



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL**

**ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. COMO AGENTES PROMOTORES DE
CRESCIMENTO E INDUTORES DE RESISTÊNCIA EM CITROS**

VANESSA MARCELE MACEDO

Araras

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL**

**ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. COMO AGENTES PROMOTORES DE
CRESCIMENTO E INDUTORES DE RESISTÊNCIA EM CITROS**

VANESSA MARCELE MACEDO

ORIENTADORA: PROFA. DRA. KATIA CRISTINA KUPPER

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Agroecologia e
Desenvolvimento Rural como requisito
parcial à obtenção do título de
**MESTRE EM AGROECOLOGIA E
DESENVOLVIMENTO RURAL**

Araras

2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M141it

Macedo, Vanessa Marcele.

Isolados de *Trichoderma spp.* como agentes promotores de crescimento e indutores de resistência em citros / Vanessa Marcele Macedo. -- São Carlos : UFSCar, 2014. 112 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Controle biológico. 2. Fitopatologia. 3. *Phytophthora nicotianae*. I. Título.

CDD: 632.96 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DE

VANESSA MARCELE MACEDO

APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL, DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 29 DE MAIO 2014.

BANCA EXAMINADORA:



PROF^ª. DR^ª. KATIA CRISTINA KUPPER
ORIENTADOR
(UFSCar)



PROF^ª. DR^ª. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI
(UFSCar)



PROF. DR. RONALDO JOSÉ DURIGAN DALIO
(IAC)

DEDICO

Aos meus pais, Paulo e Marina, e à minha avó Helena, meus exemplos de vida, honestidade e humildade. Minha eterna gratidão pelo amor incondicional e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus queridos irmãos, Paulo e Kleber, por serem a minha força e meus verdadeiros amigos,

Aos meus sobrinhos, Maísa, Neto e Gabriel, por serem minha alegria e o pensamento futuro,

Ao meu namorado, Igor Guatelli, por seu carinho e companheirismo

OFEREÇO

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.

Marcel Proust

AGRADECIMENTOS

À Profa Katia Cristina Kupper, por ter me acolhido no Centro de Citricultura/IAC, pela orientação e oportunidade de trabalhar com Controle biológico e Fitopatologia;

Aos meus pais (Paulo e Marina) e irmãos (Kleber e Poul): o amor de vocês me trouxe até aqui e tornou mais leve esta longa jornada;

Ao meu namorado, Igor Guatelli, por seu apoio reflexivo e carinho reconfortante nos momentos de dificuldade;

À Universidade Federal de São Carlos/Centro de Ciências Agrárias e ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural pela oportunidade de realização do curso;

Ao Centro de Citricultura/IAC pela oportunidade de realizar esta pesquisa;

À Profa Sandra Regina Ceccato Antonini, do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular – LAMAM/UFSCar/CCA, pelo carisma e por sempre ter me recebido de braços abertos;

À Profa Simone Daniela Sartorio, da UFSCar/CCA, pelos ensinamentos e colaboração nas análises estatísticas dos dados, imprescindíveis para este estudo;

À minha querida amiga Jéssica Camargo e sua mãe, Alessandra, pela ajuda e carinho no momento que mais precisei;

Aos amigos que fizeram parte desta etapa da minha vida: Vitória Donadon, Rafaela Malpica, Graziela Gomes, Flávia Crivelari Fassis, Lísia Attílio, Alex Soares, Thaís Sinico, Maria Carolina Bueno Ayres, Thamiris Sipriano - os levarei para sempre em meu coração!!

Aos funcionários do Centro de Citricultura/IAC pela disponibilidade e amizade: André, Everaldo, Vanderlei, Gomes e Rose;

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Controle biológico e Fitopatologia do Centro de Citricultura por termos dividido momentos tão importantes de nossas vidas.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	13
RESUMO	16
ABSTRACT	18
1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 Agroecologia e sustentabilidade	22
2.2 Citricultura	24
2.3 Doenças causadas por <i>Phytophthora</i> em citros	26
2.3.1 Sintomas	29
2.3.2 Medidas de Controle	33
2.4 Controle biológico	35
2.5 <i>Trichoderma</i> spp.	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Microrganismos	43
3.2 Influência de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. no crescimento micelial de <i>Phytophthora nicotianae</i>	44
3.3 Produção de substâncias antifúngicas termoestáveis e livres de células de <i>Trichoderma</i> spp. e seu efeito sobre o crescimento micelial de <i>Phytophthora nicotianae</i>	44
3.4 Produção de metabólitos voláteis por <i>Trichoderma</i> spp.	45
3.5 Incubação das culturas, avaliação e delineamento estatístico dos experimentos <i>in vitro</i>	45
3.6 Promoção de crescimento de porta-enxertos de citros pela aplicação de <i>Trichoderma</i> spp.	46
3.7 Indução de resistência à gomose de <i>Phytophthora nicotianae</i>	47
3.8 Controle de <i>Phytophthora nicotianae</i>	48
4. RESULTADOS	50
4.1 Influência do cultivo pareado dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. no crescimento micelial de <i>Phytophthora nicotianae</i>	50

4.2	Produção de metabólitos livres de células e termoestáveis pelos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e seu efeito sobre o crescimento micelial de <i>Phytophthora nicotianae</i>	51
4.3	Produção de metabólitos voláteis por <i>Trichoderma</i> spp.	53
4.4	Promoção de crescimento de porta-enxertos de citros pela aplicação de <i>Trichoderma</i> spp.	53
4.5	Indução de resistência à gomose de <i>Phytophthora nicotianae</i> em porta-enxertos de citros.....	87
4.6	Controle de <i>Phytophthora nicotianae</i>	92
5.	DISCUSSÃO	94
6.	CONCLUSÕES	100
7.	LITERATURA CITADA	101
	APÊNDICE	111

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Número e identificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.; Hospedeiro e Procedência.....	43
Tabela 2 - Porcentagem de inibição da colônia de <i>Phytophthora nicotianae</i> após cultivo pareado com os isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	50
Tabela 3 - Porcentagem de inibição da colônia de <i>Phytophthora nicotianae</i> pelos metabólitos termoestáveis e livres de células dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	52
Tabela 4 - Influência dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. na altura de plantas de Tangerina Sunki, após 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias do tratamento.	55
Tabela 5 - Descrição dos modelos de regressão para altura em plantas de Tangerina Sunki após tratamento com os isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	56
Tabela 6 - Influência dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. no número de folhas de Tangerina Sunki, após 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias do tratamento.	62
Tabela 7 - Descrição dos modelos de regressão para folhas em plantas de Tangerina Sunki, após tratamento com diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	63
Tabela 8 - Influência dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. na massa de matéria seca de Tangerina Sunki	64
Tabela 9 - Influência dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. na altura de plantas Citrumelo Swingle, após 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias do tratamento.	66
Tabela 10 - Descrição dos modelos de regressão para altura em plantas de Citrumelo Swingle após tratamento com diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	67
Tabela 11 - Influência dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. no número de folhas de Citrumelo Swingle, após 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias do tratamento. ...	73
Tabela 12 - Descrição dos modelos de regressão para folhas em plantas de Citrumelo Swingle. após tratamento com diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp	74

Tabela 13 - Influência dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. na massa de matéria seca de Citrumelo Swingle.....	75
Tabela 14 - Influência dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. na altura de Limão Cravo, após 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias do tratamento.	77
Tabela 15 - Descrição dos modelos de regressão para altura das plantas de Limão Cravo após tratamento com diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp...	78
Tabela 16 - Influência dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. no número de folhas de Limão Cravo, após 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias do tratamento.	84
Tabela 17 - Descrição dos modelos de regressão para folhas em plantas de Limão Cravo após tratamento com diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp...	85
Tabela 18 - Influência dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. na massa de matéria seca de Limão Cravo.	86
Tabela 19 - Quadro de análise de variância para o efeito da microbiolização de sementes com os isolados de <i>Trichoderma</i> spp na indução de resistência à <i>P. nicotianae</i> , em plantas de Tangerina Sunki, Limão Cravo e Ctrumelo Swingle. Avaliado pelo tamanho de lesão sob a casca (interna), 40 dias após a inoculação das plantas.....	88
Tabela 20 - Efeito da microbiolização de sementes com os isolados de <i>Trichoderma</i> spp na indução de resistência à <i>Phytophthora nicotianae</i> , em plantas de Tangerina Sunki, Limão Cravo e Ctrumelo Swingle. Avaliado pelo tamanho de lesão sob a casca (interna), 40 dias após a inoculação das plantas.	88
Tabela 21 - Quadro de análise de variância para o efeito da microbiolização de sementes com os isolados de <i>Trichoderma</i> spp na indução de resistência à <i>P. nicotianae</i> , em plantas de Tangerina Sunki, Limão Cravo e Ctrumelo Swingle. Avaliado pelo tamanho de lesão sobre a casca (externa), 40 dias após a inoculação das plantas.....	89
Tabela 22 - Efeito da microbiolização de sementes com os isolados de <i>Trichoderma</i> spp na indução de resistência à <i>Phytophthora nicotianae</i> , em plantas de Tangerina Sunki, Limão Cravo e Ctrumelo Swingle. Avaliado pelo tamanho de lesão sob a casca (externa), 40 dias após a inoculação das plantas.	89

- Tabela 23** - Quadro de análise de variância para o efeito da microbiolização de sementes com os isolados de *Trichoderma* spp. na sobrevivência de plântulas de Tangerina Sunki e Limão Cravo, em substrato contaminado com *P. nicotianae*, avaliado 60 dias após a semeadura. 92
- Tabela 24** - Efeito da microbiolização de sementes com os isolados de *Trichoderma* spp. na sobrevivência de plântulas de Tangerina Sunki e Limão Cravo, em substrato contaminado com *P. nicotianae*, avaliado 60 dias após a semeadura. 93
- Tabela 25** - Porcentagem de inibição da colônia de *Phytophthora nicotianae* após cultivo pareado com os isolados de *Trichoderma* spp. (Duplicata). 112

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas reprodutivas do patógeno: oósporo, clamidósporo, esporângio e zoósporo.....	29
Figura 2 - Doenças incitadas por <i>Phytophthora</i> spp. em citros: A. “Damping off” de pós-emergência; B. “Damping off” de pré-emergência; C. Podridões de raízes e radículas; D. Gomose em tronco; E. Lesões em folhas; F. Lesões em brotos novos; G: Podridão parda de frutos.. ..	32
Figura 3 - Tetraedro da doença: Interações entre patógeno e microrganismos não patogênicos no sítio de infecção do hospedeiro, influenciados pelo ambiente.	35
Figura 4 - Influência dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. (T) no crescimento micelial de <i>Phytophthora nicotianae</i> (P) em cultivo pareado. (A. Controle, B. <i>P. nicotianae</i> x ACB-36, C. <i>P. nicotianae</i> x ACB-38, D. <i>P. nicotianae</i> x ACB-14, E. <i>P. nicotianae</i> x ACB-02).....	51
Figura 5 - Influência dos metabólitos livres de células dos isolados ACB-38 (<i>T. koningii</i>) e ACB-02 (<i>Trichoderma</i> spp.)	53
Figura 6 - Estudo da promoção de crescimento: modelos de regressão de altura de plantas de Tangerina Sunki, após tratamento com isolados de <i>Trichoderma</i> spp.- ACB-02, ACB-03, ACB-04 e ACB-05.....	57
Figura 7 - Estudo da promoção de crescimento modelos de regressão de altura de plantas de Tangerina Sunki, após tratamento com isolados de <i>Trichoderma</i> spp.- ACB-14, ACB-32, ACB-33 e ACB-34.....	58
Figura 8 - Estudo da promoção de crescimento: modelos de regressão de altura de plantas de Tangerina Sunki, após tratamento com isolados de <i>Trichoderma</i> spp.- ACB-36, ACB-37, ACB-38 e ACB-40.....	59
Figura 9 - Estudo da promoção de crescimento: modelos de regressão de altura de plantas de Tangerina Sunki, após tratamento com isolados de <i>Trichoderma</i> spp.- ACB-42, ACB-183/5, ACB-T1 e ACB-T6.....	60

Figura 10 - Estudo da promoção de crescimento: modelos de regressão de altura de plantas de Tangerina Sunki, após tratamento com isolados de <i>Trichoderma</i> spp.- ACB-T002, ACB-43 e Mistura dos isolados.	61
Figura 11 - Estudo da promoção de crescimento modelos de regressão de altura de plantas de Citrumelo Swingle, após tratamento com isolados de <i>Trichoderma</i> spp.- ACB-02, ACB-03, ACB-04 e ACB-05.	68
Figura 12 - Estudo da promoção de crescimento: modelos de regressão de altura de plantas de Citrumelo Swingle, após tratamento com isolados de <i>Trichoderma</i> spp.- ACB-14, ACB-32, ACB-33 e ACB-34.	69
Figura 13 - Estudo da promoção de crescimento: modelos de regressão de altura de plantas de Citrumelo Swingle, após tratamento com isolados de <i>Trichoderma</i> spp.- ACB-36, ACB-37, ACB-38 e ACB-40.	70
Figura 14 - Estudo da promoção de crescimento: modelos de regressão de altura de plantas de Citrumelo Swingle, após tratamento com isolados de <i>Trichoderma</i> spp.- ACB-42, ACB-183/5, ACB-T1 e ACB-T6.	71
Figura 15 - Estudo da promoção de crescimento modelos de regressão de altura de plantas de Citrumelo Swingle, após tratamento com isolados de <i>Trichoderma</i> spp.- ACB-T002, ACB-43 e Mistura dos isolados.	72
Figura 16 - Estudo da promoção de crescimento: modelos de regressão de altura de plantas de Limão Cravo, após tratamento com isolados de <i>Trichoderma</i> spp.- ACB-02, ACB-03, ACB-04 e ACB-05.	79
Figura 17 - Estudo da promoção de crescimento: modelos de regressão de altura de plantas de Limão Cravo, após tratamento com isolados de <i>Trichoderma</i> spp.- ACB-14, ACB-32, ACB-33 e ACB-34.	80
Figura 18 - Estudo da promoção de crescimento modelos de regressão de altura de plantas de Limão Cravo, após tratamento com isolados de <i>Trichoderma</i> spp.- ACB-36, ACB-37, ACB-38 e ACB-40.	81
Figura 19 - Estudo da promoção de crescimento: modelos de regressão de altura de plantas de Limão Cravo, após tratamento com isolados de <i>Trichoderma</i> spp.- ACB-42, ACB-183/5, ACB-T1 e ACB-T6.	82

- Figura 20** - Estudo da promoção de crescimento: modelos de regressão de altura de plantas de Limão Cravo, após tratamento com isolados de *Trichoderma* spp.- ACB-T002, ACB-43 e Mistura dos isolados83
- Figura 21** - Efeito dos isolados de *Trichoderma* spp. na indução de resistência à *Phytophthora nicotianae*: Gráficos de dispersão - Escala dos dados originais (**A**) e transformados (**B**) referentes às lesões interna (sob a casca) e externa (sobre a casca) nas variedades Tangerina Sunki (**V1**), Limão Cravo (**V2**) e Citrumelo Swingle (**V3**).91

ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. COMO AGENTES PROMOTORES DE CRESCIMENTO E INDUTORES DE RESISTÊNCIA EM CITROS

Autora: VANESSA MARCELE MACEDO

Orientadora: Profa. Dra. KATIA CRISTINA KUPPER

RESUMO

As espécies de fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* podem ser encontradas em muitos ambientes, principalmente na rizosfera, como colonizadores de raízes de plantas e promotores de crescimento das mesmas, por facilitarem a absorção de nutrientes, além de protegê-las contra o ataque de fitopatógenos. Sendo assim, esse trabalho teve por objetivo selecionar isolados de *Trichoderma* spp. com potencial de aplicação como agentes promotores de crescimento e indutores de resistência à *Phytophthora nicotianae* em porta-enxertos de citros. Primeiramente, avaliou-se *in vitro* a produção de metabólitos voláteis, termoestáveis e livres de células de dezoito isolados de *Trichoderma* spp., assim como, a atividade antagônica sobre o crescimento micelial do patógeno. Os testes *in vivo* compreenderam estudos de promoção de crescimento de três porta-enxertos: tangerina Sunki, citrumelo Swingle e limão Cravo, avaliando-se a altura e o número de folhas aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias após o tratamento com o antagônico e, a produção de massa seca da parte aérea e raiz das plantas. Microbiolizou-se as sementes dos porta-enxertos e testou-se a indução de resistência pela inoculação no caule, 180 dias após o tratamento, avaliada pelo comprimento de lesão. O teste de controle de *Phytophthora* foi realizado pela microbiolização de sementes de tangeriana Sunki e limão Cravo. Pelos resultados dos testes *in vitro*, verificou-se que, todos os isolados de *Trichoderma* spp. proporcionaram mais de 50 % de inibição na colônia do fitopatógeno, porém, nenhum produziu metabólitos voláteis. Cinco isolados produziram metabólitos livres de células e, somente o ACB-38 produziu substâncias antifúngicas termoestáveis, com capacidade para inibir o desenvolvimento do patógeno. *Trichoderma* spp. têm potencial para

promover crescimento de porta-enxertos cítricos, bem como induzir a resistência à *P. nicotianae*, porém, as respostas variam de acordo com o genótipo da planta e com o isolado do antagonista utilizado. A maioria dos isolados de *Trichoderma* spp. testada foi capaz de controlar *P. nicotianae* em plantas de tangerina Sunki e limão Cravo.

Termos para indexação: *Phytophthora nicotianae*, controle biológico, porta-enxertos, substâncias antifúngicas, *Phytophthora parasitica*.

***Trichoderma* spp. ISOLATES AS GROWTH PROMOTERS AND RESISTANCE INDUCERS IN CITRUS**

Author: VANESSA MARCELE MACEDO

Leadership: Profa. Dra. KATIA CRISTINA KUPPER

ABSTRACT

The species of fungi belonging to the genus *Trichoderma* can be found in many environments, especially in the rhizosphere, as colonizers of roots and plant growth promoters, for their ability in facilitating the absorption of nutrients and protecting them against attack by pathogens. Thus, this study aimed to test isolates of *Trichoderma* spp. for application as growth promoting agents and inducers of resistance to *Phytophthora nicotianae* in citrus rootstocks. First, eighteen isolates of *Trichoderma* were tested *in vitro* for their ability in inhibiting mycelial growth of *P. nicotianae*, in terms of: production of volatiles or thermostable antifungal substances and cell free compounds. The growth promotion test was done with three rootstocks: Sunki tangerine, Swingle citrumelo and Rangpur lime, whose height and number of leaves were measured at 30, 60, 90, 120, 150 and 180 days after treatment with the antagonistic; and in the end of the test, the measuring of dry weight for shoots and roots of plants was measured. The seeds of the rootstocks were treated with the *Trichoderma* spp isolates and, 180 days later, was tested their capacity of resistance induction through pathogen inoculation on stem, assessed by lesion length. The *Phytophthora* control assay was carried out by seeds microbiolization of tangerine Sunki and Rangpur lime. By the results, it was found that all *Trichoderma* spp. isolates provided more than 50% inhibition of the pathogen colony, however, no one produced volatile metabolites. Five isolates produced cell free metabolites and, only the ACB-38 produced thermostable antifungal substances, capable of inhibiting the pathogen growth. *Trichoderma* spp. has the potential for rootstocks growth promoting and resistance inducing to *P. nicotianae*, but the responses vary according to the

plant genotype and the type of isolate antagonist applied. Most isolates of *Trichoderma* spp. tested were able to control *P. nicotianae* in Sunki tangerine and Rangpur lime plants.

1 INTRODUÇÃO

Intimamente associada à história brasileira, a cultura da laranja é de extrema importância para a economia do país, em especial para o Estado de São Paulo, por ser o maior exportador de suco concentrado congelado da fruta cuja safra de 2013/14 foi estimada em 296,8 milhões de caixas (CONAB, 2013). Porém, atualmente, o setor está passando por uma queda nas exportações do suco. A maior parte dos problemas é devido aos aspectos fitossanitários, que sempre foram entraves à produção citrícola no Brasil. Dentre tais problemas encontra-se a Gomose de *Phytophthora*, causada por *P. nicotianae*, a qual traz grandes danos econômicos à cultura.

A Gomose de *Phytophthora* ocorre em todas as regiões que cultivam citros do mundo e, é causada, principalmente, por *Phytophthora parasitica*, sinônimo *Phytophthora nicotianae* (Brenda de Hann) (Tucker) var. *parasitica* (Dastur) Watherh. (SIVIERO et al., 2002). No Brasil, a *P. nicotianae* é a responsável pelos maiores danos em viveiros, apesar da *P. citrophthora* (Sm. & Sm.) Leonian e outras espécies de *Phytophthora* já terem sido descritas como causadoras de doença. O principal dano causado é a podridão da raiz e do caule, podendo comprometer o bom desenvolvimento das mudas cítricas no campo ou até levá-las a morte quando a lesão atinge toda a circunferência do tronco (FEICHTENBERGER, 2001).

Os porta-enxertos limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) e citrumelo Swingle [*Citrus paradisi* Macfad cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], mais utilizados comercialmente, são moderadamente suscetível e resistente à Gomose, respectivamente. A tangerina Sunki (*Citrus sunki* hort. ex Tan.) é um porta-enxerto altamente suscetível, principalmente, à *P. nicotianae* Dastur. (FEICHTENBERGER, 1992; SIVIERO et al., 2002; MEDINA FILHO et al., 2003).

Os métodos de controle mais usados têm sido os de forma preventiva por meio de práticas culturais e pelo controle químico (FEICHTENBERGER, 2001). Entretanto, os custos financeiros e ambientais de tais aplicações tornam

essencial a busca por métodos alternativos de controle. Neste contexto o controle biológico pode ser uma estratégia viável, capaz de reduzir a densidade do inoculo de fitopatógenos de forma natural (MORETTO, 2000).

As espécies de fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* podem ser encontradas em muitos ambientes, principalmente na rizosfera, assim como na matéria orgânica em decomposição, em raízes de plantas, no solo, entre outros. Em condições de laboratório, possuem rápido crescimento em meio de cultura, com produção de numerosos conídios, caracterizados por apresentar diferentes tons de verde na placa de Petri (MONTE, 2001; SAITO et al., 2009).

Essa população microbiana é altamente eficiente para colonizar as raízes de plantas e também para aumentar a taxa de crescimento e desenvolvimento das mesmas, por facilitar a absorção de nutrientes, além de, proteger a planta contra fitopatógenos por indução de resistência (ETHUR et al., 2001; BENÍTEZ et al., 2004; SAKSIRIRAT et al., 2009). Além disso, são conhecidos pela produção de antibióticos que inibem outros fungos; pelo eficiente micoparasitismo e competição por nutrientes e espaço neste ecossistema, assim como, a produção de enzimas que degradam celulose e quitina - prejudiciais aos fungos fitopatogênicos (MELO, 1991; MORETTO et al., 2001; HARMAN et al., 2004; SABA et al., 2012).

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo testar isolados de *Trichoderma* spp. como agentes promotores de crescimento e indutores de resistência à *P. nicotianae* em porta-enxertos de citros, visando obter isolados promissores para aplicações e estudos futuros.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Agroecologia e sustentabilidade

Como o Homem pode pensar o cuidado de si a partir do cuidado da Natureza? Como mobilizar a técnica no cuidado da Natureza sem ultrapassá-la? O filósofo Martin Heidegger nos dá uma pista em seu texto "A questão da técnica". Para Heidegger (2006), todo assunto técnico está fundamentado no fazer advir algo, na produção, mas que também pode ser a produção de um resultado pela própria natureza. Ele sublinha o fato de que em toda realização algo se passa fora de nós. De certa forma, para ele, é já sempre a Natureza que, em sua técnica própria, produz, faz advir o produto, sem a nossa iniciativa ou intervenção.

Então, torna-se possível pensar: poderia o homem se utilizar da própria "técnica" da Natureza para ajudá-la a se proteger do que ela mesma "produz"? Sobre as diferentes relações históricas técnica e tecnológica do homem com a natureza, que passa de uma com-posição com ela para apenas dis-por dela, escreve Heidegger (2006, pg.19):

"O trabalho camponês não provoca e desafia o solo agrícola[...]. A lavra do lavrador não desafiava o lavradio. Na semeadura, apenas confiava a semente às forças do crescimento, encobrendo-a para seu desenvolvimento. Hoje em dia, uma outra posição também absorveu a lavra do campo, a posição que dis-põe da natureza. E dela dis-põe, no sentido de uma exploração. A agricultura tornou-se [apenas] indústria motorizada de alimentação[...]

Para o mesmo autor, como é possível perceber, o homem é capaz de interferir tecnicamente na Natureza a partir dela mesma - e não apenas a partir de uma tecnologia exterior a ela - a fim de regular seus "produtos", nem sempre positivos. É possível cuidar da Natureza, jogando com sua própria eficiência de desencadear reações naturais contrárias a ela própria, em virtude de sua conhecida potência e boa vontade de ressurgir. Manipulações técnicas naturais conduzidas pelo homem podem fazer advir uma potência de produção da própria Natureza.

Durante a última metade do século XX, a agricultura tem sido muito bem sucedida, satisfazendo uma demanda crescente de alimentos, em escala global. Esse aumento na produtividade foi atingido em função de inovações tecnológicas como a engenharia genética, o controle químico de ervas espontâneas, pragas e doenças, uso de fertilizantes sintéticos, entre outras práticas e políticas favoráveis ao agronegócio (NEVES, 2012). Porém, essa tecnologia tem sido responsável por exaurir sua base. A exploração excessiva dos recursos naturais dos quais a agricultura depende tem degradado o solo, reservas de água e a diversidade genética natural (GONÇALVES; ENGELMANN, 2009).

Nesse sentido, a agroecologia surge como a necessidade de sistemas mais sustentáveis de produção de alimentos. De acordo com Gliessman (2001), trata-se da aplicação de conceitos e princípios ecológicos no desenho e manejo de agroecossistemas sustentáveis. Desta maneira, esta nova proposta de agricultura tem o objetivo de maximizar o processo de produção de alimentos, porém, minimizando os insumos externos. A tentativa é que se consiga o manejo do agroecossistema para que este se pareça o máximo com o ecossistema natural, conseqüentemente preservando a biodiversidade; porém, que este mantenha um processo altamente produtivo, economicamente viável e ambientalmente consistente - sustentável. Para isso, faz-se necessário o estudo aprofundado da ecologia para analisar a interação de cada organismo com os fatores bióticos e abióticos, bem como a interação em nível de comunidade e sistema.

