: A partir de 40 amostras de solo, provenientes dos estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Goiás e Tocantins, uma coleção de 230 isolados monospóricos de *Trichoderma* spp. foi estabelecida, usando o meio seletivo TSM. Com o objetivo de selecionarem-se isolados com potencial para controle biológico de doenças, foram conduzidos testes de pareamento de culturas em meio BDA, a 20 °C para *Sclerotinia sclerotiorum* e a 25 °C para *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*. Antagonismo contra os dois patógenos foi observado em 10% dos isolados. Avaliações ao microscópio eletrônico de varredura de sete isolados selecionados in vitro mostraram que nem todos promoveram o hiperparasitismo dos patógenos, sugerindo a existência de outros mecanismos de antagonismo, como antibiose ou competição.

Palavras-chave: *controle biológico, interação patógeno-antagonista, coleção micológica.*

Introdução

Medidas de controle de doenças de plantas tais como o uso de variedades resistentes, fungicidas químicos e microrganismos antagonistas podem funcionar bem quando empregadas em conjunto, de modo integrado (Paula Júnior et al. 2008). Em culturas de alta rentabilidade, os fungicidas propiciam a obtenção das fibras e alimentos necessários à população mundial, mas mesmo para essas culturas o controle biológico de fitopatógenos apresenta uma série de vantagens em relação ao uso de fungicidas químicos. Na estratégia de controle biológico clássico, por exemplo, enquanto os fungicidas possuem um efeito temporário e necessitam de repetidas aplicações durante o ciclo das culturas, os agentes de controle biológico são capazes de se estabelecer, colonizar e dispersar no ecossistema (Ávila et al. 2005). Entretanto, o aspecto mais importante a ser considerado, qualquer seja a estratégia utilizada, é que esses agentes biológicos constituem alternativa viável para diminuir o potencial de inóculo de patógenos habitantes do solo, sem trazer danos ao meio ambiente (Mello et al. 2007).

Os fungos do gênero *Trichoderma* são de grande importância econômica para a agricultura, uma vez que são capazes de atuarem como agentes de controle de doenças de várias plantas cultivadas, promotores de crescimento e indutores de resistência de plantas a doenças (Mohamed & Haggag 2006, Fortes et al. 2007). Algumas linhagens desses fungos vêm recebendo grande atenção da pesquisa, também, por sua versatilidade de ação. Estas são capazes de produzir enzimas que degradam paredes celulares de outros fungos e produzem também substâncias antifúngicas (antibióticos), apresentam diversidade de estratégias de sobrevivência que as tornam altamente competitivas no ambiente e extraordinária capacidade de proliferação na rizosfera (Melo 1996, Resende et al. 2004). Ademais, certos isolados se mostram resistentes aos fungicidas, característica que os fazem potenciais agentes biorremediadores (Resende et al. 2004). A literatura disponível demonstra que os fungos desse gênero possuem amplas possibilidades para aplicação, tanto no biocontrole de patógenos foliares, quanto no de patógenos radiculares. Entre os vários exemplos, citam-se *Sclerotinia sclerotiorum* De Bary, *Phytophthora* spp. De Bary, *Cylindrocladium* spp. Morgan, *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitz. e *Sclerotium rolfsii* Saccardo (Santos & Dhingra 1982, Smith et al. 1990, Gomes et al. 2001, Patrício et al. 2001, Mello et al. 2007).

A formação de coleções de culturas microbianas é fundamental para o desenvolvimento de programas de controle biológico, uma vez que elas oferecem estoque representativo de amostras de isolados e oportunidade de gerar informações economicamente importantes para a seleção e utilização desses microrganismos (Mello, 2008). O objetivo deste trabalho foi determinar o potencial antagonístico de isolados de *Trichoderma* obtidos a partir de amostras de solos originários de diferentes ecossistemas, contra *S. sclerotiorum* e *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.

Material e Métodos

Quarenta amostras de solo foram coletadas em uma área de mata nativa e em várias outras de intensa atividade agrícola, em diferentes regiões dos estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Goiás e Tocantins (Tabela 1). As amostras foram retiradas a uma profundidade de 0-10 cm no perfil do solo, e armazenadas em câmara fria até o momento de sua utilização.

Uma massa correspondente a 10 g de solo de cada amostra foi transferida para frascos de 250 mL, ao qual se adicionaram 90 mL de água destilada. Após agitação por 40 minutos a 170 rpm, alíquotas de 1 mL dessas suspensões foram transferidas para outros tubos, procedendo-se as diluições seriadas em água destilada esterilizada.