A utilização de práticas sustentáveis que favoreçam o trabalho “natural” dos microrganismos, como as sugeridas neste estudo, sejam por meio do antagonismo contra patógenos ou, pela ação dos microrganismos como promotores de crescimento e indutores de resistência de plantas, contribuirá para uma agricultura mais agroecológica. De modo que, a ação destes microrganismos não seja ignorada pelo uso de tecnologias simplificadas, como por exemplo, a simples utilização de um fertilizante químico, mas sim, favorecida por práticas que possam dar condições para que as interações microbiológicas ocorram.

2.2 Citricultura

As plantas cítricas surgiram no sudeste da Ásia, são pertencentes à família *Rutaceae* e apresentam como principais gêneros: *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella* (DONADIO et al., 2005).

A citricultura está intimamente atrelada à história do Brasil. Pelos relatos históricos, a introdução de mudas cítricas no país ocorreu logo no início da colonização. A cultura encontrou condições favoráveis ao seu estabelecimento e logo se expandiu para todo território nacional (NEVES et al., 2010).

A cultura representa um importante segmento agroindustrial para a economia brasileira. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (2013), a produção da safra 2013/2014 foi estimada em 296,8 milhões de caixas. Já o estado de São Paulo, responsável por 70% da produção, possui 497 mil hectares de área em produção.

Contudo, a produção se expandiu na década de 20, seguindo os caminhos da cafeicultura, que sofria significativa redução da área plantada devido à crise econômica mundial, aos problemas fitossanitários, seca e geada. Foi assim que a produção de citros se expandiu e chegou à região do Vale do Paraíba, Limeira, Araraquara e Bebedouro, tornando-se, em meados da década de 40, um dos pilares da economia agrícola paulista (DONADIO et al. 2005; NEVES et al., 2010).

Neste período, quando a cultura alcançou expressão comercial, iniciou-se o uso de plantas enxertadas, com objetivo de associar dois indivíduos geneticamente diferentes para formar uma nova planta, com melhores características agrônômicas, maior produtividade e longevidade. No processo de enxertia, o porta-enxerto provoca diversas alterações na copa, como no crescimento, tamanho, precocidade de produção, produção, maturação e peso dos frutos, coloração da casca e do suco, teor de açúcares, de ácidos e outros componentes do suco, permanência dos frutos na planta e sua conservação pós-colheita, fertilidade de pólen, absorção, síntese e utilização de nutrientes, transpiração e composição química das folhas, resposta a produtos de abscisão dos frutos e folhas, tolerância à salinidade, à seca, ao frio, a doenças

e pragas (POMPEU JUNIOR, 2005). Para o autor, embora o uso dos porta-enxertos tenha permitido superar fatores bióticos e abióticos e obter maior produtividade, foi também responsável por sérios problemas fitossanitários, graves entraves à produção.

Um dos problemas fitossanitários foi o surgimento, no final da década de 30, da tristeza dos citros, causada pelo *Citrus tristeza virus* (CTV). A doença se disseminou rapidamente por borbulhas e pelo pulgão preto, dizimando rapidamente os pomares citrícolas paulistas, aliado a esse fato, 90% dos porta-enxertos utilizados eram de laranja Azeda, o qual era intolerante ao vírus, embora fosse resistente à *Phytophthora* spp. (REZENDE; KITAJIMA, 2011). Desta forma, seu uso se tornou inviável, sendo o mesmo substituído pelos porta-enxertos: limão Cravo e Rugoso, tangerinas Cleópatra e Sunki e laranja Caipira. No entanto, estes porta-enxertos por possuírem de moderada a alta suscetibilidade à gomose de *Phytophthora*, fizeram com que essa doença ganhasse maior importância (FEICHTENBERGER, 2001).

O declínio e a morte súbita dos citros surgiram nas décadas de 70 e 90, respectivamente, causando prejuízos em laranjas enxertadas em limão Cravo, fizeram com que porta-enxertos resistentes, como tangerinas Sunki e Cleópatra e citrumelo Swingle fossem mais usados (POMPEU JUNIOR, 2005).

Para o mesmo autor, as boas características agrônômicas do limão Cravo o mantêm como o preferido pelos citricultores até os dias de hoje. Trata-se de um híbrido natural de limão (*C. limon*) e uma tangerina (*C. reticulata*), originário da China. Apresenta tolerância ao vírus da tristeza, porém é suscetível à exocorte e xiloporose, e moderadamente suscetível à *Phytophthora* spp.

Por sua vez, a tangerina Sunki é originária da China e tem sido usada nos pomares paulistas desde o início do século passado. Apresenta diversas características desejáveis como resistência à seca e ao frio, tolerância à tristeza, xiloporose, morte súbita dos citros e ao declínio, além de boa produtividade de frutos. Porém, sua utilização é limitante devido à intolerância à exocorte e suscetibilidade à *Phytophthora* spp. (AGUILAR VILDOSO; POMPEU JUNIOR, 1997; FEICHTENBERGER, 2001).

Já o citrumelo Swingle é constituído do cruzamento entre pomelo Duncan e trifoliata. Foi introduzido no Brasil na década de 40 pelo IAC. Caracteriza-se por ser tolerante a doenças como: tristeza do citros, declínio, morte súbita, exocorte, xiloporose, nematoide dos citros e à gomose de *Phytophthora*; bem como, tolerante à seca e geada (POMPEU JUNIOR, 2005). Ainda de acordo com o mesmo autor, o interesse neste porta-enxerto tem aumentado desde a década de 80, por ser tolerante ao declínio e resistente à *Phytophthora*.

2.3 Doenças causadas por *Phytophthora* em citros

Espécies de *Phytophthora* são fitopatógenos, veiculados pelo solo, conhecidos por causarem algumas das mais importantes doenças em culturas de grande interesse econômico em todas as regiões do mundo. O gênero *Phytophthora* foi responsável por uma das piores epidemias da história, a requeima da batata, em 1846, causando milhares de mortes, fome e imigração na Irlanda (BERGAMIM FILHO et al., 2011).

Dentre os vários hospedeiros, o patógeno é relatado em citros desde 1842, na Ilha dos açores, como o responsável pela transição da cultura de pés-francos para plantas enxertadas, uma vez que o uso de porta-enxertos resistentes proporcionou um maior controle da doença (POMPEU JUNIOR, 2005).

De acordo com Massola Jr. e Krugner (2011), o gênero *Phytophthora* pertence ao Reino Stramenopila (Chromista), Filo Oomycota, Classe Oomycetes, Ordem Peronosporales e Família Peronosporaceae.

Conforme Feichtenberger (2001), a gomose de *Phytophthora* pode ocorrer em todas as regiões citrícolas do mundo. No Brasil, o agente causal ocorre principalmente em plantios novos, cuja alta incidência é devido ao uso de mudas contaminadas. Além da Gomose de *Phytophthora*, outras doenças podem ser causadas por esse gênero, como “Damping-off” de pré e pós-emergência; lesões em folhas, brotos novos e hastes; podridão do pé e gomose em troco e ramos; podridões de raízes e radículas e, também,

podridão parda de frutos. Nas condições brasileiras, a podridão do pé e as podridões de raízes são as mais recorrentes.

Já foram relatadas várias espécies de *Phytophthora* patogênicas ao citros, porém, as mais importantes às condições brasileiras são: *Phytophthora nicotianae* Brenda de Hann (syn. *P. parasítica* Dastur) e *P. citrophthora* (Smith & Smith) Leonian; dentre estas, a primeira é predominante nas regiões produtoras (AMORIM, 1997; BASSAN et al., 2010). A temperatura ótima do crescimento micelial de *P. nicotianae* é de 30 a 32° C e para *P. citrophthora* é de 24 a 28° C. (LARANJEIRA et al., 2005).

Este patógeno produz várias estruturas de resistência, como clamidósporos, oósporos e zoósporos encistados, os quais, quando na superfície do solo ou de órgãos afetados (com boa aeração) e em condições de alta umidade, podem formar esporângios; cujo ciclo de produção pode ocorrer muitas vezes durante o período chuvoso. Outros estímulos na formação destes propágulos são luz e baixos teores de nutrientes essenciais ao patógeno (GRAHAM; TIMMER, 2003).

A germinação dos esporângios pode ocorrer diretamente pela formação de tubos germinativos, em condições de umidade, ou, indiretamente via zoósporos, em condições de água livre e por estímulo por uma queda na temperatura (GRAHAM; MENGE, 1999). Epidemiologicamente, a liberação dos zoósporos é mais importante, pois em cada esporângio podem ser formados até 50 zoósporos (FEICHTENBERGER, 2001).

Os zoósporos são esporos assexuais e biflagelados, capazes de nadar a curtas distâncias, em direção aos exsudatos das raízes do hospedeiro, numa resposta típica de quimiotatismo. Além disso, são facilmente disseminados por respingos de chuva e pela água no solo. Então, na superfície das raízes, geralmente nas zonas de alongamento, ocorre a germinação pela produção de um tubo germinativo (AMORIM; PASCHOLATI, 2001).

Em situações de ambiente desfavorável, os zoósporos podem encistar e permanecer como esporos de resistência por longos períodos no solo (GRAHAM; TIMMER, 2003).

Além deste, *P. nicotianae* também produz grande quantidade de clamidósporos, em situações de baixas concentrações de oxigênio e nutrientes, altas concentrações de dióxido de carbono e temperatura abaixo de 18°C. O mesmo não ocorre na maioria dos isolados de *P. citrophthora*. Sob estas condições, os clamidósporos permanecem dormentes no solo por meses, mas podem germinar estimulados pelo aumento de temperatura, de 28 a 32° C, alta umidade e quantidade de nutrientes e/ou na presença de exsudatos de raízes (LARANJEIRA et al., 2005).

Já os oósporos, esporos com parede celular espessa, possuem alta resistência em condições adversas, como baixas temperaturas e dessecação. São responsáveis pela reprodução sexual de *Phytophthora*, ou seja, podem causar variações genéticas na população, quando tipos de compatibilidade sexual diferentes são pareados. As condições para a germinação são semelhantes às requeridas pelos clamidósporos (GRAHAM; TIMMER, 2003; FEICHTENBERGER, 2001).

A população do patógeno se mantém ativa no solo em virtude de repetidas infecções nas raízes. Em condições favoráveis, as raízes infectadas produzem esporângios, os quais darão origem a novos zoósporos que, atraídos pelos exsudatos radiculares, infectarão novas raízes. Em contato com o hospedeiro, os zoósporos encistam, germinam e infectam, geralmente, no local de alongamento das raízes. Este ciclo pode se repetir enquanto houver condições favoráveis e disponibilidade de tecido suscetível (GRAHAM; MENGE, 1999). Portanto, doenças causadas por este grupo são policíclicas (MASSOLA JR; KRUGNER, 2011).

À medida que as raízes apodrecem, o fitopatógeno passa a produzir clamidósporos para garantir sua sobrevivência no solo ou em restos vegetais por longos períodos; principalmente, *P. nicotianae*. Se condições favoráveis surgirem, os clamidósporos germinarão diretamente através de micélios, ou indiretamente, pela produção de esporângios e zoósporos. Quando dois tipos de diferente compatibilidade sexual se cruzam, oósporos podem ser formados, ajudando na sobrevivência do fungo (GRAHAM; MENGE, 1999; FEICHTENBERGER, 2001).

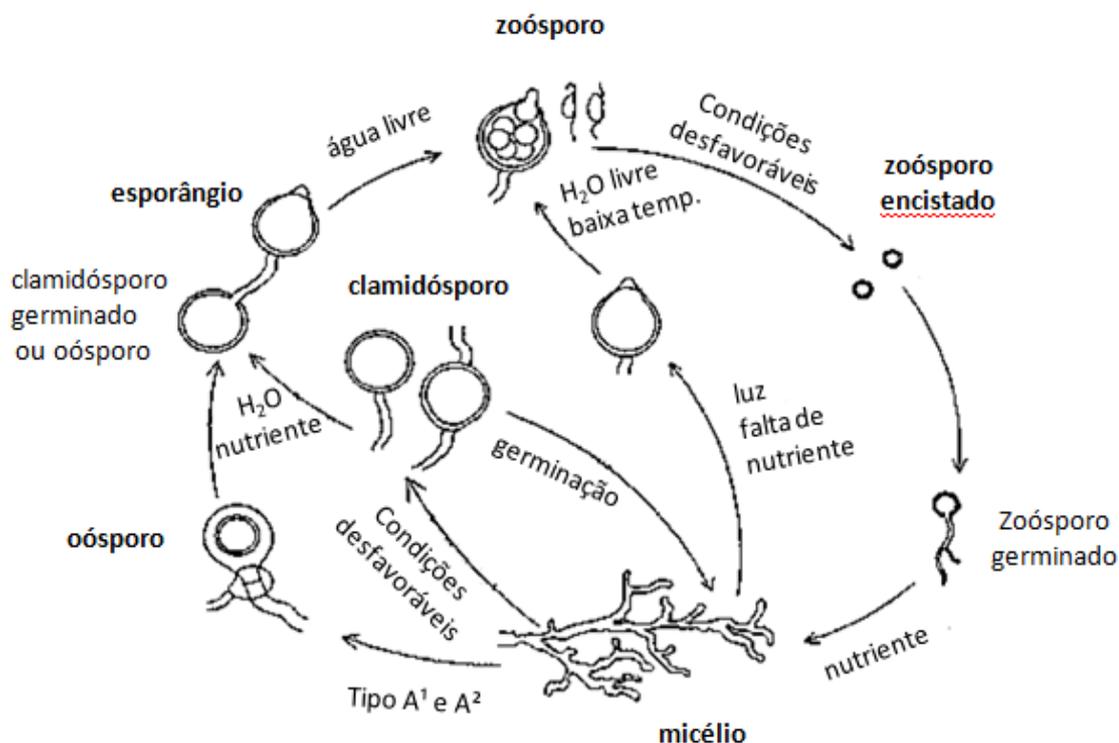


Figura 1 - Estruturas reprodutivas do patógeno: oósporo, clamidósporo, esporângio e zoósporo. (Fonte: GRAHAM; TIMMER, 2003 - Adaptado pela autora).

2.3.1 Sintomas

Phytophthora spp. pode causar diversos tipos de sintomas em plantas cítricas. Estes podem ocorrer nas sementeiras – tombamento, mela ou “Damping-off” (pré e pós-emergência); em raízes e radículas; em árvores adultas pela podridão do pé ou gomose de tronco e ramos; em folhas e brotos novos e também em frutos (Figura 2). “Damping-off” de pré-emergência ocorre quando *Phytophthora* spp. ataca as sementes, provocando seu apodrecimento e morte, antes da germinação. Já, em pós-emergência, o “Damping-off” caracteriza-se pela infecção na base do caulículo de plântulas recém-germinadas levando-as à morte (Figura 2A e 2B). (FEICHTENBERGER, 2001).

Por sua vez, os sintomas de podridões de raízes e radículas ocorrem devido à infecção e destruição dos tecidos externos do córtex (Figura 2C), que podem ser agravados por colonizações de microrganismos secundários,

originando podridões de cor parda (FUTCH; GRAHAM, 2012). Em viveiros, estes sintomas podem ser severos, principalmente, se ocorrerem em porta-enxertos suscetíveis (GRAHAM; TIMMER, 2003). É comum a ocorrência dos mesmos em pomares recém-formados, pelo plantio de mudas contaminadas, pois, as plantas nem sempre apresentam os sintomas reflexos típicos. Ou, também, pela penetração do patógeno em ferimentos provocados pelo arranquio das mudas. O ataque às plantas adultas raramente leva-as à morte, podendo comprometer a produtividade das mesmas somente quando há elevadas concentrações do patógeno no solo (FEICHTENBERGER, 2001). No entanto, a crescente utilização de mudas certificadas, instituída pela Secretaria da Agricultura para a produção de mudas cítricas em ambiente protegido no Estado de São Paulo, tem diminuído a incidência de *Phytophthora* spp. devido à melhor qualidade fitossanitária das mudas (LARANJEIRA et al., 2005).

Já os sintomas de podridão do pé e a gomose em tronco e ramos resultam do ataque do patógeno nestes locais produzindo lesões que exsudam goma (Figura 2D). A infecção ocorre quando algum propágulo do patógeno é respingado no tronco, acima da região da enxertia, sendo favorecida por ferimentos e umidade. Após um maior desenvolvimento da lesão, forma-se uma área necrótica sob a casca, de coloração escura, a qual pode circundar toda a circunferência do tronco e provocar a morte da árvore. Lesões severas como estas impedem o livre fluxo de seiva elaborada para o sistema radicular (FUTCH; GRAHAM, 2012); provocando sintomas reflexos como amarelecimento em folhas, que depois murcham e caem; florescimentos e frutificações frequentes, em geral fora de época; produção de frutos pequenos; seca e morte progressiva de ramos e ponteiros; desfolha, seca de ramos e, conseqüentemente, morte completa da planta (FEICHTENBERGER, 2001).

Esse tipo de infecção não é tão relevante do ponto de vista epidemiológico. Porém, pode-se gerar uma epidemia quando a *Phytophthora* spp. é introduzida, no campo ou em viveiros, através de mudas contaminadas (GRAHAM; MENGE, 1999). Sendo assim, os respingos de chuva ou irrigação e o vento são responsáveis pela disseminação do agente causal nos viveiros (FEICHTENBERGER, 2001). E, também, nos pomares, podem levar os

propágulos do patógeno do solo para as folhas, brotos novos e frutos da parte baixa da copa das plantas, causando infecções secundárias (GRAHAM; TIMMER, 2003; GRAHAM et al., 1998).

As lesões em folhas e brotos novos são escuras e encharcadas, tornando-se, posteriormente, necróticas (Figura 2E e 2F). Nestes, as lesões surgem da ponta para a base (FEICHTENBERGER, 2001).

A podridão parda dos frutos afeta todas as variedades, principalmente os limões, quando os frutos estão maduros. A lesão inicia-se com uma descoloração da casca que, posteriormente, torna-se marrom escura, com cheiro forte devido a podridão (Figura 2G) (LARANJEIRA et al. 2005; FUTCH; GRAHAM, 2012). Surtos epidêmicos da doença são estimulados em períodos onde coincidem umidade prolongada - excedendo sete dias - e altas temperaturas (de 23 a 32° C) durante a maturação dos frutos (GRAHAM et al., 1998).



Figura 2 - Doenças incitadas por *Phytophthora* spp. em citros: **A.** “Damping off” de pós-emergência; **B.** “Damping off” de pré-emergência; **C.** Podridões de raízes e radicelas; **D.** Gomose em tronco; **E.** Lesões em folhas; **F.** Lesões em brotos novos; **G:** Podridão parda de frutos. (Fonte: A,B: Autora; C: FUTCH; GRAHAM, 2012; D, E, F e G: FEICHTENBERGER, 2001).

2.3.2 Medidas de Controle

Dentre as medidas de controle de doenças causadas por *Phytophthora* spp. incluem-se as curativas - tratamento químico, controle biológico e cultural, e as preventivas - utilização de mudas saudáveis e de porta-enxertos tolerantes já existentes ou obtidas através de programas de melhoramento genético (MEDINA FILHO et al., 2004; BASSAN et al., 2010, GRAHAM et al., 2013).

Devido à importância da gomose em citros, muitas pesquisas são feitas com objetivo de estudar a resistência de porta-enxertos a *Phytophthora* spp. visando selecioná-los para programas de melhoramento genético, utilizado como a principal medida de controle. Em um estudo de Graham (1990), através da inoculação do solo com alta densidade de inóculo de *Phytophthora* foi possível quantificar a severidade da doença em porta-enxertos de citros. De acordo com a pesquisa, citrumelo Swingle e trifoliata não são imunes à infecção, mas são capazes de regenerar suas raízes. Em estudo posterior, Graham (1995) identificou como tolerantes ao ataque de *P. nicotianae*, em solo infestado, os porta-enxertos capazes de regenerar os tecidos de suas raízes infectadas. Isso se deve às diferentes respostas dos porta-enxertos à colonização das células corticais por *Phytophthora* spp., que foram menos severas em trifoliata, tolerante, em comparação com laranja azeda, suscetível (WIDMER et al., 1998).

Medina Filho et al. (2004) ao avaliarem vários porta-enxertos de citros infectados por *P. nicotianae* quanto à taxa de sobrevivência, redução de raízes e partes aéreas, diâmetro do caule e altura de plantas, observaram que o citrumelo Swingle e tangerina Sunki são altamente resistentes e suscetíveis ao patógeno, respectivamente. Enquanto que os demais clones testados, limão Cravo, laranja Azeda, limão Volkameriano e tangerina Suen Kat apresentaram porcentagens intermediárias quanto aos parâmetros analisados. Outro ponto interessante deste estudo foi que o mais baixo nível de tolerância, entre todos os materiais estudados, foi encontrado em um grupo formado por híbridos entre a tangerina Sunki e o limão Cravo.

Siviero et al. (2002) trouxeram muitas contribuições em avaliações de porta-enxertos a *Phytophthora* spp. testando diferentes métodos de inoculação em plântulas e plantas jovens de citros. Entre os métodos, a inoculação em plântulas pode ser feita através de ferimentos na região do colo, enquanto que em plantas jovens pode ser feita pela técnica do palito de dente ou agulha infestada com o patógeno. Também é possível utilizar métodos de inoculação com estruturas do patógeno em substrato (zoósporo, clamidósporo, esporângio e micélio), conforme trabalhos de Graham (1995); Timmer et al., 1988; Widmer et al., 1998; entre outros.

Em relação ao controle cultural, práticas são adotadas com o objetivo de desfavorecer o patógeno (BEDENDO et al., 2011). Desta forma, preconiza-se evitar ferimentos de tronco e raízes principais, principalmente no momento do transplante; evitar o uso de equipamentos de manejo que possam ferir as plantas; selecionar áreas para plantio, evitando-se solos com má-drenagem; adotar práticas de conservação do solo; utilizar adubos orgânicos que favoreçam a microflora antagônica a *Phytophthora* spp. no solo; evitar respingos de água no tronco das árvores (FEICHTENBERGER, 2001); De acordo com Graham et al. (2013), deve-se fazer inspeções frequentes nos viveiros e, em locais com histórico de podridão do pé, deve-se evitar o plantio de porta-enxertos suscetíveis, substituindo-os por citrumelo Swingle para o replantio.

Por sua vez, o controle químico é feito de maneira preventiva e curativa, pela aplicação de fungicidas específicos para os oomicetos, como o metalaxyl, fosetil-Al e os fosfitos. Estes produtos promovem somente uma ação inibitória ao patógeno, mas não sua erradicação no solo. Uma vez que seu uso é cessado, rapidamente a *Phytophthora* spp. pode recuperar sua densidade populacional no campo e causar, novamente, prejuízos à cultura (FEICHTENBERGER, 2001).

Em contrapartida, o controle biológico de doenças de plantas utiliza um ou mais microrganismos para reduzir a quantidade de inóculo ou as atividades determinantes da doença (BEDENDO et al., 2011). Este tipo de controle tem sido estimulado em virtude da pressão da sociedade por alimentos saudáveis,

livres de resíduos químicos, bem como, para a conservação dos recursos naturais (ALABOUVETTE et al., 2006; BETIOL; MORANDI, 2009).

2.4 Controle biológico

As doenças de plantas sempre foram entraves à produção agrícola por causarem redução na produção gerando prejuízos econômicos (BERGAMIN FILHO et al., 2011), principalmente para a citricultura (POMPEU JUNIOR, 2005; LARANJEIRA et al., 2005).

Dentro das perspectivas atuais, sustentabilidade e alimentos mais saudáveis têm sido uma constante exigência da sociedade (LOPES, 2009). Para atender esta demanda, o controle biológico mostra-se como uma alternativa viável e tecnicamente justificável, por manter a densidade populacional dos fitopatógenos associados à agricultura abaixo do limiar de dano econômico de forma natural e em níveis ecologicamente aceitáveis (MORETTO, 2000; BETIOL; MORANDI, 2009).

Para o controle biológico, a doença é representada por um tetraedro, em que há influência direta do ambiente no patógeno e nos microrganismos não-patogênicos no sítio de infecção do hospedeiro (Figura 3) (BETTIOL; GHINI, 2009).

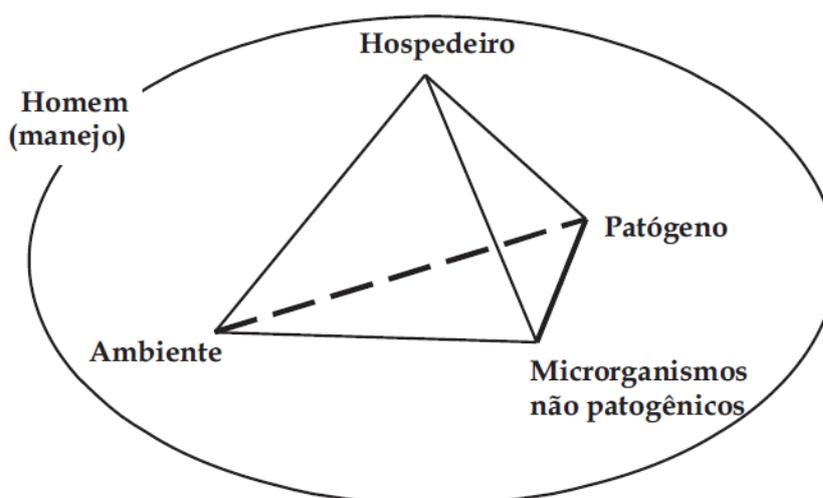


Figura 3 - Tetraedro da doença: Interações entre patógeno e microrganismos não patogênicos no sítio de infecção do hospedeiro, influenciados pelo ambiente. Fonte: BETTIOL; GHINI, 2009.

Ainda para os autores, os microrganismos não-patogênicos são capazes de aumentar ou limitar a ação dos patógenos e, também, de estimular a resistência do hospedeiro (BETTIOL; GHINI, 2009). Para isso, os antagonistas possuem diversos mecanismos cuja ação afetam as populações dos fitopatógenos, devido a capacidade de hiperparasitismo; de competir por espaço e nutrientes para sobreviver na presença de outros microrganismos; de produzir substâncias antibióticas, tóxicas, que afetam diretamente o patógeno; pela produção de enzimas que atacam os componentes celulares dos agentes patogênicos; pela capacidade de induzir respostas de defesa nas plantas ou por estimular o metabolismo delas, agindo indiretamente no patógeno (AGRIOS, 2005).