Para o isolamento, alíquotas das diluições seriadas de 10^{-2} e 10^{-3} g de solo/mL de água foram semeadas em placas de Petri contendo o meio TSM (0,12 g de KH_2PO_4 ; 0,26 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,26 g de KNO_3 ; 1,0 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,0 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 1,0 mL de Igepal; 5 g de Sacarose; 20,0 g de ágar e 0,0025 g de Vinclozolin), conforme Corabi-Adell (2004). As culturas assim preparadas foram incubadas no escuro, sob temperatura ambiente. Após sete dias, colônias típicas de *Trichoderma* foram transferidas para meio batata-dextrose-ágar (BDA) e mantidas a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas, para obtenção das culturas puras. As características macroscópicas de cada colônia (micélio, pigmentação do meio, esporulação) e microscópicas (fiálides e conídios) dos isolados foram examinadas aos cinco dias, para confirmação do gênero.

Para a preservação dos isolados de *Trichoderma* obtidos, utilizouse o método descrito por Gonçalves et al. (2007). As culturas foram repicadas para placas contendo meio BDA, porém coberto com papel de filtro previamente esterilizado. Decorridos cinco dias (100% de colonização das placas), os papéis de filtro colonizados foram transferidos para placas esterilizadas e, então, mantidos em estufa a 27 °C. Após secagem, esses foram recortados e depositados em

Tabela 1. Origem e habitat dos isolados de *Trichoderma* obtidos a partir de amostras de solo.

Table 1. Geographical origin of *Trichoderma* isolates obtained from soil samples.

Origem	Cultura	Número de isolados obtidos
Água Fria - GO	Feijão comum	8
Água Fria - GO	Soja	12
Dueré - TO	Pousio	4
Dueré - TO	Sorgo consorciado com <i>B. brizantha</i>	7
Dueré - TO	Milheto	4
Dueré - TO	Milheto consorciado com <i>B. brizantha</i>	7
Dueré - TO	Milheto consorciado com <i>B. decumbens</i>	3
Dueré - TO	Solo arado - abertura de área	4
Farroupilha - RS	Morango	6
Guairá - SP	Cana de açúcar	9
Mucugê - BA	Batata	12
Mucugê - BA	Braquiária (<i>Brachiaria ruziziensis</i>)	13
Mucugê - BA	Feijão comum	20
Mucugê - BA	Solo arado	8
Mucugê - BA	Vegetação nativa	1
Patos de Minas - MG	Tomate	42
Rio Verde - GO	Soja	19
Santo Antônio de Goiás - GO	Milho orgânico	2
Santo Antônio de Goiás - GO	Feijão orgânico	10
Santo Antônio de Goiás - GO	Café orgânico	10
Santo Antônio de Goiás - GO	Banana orgânica	10
Santo Antônio de Goiás - GO	Mata nativa	4
Taquarituba - SP	Feijão comum	15

saquinhos de papel manteiga estéril envolto com papel alumínio, para o subsequente armazenamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Os isolados de *S. sclerotiorum* e *F. solani* foram obtidos, respectivamente, de planta de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e de amostras de solo procedentes de área de cultivo de feijoeiro com histórico de ocorrência das doenças. Para *F. solani*, o solo foi submetido à diluição em série e plaqueamento em meio semi-seletivo de Nash-Snyder, com as características confirmadas de acordo com Leslie & Summerell (2006). Em seguida, os isolados foram repicados para meio BDA e incubados em BOD (Fanem, Modelo 347) à temperatura de $20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas. Para obtenção dos isolados de *S. sclerotiorum*, escleródios foram desinfestados superficialmente com álcool 70% (1 minuto), imersos em hipoclorito de sódio 3% (1 minuto) e lavados por três vezes com água destilada autoclavada, seguindo-se o plaqueamento em meio BDA. Após a germinação da estrutura de resistência, o micélio foi mantido em meio BDA. Os patógenos foram re-inoculados em plantas de feijão comum, para a confirmação da patogenicidade.

O antagonismo dos isolados de *Trichoderma* contra ambos os patógenos foi avaliado pelo método de culturas pareadas, conforme descrito por Mello et al. (2007). Discos de ágar contendo micélio de *S. sclerotiorum* e do antagonista (5 mm de diâmetro) foram retirados de colônias com três dias de cultivo e depositados, simultaneamente, em extremidades opostas das placas de Petri, contendo meio BDA solidificado. Igual procedimento foi adotado para os testes com *F. solani*, exceto que o tempo de repicagem do patógeno foi de dois dias antes do antagonista. As placas foram incubadas em BOD a $20\text{ e }25\text{ }^{\circ}\text{C}$ para favorecimento dos patógenos *S. sclerotiorum* e *F. solani*, respectivamente (Bardin & Huang 2001).

Após sete dias de cultivo, avaliou-se o crescimento micelial dos fungos, conforme escala proposta por Bell et al. (1982), modificada. De acordo com essa escala, os isolados foram classificados como: nota 1, crescimento de *Trichoderma* sobre o patógeno, ocupando toda a superfície do meio; nota 1,5 - crescimento de *Trichoderma*, ocupando $7/8$ da superfície do meio; nota 2 - crescimento de *Trichoderma*, ocupando mais de $2/3$ da superfície do meio; nota 2,5 - crescimento de *Trichoderma*, ocupando $5/8$ da superfície do meio; nota 3 - crescimento de *Trichoderma*, ocupando aproximadamente metade da superfície do meio; nota 3,5 - crescimento de *Trichoderma*, ocupando $3/8$ da superfície do meio; nota 4 - crescimento de *Trichoderma*, ocupando $1/3$ da superfície do meio e nota 5 - ausência de crescimento de *Trichoderma*, patógeno ocupando toda a superfície do meio. Os experimentos foram realizados com três repetições. Considerou-se o isolado como antagonístico ou eficiente quando sua nota era menor ou igual a 3,0.

Para estudo da interação entre isolados de *Trichoderma* e dos patógenos, pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram utilizadas amostras provenientes do pareamento de culturas realizado com sete isolados de *Trichoderma*. Para tanto, discos de

BDA (5 mm de diâmetro) provenientes de áreas do confronto entre as colônias de sete isolados de *Trichoderma* spp. (cinco isolados com forte atividade antagonística: 26/01, 05/01, 15/05, 13/03 e 04/10; dois isolados inativos nos testes de cultura pareada: 03/06 e 50/02) e dos patógenos (*F. solani* e *S. sclerotiorum*) foram removidos e submetidos ao procedimento descrito por Bossola & Russel (1998), adaptado por Alves (2004), a seguir: tratamento com solução fixadora (glutaraldeído 2% e paraformaldeído 2%, em tampão cacodilato 0,05 M a pH 7,2) para fixação a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, seguido de 4 lavagens com tampão cacodilato 0,05 M (pH 7,2) e pós-fixados durante 1 hora a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ com tetróxido de ósmio (OsO_4) 1% em tampão cacodilato 0,01 M (pH 7,2). Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes com água destilada, e desidratadas em gradiente crescente de álcool etílico (10, 20, 30, 50, 70, 80, 90, 95 e 100%). Para secagem ao ponto crítico, utilizou-se dióxido de carbono no secador Elmitech Critical Point Drayer K850. As amostras foram, então, montadas sobre "stubs" de alumínio e metalizadas com ouro (20 nm) em evaporador de ouro Elmitech k 550. As visualizações foram realizadas ao microscópio eletrônico ZEISS® DSM 962, com o objetivo de observar o enrolamento de hifas dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre os patógenos. Todas as repetições de pareamento de culturas representativas dos sete isolados do antagonista foram incluídas neste estudo.

Resultados

Identificaram-se 230 isolados como pertencentes ao gênero *Trichoderma*. Destes, 50 isolados inibiram o crescimento micelial de *F. solani* e 111 de *S. sclerotiorum*, pelo teste de pareamento de culturas (notas menores que 3), conforme resumido na Tabela 2. O antagonismo contra os dois patógenos foi observado em 10% dos isolados (24 isolados). Praticamente metade dos isolados de *Trichoderma* (52%) não apresentaram efeito inibitório contra *F. solani* (notas superiores a 3), enquanto para *S. sclerotiorum*, esse índice foi de apenas 14%.

Após processamento para MEV das amostras representativas dos isolados 03/06, 04/10, 05/01, 13/03, 15/05, 26/01 e 50/02 de *Trichoderma*, obtidas do pareamento de culturas, interações entre patógeno e antagonista foram observadas apenas para os isolados 04/10, 05/01 e 50/02 (Figura 1).