Os microrganismos com potencialidade antagonística podem ser encontrados no filoplano, predominantemente caracterizado por comunidades de bactérias, leveduras e fungos relacionados com a senescência. Ecologicamente, estes organismos possuem importante função de equilíbrio na filosfera, pois competem com os fitopatógenos, produzem hormônios de crescimento e fitoalexinas, fixam nitrogênio, entre outros (BETTIOL; GHINI, 2009). Além disso, agentes de controle biológico podem ser encontrados na rizosfera, apresentando habilidade de competição saprofítica, decomposição da matéria orgânica, bem como, prevenindo o estabelecimento de fitopatógenos ou inibindo suas atividades patogênicas; denominado pela comunidade científica por solo supressivo (AGRIOS, 2005; REIS, 1991).

Estes microrganismos, além de suas funções naturais no agroecossistema, podem ser aplicados no solo, na parte aérea das plantas ou após a colheita em frutos e hortaliças, visando o biocontrole de doenças. E, ainda, conforme trabalhos de Luz (1993, 2001), Amorim e Melo (2002), Diniz et al. (2009), entre outros, a microbiolização de sementes, antes do plantio, com propágulos dos bioprotetores, tem sido uma estratégia para o controle de patógenos habitantes do solo, por proteger a germinação, bem como, favorecer o desenvolvimento das plantas.

Em muitos trabalhos, estes microrganismos não-patogênicos são aplicados em misturas com o objetivo de obter melhores resultados de controle.

Segundo Raupach e Kloepper (1998), a mistura de agentes de biocontrole pode incluir microrganismos com diferentes padrões de colonização e que controlam diferentes patógenos, além de poder combinar diferentes mecanismos de ação; o que conseqüentemente, pode levar a uma maior supressão de patógenos prejudiciais no solo. Além disso, a mistura de isolados se aproxima mais do que acontece naturalmente no ambiente.

Dentre as doenças de plantas, o controle de fitopatógenos veiculados pelo solo é extremamente difícil. Os fungos do gênero *Trichoderma* são extensivamente citados na literatura científica como eficazes agentes de controle biológico contra diversos patógenos de solo, que causam tombamento, como *Fusarium* e *Rhizoctonia*, além de *Pythium*, *Phytophthora*, *Sclerotium* e *Sclerotinia*; diminuindo a incidência e severidade dos mesmos (HARMAN, 2000; HOWELL, 2003; LONGA; PERTOT, POMELLA; RIBEIRO, 2009).

Autores da literatura científica como Amorim (1997), Corrêa et al. (2011), entre outros, obtiveram inibição da colônia e redução na porcentagem de infecção de *Phytophthora nicotianae* em citros pela aplicação de isolados de *Trichoderma* spp.

2.5 *Trichoderma* spp.

O potencial dos *Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole é reconhecido pela comunidade científica desde 1930, o que desencadeou na produção comercial de várias espécies do antagonista para a proteção e crescimento de plantas de inúmeras culturas nos EUA; assim como, na Índia, Israel, Nova Zelândia e Suécia, pela produção e uso de mistura de espécies (HOWELL, 2003).

No Brasil, espécies de *Trichoderma* merecem posição de destaque dentro dos estudos sobre controle biológico de doenças de plantas. Em 1950, foi o tema da primeira publicação sobre o assunto pelo pesquisador Reinaldo Foster, do Instituto Agrônomo de Campinas. Em sua pesquisa, Foster conseguiu reduzir em até 90% a capacidade infectiva do vírus do mosaico do fumo (TMV) por filtrados de cultura de *Trichoderma* spp. Anos depois, no final

da década de 80, o primeiro produto comercial disponibilizado também foi com uma espécie do antagonista, que passou a ser utilizado para o controle de *Phytophthora cactorum* da macieira (LOPES, 2009).

Devido sua eficiência, em 1992, a primeira empresa privada do ramo, no país, começou a produzir e comercializar espécies de *Trichoderma*. Outro ano importante foi o registro do primeiro fungicida biológico comercial chamado Trichodermil – *Trichoderma harzianum*, em 2008, pela empresa Itaforte Bioprodutos Ltda. Portanto, trata-se do agente de controle biológico mais estudado e utilizado no Brasil e, também, em outros países da América Latina. (BETIOL; MORANDI, 2009).

Dentro deste contexto, diversos autores têm demonstrado a eficiência de espécies de *Trichoderma* spp. no controle biológico de patógenos (PORRAS et al., 2007; LOUZADA et al., 2009; SAKSIRIRAT et al., 2009; CORREA et al., 2011).

Do ponto de vista etiológico, as espécies de *Trichoderma* são fungos filamentosos, cosmopolitas, pois estes habitantes, principalmente do solo e da rizosfera, podem ser facilmente encontrados em diversos tipos de solos no mundo (HARAN et al., 1996).

Estes agentes de controle biológico promovem a supressão de patógenos de plantas no solo, devido à produção de um complexo de enzimas, como protease, glucanase, celulase e quitinase. Essas enzimas degradam os polissacarídeos, quitina e β -glucanas que são responsáveis pela rigidez das paredes das células dos fungos, destruindo sua integridade (WOOD; McCRAE, 1977; HARAN, 1996; ZALDÍVAR et al., 2001; HOWELL, 2003). De acordo com Howell (2003), eles também produzem uma vasta gama de substâncias antibióticas que inibem outros fungos.

Contudo, são avirulentos às plantas e convivem com elas de forma simbiótica e oportunista, favorecendo-as também por parasitarem outros fungos no solo – mecanismo chamado micoparasitismo (HARMAN et al., 2004; HARMAN; SHORESH, 2007).

Este complexo mecanismo envolve desde a percepção pelo *Trichoderma* spp. da presença do fungo alvo, por estímulos químicos –

quimiotropismo ou por tigmotropismo, bem como por seu crescimento proposital em direção ao hospedeiro e, posteriormente, seu enrolamento em torno de suas hifas; como também, a produção de várias enzimas extracelulares antifúngicas. Na interação com outros fungos, antes de parrear com o hospedeiro alvo, o gene que codifica a produção da endoquitinase é ativado, enquanto que a produção da exoquitinase ocorre somente depois que o contato é estabelecido entre ambos, sendo responsáveis por fragmentar as paredes das células do fungo alvo; além das substâncias fungitóxicas que são liberadas e atacam o fungo hospedeiro antes mesmo do contato (CHET et al., 2002). Há, pelo menos, de 20 a 30 genes conhecidos, além de proteínas ou metabólitos diretamente envolvidos neste processo (HARMAN; SHORESH, 2007).

Além disso, os *Trichoderma* spp. são conhecidos por serem eficientes competidores com outros fungos por espaço e nutrientes na rizosfera, bem como, por competirem por exsudatos de sementes no solo - substâncias que estimulam a germinação de propágulos de fungos fitopatogênicos de plantas (HARMAN et al., 2006).

Descobertas recentes têm mostrado que espécies de *Trichoderma* spp. são capazes de induzir resistência sistêmica e localizada para uma variedade de patógenos de plantas; incluindo fungos, oomicetos, bactérias e até vírus (HANSON et al., 2004; HARMAN et al., 2006). E, alguns isolados também têm influência substancial sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas (HOWELL, 2003; HARMAN et al., 2004; TUCCI et al., 2011).

O fenômeno da resistência sistêmica induzida também é conhecido por indução de proteção ou imunidade adquirida e ocorre quando os mecanismos latentes de resistência de uma planta, pós-infeccionais, são ativados por meio de elicitores externos, que podem ser bióticos ou abióticos; sem que haja alteração do genoma da mesma (BEDENDO et al., 2011).

A proteção induzida pode se manifestar local ou sistemicamente e exige um intervalo de tempo entre a aplicação do indutor até a inoculação do patógeno, haja vista que se espera que ocorra uma série de modificações específicas no metabolismo da planta, relacionados a defesa. Porém, a

indução de resistência nem sempre leva ao controle da doença, pois os mecanismos de defesa ativados podem ser localizados e de curta duração (PASCHOLATI, 2011). Quando a indução de resistência é promovida por um agente biótico e a doença é controlada, ele é considerado um agente de controle biológico (BEDENDO et al., 2011).

Yedidia et al. (1999) estudaram as respostas de indução de defesa por *Trichoderma harzianum* em plantas de pepino e trouxeram muitas contribuições para a compreensão de como o fungo ativa os mecanismos de resistência da planta. De acordo com este trabalho, o fungo penetrou nas células da epiderme e do córtex das raízes, cresceu intercelularmente, sem extensa degradação da parede celular do hospedeiro. Todavia, ele não penetrou nos tecidos mais íntimos da raiz, exceto em algumas áreas localizadas, onde as células do mesmo puderam ser vistas na endoderme. Sua colonização não foi associada com alterações celulares ou digestão da parede celular do hospedeiro, como ocorre em várias outras interações patógeno-hospedeiro. O momento mais interessante deste estudo foi a resposta da planta à penetração das hifas de *T. harzianum* em suas raízes. Elas produziram aposições de parede de células, enriquecidas com calose, adjacentes às células invadidas. Acrescenta-se que houve também a produção de substâncias tóxicas, como os compostos fenólicos e fitoalexinas. Outra resposta à infecção foi a oclusão da maioria dos espaços intercelulares na epiderme e córtex da raiz com um material denso que mostrou diferentes graus de compactação e opacidade eletrônica, impedindo a penetração e o desenvolvimento das células fúngicas. Foi constatado, ainda, a ativação de mecanismos de defesa das plantas de pepino, como maior atividade de quitinase e peroxidase (proteínas RP) em raízes e folhas. Segundo Harman e Shores (2007), o aumento da atividade das enzimas nas folhas sugere uma resposta de defesa sistêmica pela presença de *Trichoderma* spp. nas raízes.

Desta forma, a interação de *Trichoderma* spp. com raízes das plantas torna-as mais sensíveis, o que lhes permite responder de forma mais eficiente à um posterior ataque patogênico. Essa sensibilização foi evidente, tanto pela redução de sintomas da doença, como pela potenciação sistêmica da

expressão de genes relacionados com a defesa (YEDIDIA et al., 2003; SHORESH et al., 2005; HARMAN; SHORESH, 2007).

Em um estudo de Howell et al. (2000), pela microbiolização de sementes de algodão com *T. virens*, também constataram que a resistência do hospedeiro foi induzida, devido à síntese de terpenóides no sistema radicular, bem como maior atividade da peroxidase. As mudas tratadas e posteriormente inoculadas com *Rhizoctonia solani* apresentaram maiores concentrações destes compostos bioativos em relação ao controle; estimuladas pela colonização e penetração do agente de biocontrole na epiderme e tecidos corticais da raiz. Um ponto esclarecedor deste estudo foi mostrar que terpenóides, presente na primeira fase do desenvolvimento radicular, em concentrações muito baixas, não são tóxicos ao *T. virens* cuja colonização pode prosseguir desimpedida.

Ainda em relação à capacidade de induzir os mecanismos de defesa das plantas, as pesquisas de Shoresch et al. (2005) e Djonovic et al. (2007), indicaram que o ácido jasmônico e o etileno podem ser as moléculas de sinalização envolvidas na indução de resistência pelo *Trichoderma* ssp.

Além da indução de resistência sistêmica, o estudo de Yedidia et al. (1999) também verificaram maior crescimento de plantas de pepino pela aplicação de *T. harzianum*. Isso se justifica porque deve haver um reconhecimento molecular entre *Trichoderma* e a planta, resultando na criação de uma parceria benéfica que, conseqüentemente, conduz a uma diminuição na síntese e acúmulo de moléculas de defesa.

Shoresch e Harman (2008) ao estudarem os efeitos da inoculação do T22 (*Trichoderma harzianum*) nas raízes de mudas de milho constataram maior crescimento das plantas e também maior resistência foliar ao *Colletotrichum graminicola*. Neste estudo, o efeito da promoção de crescimento nas plantas foi explicado devido às alterações no proteoma, em que houve alteração na expressão de mais de 300 proteínas nas plantas tratadas pelo antagonista. Dentre elas, ocorreu aumento dos níveis de enzimas envolvidas nas vias respiratórias, juntamente com o aumento dos níveis de proteínas envolvidas no processo de fotossíntese, além de proteínas relacionadas à produção de

celulose e parede celular (maior barreira física, maior resistência aos patógenos). Constatou-se também, alterações no metabolismo energético tanto via glicólise como via ácido tricarbóxico; aumentando a taxa fotossintética e a quantidade de amido na planta. Isso mostra que a interação fungo-planta tem efeito sistêmico. Apesar de terem sido aplicados nas raízes, eles provocaram diversas modificações fisiológicas e fenotípicas na planta (SHORESH; HARMAN, 2008). Porém, as respostas de crescimento variaram entre os vários híbridos de milho tratados com T-22, pois, em algumas linhagens da cultura ocorreram reduções no rendimento, sugerindo que as respostas variam de acordo com o genótipo da planta (HARMAN et al., 2004).

Outra informação importante na interação *Trichoderma*-planta, é que ao penetrar nas raízes, o fungo tem acesso aos nutrientes das plantas, o que lhes permite proliferar. Isso está diretamente relacionado à maior massa de raízes e parte aérea nas plantas, pois esse aumento na massa de raízes é o que garante mais sítios para sua sobrevivência. Portanto, essa interação simbiótica, de benefício mútuo, foi o sucesso da sua sobrevivência na maioria dos solos do mundo. Para as plantas, os benefícios são o aumento de raízes e parte aérea, maior absorção de macro e micro-nutrientes e proteção aos patógenos (HARMAN; SHORESH, 2007). Para os autores, esta interação se assemelha à associação de endomicorrizas com as plantas.

Quanto à maior absorção de nutrientes pelas plantas devido a interação com *Trichoderma* spp., muitos trabalhos científicos indicam que essa espécie de fungo é capaz de solubilizar vários nutrientes presentes no solo em formas insolúveis às plantas, como o fósforo, ferro, cobre, zinco e manganês. E também, aumenta a eficiência na absorção de nitrogênio fertilizante (HARMAN et al., 2004). De acordo com os autores, esse agente de biocontrole é resistente à microbiota deletéria presente no solo. Alguns microrganismos deletérios não patogênicos associados às raízes das plantas produzem cianeto - provavelmente para competir com os demais e manter o seu nicho. Espécies de *Trichoderma* produzem duas enzimas que são capazes de degradá-los, bem como, destruir metabolitos tóxicos produzidos por eles.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

O isolado de *Phytophthora nicotianae*, IAC-95, e as 18 linhagens de *Trichoderma* sp. (ACB-02, ACB-03, ACB-04, ACB-05, ACB-14, ACB-32, ACB-33, ACB-34, ACB-36, ACB-37, ACB-38, ACB-40, ACB-42, ACB-43, ACB-183/5, ACB-T1, ACB-T6, ACB-T002) fazem parte da coleção de isolados do Laboratório de Fitopatologia e Controle biológico do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, em Cordeirópolis/SP (Tabela 1).

Tabela 1 - Número e identificação dos isolados de *Trichoderma* spp.; Hospedeiro e Procedência

Nº isolado	Identificação	Hospedeiro	Procedência
ACB - 02	<i>Trichoderma</i> sp.	Banana	Jaboticabal
ACB - 03	<i>T. aureoviride</i>	Milho	Lab. De Fitopatologia - FCAV/ UNESP
ACB - 04	<i>T. harzianum</i>	Feijão	Lab. De Fitopatologia - FCAV/ UNESP
ACB - 05	<i>T. koningii</i>	Citros	Lab. De Fitopatologia - FCAV/ UNESP
ACB - 14	<i>T. viride</i>	Citros	Dep. de Microbiologia - FCAV/ UNESP
ACB - 32	<i>T. virens</i>	Laranja Pêra	Bebedouro
ACB - 33	<i>T. aureoviride</i>	Laranja Pêra	Taiúva
ACB - 34	<i>T. aureoviride</i>	Laranja Pêra	Mogi Guaçú
ACB - 36	<i>T. aureoviride</i>	Laranja Pêra	Mogi Guaçú
ACB - 37	<i>T. pseudokoningii</i>	Laranja Pêra	Mogi Guaçú
ACB - 38	<i>T. koningii</i>	Laranja Pêra	Mogi Guaçú
ACB - 40	<i>Trichoderma</i> sp.	Lima Ácida Tahiti	Itápolis
ACB - 42	<i>Trichoderma</i> sp.	Banana	Instituto Biológico/ SP
ACB - 43	<i>Trichoderma</i> sp.	Palmito	São Bento do Sapucaí
ACB - 183/5	<i>Trichoderma</i> sp.	Citros	Jaguariúna - EMBRAPA
ACB - T1	<i>Trichoderma</i> sp.	Soja	Uberaba
ACB - T6	<i>Trichoderma</i> sp.	Soja	Uberaba
ACB - T002	<i>Trichoderma</i> sp.	Banana	Guarulhos

3.2 Influência de isolados de *Trichoderma* spp. no crescimento micelial de *Phytophthora nicotianae*

Para verificar o efeito dos isolados de *Trichoderma* spp. no crescimento micelial de *P. nicotianae*, utilizou-se a técnica de cultivo pareado em placa de Petri (DENNIS; WEBSTER, 1971). Discos de 5 mm de diâmetro retirados de colônias ativas de *P. nicotianae* (7 dias), cultivado em meio cenoura-ágar, foram transferidos para placas de Petri contendo batata-dextrose-ágar a 3cm de distância da colônia dos diferentes isolados de *Trichoderma* spp. As testemunhas foram representadas pelo cultivo do patógeno, na ausência dos antagonistas.

3.3 Produção de substâncias antifúngicas termoestáveis e livres de células de *Trichoderma* spp. e seu efeito sobre o crescimento micelial de *Phytophthora nicotianae*

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram estudados quanto ao efeito de seus metabólitos, livres de células, sobre o crescimento micelial de *P. nicotianae*. Para cada isolado de *Trichoderma* sp. foi utilizado um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de batata dextrose (BD). Três discos de meio, com crescimento micelial do antagonista foi colocado no Erlenmeyer e incubado a 28° C por 120 horas, sob agitação constante e fotoperíodo 12/12h. O caldo obtido foi filtrado em membrana Millipore (0,45 µm), a fim de se conseguir um filtrado livre de células de *Trichoderma* sp. (FRIGHETTO; MELO, 1995).

Amostras de 10 mL de cada filtrado foram transferidas para Erlenmeyers com capacidade para 250 mL, contendo 90 mL de BDA fundente (aproximadamente 45° C). Os meios, correspondentes a cada tratamento, foram vertidos para placas de Petri.

Para testar a produção de metabólitos termoestáveis pelos isolados de *Trichoderma* spp., foi utilizada a mesma metodologia da obtenção do caldo, sendo que, em seguida, uma alíquota de 40 mL foi retirada de cada frasco,

correspondente a cada isolado de *Trichoderma* spp., e submetida a centrifugação. Obtidos os sobrenadantes, foram transferidas amostras de 10 mL para Erlenmeyers com 90 mL de BDA. Em seguida, os meios foram esterilizados em autoclave por 20 minutos, a 120° C e 1 atm de pressão, sendo que, posteriormente, cada meio, contendo o respectivo metabólito, foi vertido para placas de Petri.

Após solidificação dos meios, um disco de 5 mm de diâmetro retirados de colônias ativas de *Phytophthora* (7 dias), foi transferido para o centro de cada placa. As testemunhas foram constituídas de placas contendo o fitopatógeno nos meios de cultura, sem a presença de metabólitos (livres de células ou termoestáveis).

3.4 Produção de metabólitos voláteis por *Trichoderma* spp.

Para verificar a produção de metabólitos voláteis pelos isolados de *Trichoderma* spp. e o efeito sobre o desenvolvimento micelial da colônia de *P. nicotianae*, discos de 5 mm do antagonista e do patógeno foram transferidos para cada um dos lados de placas de poliestireno descartáveis divididas ao meio, contendo meio BDA. A testemunha foi constituída de placas contendo apenas um disco do fitopatógeno.

3.5 Incubação das culturas, avaliação e delineamento estatístico dos experimentos *in vitro*

Em todos os experimentos *in vitro*, as culturas foram mantidas a 28°C sob fotoperíodo de 12/12 h, em estufa para B.O.D. A avaliação foi realizada quando a colônia do patógeno nos tratamentos testemunhas atingiram as bordas das placas, por meio de medições do crescimento micelial das colônias de *Phytophthora*, em dois sentidos perpendiculares. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Os dados foram submetidos à

análise de variância (ANOVA), considerando um nível de significância $\alpha = 0,05$ e as médias comparadas pelo Teste de Tukey. Os dados foram transformados, quando necessário, segundo o método de Box-Cox (BOX; COX, 1964), para obter a normalidade dos dados (SHAPIRO; WILK, 1965). Utilizou-se o software livre R (versão 3.0.1) e seu pacote ExpDes.

3.6 Promoção de crescimento de porta-enxertos de citros pela aplicação de *Trichoderma* spp.

Foi realizado um experimento em casa-de-vegetação com o objetivo de selecionar isolados de *Trichoderma* spp. como promotores de crescimento de plantas cítricas.

Neste estudo, foram utilizados três porta-enxertos: limão Cravo, tangerina Sunki e citrumelo Swingle, cujas sementes foram provenientes do setor de Borbulhas do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, em Cordeirópolis/SP. As mudas foram produzidas em tubetes, utilizando o substrato 'Plantmax', mantido sem esterilização, e constituído de mesmo lote (FREITAS; AGUILAR VILDOSO, 2004).

Os 18 isolados de *Trichoderma* spp. foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA e incubados por dez dias em estufa para BOD a 28° C e fotoperíodo de 12 horas. A suspensão de inóculo para cada agente de controle biológico (ACB) foi feita adicionando-se 10 mL de água destilada e esterilizada/placa, onde o micélio foi raspado com o auxílio de uma lâmina de microscopia estéril. 10 mL da suspensão (1×10^7 conídios/mL) de cada isolado de *Trichoderma* foi adicionada por tubete aos 55 dias após a semeadura. Como testemunha, foram usadas plantas sem tratamento com o ACB. Um tratamento foi constituído da mistura de três isolados (ACB-33, ACB-34 e ACB-37), na proporção 1:1:1 (v/v), conforme Macagnan (2008). Estes foram escolhidos de acordo com os resultados obtidos por Corrêa et al. (2011). Aos 146 dias após a semeadura, as plantas foram novamente tratadas com os isolados (metodologia adaptada de FREITAS; AGUILAR VILDOSO, 2004).

Foram avaliados a altura e número de folhas das plantas aos 30, 60, 90, 120, 150, 180 dias após o tratamento com os antagonistas. Ao final do experimento foi determinada a massa de matéria seca da parte aérea e de raízes das plantas.

Os tratamentos foram dispostos em um delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições, sendo cada repetição constituída de uma planta, em esquema de parcela subdividida em que nas parcelas aplicaram-se os isolados de *Trichoderma* spp. (20 níveis) e nas subparcelas considerou-se 6 tempos: 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias após a aplicação, para os parâmetros de altura e número de folhas. Os dados foram analisados separadamente para cada variedade e foram transformados segundo o método de Box-Cox (BOX; COX, 1964), para obter a normalidade dos dados (SHAPIRO; WILK, 1965). Utilizou-se o software livre R (versão 3.0.1) e seu pacote ExpDes e as médias comparadas pelo Teste de Duncan a 5 %.

3.7 Indução de resistência à gomose de *Phytophthora nicotianae*

O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação para selecionar isolados de *Trichoderma* spp. com potencial para induzir resistência à *P. nicotianae* nos mesmos porta-enxertos utilizados no experimento anterior (item 3.6). As plantas foram cultivadas em vasos de 3 L contendo substrato 'Plantmax' mantido sem esterilização, e constituído de mesmo lote (FREITAS; AGUILAR VILDOSO, 2004).

Os 18 isolados de *Trichoderma* spp. foram cultivados em placas de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Agar e incubados por dez dias em câmara de crescimento a 28°C e fotoperíodo de 12 horas.

As sementes de cada um dos porta-enxertos foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO 0.7%) por 5 minutos, lavadas em água corrente e, após 24 horas de secagem, em temperatura ambiente, foram imersas nas suspensões de cada isolado de *Trichoderma* (1×10^7 conídios/mL) por 1 hora. As testemunhas consistiram de sementes desinfestadas e imersas

em água destilada autoclavada no lugar do antagonista. Após a secagem por duas horas, as sementes foram semeadas (AMORIM; MELO, 2002).

Um tratamento constituiu da imersão das sementes em mistura de suspensões de três antagonistas (ACB-33, ACB-34 e ACB-37).

As mudas foram inoculadas com *P. nicotianae* aos 180 dias após o plantio. A metodologia de inoculação seguiu a descrita por Sivieiro (2001; 2002). Com o auxílio de uma agulha de metal, previamente desinfestada com álcool 70%, hastes das plantas foram infectadas à altura de 2 cm do colo com estruturas de *P. nicotianae* obtidas de colônias ativas (sete dias). O ponto de inoculação foi protegido com algodão umedecido e vedado com auxílio de fita de enxertia. As plantas foram incubadas por 40 dias em uma sala climatizada com temperatura controlada ($25 \pm 3^\circ\text{C}$). A avaliação foi realizada medindo-se o comprimento da lesão.

Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, sendo cada repetição constituída de duas plantas. Os dados foram transformados segundo o método de Box-Cox (BOX; COX, 1964), para obter a normalidade dos dados (SHAPIRO; WILK, 1965) e, submetidos à análise de variância (ANOVA). Foi utilizado o software livre R (versão 3.0.1) e seu pacote ExpDes, e a comparação de médias foi feita pelo teste de Duncan a 5 %.

3.8 Controle de *Phytophthora nicotianae*

Este experimento foi conduzido conforme metodologia adaptada de Amorim e Melo (2002). Sementes de limão Cravo e tangerina Sunki foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO 0.7 %) por 5 minutos e lavadas em água corrente. Após 24 horas, à 25° C, foram imersas em suspensões de *Trichoderma* spp. (1×10^7 conídios/mL) por 1 hora. As testemunhas consistiram de sementes desinfestadas e imersas em água destilada autoclavada. Após a secagem por 2 horas, as sementes foram

semeadas em substrato 'Plantmax' esterilizado, infestado artificialmente com *Phytophthora nicotianae*.

De acordo com Medina Filho et al. (2004), para a produção de inóculo de *P. nicotianae*, discos de micélio do patógeno foram retirados das colônias e transferidos para placas de Petri com meio de cultura cenoura-ágar. As culturas foram mantidas a 24° C, no escuro, por seis dias, até o crescimento do micélio em toda a superfície do meio. Metade das placas foi mantida sob luz fluorescente contínua, durante cinco dias, para promover o desenvolvimento de esporângios, enquanto que a outra metade continuou no escuro, à mesma temperatura. Todas as placas foram posteriormente mantidas no escuro, por mais três dias, antes da sua utilização nas inoculações. O conteúdo de quatro placas foi composto por diferentes propágulos do patógeno, incluindo micélio, esporângios e clamidósporos, os quais foram homogeneizados no liquidificador por 1 min, diluindo-se essa suspensão com 800 ml de água destilada. Cada tubete recebeu 3 mL dessa suspensão.

Avaliou-se o número de plantas sobreviventes após 60 dias da semeadura. As plantas foram mantidas em uma sala com temperatura controlada que variou de 25 a 28° C. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, com nove repetições, sendo cada repetição constituída de três plantas, em arranjo fatorial 21x2 (2 níveis: T. Sunki e L. Cravo). Os dados foram transformados segundo o método de Box-Cox (BOX; COX, 1964), para obter a normalidade dos dados (SHAPIRO; WILK, 1965) e, submetidos à análise de variância (ANOVA). Foi utilizado o software livre R (versão 3.0.1) e seu pacote ExpDes, e a comparação de médias foi feita pelo teste de Duncan a 5 %.

4 RESULTADOS

4.1 Influência do cultivo pareado dos isolados de *Trichoderma* spp. no crescimento micelial de *Phytophthora nicotianae*

Os resultados mostraram que todos os isolados foram capazes de inibir, significativamente, a colônia de *Phytophthora*, sendo que, 15 isolados causaram inibições no tamanho da colônia do patógeno acima de 75%. Os isolados ACB-02 (*Trichoderma* spp.), ACB-14 (*T. viride*), ACB-36 (*T. aureoviride*) e ACB-38 (*T. koningii*) apresentaram os melhores resultados, proporcionando 84 % de inibição (Tabela 2, Figura 4).

Tabela 2 - Porcentagem de inibição da colônia de *Phytophthora nicotianae* após cultivo pareado com os isolados de *Trichoderma* spp.

Isolados	Diâmetro médio da colônia (cm)	% de inibição
Testemunha	7,28a ¹	0,00
ACB-T6	3,40b	53,29
ACB-43	2,26c	68,95
ACB-34	2,23cd	69,36
ACB-37	1,80de	75,27
ACB-183/5	1,76ef	75,82
ACB-03	1,66ef	77,19
ACB-T1	1,66ef	77,19
ACB-04	1,46efg	79,94
ACB-32	1,43efgh	80,35
ACB-40	1,43efgh	80,35
ACB-T002	1,42fgh	80,49
ACB-05	1,27ghi	82,55
ACB-33	1,22ghi	83,24
ACB-42	1,20ghi	83,51
ACB-36	1,16ghi	84,06
ACB-38	1,15ghi	84,20
ACB-14	1,13hi	84,47
ACB-02	1,10i	84,89

CV = 2,12 %

¹ Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados transformados: BoxCox: $\lambda = 0,21$

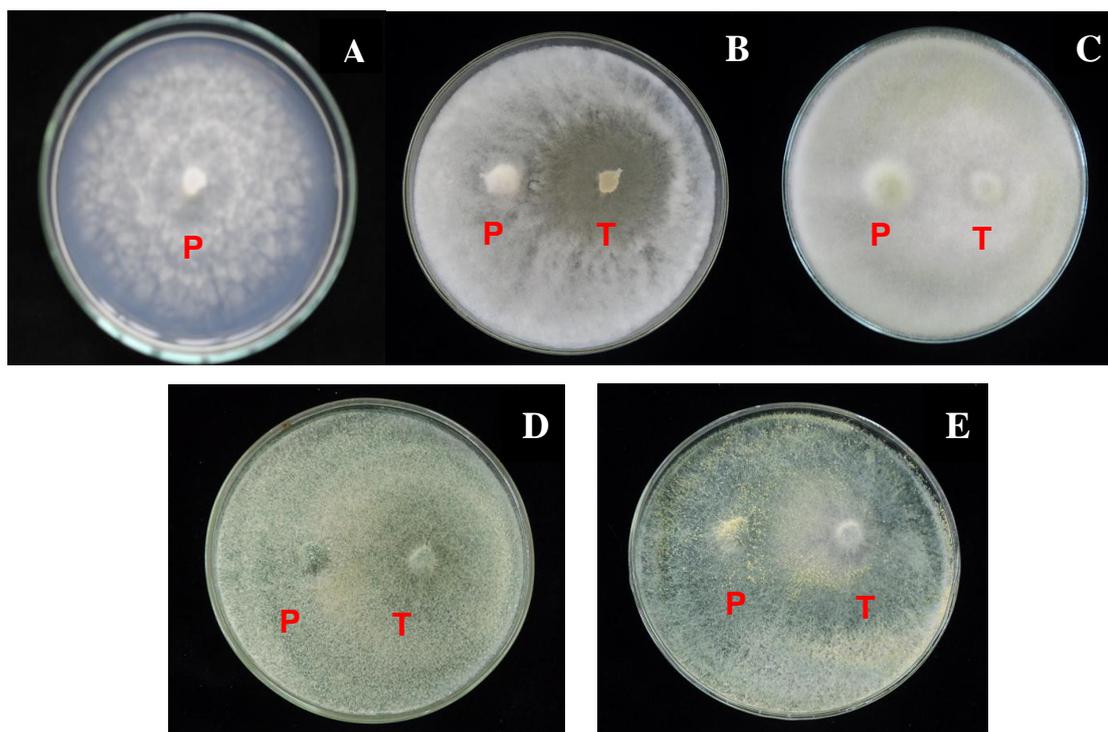


Figura 4 - Influência dos isolados de *Trichoderma* spp. (T) no crescimento micelial de *Phytophthora nicotianae* (P) em cultivo pareado. (A. Controle, B. *P. nicotianae* x ACB-36, C. *P. nicotianae* x ACB-38, D. *P. nicotianae* x ACB-14, E. *P. nicotianae* x ACB-02).

4.2 Produção de metabólitos livres de células e termoestáveis pelos isolados de *Trichoderma* spp. e seu efeito sobre o crescimento micelial de *Phytophthora nicotianae*

Quando se avaliou a produção de metabólitos pelos isolados de *Trichoderma* spp., verificou-se que a maioria deles não apresentou metabólitos livres de células, em quantidades suficientes para inibir o desenvolvimento do patógeno (Figura 5). Apenas os isolados ACB-02, ACB-38, ACB-40, ACB-42 e ACB-183/5 produziram substâncias antifúngicas que provocaram inibições na colônia de *Phytophthora*, as quais variaram de 30 a 58%, porém, com exceção do ACB-38, tais substâncias não suportaram a alta temperatura (Tabela 3).

Tabela 3 - Porcentagem de inibição da colônia de *Phytophthora nicotianae* pelos metabólitos termoestáveis e livres de células dos isolados de *Trichoderma* spp.

Isolados	Livre de células		Termoestáveis	
	Diâmetro da colônia (cm)	% de inibição	Diâmetro da colônia (cm)	% de inibição
ACB-02	3,25 e	57,9	8,16 a ¹	8,00
ACB-03	7,65 abc	0,91	8,29 a	6,54
ACB-04	8,10 ab	-4,92	8,04 a	9,36
ACB-05	7,42 bc	3,89	9,00 a	-1,47
ACB-14	7,11 bc	7,90	8,81 a	0,68
ACB-32	7,56 abc	2,07	8,71 a	1,80
ACB-33	7,38 bc	4,40	8,73 a	1,58
ACB-34	7,62 abc	1,30	9,00 a	-1,47
ACB-36	8,76 a ¹	-13,47	8,82 a	0,56
ACB-37	7,32 bc	5,18	8,27 a	6,76
ACB-38	4,18 de	45,85	4,15 b	53,21
ACB-40	4,97 d	35,62	8,66 a	2,37
ACB-42	4,78 d	38,08	8,77 a	1,13
ACB-43	6,87 bc	11,01	8,40 a	5,30
ACB-183/5	5,40 d	30,05	9,00 a	-1,47
ACB-T1	6,77 c	12,31	8,11 a	8,57
ABC-T6	7,85 abc	-1,68	8,41 a	5,19
ACB-TP002	7,38 bc	4,40	8,82 a	0,56
Testemunha	7,72 abc	0,00	8,87 a	0,00

¹ Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

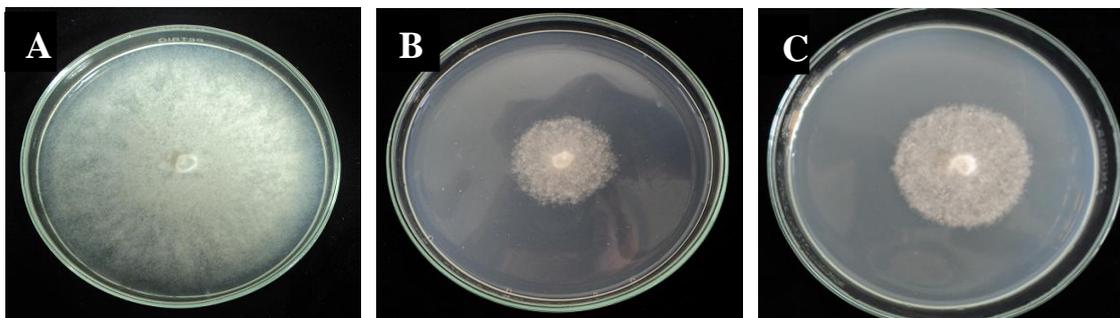


Figura 5 - Influência dos metabólitos livres de células dos isolados ACB-38 (*T. koningii*) e ACB-02 (*Trichoderma* spp.) no crescimento micelial de *Phytophthora nicotianae* (A. Testemunha, B. ACB-02, C. ACB-38).

4.3 Produção de metabólitos voláteis por *Trichoderma* spp.

Nenhum dos 18 isolados de *Trichoderma* spp. testados foi capaz de produzir compostos voláteis que inibissem significativamente o desenvolvimento do patógeno.

4.4 Promoção de crescimento de porta-enxertos de citros pela aplicação de *Trichoderma* spp.

Para a tangerina Sunki, pela Análise de Variância, o fator fungo foi dependente do tempo. Analisando fungo dentro de cada tempo, observou-se que houve diferença entre os isolados de *Trichoderma* spp. em todos os tempos analisados (30, 60, 90, 120, 150 e 180) em relação à altura da planta. Ao serem analisados os dados das Tabelas 4 e 5, verifica-se que 04 isolados de *Trichoderma* ACB-32 (*T. virens*), ACB-36 (*T. aureoviride*) e ACB-38 (*T. koningii*) mostraram ser capazes de promover o crescimento das plantas da variedade Sunki, em todos os tempos avaliados. Tais isolados proporcionaram porcentagens de crescimento de planta que variaram de 20 a 50% superiores em relação ao tratamento testemunha. Quanto ao número de folhas, pode-se perceber que ACB-38 e o tratamento com a mistura dos isolados diferiram da

testemunha nos dois últimos tempos de avaliações (150 e 180 dias), enquanto que, na avaliação de 180 dias, os isolados ACB-32, ACB-36, ACB-38, ACB-183/5 e ACB-T6 foram os que apresentaram o maior número de folhas (Tabela 6). Em relação à massa de matéria seca, o ACB-43 e a mistura dos isolados proporcionaram, significativamente, maior massa da parte aérea e de raiz; além disso, a massa da parte aérea também foi significativa nos tratamentos ACB-T6 e ACB-T002, enquanto que, maior quantidade de raiz também ocorreu nos tratamentos ACB-04, ACB-05, ACB-32 e ACB-38. (Tabela 8).

O desdobramento dos tempos dentro de cada fungo, representado pelas análises de regressão, está descrito para cada tratamento nas Tabelas 5 e 7, para o parâmetro altura e número de folhas, respectivamente. Os gráficos dos valores observados em cada tempo analisado junto com o modelo de regressão obtido para cada fungo estão apresentados nas Figuras 6, 7, 8, 9 e 10 para o parâmetro altura.

Tabela 4 - Influência dos isolados de *Trichoderma* spp. na altura de plantas de Tangerina Sunki, após 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias do tratamento.

Tratamentos	Tempo 30	Tempo 60	Tempo 90	Tempo 120	Tempo 150	Tempo 180	Altura (cm)						
Testemunha	2,86ab	3,51abc	4,11a ¹	4,58a ¹	6,38a ¹	11,00a ¹							
ACB-02	2,83ab	3,23a ¹	4,5ab	5,25abc	7,48abc	12,25ab							
ACB-03	3,12 abcd	3,58abcde	4,96abc	5,36abc	6,93ab	11,91ab							
ACB-04	3,26 bcde	4,21bcdefg	4,98abc	5,51abc	7,43abc	12,80ab							
ACB-05	3,61cdef	4,03abcdef	4,91abc	5,28ab	7,38abc	13,11ab							
ACB-14	2,98abc	4,24bcdef	4,98abc	5,80abc	8,16abc	13,24ab							
ACB-32	3,60def	4,38defg	5,60bc	6,80c	9,25c	15,63b							
ACB-33	3,70defg	4,51efg	5,46bc	6,11bc	8,70bc	13,86ab							
ACB-34	3,83defg	4,35cdefg	5,83bc	6,71c	9,10bc	13,40ab							
ACB-36	4,35fg	4,68fg	4,98c	6,78c	9,51c	15,28b							
ACB-37	3,63cdef	4,08bcdef	5,26bc	6,35bc	8,15abc	13,50ab							
ACB-38	4,43g	5,18g	5,50bc	6,75c	9,51c	15,66b							
ACB-40	3,75defg	4,20bcdefg	5,36bc	6,45bc	9,41c	15,50b							
ACB-42	3,88efg	4,15bcdefg	5,20bc	6,05bc	8,48bc	14,38ab							
ACB-43	2,90ab	3,38a ¹	5,21abc	6,31bc	9,05bc	15,01ab							
ACB-T1	3,18bcde	3,73abcde	4,93abc	5,55abc	8,16abc	12,53ab							
ACB-T6	2,85ab	3,46ab	5,03abc	5,86bc	7,91abc	12,85ab							
ACB-T002	3,11abcd	3,61abcd	5,28bc	6,11bc	8,53bc	14,23ab							
ACB-183/5	2,58a ¹	3,43ab	4,98abc	6,20bc	9,08bc	14,58ab							
Mistura	2,95ab	3,70abcde	5,18abc	5,81abc	8,65bc	14,61ab							

CV = 13,27 %

¹Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

* Dados transformados: BoxCox com $\lambda = -0,36$.

Tabela 5 - Descrição dos modelos de regressão para altura em plantas de Tangerina Sunki após tratamento com os isolados de *Trichoderma* spp.

Tratamento	Regressão*	b0	b1	b2	b3	R ²
ACB-02	Linear	0.7598849	-0.0018811	—	—	0.9889332
ACB-03	Cúbico	0.74431303	-0.00314617	0.00002235	-0.00000008	0.9906087
ACB-04	Cúbico	0.72171496	-0.00305280	0.00002351	-0.00000009	0.99671
ACB-05	Cúbico	0.70279297	-0.00264705	0.00002339	-0.00000010	0.9927513
ACB-14	Linear	0.729057	-0.001736	—	—	0.9868368
ACB-32	Linear	0.68704655	-0.00165167	—	—	0.9909761
ACB-33	Quadrático	0.6638354	-0.0009525	-0.0000029	—	0.9881967
ACB-34	Linear	0.66236507	-0.00140698	—	—	0.9856134
ACB-36	Cúbico	0.65230613	-0.00211124	0.00001432	-0.00000006	0.9941742
ACB-37	Linear	0.68469242	-0.00148344	—	—	0.9836603
ACB-38	Quadrático	0.60906785	-0.00036797	-0.00000500	—	0.981968
ACB-40	Quadrático	0.65403903	-0.00062867	-0.00000506	—	0.9967379
ACB-42	Quadrático	0.65865698	-0.00071609	-0.00000413	—	0.9861124
ACB-183/5	Linear	0.76222378	-0.00207733	—	—	0.9952314
ACB-T1	Quadrático	0.69277794	-0.00095712	-0.00000348	—	0.9938032
ACB-T6	Linear	0.7384001	-0.0018143	—	—	0.9895599
ACB-T002	Linear	0.73040585	-0.00182958	—	—	0.990244
ACB-43	Quadrático	0.74571445	-0.00170435	-0.00000173	—	0.9908171
Mistura	Linear	0.73430650	-0.00186456	—	—	0.98791
Testemunha	Cúbico	0.73323194	-0.00219083	0.00001573	-0.00000007	0.9967349

CV = 4,16 %

*Regressão com os dados transformados: BoxCox com $\lambda = -0,36$.

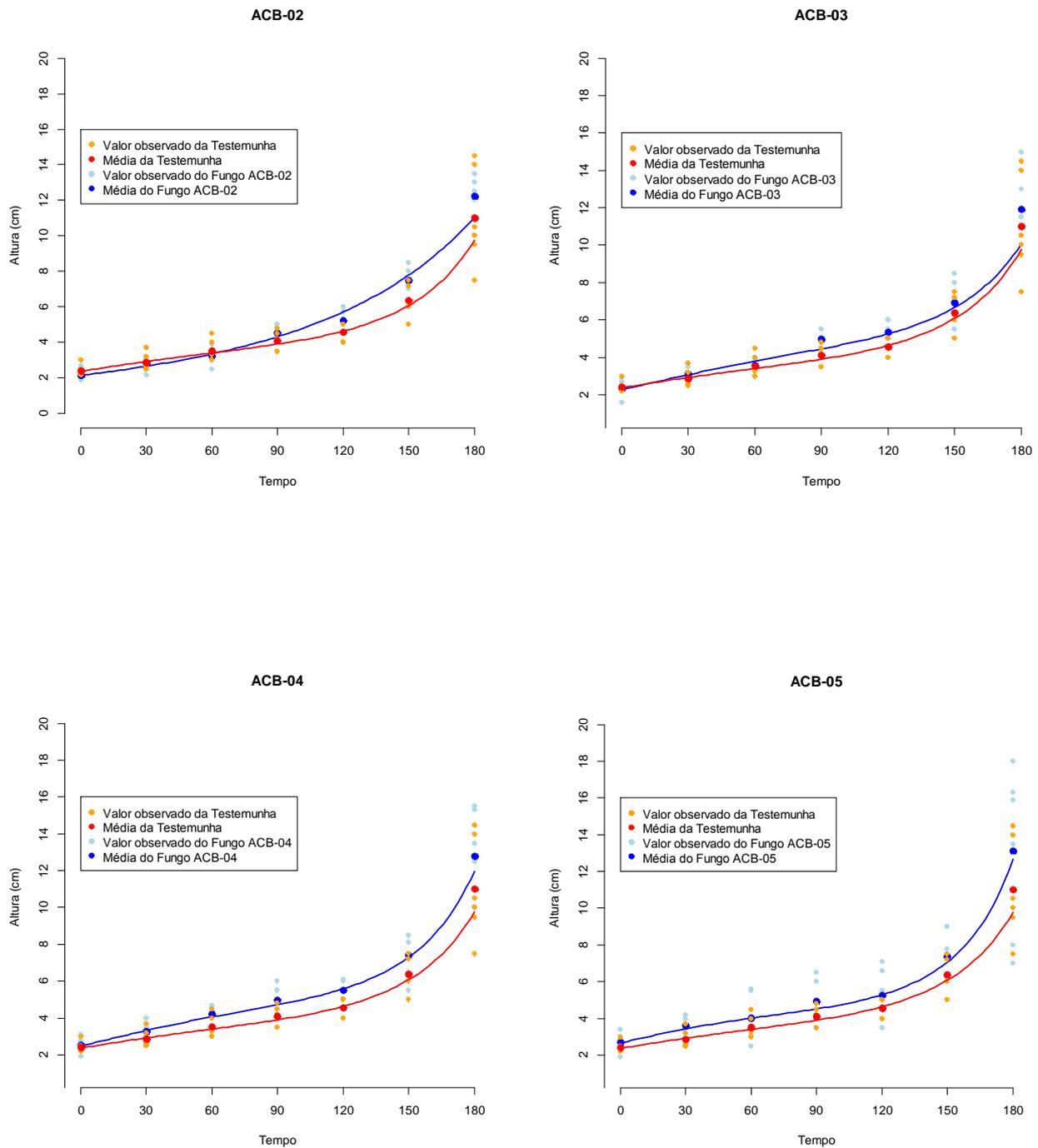


Figura 6 - Estudo da promoção de crescimento: modelos de regressão de altura de plantas de Tangerina Sunki, após tratamento com isolados de *Trichoderma* spp.- ACB-02, ACB-03, ACB-04 e ACB-05.

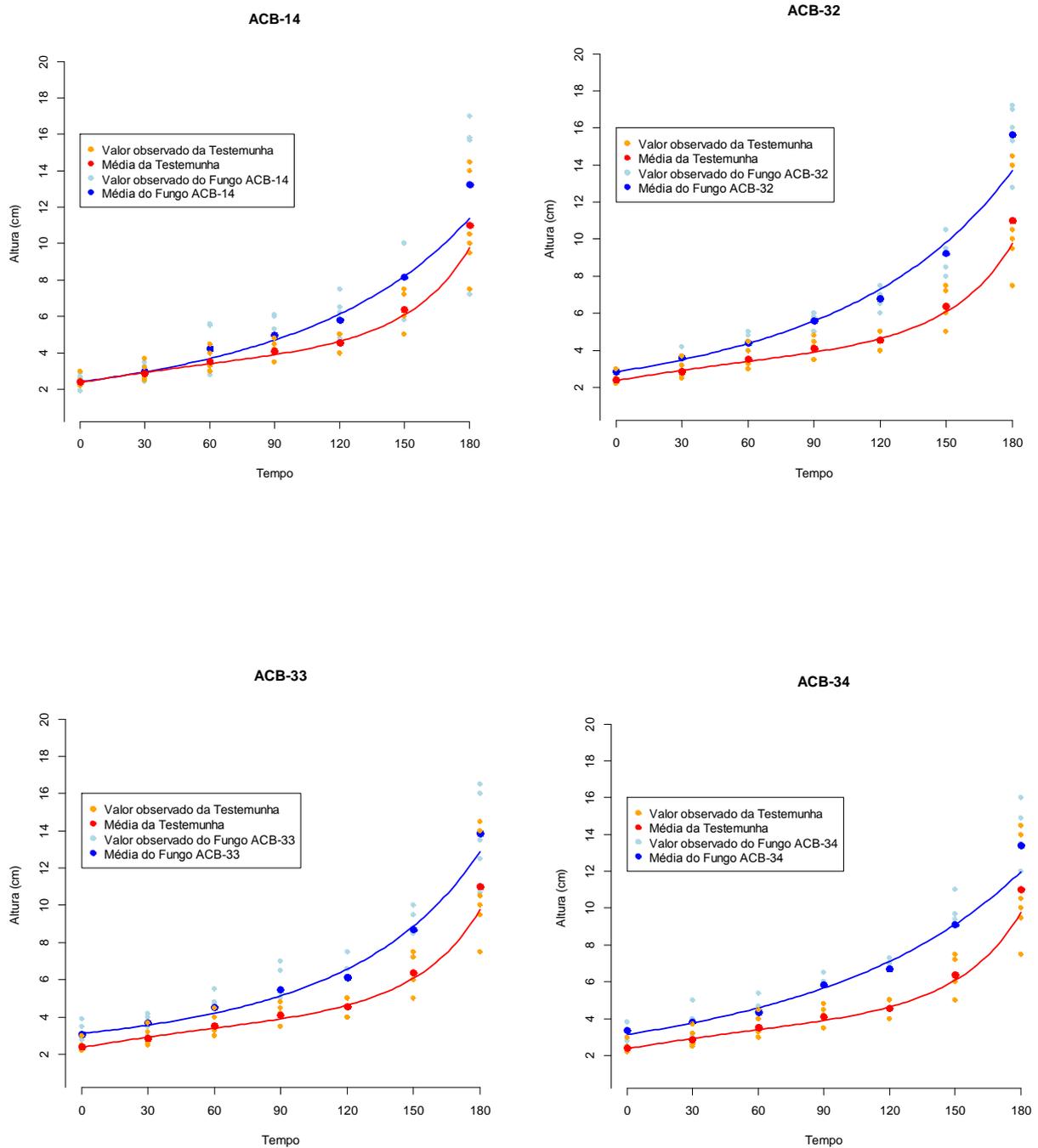


Figura 7 - Estudo da promoção de crescimento modelos de regressão de altura de plantas de Tangerina Sunki, após tratamento com isolados de *Trichoderma* spp.- ACB-14, ACB-32, ACB-33 e ACB-34.