Discussão

Embora eficientes contra os dois patógenos nos testes de cultura pareada, os isolados 13/03, 15/05 (ambos com origem em Patos de Minas, MG) e 26/01 (Dueré, TO) não revelaram qualquer tipo de parasitismo direto, pelos exames das amostras realizados ao MEV. Esse resultado corrobora dados obtidos por outros autores, evidenciando que, além do parasitismo direto, outros mecanismos podem estar envolvidos na ação antagonista de fungos do gênero *Trichoderma*,

Tabela 2. Potencial antagonístico de *Trichoderma* spp. contra *F. solani* e *S. sclerotiorum* segundo escala de Bell et al. (1982) ao 7º dia de cultivo pareado.

Table 2. Antagonistic potential of *Trichoderma* spp. against *F. solani* and *S. sclerotiorum* according to Bell's scale (Bell et al. 1982) with 7 days of dual culture.

Notas de acordo com a escala de Bell et al. (1982) atribuídas aos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. quanto ao antagonismo ao 7º dia*	Quantidade de isolados de <i>Trichoderma</i> avaliados contra os patógenos	
	<i>F. solani</i>	<i>S. sclerotiorum</i>
Menor que 3	50	111
3	70	88
Maior que 3	110	31

*Nota 3: *Trichoderma* ocupa aproximadamente metade da superfície da placa de Petri.

*Note 3: *Trichoderma* grown on 50% of Petri dish surface.

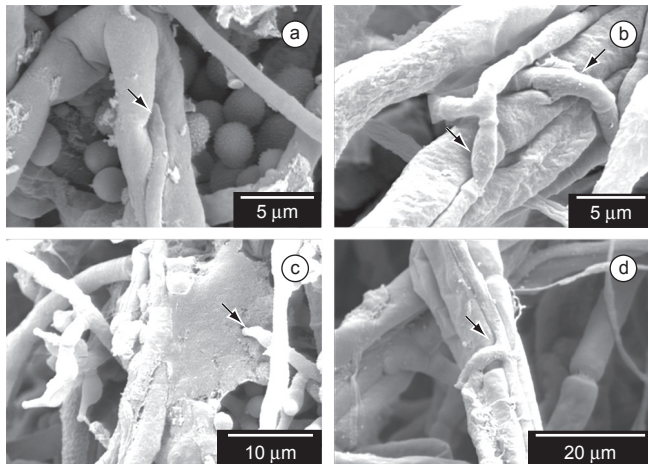


Figura 1. Eletromicrografia de varredura das interações entre *Trichoderma* spp. e os patógenos (*Fusarium solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*): a) Hifa de *Trichoderma* spp., isolado 04/10, aparentemente penetrando a hifa de *F. solani*; b) Enrolamento de hifas de *Trichoderma* spp., isolado 50/02, em hifas de *F. solani*; c) Aglomerado de hifas de *S. sclerotiorum* sendo parasitado por uma hifa de *Trichoderma* spp. (isolado 05/01); d) Parasitismo de hifas de *Trichoderma* spp., isolado 50/02, sobre *S. sclerotiorum*. As setas destacam as etapas de hiperparasitismo no hospedeiro: a, c) penetração, b) enrolamento e d) hifas paralelas.

Figure 1. Scanning electron micrographs of interactions between *Trichoderma* spp. and pathogen (*Fusarium solani* and *Sclerotinia sclerotiorum*): a) *Trichoderma* hyphae, isolate 04/10, causing an apparent penetration in *F. solani* hyphae; b) Hyphae of *Trichoderma*, isolate 50/02, rolled-up the *F. solani* hyphae; c) *S. sclerotiorum* hyphae complex colonized by the *Trichoderma* spp. hyphae, isolate 05/01; d) Parasitism of *Trichoderma* spp., isolate 50/02, on *S. sclerotiorum*. The arrows shown the hyperparasitism stages on the host: a, c) penetration, b) rolling-up and d) parallel hyphae.

tais como antibiose e competição (Benhamou & Chet 1996, Fravel 2005).

O primeiro trabalho que descreveu um isolado de *Trichoderma* como agente de biocontrole foi publicado por Weindling (1932). Desde então, várias espécies do gênero tem sido pesquisadas e desenvolvidas como agentes de biocontrole para diversos patógenos (Mello et al. 2007). Com este trabalho, foram obtidos dados que indicam o potencial antagonista de isolados de *Trichoderma* provenientes de diferentes regiões brasileiras, contra dois patógenos distintos. De fato, a literatura refere-se a espécies de *Trichoderma* como parasitas de uma ampla gama de fitopatógenos, a despeito da maioria dos agentes empregados no biocontrole de doenças de plantas apresentarem certo grau de especialização. Entretanto, o nível de controle pode variar, a depender do isolado e de sua adaptação às condições bióticas e abióticas específicas, dentro e entre espécies de *Trichoderma* (Dennis & Webster 1971a, b). Wells et al. (1972), por sua vez, observaram que espécies de *Trichoderma* podem ser diferencialmente seletivas contra diferentes fungos. Neste trabalho, vários isolados (10% do total) se revelaram altamente efetivos in vitro contra dois patógenos que atacam culturas economicamente importantes. Esse potencial necessita agora ser examinado por meio de bioensaios conduzidos sob condições controladas e de campo.