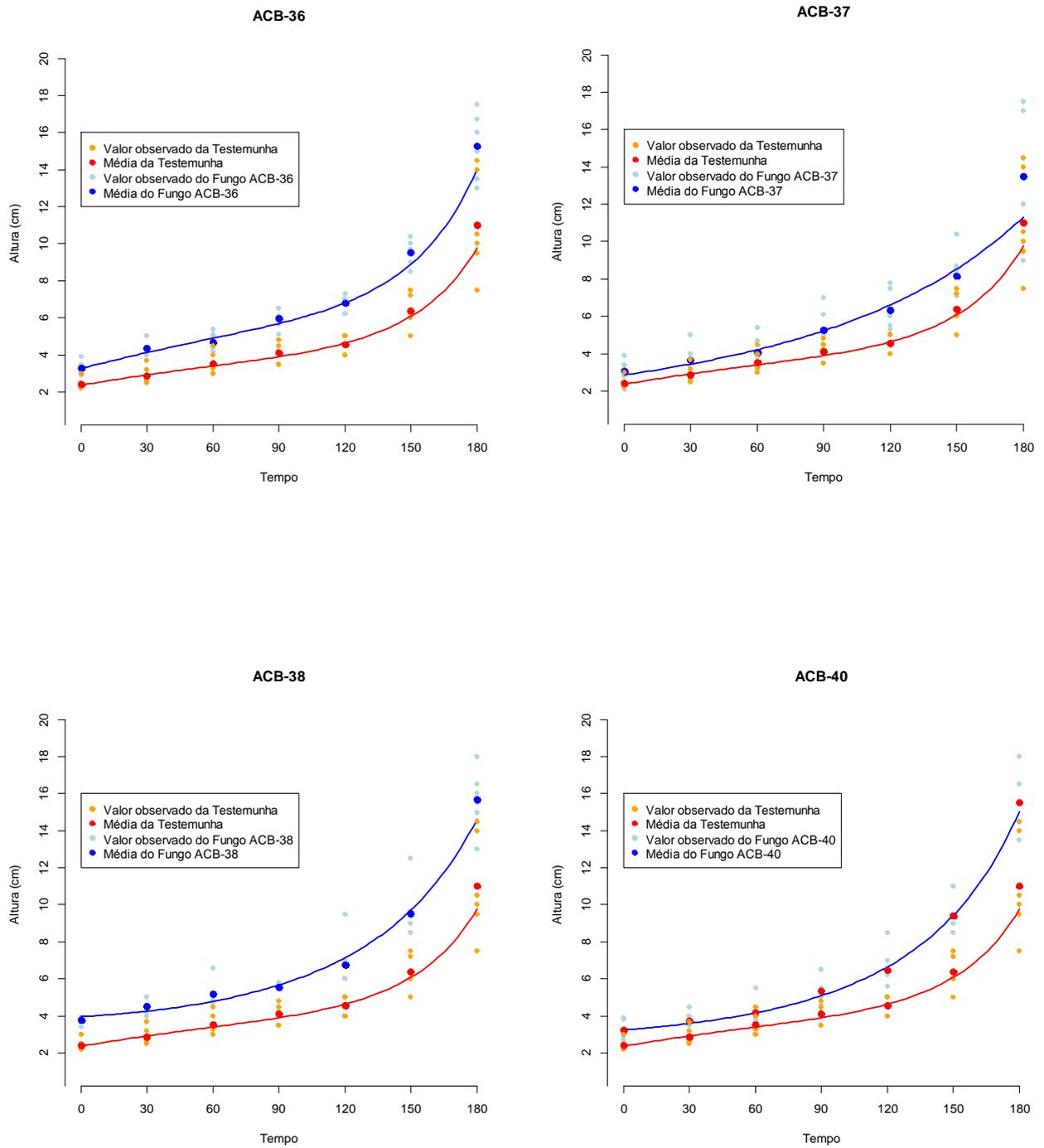


Figura 8 - Estudo da promoção de crescimento: modelos de regressão de altura de plantas de Tangerina Sunki, após tratamento com isolados de *Trichoderma* spp.- ACB-36, ACB-37, ACB-38 e ACB-40.

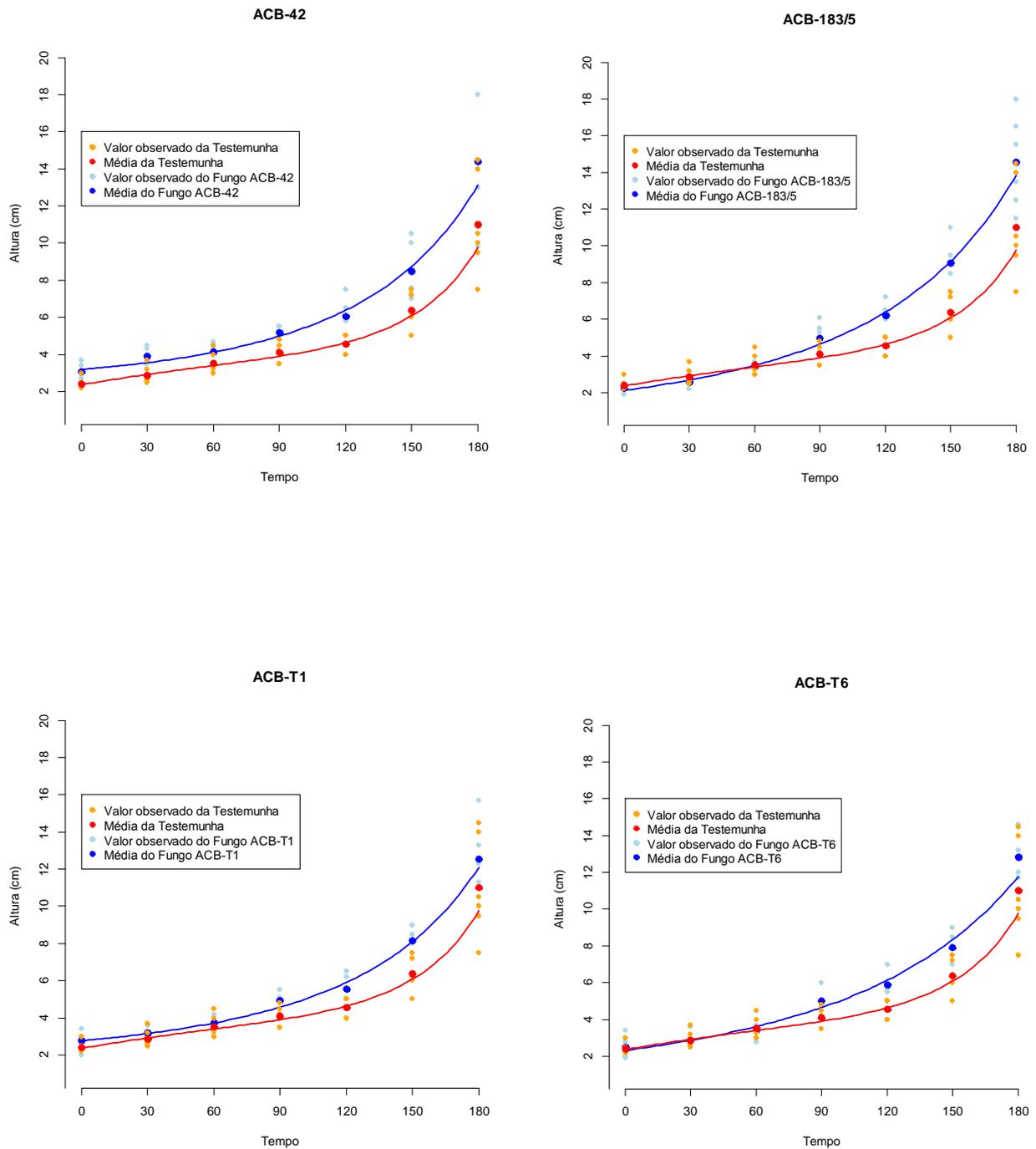


Figura 9 - Estudo da promoção de crescimento: modelos de regressão de altura de plantas de Tangerina Sunki, após tratamento com isolados de *Trichoderma* spp.- ACB-42, ACB-183/5, ACB-T1 e ACB-T6.

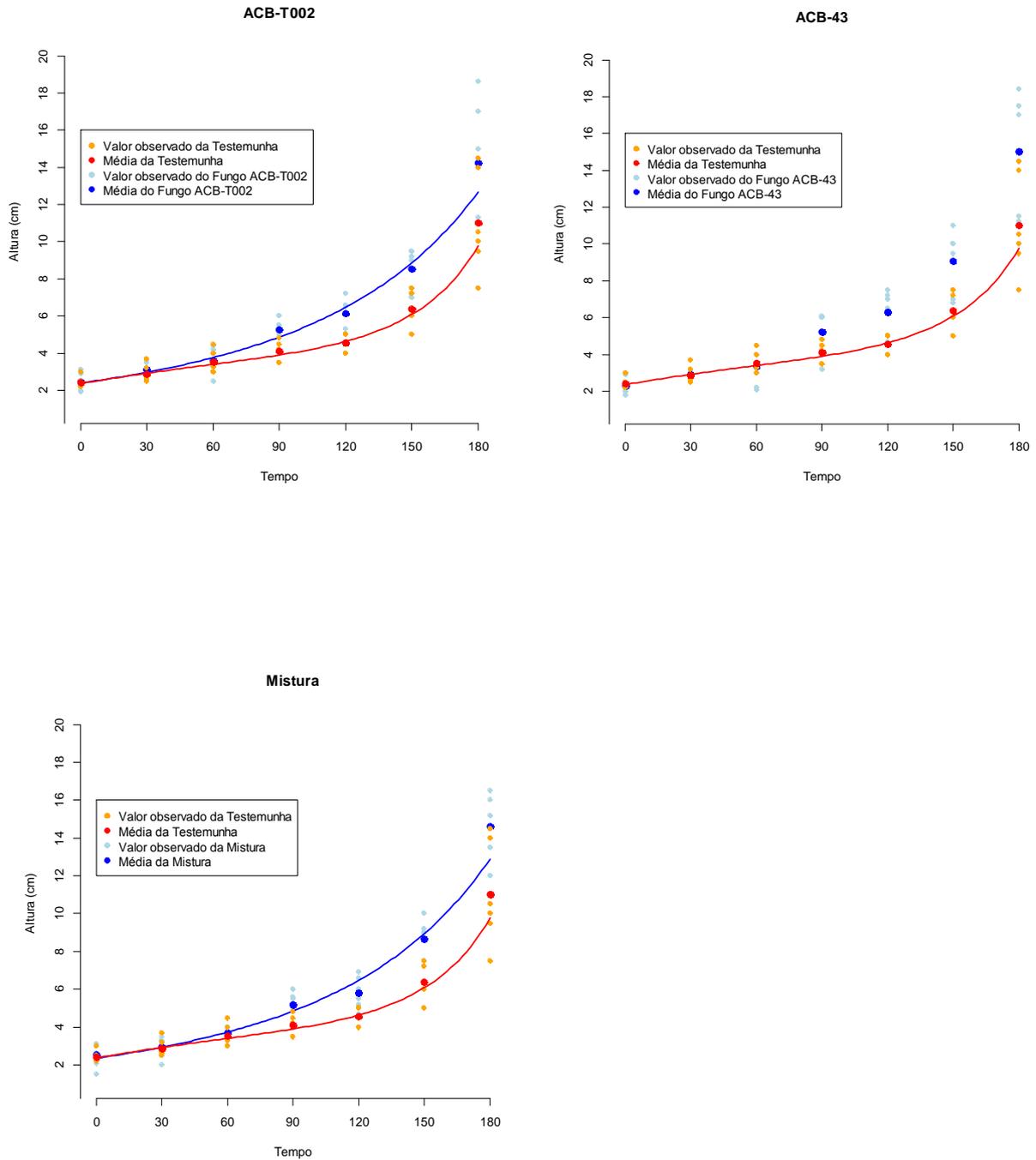


Figura 10 - Estudo da promoção de crescimento: modelos de regressão de altura de plantas de Tangerina Sunki, após tratamento com isolados de *Trichoderma* spp.- ACB-T002, ACB-43 e Mistura dos isolados.

Tabela 6 - Influência dos isolados de *Trichoderma* spp. no número de folhas de Tangerina Sunki, após 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias do tratamento.

Tratamentos	Tempo 30	Tempo 60	Tempo 90	Tempo 120	Tempo 150	Tempo 180
	N° Folhas					
Testemunha	5,34a	7,17c	8,50ab	10,33abcd	13,17cdef	20,00efgh
ACB-02	5,17a ¹	7,84bc	8,50ab	9,17cd	12,33fg	19,83efgh
ACB-03	5,00a	7,17c	7,84b	8,17d	10,67g	18,00h
ACB-04	5,34a	8,34abc	8,50ab	9,33bcd	12,83def	20,33defg
ACB-05	5,00a	6,84c	8,34ab	9,17cd	12,50efg	19,67fgh
ACB-14	5,00a	7,80bc	8,40ab	10,00abcd	12,20fg	20,00efgh
ACB-32	6,17a	8,17abc	9,67ab	11,83a ¹	14,83abcd	23,17ab
ACB-33	6,00a	7,50bc	8,50ab	10,00abcd	13,33bcdef	20,67cdefg
ACB-34	6,00a	8,34abc	9,50ab	11,17abc	14,17bcdef	21,33bcdefg
ACB-36	6,17a	8,67abc	9,50ab	11,33abc	15,17abc	22,50bcd
ACB-37	5,84a	7,34c	8,67ab	9,50bcd	12,50efg	19,33gh
ACB-38	6,67a	9,67ab	9,83ab	11,33abc	15,50ab	22,83abc
ACB-40	5,67a	7,17c	9,00ab	10,33abcd	13,67bcdef	20,83cdefg
ACB-42	6,00a	7,84bc	9,17ab	10,50abc	14,00bcdef	21,50bcdefg
ACB-43	6,17a	7,50bc	9,50ab	11,33abc	14,67bcde	22,00bcde
ACB-T1	5,84a	7,50bc	8,33ab	11,50ab	14,17bcdef	22,17bcd
ACB-T6	5,67a	7,84bc	8,67ab	9,83abcd	13,17 cdef	19,33gh
ACB-T002	6,00a	8,34abc	10,17a ¹	11,00abc	14,83abcd	22,33bcd
ACB-183/5	6,17a	10,17a ¹	10,17a	10,67abc	15,17abc	21,67bcdef
Mistura	6,17a	8,00bc	10,33a	11,50ab	16,83a ¹	24,50a ¹

CV = 27,72%

¹Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade

Tabela 7 - Descrição dos modelos de regressão para folhas em plantas de Tangerina Sunki, após tratamento com diferentes isolados de *Trichoderma* spp.

Tratamentos	Regressão	b0	b1	b2	b3	R ²
ACB-02	Quadrática	7.41666667	-0.05902778	0.00067791	—	0.9352905
ACB-03	Quadrática	7.41666667	-0.06597222	0.00065807	—	0.9171151
ACB-04	Quadrática	7.81666667	-0.06422619	0.00071098	—	0.9340186
ACB-05	Quadrática	6.80000000	-0.05484127	0.00067460	—	0.9613711
ACB-14	Cúbica	6.82000000	-0.04530952	0.00062302	—	0.9381056
ACB-32	Quadrática	7.86666667	-0.05488095	0.00074735	—	0.9710275
ACB-33	Linear	1.76666667	0.08793651	—	—	0.8493829
ACB-34	Linear	2.16666667	0.09126984	—	—	0.887572
ACB-36	Quadrática	7.95000000	-0.05259921	0.00071759	—	0.972727
ACB-37	Linear	2.14444444	0.07984127	—	—	0.8494843
ACB-38	Quadrática	8.93333333	-0.06186508	0.00074735	—	0.9583714
ACB-40	Quadrática	7.16666667	-0.05099206	0.00068122	—	0.974955
ACB-42	Quadrática	7.93333333	-0.06146825	0.00073413	—	0.9696168
ACB 43	Quadrática	7.50000000	-0.04960317	0.00070106	—	0.9820449
ACB183/5	Linear	1.10000000	0.09984127	—	—	0.8771652
ACB-T1	Quadrática	7.20000000	-0.04357143	0.00059524	—	0.9672784
ACB-T6	Quadrática	7.55000000	-0.04382937	0.00067130	—	0.9627313
ACB-T002	Linear	3.03333333	0.08857143	—	—	0.8501638
Mistura	Quadrática	7.81666667	-0.05787698	0.00081680	—	0.9810637
Testemunha	Linear	1.43333333	0.08873016	—	—	0.8932495

CV = 9,25 %

Tabela 8 - Influência dos isolados de *Trichoderma* spp. na massa de matéria seca de Tangerina Sunki

Tratamentos	Parte aérea (g)	Raíz (g)	Total (g)
Testemunha	1,22 d	0,33 e	1,55 d
ACB-02	1,71 bcd	1,22 bcde	2,93 bcd
ACB-03	1,33 cd	1,09 bcde	2,41 cd
ACB-04	2,29 abcd	1,83 abc	4,11 abc
ACB-05	2,28 abcd	1,48 abcd	3,76 abcd
ACB-14	1,56 bcd	1,22 bcde	2,78 cd
ACB-32	2,79 abcd	1,51 abcd	4,30 abc
ACB-33	2,08 bcd	1,24 bcde	3,31 abcd
ACB-34	2,29 abcd	1,23 bcde	3,53 abcd
ACB-36	2,43 abcd	1,14 bcde	3,57 abcd
ACB-37	1,80 bcd	1,28 bcde	3,08 bcd
ACB-38	2,45 abcd	1,82 abc	4,27 abc
ACB-40	2,79 abcd	1,00 bcde	3,79 abcd
ACB-42	2,83 abcd	0,85 bcde	3,68 abcd
ACB 43	3,02 ab	2,41 a	5,43 ab
ACB183/5	2,64 abcd	1,01 bcde	3,65 abcd
ACB-T1	2,05 bcd	0,59 de	2,64 cd
ACB-T6	3,03 ab	0,90 bcde	3,93 abcd
ACB-T002	2,91 abc	0,82 cde	3,73 abcd
Mistura	3,87 a	1,96 ab	5,83 a

¹ Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade

Para o porta-enxerto citrumelo Swingle, o fator referente aos tratamentos com os isolados de *Trichoderma* spp. foi dependente do tempo de avaliação. Analisando os tratamentos dentro de cada tempo, observou-se que houve diferença dos isolados de *Trichoderma* spp. nos tempos 120, 150 e 180 dias em relação à altura das plantas. Pode se perceber que até 90 dias de avaliação, não houve diferença entre os tratamentos com relação ao efeito de *Trichoderma* spp. quanto à altura das plantas. Após a segunda aplicação dos antagonistas (91 dias após à primeira aplicação), verificou-se que o tratamento referente à mistura dos isolados (ACB-33+ACB-34+ACB-37) promoveu, significativamente, o crescimento das plantas em relação à testemunha nas três últimas avaliações (120, 150 e 180 dias). Considerando, particularmente, os dados da última avaliação (180 dias), verificou-se que, os tratamentos referentes aos isolados ACB-33, ACB-34, ACB-37, ACB-43, ACB-183/5, ACB-T6, ACB-T1 e ACB-T002 proporcionaram plantas com alturas superiores às plantas referentes ao tratamento testemunha. Tais isolados foram capazes de aumentar a altura das plantas de 41,9 % (ACB-37) a 63,13 % (ACB-183/5) (Tabelas 9 e 10), além de promoverem, também, o maior número de folhas (Tabela 11). Ainda na Tabela 11, é possível verificar que os isolados ACB-03, ACB-04, ACB-38, ACB-42, também favoreceram, significativamente, o aumento do número de folhas. Em relação à massa de matéria seca da parte aérea os melhores isolados foram ACB-33, ACB-34, ACB-36, ACB-37, ACB-38, ACB-42, ACB-43, ACB-183/5, ACB-T002, ACB-T1, ACB-T6 e a mistura, enquanto que, para a raiz, os mesmos isolados citados acima, com exceção do ACB-33, ACB-T1 e ACB-T6, promoveram maior quantidade de matéria (Tabela 13).

O desdobramento dos tempos dentro de cada fungo, representados nas análises de regressão, estão descritos para cada tratamento nas Tabelas 10 e 12 para o parâmetro altura e número de folhas, respectivamente. Os gráficos dos valores observados em cada tempo analisado junto com o modelo de regressão obtido para cada fungo estão apresentados nas Figuras 11, 12, 13, 14 e 15 para o parâmetro altura.

Tabela 9 - Influência dos isolados de *Trichoderma* spp. na altura de plantas Citrumelo Swingle, após 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias do tratamento.

Tratamentos	Tempo 30	Tempo 60	Tempo 90	Tempo 120	Tempo 150	Tempo 180
	————— Altura (cm) —————					
Testemunha	6,75abcdef	7,28ab	8,08abc	9,25ab	10,50a ¹	14,92a ¹
ACB-02	6,30ab	7,16ab	8,41abc	9,33abc	11,75ab	16,00ab
ACB-03	6,38abc	7,48ab	8,66abc	9,95abc	11,48ab	17,00abcd
ACB-04	6,91bcdef	7,71ab	8,40abc	10,03abc	13,00ab	18,92abcd
ACB-05	6,00a ¹	6,86a ¹	7,70ab	9,00ab	10,88ab	16,08abc
ACB-14	6,71abcdef	7,48ab	8,28abc	9,38abc	11,95ab	16,00abc
ACB-32	6,48abcd	7,21ab	7,68a ¹	9,03a ¹	10,91ab	16,83abc
ACB-33	7,20bcdef	8,08ab	9,15bc	10,78bc	13,01ab	22,50cd
ACB-34	7,00bcdef	7,66ab	8,81abc	10,1abc	12,66ab	22,28cd
ACB-36	6,30ab	7,76ab	8,80abc	9,60abc	11,60ab	18,30abcd
ACB-37	7,50f	8,25b	8,88abc	10,05abc	12,13ab	21,17bcd
ACB-38	6,70abcdef	7,46ab	8,01abc	9,38abc	11,38ab	19,38abcd
ACB-40	6,63abcdef	7,58ab	8,30abc	9,86abc	11,65ab	18,25abcd
ACB-42	6,66abcde	7,33ab	8,36abc	9,50abc	10,85ab	20,27abcd
ACB-43	7,33def	8,25b	8,98abc	10,26abc	13,20ab	24,28d
ACB-T1	6,50abcd	7,33ab	8,93abc	9,46abc	11,85ab	21,75cd
ACB-T6	6,91abcdef	7,50ab	8,31abc	9,35ab	11,58ab	23,10d
ACB-T002	7,33cdef	8,00ab	9,23bc	9,98abc	13,16ab	23,75d
ACB-183/5	7,50ef	8,06b	9,13bc	10,61abc	12,88ab	24,33d
Mistura	7,38def	8,20b	9,46c	11,48c	13,30b	22,45cd

CV = 23,24%

¹ Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade* Dados transformados: BoxCox com $\lambda = -0,84$.

Tabela 10 - Descrição dos modelos de regressão para altura em plantas de Citrumelo Swingle após tratamento com diferentes isolados de *Trichoderma* spp.

Fungo	Regressão*	b0	b1	b2	b3	R ²
ACB-02	Linear	0.23559800	-0.00072592	—	—	0.9965435
ACB-03	Linear	0.23299451	-0.00074461	—	—	0.9895698
ACB-04	Quadrático	0.21146677	-0.00031281	-0.00000212	—	0.9968645
ACB-05	Linear	0.24745257	-0.00077838	—	—	0.9888751
ACB-14	Linear	0.22375351	-0.00065408	—	—	0.9822088
ACB-32	Quadrático	0.22146494	-0.00023091	-0.00000244	—	0.9888922
ACB-33	Cúbico	0.20232818	0.00069264	-0.00002543	0.00000012	0.8809764
ACB-34	Quadrático	0.20645645	-0.00022535	-0.00000267	—	0.993261
ACB-36	Linear	0.2322642	-0.0007336	—	—	0.9828236
ACB-37	Cúbico	0.20114306	-0.00083185	0.00000761	-0.00000004	0.9986988
ACB-38	Cúbico	0.22723375	-0.00099705	0.00000783	-0.00000004	0.9985902
ACB-40	Quadrático	0.21735062	-0.00038569	-0.00000166	—	0.9927457
ACB-42	Cúbico	0.22911312	-0.00099961	0.00000774	-0.00000004	0.9897159
ACB-43	Quadrático	0.19784810	-0.00015626	-0.00000293	—	0.9854657
ACB-183/5	Quadrático	0.19022493	-0.00004605	-0.00000329	—	0.9876606
ACB-T1	Cúbico	0.23498751	-0.00118458	0.00000831	-0.00000004	0.9913399
ACB-T6	Quadrático	0.21643131	-0.00020209	-0.00000297	—	0.6301603
ACB-T002	Quadrático	0.19731804	-0.00011435	-0.00000310	—	0.9870854
Mistura	Quadrático	0.19773116	-0.00030308	-0.00000202	—	0.9928086
Testemunha	Quadrático	0.2111540	-0.0002455	-0.0000018	—	0.9948314

CV = 6,87%

* Regressão com os dados transformados: BoxCox com $\lambda = -0,84$.

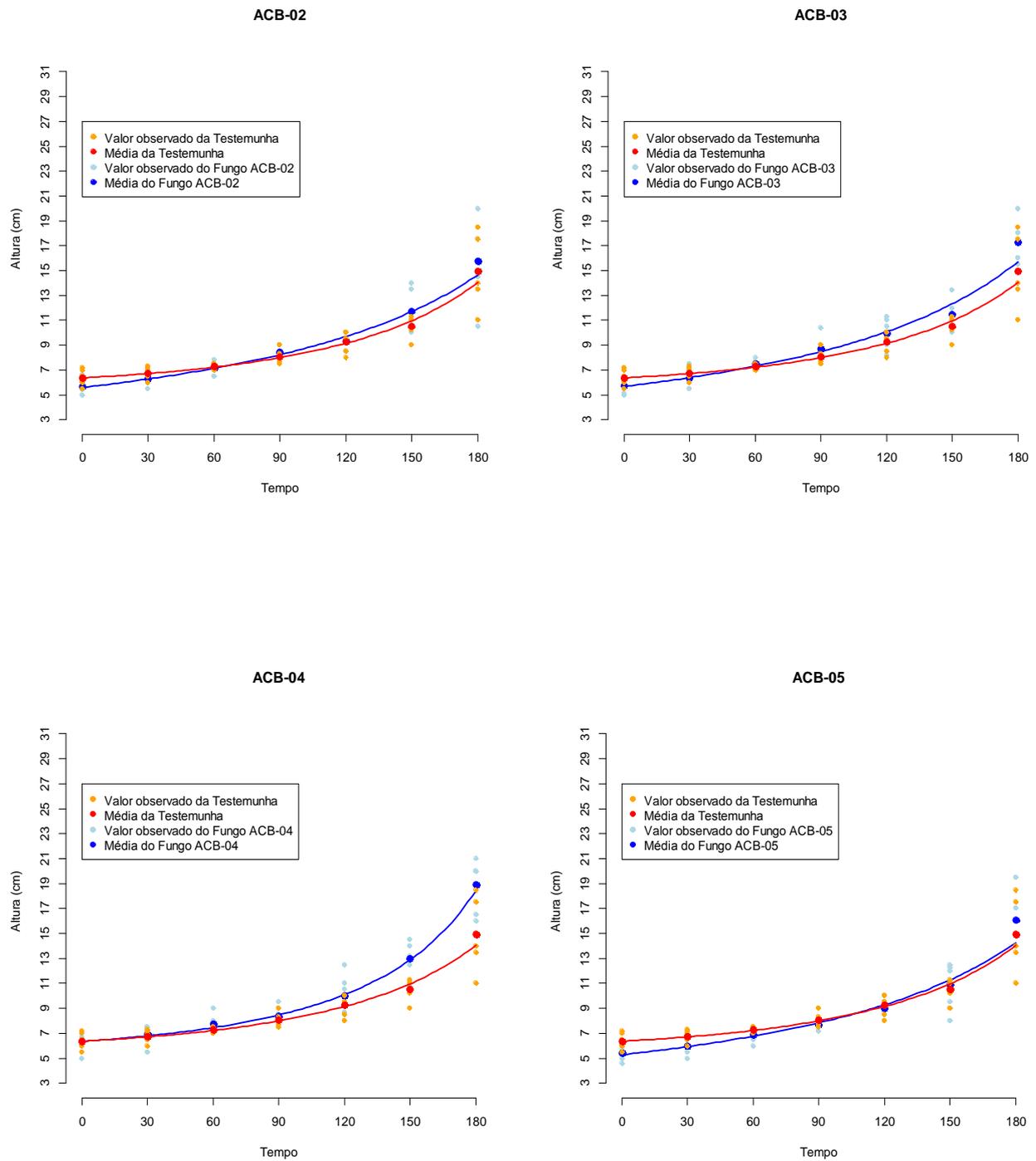


Figura 11 - Estudo da promoção de crescimento modelos de regressão de altura de plantas de Citrumelo Swingle, após tratamento com isolados de *Trichoderma* spp.- ACB-02, ACB-03, ACB-04 e ACB-05.

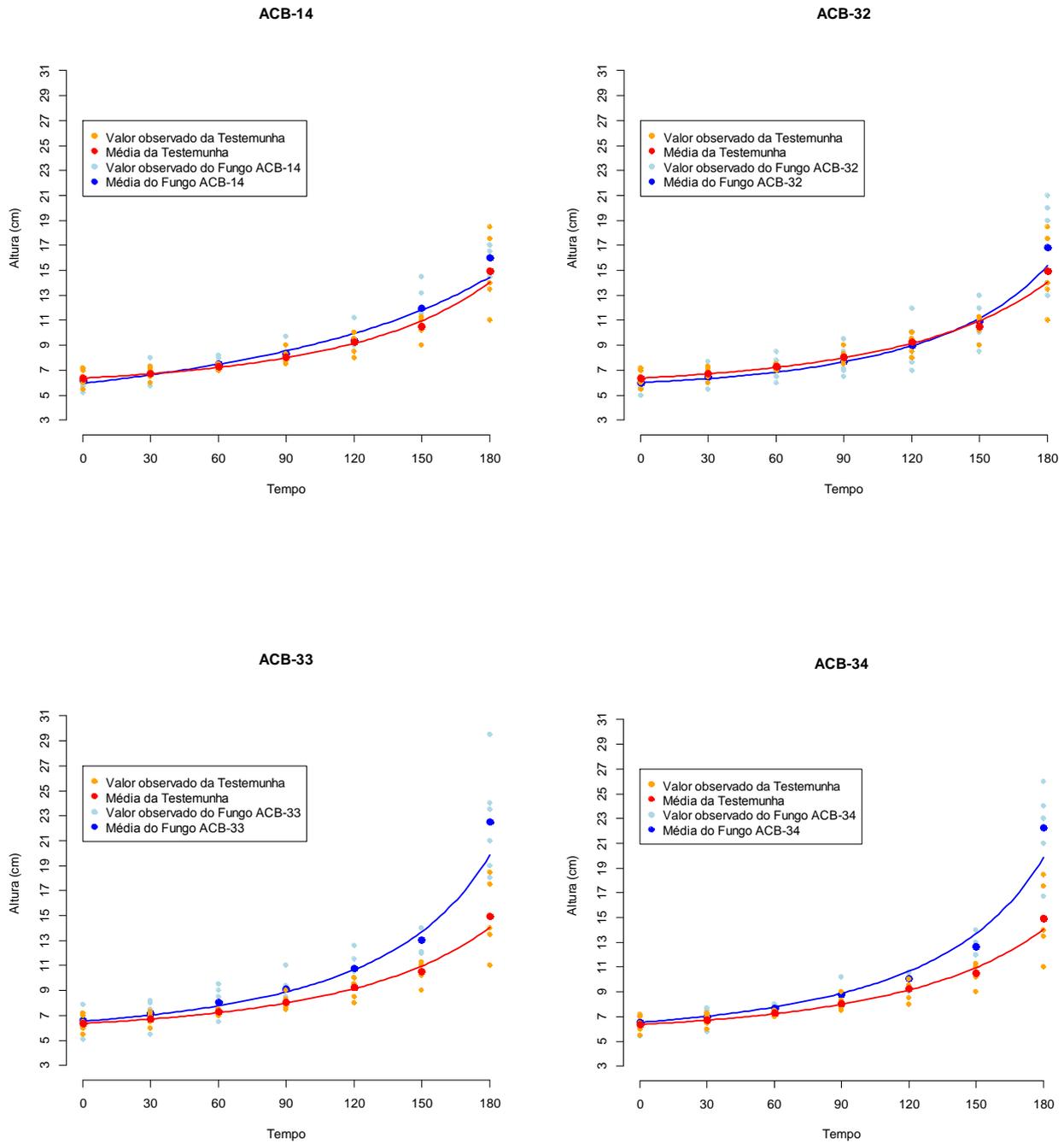


Figura 12 - Estudo da promoção de crescimento: modelos de regressão de altura de plantas de Citrumelo Swingle, após tratamento com isolados de *Trichoderma* spp.- ACB-14, ACB-32, ACB-33 e ACB-34.

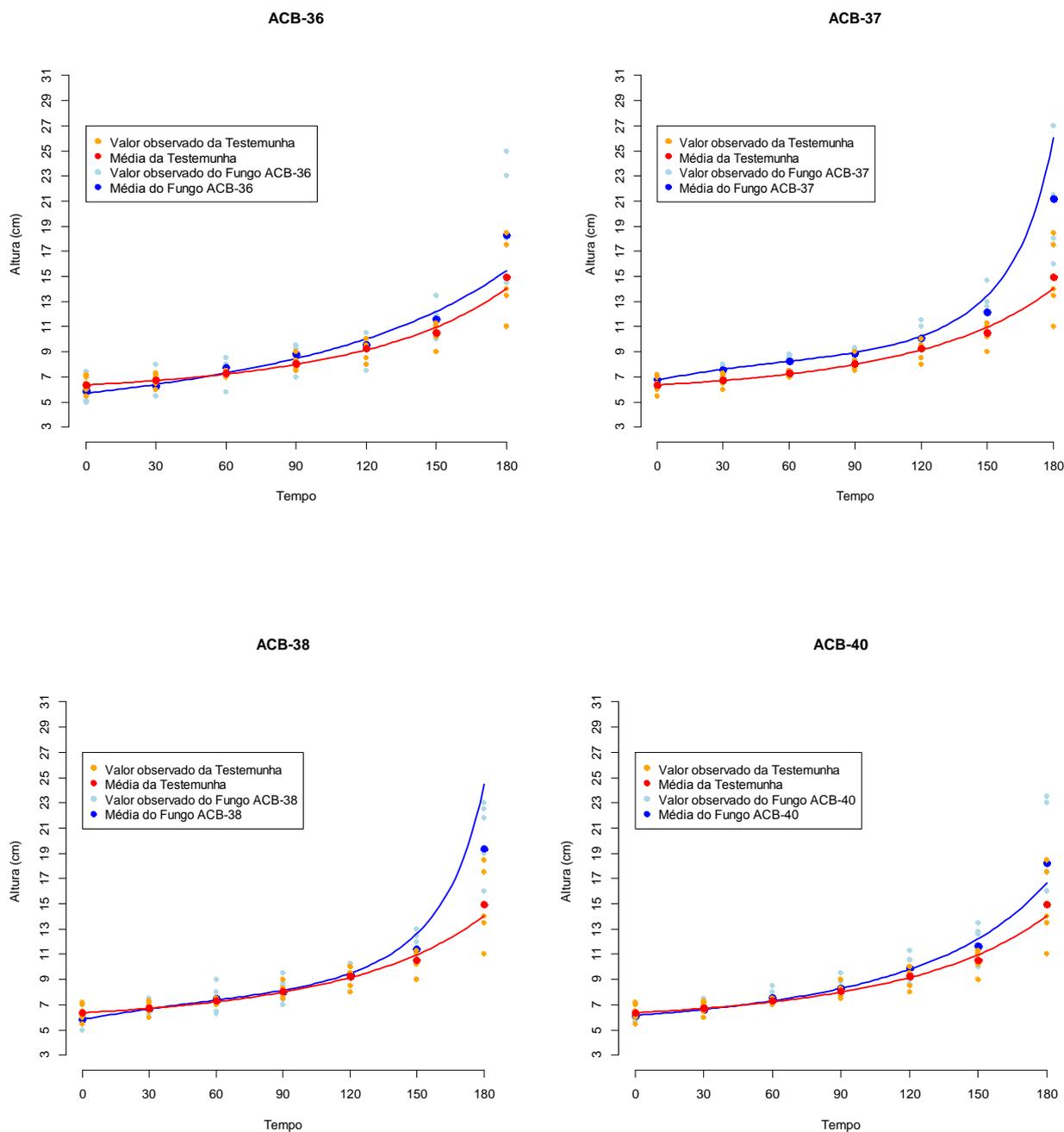


Figura 13 - Estudo da promoção de crescimento: modelos de regressão de altura de plantas de Citrumelo Swingle, após tratamento com isolados de *Trichoderma* spp.- ACB-36, ACB-37, ACB-38 e ACB-40.

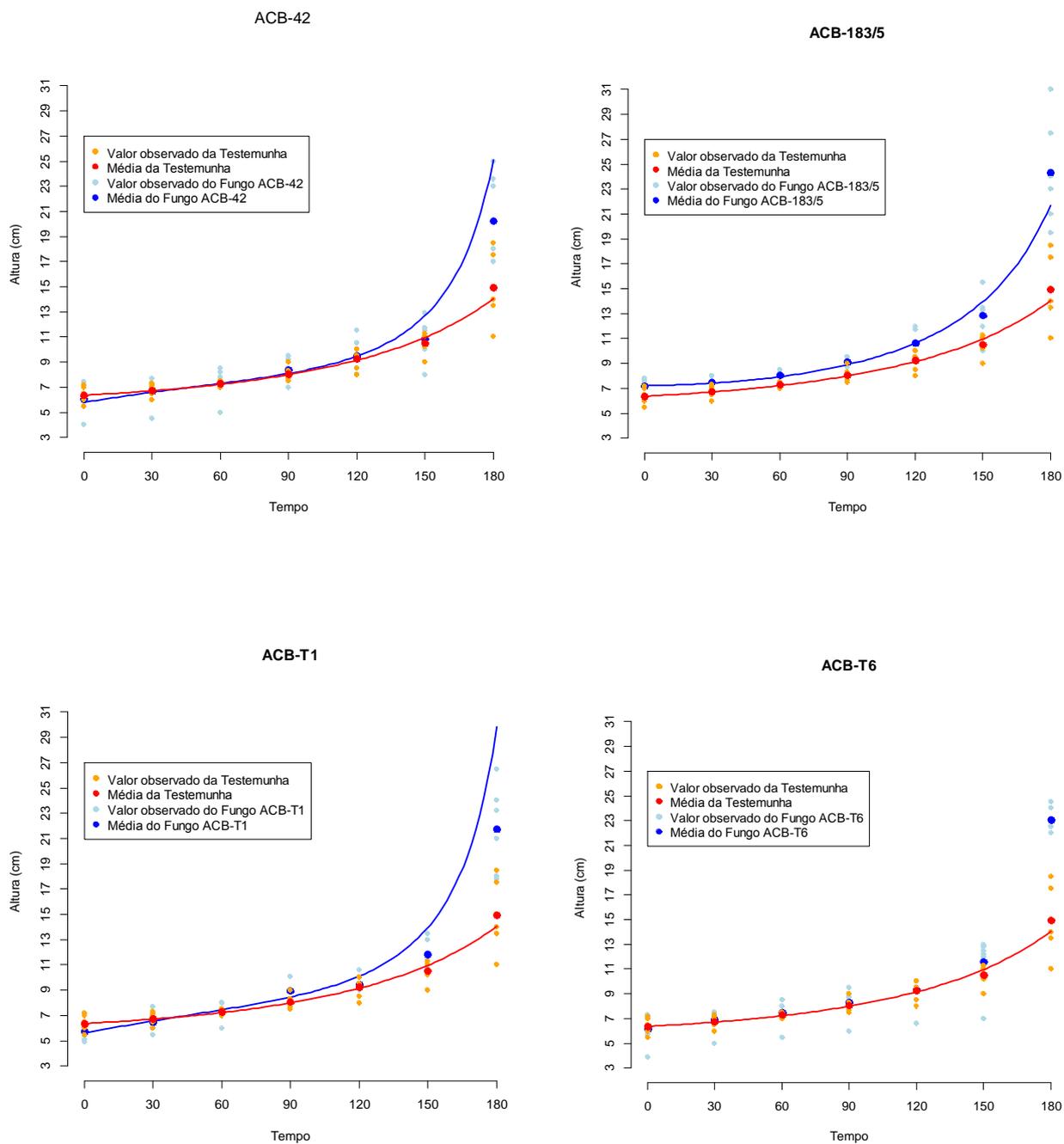


Figura 14 - Estudo da promoção de crescimento: modelos de regressão de altura de plantas de Citrumelo Swingle, após tratamento com isolados de *Trichoderma* spp.- ACB-42, ACB-183/5, ACB-T1 e ACB-T6.

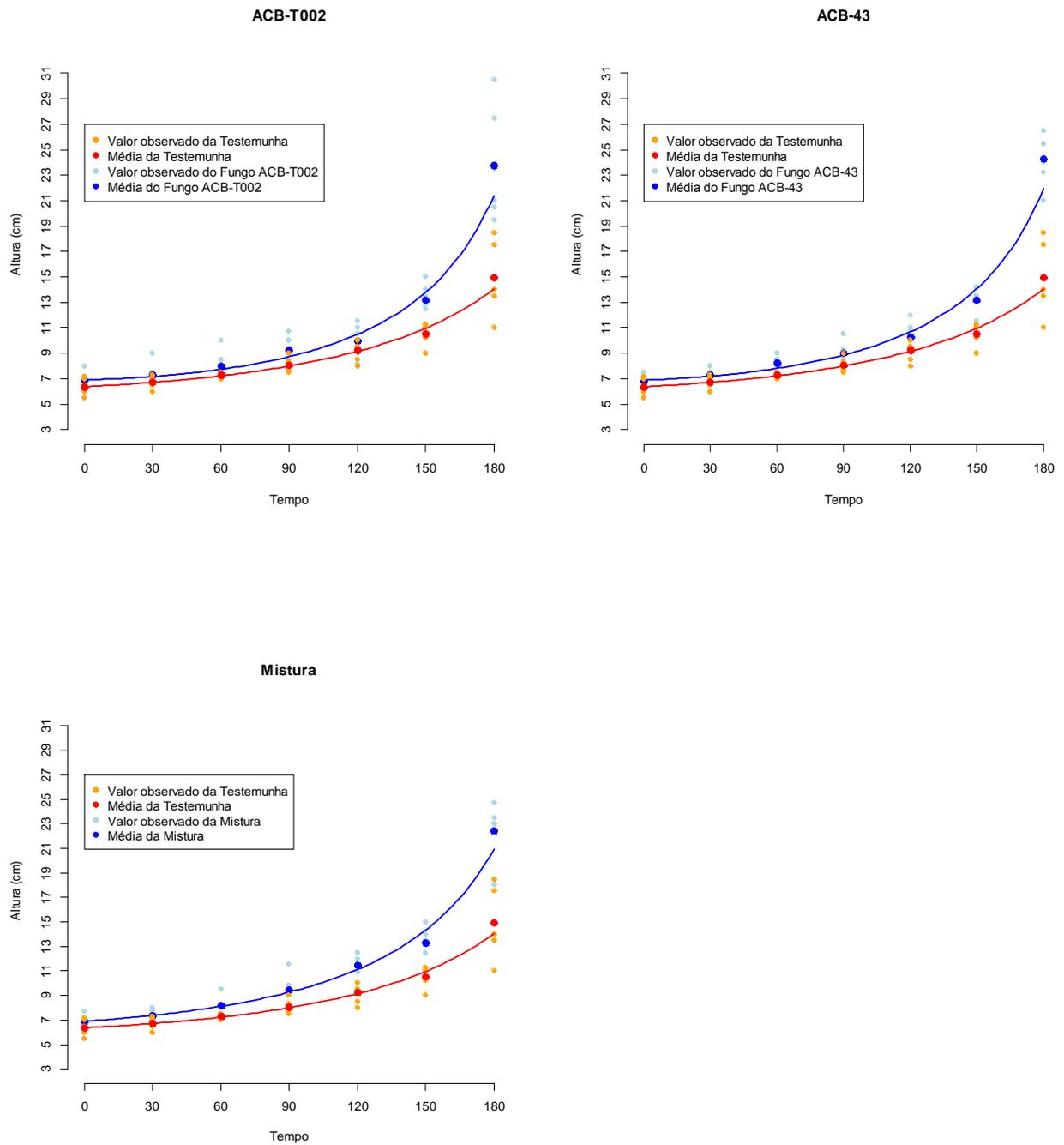


Figura 15 - Estudo da promoção de crescimento modelos de regressão de altura de plantas de Citrumelo Swingle, após tratamento com isolados de *Trichoderma* spp.- ACB-T002, ACB-43 e Mistura.

Tabela 11 - Influência dos isolados de *Trichoderma* spp. no número de folhas de Citrumelo Swingle, após 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias do tratamento.

Tratamentos	Tempo 30	Tempo 60	Tempo 90	Tempo 120	Tempo 150	Tempo 180
N° Folhas						
Testemunha	6,83 a	6,83 a	7,50 a	9,00 a	10,00 bc	14,33 gh
ACB-02	5,50 a	6,50 a	7,33 a	8,17 a	10,67 abc	14,67 fgh
ACB-03	6,33 a	6,83 a	7,50 a	8,17 a	10,50 abc	16,67 def
ACB-04	6,50 a	7,33 a	8,00 a	9,00 a	11,67 abc	16,50 def
ACB-05	6,67 a	6,83 a	7,67 a	8,50 a	11,00 abc	14,83 efgh
ACB-14	6,50 a	7,33 a	8,33 a	9,17 a	11,67 abc	15,67 efgh
ACB-32	6,17 a	6,50 a	7,00 a	8,00 a	9,83 c	14,00 h
ACB-33	7,00 a	7,50 a	8,17 a	9,50 a	12,00 abc	18,33 cd
ACB-34	6,67 a	6,83 a	8,00 a	8,83 a	12,17 ab	19,00 bc
ACB-36	6,80 a	6,80 a	7,40 a	9,20 a	11,4 abc	16,20 efg
ACB-37	6,83 a	6,83 a	7,67 a	8,83 a	11,00 abc	16,83 de
ACB-38	7,17 a	7,50 a	7,67 a	8,67 a	11,5 abc	16,67 def
ACB-40	6,83 a	7,00 a	8,00 a	9,33 a	10,00 bc	16,17 efg
ACB-42	5,5 a	6,83 a	7,50 a	8,83 a	10,67 abc	20,67 ab
ACB-43	6,83 a	7,33 a	8,00 a	8,33 a	11,67 abc	18,50 cd
ACB-183/5	6,83 a	7,33 a	8,00 a	9,17 a	10,50 abc	21,17 a
ACB-T1	6,17 a	6,67 a	7,83 a	8,33 a	10,67 abc	19,33 abc
ACB-T6	8,00 a	8,40 a	8,00 a	9,00 a	11,60 abc	20,00 abc
ACB-T002	7,83 a	8,00 a	8,83 a	9,67 a	12,67 a	19,83 abc
Mistura	7,50 a	7,83 a	8,50 a	10,00 a	12,50 a	19,17 abc

CV = 27,50%

¹ Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade

Tabela 12 - Descrição dos modelos de regressão para folhas em plantas de Citrumelo Swingle. após tratamento com diferentes isolados de *Trichoderma* spp

Tratamentos	Regressão	b0	b1	b2	b3	R ²
ACB-02	Linear	2.88888889	0.05634921	—	—	0.883033
ACB-03	Quadrática	8.83333333	-0.08551587	0.00069444	—	0.9570478
ACB-04	Quadrática	8.10000000	-0.05571429	0.00055556	—	0.9801422
ACB-05	Quadrática	8.00000000	-0.05257937	0.00049603	—	0.9906806
ACB-14	Linear	3.81111111	0.0568254	—	—	0.8856406
ACB-32	Linear	3.56666667	0.04777778	—	—	0.8184003
ACB-33	Quadrática	9.35000000	-0.08398810	0.00072421	—	0.9740135
ACB-34	Quadrática	9.40000000	-0.10023810	0.00083333	—	0.9750732
ACB-36	Linear	3.37333333	0.05961905	—	—	0.829695
ACB-37	Linear	3.30000000	0.06063492	—	—	0.783695
ACB-38	Quadrática	9.61666667	-0.08751984	0.00069114	—	0.9802487
ACB-40	Quadrática	8.63333333	-0.06515873	0.00056878	—	0.9317338
ACB-42	Quadrática	9.13333333	-0.11555556	0.00095238	—	0.9186685
ACB- 43	Quadrática	10.00000000	-0.10813492	0.00083995	—	0.9578974
ACB-183/5	Quadrática	11.18333333	-0.14450397	0.00106151	—	0.9011295
ACB-T1	Quadrática	9.58333333	-0.11498016	0.00090278	—	0.9307008
ACB-T6	Linear	3.64772727	0.06704545	—	—	0.7253695
ACB-T002	Quadrática	10.93333333	-0.1106746	0.0008664	—	0.9671373
Mistura	Quadrática	10.03333333	-0.09218254	0.00077381	—	0.9751416
Testemunha	Linear	4.23333333	0.04619048	—	—	0.8187672

CV = 12,46%

Tabela 13 - Influência dos isolados de *Trichoderma* spp. na massa de matéria seca de Citrumelo Swingle.

Tratamentos	Parte aérea (g)	Raíz (g)	Total (g)
Testemunha	0,64 h	0,39 c	1,03 d
ACB-02	1,15 fgh	0,73 bc	1,88 d
ACB-03	0,94 gh	0,46 c	1,39 d
ACB-04	1,08 fgh	0,43 c	1,51 d
ACB-05	1,18 fgh	0,37 c	1,55 d
ACB-14	1,17 fgh	0,43 c	1,60 d
ACB-32	1,39 efgh	0,39 c	1,78 d
ACB-33	2,78 cdef	1,35 abc	4,13 bc
ACB-34	4,44 abc	2,18 a	6,62 ab
ACB-36	2,93 bcde	1,58 ab	4,51 bc
ACB-37	3,07 bcde	1,76 a	4,83 abc
ACB-38	2,70 cdefg	1,78 a	4,48 bc
ACB-40	2,18 defgh	1,27 abc	3,45 cd
ACB-42	4,99 a	2,08 a	7,07 a
ACB-43	4,90 a	1,46 ab	6,36 ab
ACB-183/5	4,70 ab	1,89 a	6,59 ab
ACB-T1	3,77 abcd	0,69 bc	4,46 bc
ACB-T6	3,93 abcd	1,29 abc	5,22 abc
ACB-T002	4,61 ab	1,70 ab	6,31 ab
Mistura	4,13 abc	1,88 a	6,01 ab

¹ Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade

Para o porta-enxerto limão Cravo, os dados apresentados na Tabela 14, também mostraram que existem diferenças entre os tratamentos em função do tempo de avaliação. Quando se analisaram os dados referentes ao último dia de avaliação (180 dias), verificou-se que os isolados ACB-03, ACB-04 e ACB-05 foram os que proporcionaram maior comprimento das plantas de limão Cravo, quando comparado com as plantas do tratamento testemunha. Com relação ao parâmetro referente ao número de folhas (Tabela 16), somente foi possível verificar diferenças entre os tratamentos no último tempo de avaliação (180 dias). Neste período, os isolados ACB-02, ACB-03, ACB-04, ACB-14, ACB-33 e ACB-34 foram os que promoveram maior número de folhas. Para essa variedade, quando se avaliou a massa seca da parte aérea, observou-se diferença significativa entre os tratamentos ACB-05, ACB-37, ACB-43 e a mistura em relação aos tratamentos testemunhas. Com exceção do ACB-37, os mesmos tratamentos citados acima, com adição do ACB-03 e ACB-04, favoreceram o aumento de massa seca de raiz. Com relação à massa de matéria seca total da planta, todos os isolados mencionados, tanto para a massa da parte aérea quanto para a de raiz, com adição do ACB-34, diferiram estatisticamente da testemunha (Tabela 18).

O desdobramento dos tempos dentro de cada fungo, representado pelas análises de regressão, está descrito para cada tratamento na Tabela 15 e 17 para o parâmetro altura e número de folhas, respectivamente. Os gráficos dos valores observados em cada tempo analisado junto com o modelo de regressão obtido para cada fungo estão apresentados nas Figuras 16, 17, 18, 19 e 20 para o parâmetro altura.

Tabela 14 - Influência dos isolados de *Trichoderma* spp. na altura de Limão Cravo, após 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias do tratamento.

Tratamentos	Tempo 30	Tempo 60	Tempo 90	Tempo 120	Tempo 150	Tempo 180
	Altura (cm)					
ACB-02	5,56a ¹	6,48a ¹	8,03a ¹	10,06abcd	12,48abc	17,78cde
ACB-03	6,61bcde	7,98cd	9,35abcd	11,16bcde	13,91bc	20,51e
ACB-04	6,35abcd	7,38abcd	9,16abcd	10,43abcde	13,68abc	20,21e
ACB-05	6,71bcde	8,20cd	10,16d	12,23e	14,80c	20,76e
ACB-14	6,98cde	7,85cd	9,76bcd	11,58de	12,91abc	17,03bcde
ACB-32	6,46bcde	7,50abcd	8,80abcd	10,38abcde	11,90ab	14,02ab
ACB-33	6,60bcde	7,14abcd	9,48abcd	11,12bcde	12,30abc	15,10abcd
ACB-34	7,58e	7,98cd	9,44abcd	11,30cde	14,80c	18,10de
ACB-36	7,46de	8,08cd	10,0cd	11,18bcde	13,01abc	15,00abcd
ACB-37	7,26cde	7,66bcd	8,52abc	10,36abcde	12,54abc	17,82cde
ACB-38	6,98cde	8,30d	9,25abcd	10,38abcde	12,2ab	14,60abc
ACB-40	7,06cde	7,65bcd	8,58abc	10,25abcd	12,91abc	17,13bcde
ACB-42	6,58bcde	7,50abcd	9,46abcd	11,08bcde	12,50abc	14,12ab
ACB-43	5,85ab	6,68ab	8,20a	9,55abc	11,66ab	17,21bcde
ACB-T1	6,50bcde	7,00abc	8,03a	8,91a ¹	11,75ab	13,66a ¹
ACB-T6	6,84cde	7,52abcd	9,76bcd	10,9bcde	12,00ab	15,18abcd
ACB-T002	6,52bcde	7,04abc	8,40ab	9,46ab	11,42a ¹	14,62abc
ACB-183/5	6,53bcde	7,21abcd	8,48abc	9,85abcd	12,13ab	13,96 ^a
Mistura	6,48bcde	7,36abcd	9,16abcd	9,91abcd	11,66ab	15,58abcd
Testemunha	6,26abc	6,96abc	8,78abcd	10,43abcde	11,75ab	15,68abcd
	CV = 6,64 %					

¹ Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade

* Dados transformados: BoxCox com $\lambda = -0,28$.