No presente estudo, entre as 23 amostras de solo utilizadas, 22 eram provenientes de áreas cultivadas. Portanto, a grande maioria dos isolados fora submetidos ao contato com patógenos e distúrbios como preparo do solo e aplicação de insumos. De forma oposta a este trabalho, Corabi-Adell (2004) trabalhou com isolados de *Trichoderma* provenientes de áreas nativas ou com reduzido efeito antrópico, e

verificou maior percentual de isolados potencialmente ativos contra fitopatógenos nos testes in vitro, de aproximadamente 80%. Aparentemente, não há outros relatos em literatura que informem sobre a perda de diversidade de *Trichoderma* spp. com o uso agrícola contínuo de solos ou a possível relação de tais distúrbios com a redução da frequência do antagonismo a patógenos. Além disso, os resultados obtidos neste trabalho não apresentaram correlação com a origem da amostra ou espécie vegetal cultivada.

O enrolamento de hifas de *F. solani* e *S. sclerotiorum* por *Trichoderma* (isolado 50/02 – proveniente de Rio Verde, GO) foi observado em MEV, conforme documentado nas Figuras 1b e 1d, respectivamente. Para o isolado 05/01 (Mucugê, BA), confirmou-se a atividade parasítica in vitro contra *S. sclerotiorum* (Figura 1c). Já o isolado 04/10 (Mucugê, BA), que foi ativo contra os dois patógenos em cultura pareada, apresentou capacidade parasítica apenas nas amostras do pareamento com *F. solani* (Figura 1a). Os três tipos de interações verificadas, penetração (Figura 1a e 1c), enrolamento (Figura 1b) e desenvolvimento de hifas paralelas (Figura 1d), podem ser interpretados como ação hiperparasítica (Agrios 2005). Os resultados obtidos em MEV para os isolados 04/10, 05/01 e 50/02 estão de acordo com relatos de Inbar et al. (1996) e Ávila et al. (2005), que verificaram por meio de microscopia eletrônica de varredura e de luz, interações semelhantes entre hifas de *T. harzianum* e *S. sclerotiorum*, em condições de cultivo simultâneo in vitro.

Este trabalho demonstrou a importância de se estabelecer coleções de culturas de *Trichoderma* spp., que sejam representativas de uma ampla área geográfica, pois bons antagonistas estão dispersos por diferentes regiões do país. Embora a grande maioria dos isolados de *Trichoderma* obtidos tenha sido considerada ineficiente na inibição do crescimento micelial dos dois patógenos testados, o presente trabalho gerou um número considerável de novas culturas fúngicas. A partir da incorporação dessas culturas às coleções de microrganismos da Embrapa, esses novos isolados passam a fazer parte do patrimônio de recursos genéticos microbianos, preservado no país. Vale salientar que a formação de coleções de culturas é de real importância pela possibilidade de se disponibilizar esses organismos para estudos e testes pela comunidade científica, o que poderá originar uma infinidade de produtos e processos de interesse da sociedade.

Finalmente, cabe lembrar que excelentes resultados com antagonistas obtidos in vitro podem não ser confirmados em condições de campo, já que esses organismos estão sujeitos às reações diferenciais do hospedeiro e do ambiente (Harman 1991). Um total de 24 isolados de *Trichoderma* sp. foram selecionados após pareamento de culturas contra os patógenos *F. solani* e *S. sclerotiorum*, incluindo o isolado 50/02 (hiperparasita, conforme demonstrado em MEV). Além dos isolados mencionados acima, os isolados que se mostraram ineficientes ou de moderada eficiência nos testes realizados, deverão ser mantidos em condições seguras, para uso futuro em estudos visando ao biocontrole de outros patógenos, bem como para prospecção da produção de enzimas e outros metabólitos de interesse agroindustrial.

Agradecimento

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por uma bolsa de mestrado e outra de doutorado.

Referências

- AGRIOS, G.N. 2005. Plant Pathology. 5 ed. Elsevier academic press, New York, 922p.
- ALVES, E. 2004. Curso introdutório à microscopia eletrônica de varredura. UFLA/FAEPE, Lavras, 43 p.