Tabela 15 - Descrição dos modelos de regressão para altura das plantas de Limão Cravo após tratamento com diferentes isolados de *Trichoderma* spp.

Fungo	Regressão	b ₀	b ₁	b ₂	b ₃	R ²
ACB-02	Linear	0.65216135	-0.00107793	—	—	0.9914347
ACB-03	Linear	0.62144397	-0.00099753	—	—	0.9892106
ACB-04	Cúbico	0.62608214	-0.00114613	0.00000477	-0.00000002	0.9980187
ACB-05	Linear	0.62054273	-0.00104363	—	—	0.9967809
ACB-14	Linear	0.61097858	-0.00086613	—	—	0.9930153
ACB-32	Linear	0.62443660	-0.00084201	—	—	0.9875049
ACB-33	Linear	0.61989869	-0.00085696	—	—	0.9867294
ACB-34	Linear	0.60650393	-0.00087633	—	—	0.9838071
ACB-36	Linear	0.59752943	-0.00073093	—	—	0.992193
ACB-37	Cúbico	0.61419282	-0.00128808	0.00000944	-0.00000004	0.9934159
ACB-38	Linear	0.60974370	-0.00076708	—	—	0.9796812
ACB-40	Quadrático	0.60494661	-0.00047339	-0.00000197	—	0.9932814
ACB-42	Linear	0.61646726	-0.00082339	—	—	0.9857913
ACB-183/5	Linear	0.62268806	-0.00080229	—	—	0.9949693
ACB-T1	Linear	0.62824852	-0.00080033	—	—	0.9803492
ACB-T6	Linear	0.61377210	-0.00081686	—	—	0.98198
ACB-T002	Linear	0.62588793	-0.00081641	—	—	0.9888029
ACB-43	Quadrático	0.62813675	-0.00051609	-0.00000239	—	0.9958209
Mistura	Linear	0.6191471	-0.0008029	—	—	0.9919288
Testemunha	Linear	0.62953646	-0.00089079	—	—	0.9925153

CV = 2,44%

Dados transformados: BoxCox com $\lambda = -0,28$.

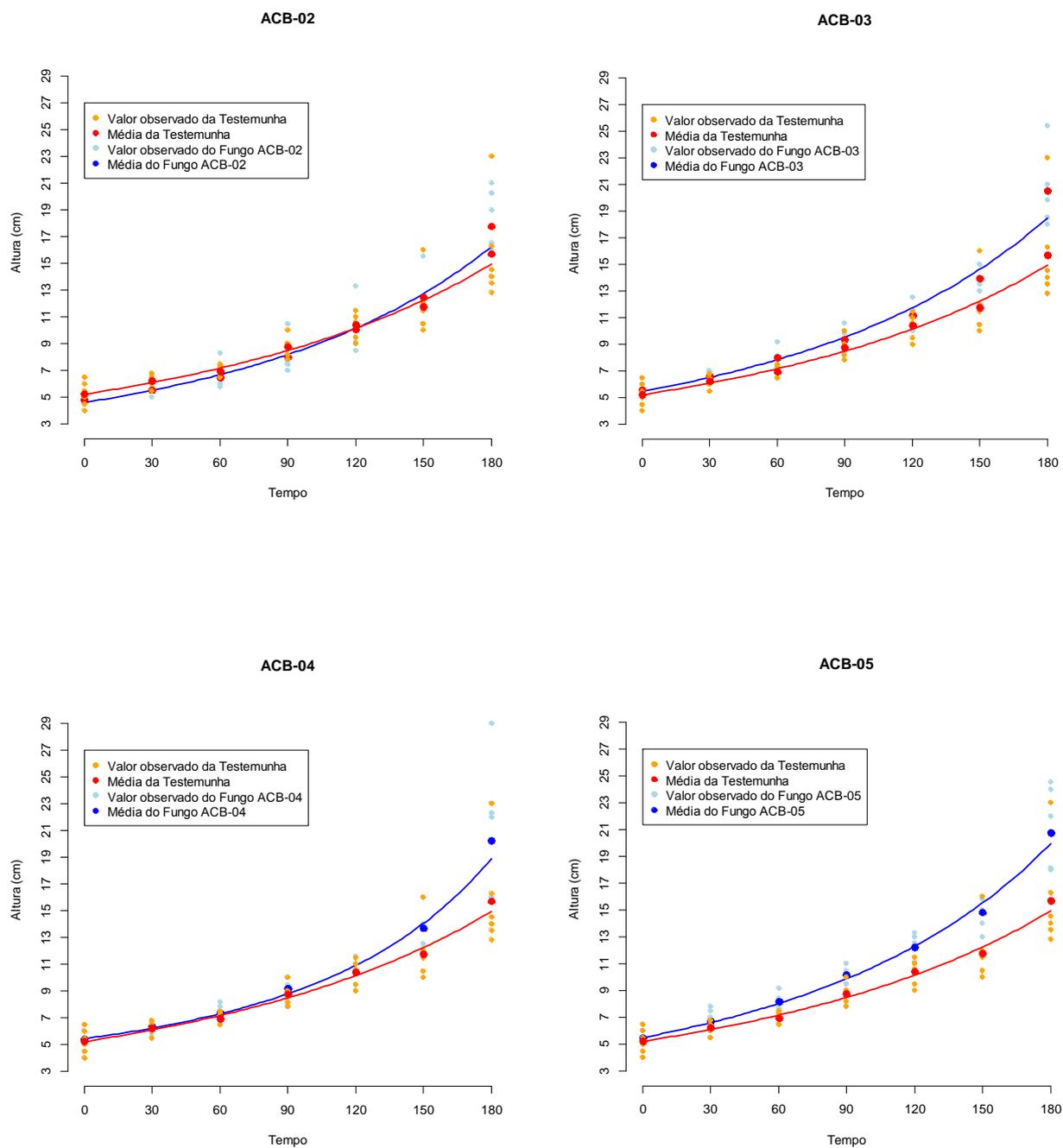


Figura 16 - Estudo da promoção de crescimento: modelos de regressão de altura de plantas de Limão Cravo, após tratamento com isolados de *Trichoderma* spp.- ACB-02, ACB-03, ACB-04 e ACB-05.

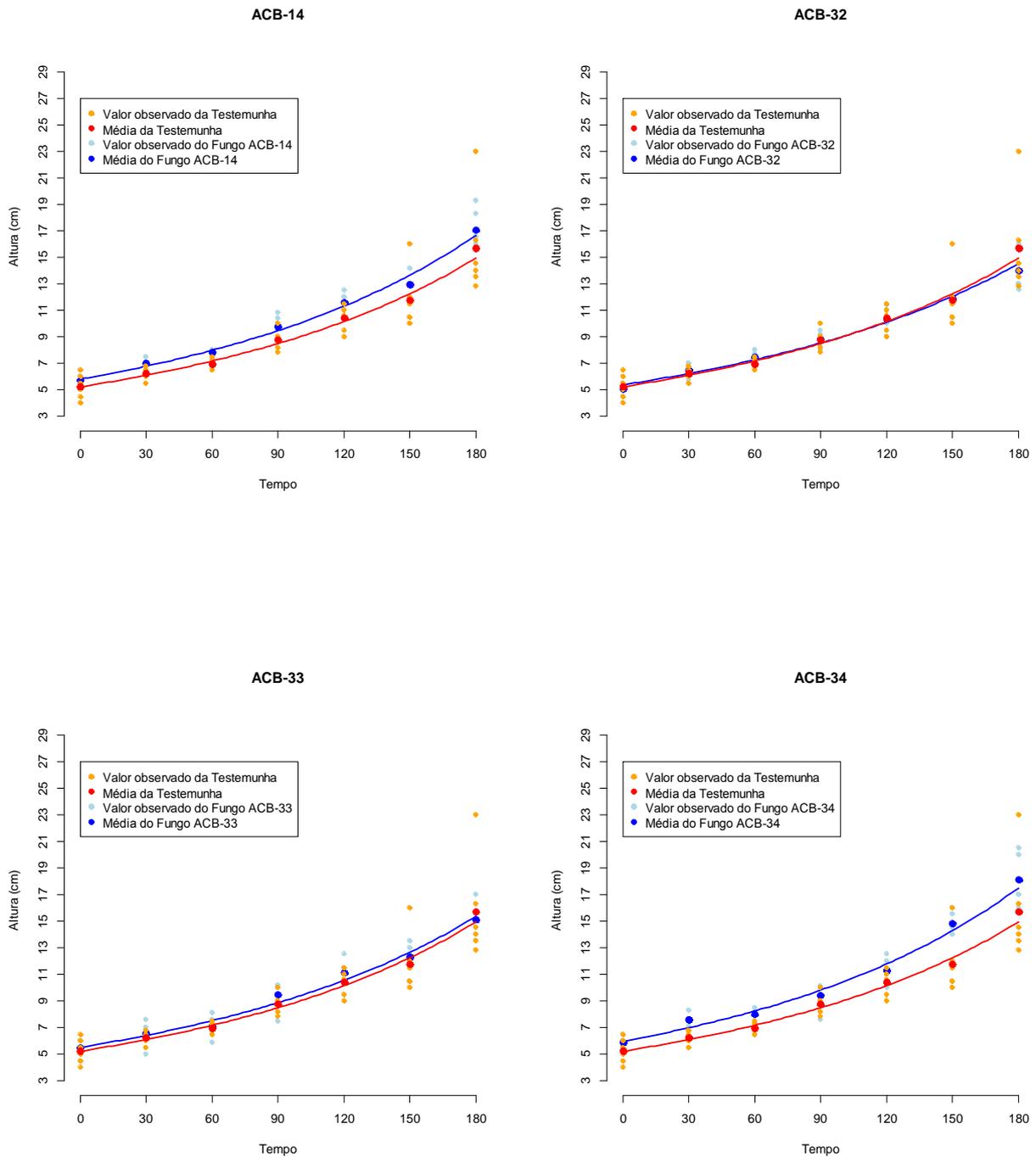


Figura 17 - Estudo da promoção de crescimento: modelos de regressão de altura de plantas de Limão Cravo, após tratamento com isolados de *Trichoderma* spp.- ACB-14, ACB-32, ACB-33 e ACB-34.

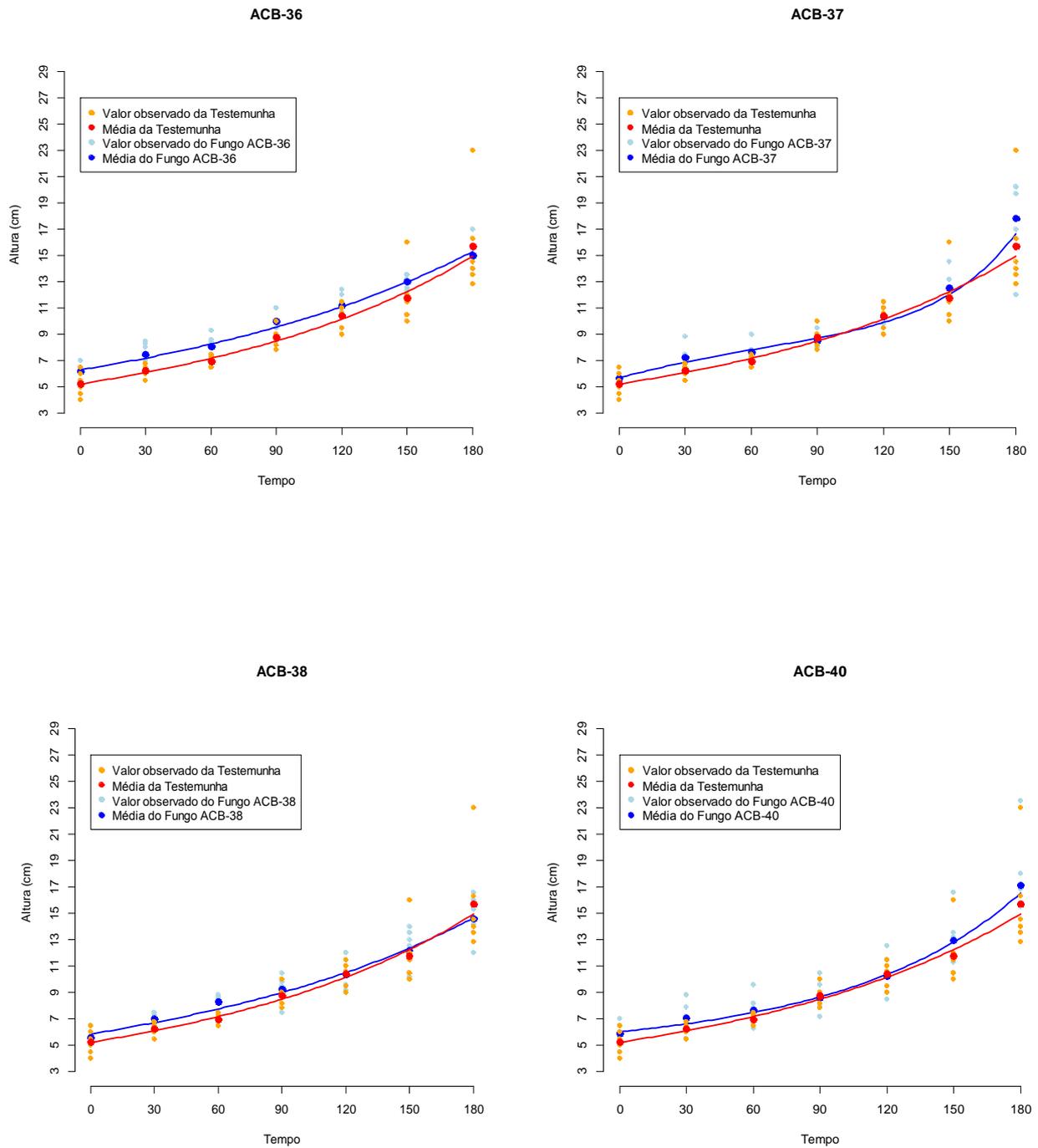


Figura 18 - Estudo da promoção de crescimento modelos de regressão de altura de plantas de Limão Cravo, após tratamento com isolados de *Trichoderma* spp.- ACB-36, ACB-37, ACB-38 e ACB-40.

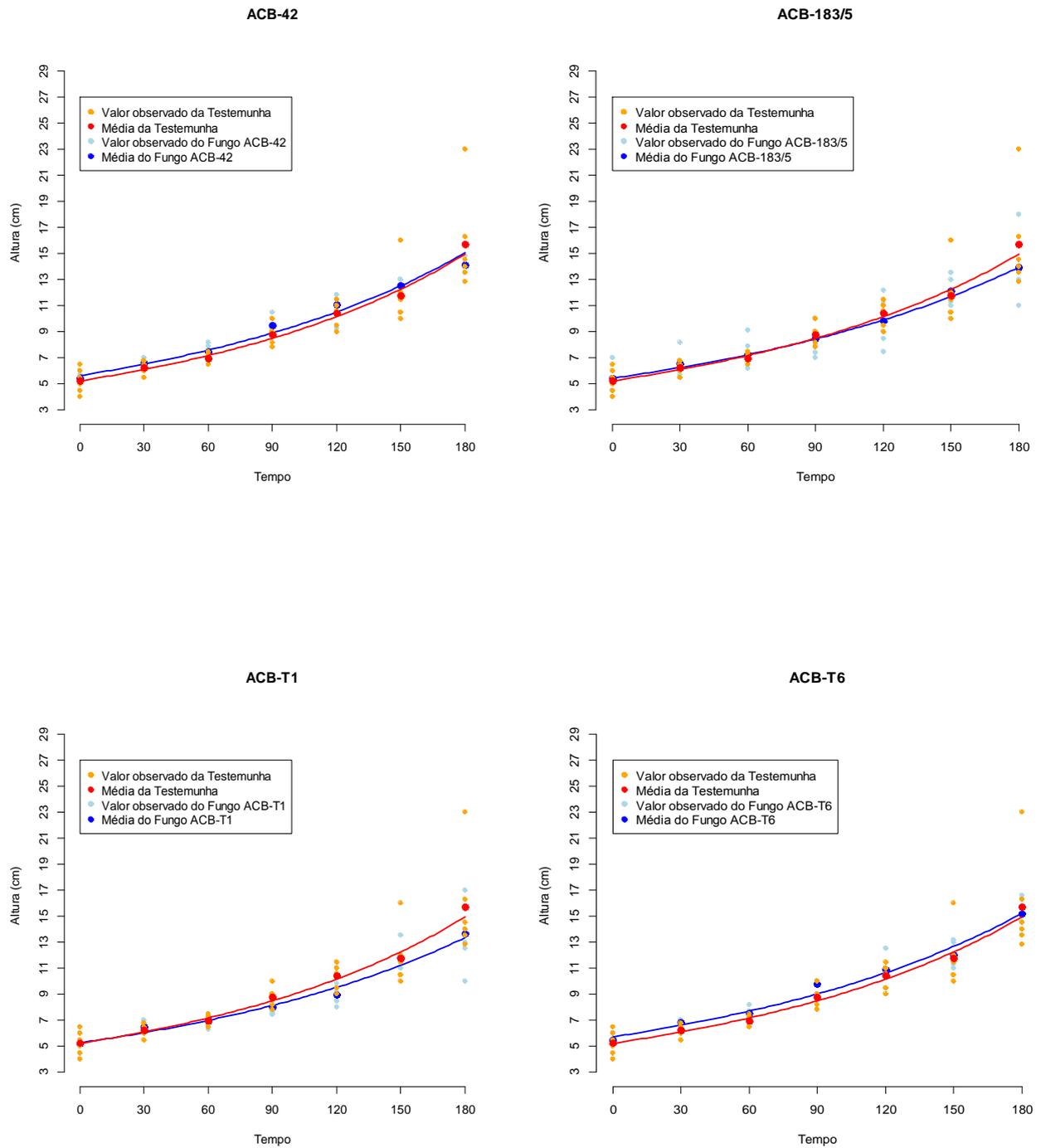


Figura 19 - Estudo da promoção de crescimento: modelos de regressão de altura de plantas de Limão Cravo, após tratamento com isolados de *Trichoderma* spp.- ACB-42, ACB-183/5, ACB-T1 e ACB-T6.

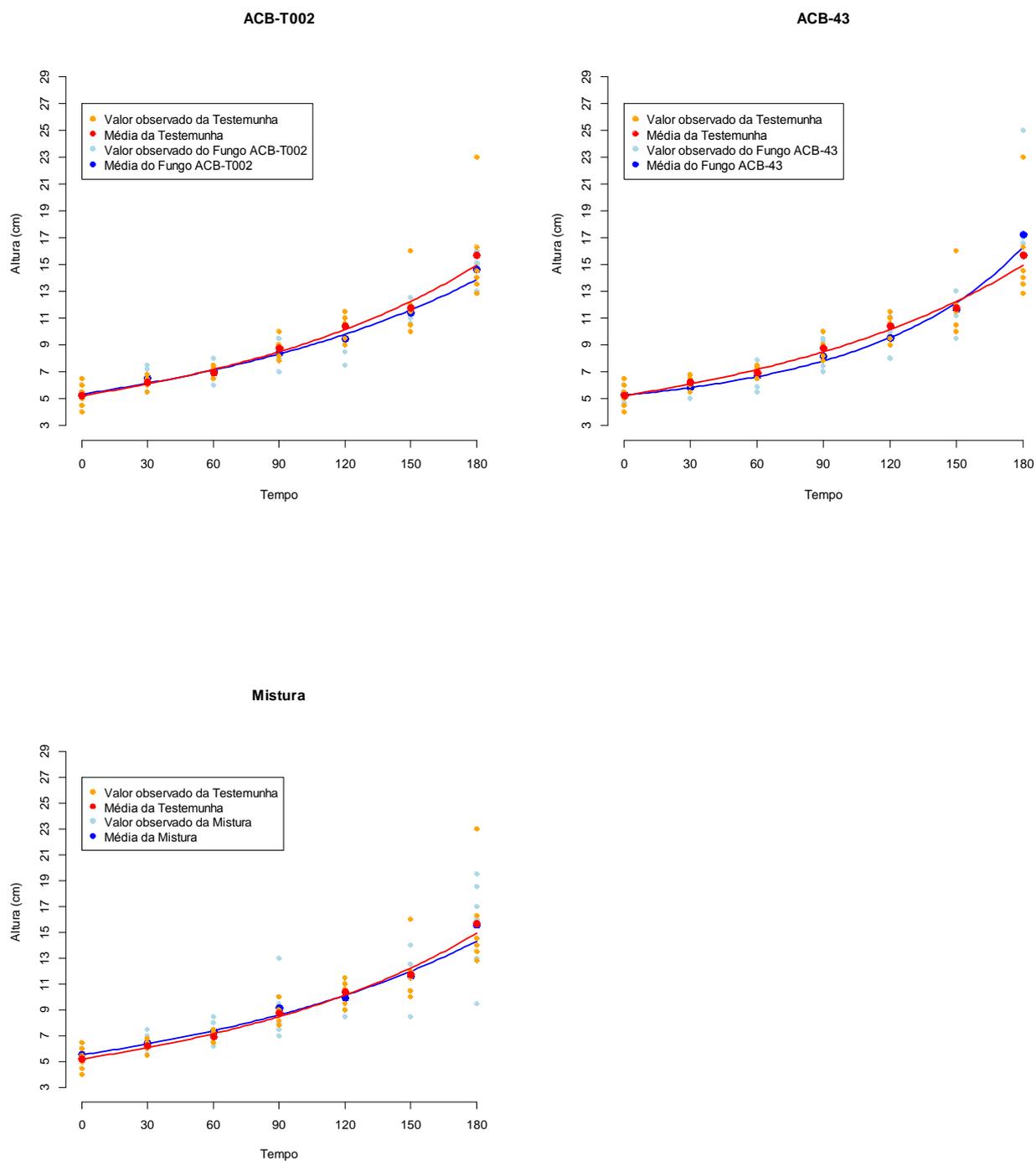


Figura 20 - Estudo da promoção de crescimento: modelos de regressão de altura de plantas de Limão Cravo, após tratamento com isolados de *Trichoderma* spp.- ACB-T002, ACB-43 e Mistura.

Tabela 16 - Influência dos isolados de *Trichoderma* spp. no número de folhas de Limão Cravo, após 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias do tratamento.

Tratamentos	Tempo 30	Tempo 60	Tempo 90	Tempo 120	Tempo 150	Tempo 180
Testemunha	4,83 a	5,83 a	7,17 a	8,33 a	9,17 abc	13,00 de
ACB-02	4,50 a	6,00 a	7,17 a	8,50 a	10,33 abc	15,67 bc
ACB-03	5,67 a	7,17 a	8,17 a	9,17 a	11,17 a	18,00 a
ACB-04	5,00 a	6,00 a	6,83 a	8,33 a	9,83 abc	15,50 bc
ACB-05	5,17 a	7,33 a	8,17 a	9,67 a	10,83 ab	14,83 cd
ACB-14	5,50 a	6,67 a	8,17 a	8,83 a	10,00 abc	16,17 abc
ACB-32	5,20 a	6,20 a	7,20 a	8,00 a	8,40 c	14,60 cd
ACB-33	5,00 a	6,40 a	7,60 a	8,60 a	9,20 abc	15,60 bc
ACB-34	5,60 a	6,00 a	7,40 a	9,00 a	10,6 abc	17,40 ab
ACB-36	5,83 a	6,67 a	7,50 a	8,33 a	8,67 bc	14,67 cd
ACB-37	5,60 a	6,20 a	7,20 a	8,20 a	9,60 abc	14,20 cde
ACB-38	5,83 a	7,17 a	7,67 a	8,50 a	9,00 abc	12,17 e
ACB-40	4,83 a	6,00 a	6,83 a	8,00 a	8,83 abc	14,00 cde
ACB-42	5,60 a	6,60 a	7,60 a	8,40 a	8,40 c	12,80 de
ACB-43	5,50 a	6,00 a	7,17 a	8,33 a	9,17 abc	14,83 cd
ACB-183/5	5,83 a	6,17 a	7,50 a	7,67 a	8,50 bc	12,67 de
ACB-T1	6,00 a	6,50 a	6,83 a	7,50 a	8,33 c	12,83 de
ACB-T6	5,80 a	6,60 a	8,20 a	8,20 a	9,60 abc	13,80 cde
ACB-T002	4,80 a	6,00 a	7,20 a	7,60 a	8,40 c	14,20 cde
Mistura	5,33 a	6,17 a	7,00 a	7,83 a	8,50 bc	12,50 de

CV = 29,62%

¹ Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade

Tabela 17 - Descrição dos modelos de regressão para folhas em plantas de Limão Cravo após tratamento com diferentes isolados de *Trichoderma* spp.

Tratamentos	Regressão	b0	b1	b2	b3	R ²
ACB-02	Linear	1.6777778	0.0668254	—	—	0.895707
ACB-03	Quadrática	7.53333333	-0.05666667	0.00060847	—	0.9447942
ACB-04	Quadrática	6.36666667	-0.04595238	0.00051587	—	0.9624556
ACB-05	Linear	3.30000000	0.05746032	—	—	0.9397877
ACB-14	Linear	2.82222222	0.06095238	—	—	0.8302079
ACB-32	Cúbica	0.13333427	0.23134035	-0.00259965	0.00000974	0.9704545
ACB-33	Quadrática	6.26000000	-0.03473810	0.00044841	—	0.9067244
ACB-34	Quadrática	7.36000000	-0.06580952	0.00065079	—	0.9613999
ACB-36	Cúbica	1.22222133	0.21180191	-0.00242578	0.00000920	0.9684337
ACB-37	Linear	3.08000000	0.05161905	—	—	0.8533202
ACB-38	Linear	4.58888889	0.03619048	—	—	0.8890206
ACB-40	Quadrática	5.86666667	-0.03047619	0.00039683	—	0.9370468
ACB-42	Cúbica	1.46666731	0.18365959	-0.00192416	0.00000693	0.9613769
ACB 43	Quadrática	6.85000000	-0.04748016	0.00048611	—	0.9391342
ACB183/5	Quadrática	6.78333333	-0.03216270	0.00034061	—	0.9174615
ACB-T1	Quadrática	7.63333333	-0.05325397	0.00043651	—	0.9255826
ACB-T6	Linear	3.80000000	0.04666667	—	—	0.8545092
ACB-T002	Cúbica	-0.53333235	0.24265429	-0.00266490	0.00000981	0.9804374
Mistura	Linear	3.5222222	0.0415873	—	—	0.8532151
Testemunha	Linear	2.85555556	0.04952381	—	—	0.9225753

CV = 16,87%

Tabela 18 - Influência dos isolados de *Trichoderma* spp. na massa de matéria seca de Limão Cravo.