- ÁVILA, Z.R., CARVALHO, S.S., BRAÚNA, L.M., GOMES, D.M.P.A., SILVA, M.C.F. & MELLO, S.C.M. 2005. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonísticos a *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Embrapa Recursos Genéticos, Brasília. 30p. (Boletim Técnico de Desenvolvimento e Pesquisa 177).
- BARDIN, S.D. & HUANG, H.C. 2001. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 23 (1):88-98.
- BELL, D.K., WELLS, H.D. & MARKHAM, C. R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72(4):379-382.
- BENHAMOU, N. & CHET, I. 1996. Parasitism de Sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* 86(4):405-416.
- BOSSOLA, J.J. & RUSSEL, L.D. 1998. *Electron Microscopy*. 2 ed. Jones and Bartlett Publishers, Boston, 670p.
- CORABI-ADELL, C. 2004. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (HYPOCREALES – FUNGI) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, Rio Claro, 220 p.
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. 1971a. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* I. Production of non-volatile antibiotics. *T. Brit. Mycol. Soc.* 57(1):25-39.
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. 1971b. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. *T. Brit. Mycol. Soc.* 57(3):363-369.
- FORTES, F.O., SILVA, A.C.F., ALMANÇA, M.A.K. & TEDESCO, S.B. 2007. Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. *Rev. Árvore* 31(2):221-228.
- FRAVEL, D.R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* 43(1):337-359.
- GOMES, N.S.B., GRIGOLLET JUNIOR, A. & AUER, C.G. 2001. Seleção de antagonistas para controle de *Cylindrocladium spathulatum* em erva mate. *Bol. Pesq. Fl.* 43(1):123-128.
- GONÇALVES, R.C., ALFENAS, A.C. & MAFIA, R.G. 2007. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: *Métodos em Fitopatologia* (A.C. ALFENAS & R.G. MAFIA, eds). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 382p.
- HARMAN, G.E. 1991. Seed treatment for biological control of plant disease. *Crop Prot.* 10(3):166-171.
- INBAR, J., MENENDEZ, A. & CHET, I. 1996. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. *Soil Biol. Biochem.* 28(6):757-763.
- LESLIE, J.F. & SUMMERELL, B.A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Professional Publishing, Ames, Iowa. 385 p.
- MELLO, S.C.M. 2008. Recursos genéticos de microrganismos. In: *Agricultura Tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucional e políticas*. v. 2. (A.C.S. ALBUQUERQUE & A.G. SILVA). Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 700p.
- MELLO, S.C.M., ÁVILA, Z.R., BRAÚNA, L.M., PÁDUA, R.R. & GOMES, D. 2007. Cepas de *Trichoderma* para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad* 11(1):3-9.
- MELO, I.S. 1996. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. *Revis. Anu. Patol. Plantas* 4(1):261-295.
- MOHAMED, H.A.L.A. & HAGGAG, W.M. 2006. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. *Braz. J. Microbiol.* 37(2):181-191.
- PATRÍCIO, F.R.A., KIMATI, H. & BARROS, B.C. 2001. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. Antagônicos a *Pythium aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani*. *Summa Phytopathol.* 27(2):223-229.
- PAULA JÚNIOR, T.J., VIEIRA, R.F., TEIXEIRA, H., COELHO, R.R., CARNEIRO, J.E.S., ANDRADE, M.J.B. & REZENDE, A.M. 2008. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central brasileira: 2007-2009. EPAMIG-CTZM, Viçosa, 180p.
- RESENDE, M.L., OLIVEIRA, J.A., GUIMARÃES, R.M., VON, R.G.P. & VIEIRA, A.R. 2004. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. *Cienc. Agrotec.* 28(4):793-798.
- SANTOS, A.F. & DHINGRA, O.D. 1982. Pathogenicity of *Trichoderma* spp. on the sclerotia of *Sclerotinia Sclerotiorum*. *Can. J. Botany* 60(4):472-475.
- SMITH, V.L., WILCOX, W.F. & HARMAN, G.E. 1990. Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. *Phytopathology* 80(9):880-885.
- WEINDLING, R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of others soil fungi. *Phytopathology* 22(8):837-845.
- WELLS, H.D., BELL, D.K. & JAWORSKI, C.A. 1972. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 62(4):442-447.

Recebido em 08/04/09

Versão reformulada recebida em 25/06/09

Publicado em 05/07/09