Tratamentos	Parte aérea (g)	Raíz (g)	Total (g)
Testemunha	0,31 e	0,31 d	0,62 e
ACB-02	0,61 cde	0,70 bcd	1,31 cde
ACB-03	1,14 abcde	1,44 abc	2,59 abc
ACB-04	0,64 bcde	1,51 abc	2,15 bcde
ACB-05	1,58 abc	1,69 ab	3,27 ab
ACB-14	1,19 abcde	0,83 bcd	2,02 bcde
ACB-32	1,30 abcde	0,52 cd	1,82 bcde
ACB-33	1,22 abcde	0,55 cd	1,76 bcde
ACB-34	1,32 abcde	1,10 bcd	2,42 abcd
ACB-36	0,60 cde	0,57 cd	1,17 cde
ACB-37	1,33 abcd	1,14 bcd	2,47 abcd
ACB-38	0,39 de	0,32 d	0,71 de
ACB-40	0,74 abcde	0,63 cd	1,37 cde
ACB-42	0,48 de	0,51 cd	0,99 cde
ACB-43	1,69 a	2,25 a	3,93 a
ACB-183/5	1,31 abcde	0,78 bcd	2,09 bcde
ACB-T1	0,87 abcde	0,50 cd	1,37 cde
ACB-T6	0,97 abcde	1,00 bcd	1,97 bcde
ACB-T002	0,88 abcde	0,65 cd	1,53 cde
Mistura	1,64 ab	2,21 a	3,85 a

¹ Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade

4.5 Indução de resistência à gomose de *Phytophthora nicotianae* em porta-enxertos de citros

Pelos resultados, foi possível verificar que não houve diferença entre os tratamentos quanto à indução de resistência contra *P. nicotianae* em plantas de limão Cravo, avaliados pelo tamanho de lesão sob a casca (interna), aos 180 dias após o tratamento (Tabela 20). Por sua vez, nas plantas de tangerina Sunki, verificou-se que a testemunha diferiu significativamente dos tratamentos ACB-04, ACB-33, ACB-34, ACB-40 e ACB-T6. Em relação ao porta-enxerto citrumelo Swingle, apesar de resistente ao patógeno em relação aos outros dois porta-enxertos, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as testemunhas em relação aos tratamentos ACB-03, ACB-14, ACB-36, ACB-37, ACB-42, ACB-T6 e a Mistura dos isolados. Esses resultados indicam que houve indução de resistência sistêmica contra *P. nicotianae*, em relação ao tamanho de lesões sob a casca - internas.

Os dados apresentados na Tabela 22 indicam os resultados obtidos pelo tamanho de lesão sobre a casca (externa) para os três porta-enxertos estudados. Observou-se que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos em plantas de limão Cravo e citrumelo Swingle. Porém, em plantas de tangerina Sunki verificou-se que as plantas testemunhas diferiram significativamente das plantas tratadas com os isolados de *Trichoderma* spp: ACB-04, ACB-33 e ACB-40 quanto ao comprimento de lesão externa. Isso demonstra que estes isolados foram capazes de induzir a resistência sistêmica nas plantas, pela microbiolização das sementes.

A lesão externa, sobre a casca, observada no sítio de inoculação, caracterizava-se por apresentar crescimento arredondado e coloração parda, meio encharcada; ao retirar a casca para avaliar a lesão interna, observou-se que as lesões eram um pouco maiores, demonstrando a colonização de novas células pelo patógeno, as quais, ainda não exteriorizavam os sintomas através da casca.

Tabela 19 - Quadro de análise de variância para o efeito da microbiolização de sementes com os isolados de *Trichoderma* spp na indução de resistência à *P. nicotianae*, em plantas de Tangerina Sunki, Limão Cravo e Ctrumelo Swingle. Avaliado pelo tamanho de lesão sob a casca (interna), 40 dias após a inoculação das plantas.

C. variação	G.L	S.Q	Q.M.	F	P>F
Fungo	19	3.302	0.1738	2.119*	0.0028531
Variedade	2	44.170	22.0851	277.015*	0.0000000
Fungo X Variedade	38	5.746	0.1512	1.807*	0.0014842
Resíduo	259	20.211	0.0780		
Total	318	73.429			

CV = 26,93%

*Interações significativas ($p < 0,05$).

Tabela 20 - Efeito da microbiolização de sementes com os isolados de *Trichoderma* spp na indução de resistência à *Phytophthora nicotianae*, em plantas de Tangerina Sunki, Limão Cravo e Ctrumelo Swingle. Avaliado pelo tamanho de lesão sob a casca (interna), 40 dias após a inoculação das plantas.

Tratamentos	Tamanho médio de lesão (cm)		
	tangerina Sunki	limão Cravo	citrumelo Swingle
ACB-02	5,20 bcde	1,02 a	0,67 abc
ACB-03	3,36 bcde	0,85 a	0,48 a
ACB-04	2,76 ab	0,96 a	0,67 abc
ACB-05	6,30 cde	0,73 a	0,60 abc
ACB-14	6,10 cde	1,06 a	0,51 a
ACB-32	2,08 bcde	1,08 a	0,58 abc
ACB-33	2,80 ab	0,96 a	0,60 abc
ACB-34	2,82 bc	1,02 a	0,52 abc
ACB-36	2,88 bcd	1,00 a	0,56 ab
ACB-37	3,74 bcd	0,87 a	0,63 ab
ACB-38	2,13 bcde	0,91 a	0,80 abc
ACB-40	5,36 a	0,95 a	0,56 bc
ACB-42	6,38 bcde	1,10 a	0,68 ab
ACB-43	4,90 cde	1,10 a	0,60 abc
ACB-183/5	4,65 bcde	1,30 a	0,60 abc
ACB-T002	10,18 bcde	0,87 a	0,68 bc
ACB-T1	3,00 e	1,06 a	0,54 abc
ACB-T6	4,41 bc	0,90 a	0,47 ab
Mistura	2,70 bcde	0,90 a	0,75 a
Testemunha	7,70 de	1,22 a	0,82 c

¹ Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade

Dados transformados: BoxCox com $\lambda = - 0,78$

Tabela 21 - Quadro de análise de variância para o efeito da microbiolização de sementes com os isolados de *Trichoderma* spp na indução de resistência à *P. nicotianae*, em plantas de Tangerina Sunki, Limão Cravo e Ctrumelo Swingle. Avaliado pelo tamanho de lesão sobre a casca (externa), 40 dias após a inoculação das plantas.

C. variação	G.L	S.Q	Q.M.	F	P>F
Fungo	19	6.423	0.338	2.069*	0.006342
Variedade	2	68.058	34.029	208.241*	0.000000
Fungo x Variedade	38	9.252	0.243	1.490*	0.039094
Resíduo	259	43.324	0.163		
Total	318	126.057			

CV = 31,05 %

*Interações significativas ($p < 0,05$).

Tabela 22 - Efeito da microbiolização de sementes com os isolados de *Trichoderma* spp na indução de resistência à *Phytophthora nicotianae*, em plantas de Tangerina Sunki, Limão Cravo e Ctrumelo Swingle. Avaliado pelo tamanho de lesão sob a casca (externa), 40 dias após a inoculação das plantas.

Tratamentos	Tamanho médio de lesão (cm)		
	tangerina Sunki	limão Cravo	citrumelo Swingle
ACB-02	4,51 abcd	0,86 a	0,56 a
ACB-03	2,88 bcd	0,62 a	0,54 a
ACB-04	0,94 ab	0,72 a	0,51 a
ACB-05	5,53 bcd	0,63 a	0,55 a
ACB-14	5,46 cd	0,80 a	0,58 a
ACB-32	1,65 cd	0,87 a	0,53 a
ACB-33	2,48 ab	0,70 a	0,60 a
ACB-34	2,40 abc	0,70 a	0,58 a
ACB-36	2,43 abc	0,75 a	0,54 a
ACB-37	3,20 abc	0,65 a	0,50 a
ACB-38	2,60 cd	0,81 a	0,67 a
ACB-40	4,58 a	0,80 a	0,46 a
ACB-42	5,63 bcd	0,70 a	0,60 a
ACB-43	4,41 cd	0,90 a	0,54 a
ACB-183/5	4,20 cd	1,17 a	0,62 a
ACB-T002	9,33 bcd	0,72 a	0,52 a
ACB-T1	2,63 d	0,76 a	0,54 a
ACB-T6	3,91 abc	0,65 a	0,52 a
Mistura	2,18 cd	0,70 a	0,65 a
Testemunha	7,10 cd	1,02 a	0,62 a

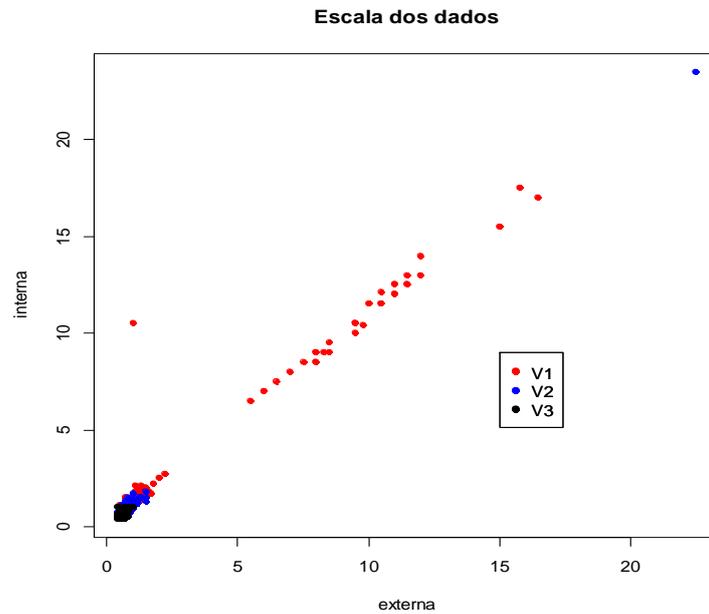
¹ Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade

Dados transformados: BoxCox com $\lambda = - 1.0$

Observou-se que houve interação significativa entre os fatores analisados pela análise de variância (tratamentos X variedade = 20 x 3), tanto nas lesões internas (Tabela 19) como nas externas (Tabela 21), demonstrando que o tratamento é dependente da variedade.

Os gráficos de dispersão dos dados originais (Gráfico A) e dos dados transformados (Gráfico B), apresentados na Figura 21, mostram como foi o comportamento da massa de dados para cada porta-enxerto em relação aos tratamentos. Sendo assim, foi possível observar que na V1 – tangerina Sunki, bem como, na V2 – limão Cravo, apenas um ponto se dispersou da massa de dados originais (Figura 21A); e a necessidade de transformação dos mesmos, (Figura 21B), tanto em relação às lesões internas quanto às externas. A transformação foi feita devido à grandeza de medida da variável resposta não satisfazer a suposição de normalidade dos dados, segundo o método de Box-Cox. Pelo gráfico também foi possível visualizar que existe correlação positiva forte entre as medidas externas das internas ($r= 0,9866$, $p\text{-valor} < 0,05$).

A



B

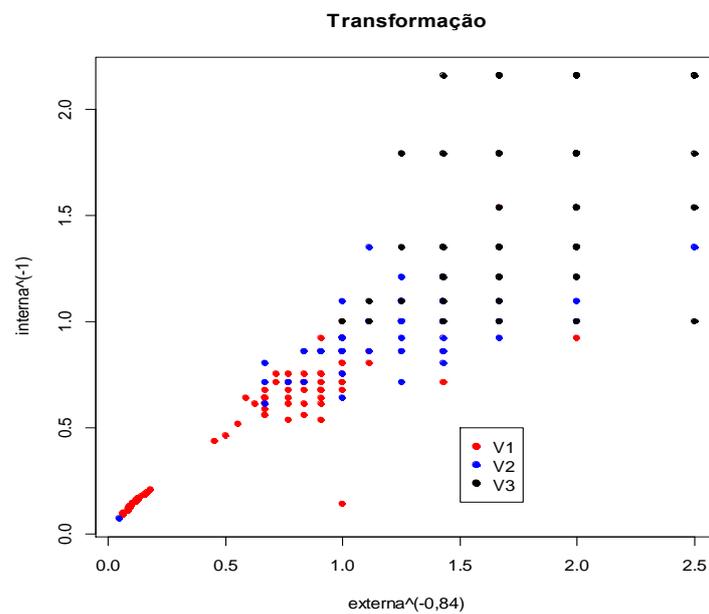


Figura 21 - Efeito dos isolados de *Trichoderma* spp. na indução de resistência à *Phytophthora nicotianae*: Gráficos de dispersão - Escala dos dados originais (A) e transformados (B) referentes às lesões interna (sob a casca) e externa (sobre a casca) nas variedades Tangerina Sunki (V1), Limão Cravo (V2) e Citrumelo Swingle (V3).

4.6 Controle de *Phytophthora nicotianae*

Observou-se que houve interação significativa entre os fatores analisados pela análise de variância (tratamentos X variedade = 21 x 2) (Tabela 23).

Pelos resultados, todos os isolados de *Trichoderma* spp., exceto o ACB-14, diferiram significativamente ($p < 0,05$) do controle positivo (plantas sem tratamento semeadas em solo infestado com o patógeno), indicando um controle eficiente de *Phytophthora nicotianae* pela sobrevivência das plantas, após 60 dias da semeadura (Tabelas 24).

Tabela 23 - Quadro de análise de variância para o efeito da microbiolização de sementes com os isolados de *Trichoderma* spp. na sobrevivência de plântulas de Tangerina Sunki e Limão Cravo, em substrato contaminado com *P. nicotianae*, avaliado 60 dias após a semeadura.

C. variação	G.L	S.Q	Q.M.	F	P>F
Fungo	1	4.605	4.6045	31.793*	0.000000
Variedade	20	10.466	0.5233	3.613*	0.000001
Fungo X Variedade	20	3.707	0.1854	1.280*	0.189429
Resíduo	334	48.373	0.1448		
Total	375	67.151			

CV = 24,53%

*Interações significativas para ($p < 0,05$).

Tabela 24 - Efeito da microbiolização de sementes com os isolados de *Trichoderma* spp. na sobrevivência de plântulas de Tangerina Sunki e Limão Cravo, em substrato contaminado com *P. nicotianae*, avaliado 60 dias após a semeadura.

Tratamentos	Número médio de plantas
Controle Negativo*	13,64 a ¹
ACB-183/5	12,77 ab
ACB-40	11,60 abc
ACB-T1	11,60 abc
ACB-38	11,57 abc
Mistura	11,46 abc
ACB-T6	11,45 abc
ACB-36	11,40 abc
ACB-T002	11,23 abc
ACB-04	11,09 abc
ACB-37	10,97 abc
ACB-03	10,13 bcd
ACB-42	9,93 bcd
ACB-43	9,72 bcd
ACB-02	9,52 bcd
ACB-05	9,34 bcd
ACB-32	9,18 cd
ACB-34	8,96 cd
ACB-33	8,53 cd
ACB-14	7,21 de
Controle Positivo**	4,78 e

*Controle Negativo: plântulas sem tratamento em solo não infestado com *P. nicotianae*

**Controle Positivo: plântulas sem tratamento em solo infestado com *P. nicotianae*

¹Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade

Dados Transformados: BoxCox com $\lambda = 0.56$

5 DISCUSSÃO

Este estudo teve o objetivo de selecionar isolados de *Trichoderma* spp. capazes de controlar *P. nicotianae* e promover o crescimento de plantas cítricas. Nos ensaios referentes às interações *in vitro* entre os isolados de *Trichoderma* spp. e o fitopatógeno verificou-se que, todos foram capazes de inibir o crescimento micelial de *P. nicotianae* nos testes de pareamento (Tabela 2). Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores, Silva et al. (2008) verificaram a atividade antagônica *in vitro* de *Trichoderma viride*, *T. virens*, *T. harzianum* e *T. stromaticum* contra *P. citrophthora* e relataram que todas as espécies afetaram, significativamente, o desenvolvimento micelial do fungo.

Com relação à produção de substâncias antifúngicas pelos isolados de *Trichoderma* spp, observou-se que os mesmos não foram capazes de produzir substâncias voláteis neste estudo. Esses resultados não corroboram com o encontrado por Bomfim et al. (2010). De acordo com os autores, estudos *in vitro* e *in vivo*, sobre antagonismo de diferentes espécies de *Trichoderma* spp. contra *Rhizopus stolonifer*, mostraram inibições no desenvolvimento do fungo pela produção de metabólitos voláteis por todos os isolados testados. Por outro lado, para Dennis e Webster (1971), isolados de *Trichoderma* spp., com capacidade para produzirem substâncias antifúngicas não voláteis, nem sempre produzem substâncias voláteis. Embora esses autores tenham relatado que espécies de *T. viride* e *T. koningii* são eficientes como produtoras de metabólitos voláteis em meio de cultura, em nosso trabalho, isolados destas espécies como o ACB-14 (*T. viride*) e ACB-05 e ACB-38 (*T. koningii*), não mostram a mesma capacidade antagônica.

Quando se avaliou a produção de metabólitos livres de células, alguns isolados como ACB-02, ACB-38, ACB-40, ACB-42 e ACB-183/5 produziram tais substâncias, em quantidades suficientes, para reduzir o tamanho da colônia do fitopatógeno, sendo que destes, somente os metabólitos produzidos pelo ACB-38 suportaram a alta temperatura (Tabela 3). Supõe-se que os metabólitos produzidos pela maioria dos isolados sejam de natureza proteica, já que, com exceção do ACB-38, nenhum outro produziu substâncias

antifúngicas que resistissem à alta temperatura. Amorim (1997) também obteve resultados satisfatórios de controle de *P. citrophthora* e de *P. parasitica* com *T. koningii* pela produção de substâncias antifúngicas pelo antagonista.

Neste estudo, foram observados diferentes respostas de promoção de crescimento nas três variedades de porta-enxertos estudadas em relação aos tratamentos com os isolados de *Trichoderma* spp., o que demonstra que o estímulo ao crescimento da planta deve ser dependente do genótipo de citros, sugerindo que a ação de *Trichoderma* spp. está sob o controle genético da planta. Os isolados ACB-32 - *T. virens*, ACB-36 - *T. aureoviride*, ACB-38 - *T. koningii*, embora, tenham sido capazes de proporcionar maior altura (Tabela 4 e 5) e número de folhas (Tabela 6 e 7) em plantas de tangerina Sunki, quando se avaliaram os dados referentes à massa de matéria seca total, apenas o ACB-36 não apresentou, significativamente, o mesmo desempenho (Tabela 8), sendo que nesse parâmetro, os melhores tratamentos foram ACB-43 e a mistura dos isolados, que mostraram aumento tanto da parte aérea como da raiz. Em contrapartida, em plantas de citrumelo Swingle os melhores tratamentos foram ACB-34, ACB-37, ACB-43, ACB-183/5, ACB-T002, ACB-T1 e a mistura foram capazes de promover maior crescimento das plantas em comparação à testemunha, em todos os parâmetros avaliados (altura de planta, número de folhas e massa de matéria seca aérea e raiz) (Tabelas 9, 10, 11, 12 e 13). Em relação ao limão Cravo, os isolados ACB-03, ACB-04 e ACB-05 mostraram potencial para a promoção de crescimento quando se avaliaram os parâmetros relacionados à altura, número de folhas (Tabelas 14, 15, 16 e 17). Em relação à massa seca tanto da parte aérea como de raiz, os melhores foram ACB-05, ACB-43 e mistura dos isolados (Tabela 18).

Os resultados encontrados no respectivo estudo estão, em parte, de acordo com os relatados na literatura. Tucci et al. (2011), estudaram os efeitos benéficos de dois isolados, *T. atroviride* e *T. harzianum*, em cinco genótipos diferentes de tomate e obtiveram respostas distintas em relação à promoção de crescimento, quanto à massa de matéria seca e comprimento de tronco, para cada variedade. Harman et al. (2004), também se refere à importância genética da planta para a interação entre milho e *T. harzianum* – T22. De acordo com os

autores, testes comerciais com vários híbridos de milho tratados com T-22 apresentaram aumento em produtividade, porém, em algumas linhagens da cultura ocorreram reduções no rendimento. Em estudo posterior, Harman et al. (2006) demonstraram por análises genéticas, que a resposta de *Trichoderma* spp. em milho está condicionada pelos genes dominantes. Contudo, em nosso trabalho, não foram investigados os mecanismos de ações responsáveis pelas diferentes interações fungo-planta, encontrados nas três variedades estudadas, o que demanda pesquisas no assunto.

Autores têm levantado hipóteses para explicar a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. em promover o crescimento de plantas. Em um trabalho realizado por Harman et al. (2004) quando sementes de milho foram tratadas por T-22 obtiveram máximo rendimento, com 40% menos de fertilizante nitrogenado em relação às plantas testemunhas. Os autores verificaram que espécies de *Trichoderma* aumentaram o crescimento da raiz, o que, conseqüentemente, levou a uma maior produtividade, apontando assim, que estes fungos benéficos aumentam a captação e eficiência do uso de nitrogênio e, também, podem solubilizar nutrientes no solo, beneficiando as plantas. Porém, os elicitores moleculares responsáveis pelo crescimento de plantas pelos *Trichoderma* spp. ainda são desconhecidos. Por outro lado, outra hipótese diz respeito ao fato do antagonico ser capaz de colonizar as raízes (HARMAN et al., 2008). Os autores ao relatarem o tratamento de raízes de milho com *T. harzianum* consideraram que, o efeito benéfico e duradouro na produtividade das plantas foi devido à competência e persistência do antagonico na rizosfera, como simbiote de raiz, durante todo o período de cultivo. Ainda, em relação à capacidade de promover o crescimento das plantas, Harman e Shores (2007) relataram que a interação *Trichoderma*-planta deve ser semelhante à interação de endomicorizas com as plantas. Sendo assim, ao penetrar nas raízes, o fungo tem acesso aos nutrientes das plantas, o que lhes permite proliferar. Em contrapartida, eles favorecem o desenvolvimento de maior massa de raízes e da parte aérea das plantas, através da solubilização de nutrientes. O aumento na massa de raízes, em particular, conseqüentemente irá garantir um maior sítio de sobrevivência para

o *Trichoderma*. Essa informação pode explicar os resultados positivos encontrados neste estudo quanto à promoção de maior massa de matéria seca de raízes e parte aérea nos três porta-enxertos avaliados.

Considerando que espécies de *Trichoderma* tem potencial de induzir respostas de defesa sistêmica e localizada em diversas plantas contra vários fitopatógenos (HARMAN et al., 2004, YEDIDIA et al., 1999, 2003; SHORESH et al. 2005), os dados obtidos neste estudo indicam que os isolados de *Trichoderma* spp. podem ter apresentado esse mecanismo de ação, uma vez que diminuíram a severidade da doença em tangerina Sunki e citrumelo Swingle (Tabelas 19, 20, 21 e 22).

Segundo relatos da literatura, para que a proteção induzida se expresse, é necessário que haja um intervalo de tempo entre o tratamento inicial (tratamento indutor) e a subsequente inoculação do patógeno (tratamento provocador) (Pascholati, 2011). Aliado a isso, os resultados obtidos por Teixeira et al. (2005), em seus estudos com eucalipto, sugeriram que para plantas perenes é necessário um tempo maior que o observado nas plantas anuais para que a resistência seja manifestada plenamente. Considerando esses relatos e comparando com o respectivo trabalho cujo período de aplicação do tratamento indutor ao provocador foi de 180 dias, acredita-se que foi um tempo suficiente para que plantas de Tangeriana Sunki pudessem ativar os seus mecanismos de resistência pela ação dos indutores, ACB-04, ACB-33 e ACB-40 (Tabelas 19 e 20). Com relação aos resultados observados em citrumelo Swingle, onde um maior número de isolados de *Trichoderma* spp. ativaram os mecanismos de defesa, acredita-se que pelo fato do porta-enxerto apresentar tolerância natural às doenças causadas por *Phytophthora*, a ação destes antagonísticos possam ter sido potencializada.

Como já mencionado no decorrer desta discussão, houve diferentes respostas nas interações variedade-fungo antagonista, o que talvez possa explicar a não existência de indutores de resistência para o porta-enxerto limão Cravo. De acordo com Yedidia et al. (1999), em função da colonização das células superficiais das raízes pelos *Trichoderma* spp., as plantas ativam seus mecanismos de defesa, bioquímicos e estruturais. Segundo os autores, em

uma associação do tipo simbiótica deve haver um reconhecimento molecular entre a planta e o *Trichoderma* spp., resultando na criação de uma parceria benéfica que, conseqüentemente, conduz a uma diminuição na síntese e acúmulo de moléculas de defesa. Esse conceito foi suportado pelos autores devido a constatação de ter ocorrido promoção de crescimento nas plantas tratadas com *Trichoderma* spp., o que indica o efeito benéfico da associação. Esse fato corrobora com os resultados encontrados neste estudo, principalmente pela capacidade de alguns isolados de *Trichoderma* spp. em promover o crescimento em plantas de limão Cravo, evidenciadas principalmente aos 180 dias após o tratamento, mas não ter tido um efeito sobre a indução de resistência.

Portanto, mais estudos desse fenômeno ao longo do tempo são necessários para melhor investigar o período de tempo em que os mecanismos de defesa de cada porta-enxerto de citros estariam ativados após a aplicação de *Trichoderma* spp. Estudos histológicos, bioquímicos e fisiológicos poderiam detectar quais são as modificações que ocorrem no metabolismo da planta em função da interação com o antagonista.

Nos ensaios sobre o efeito da microbiolização de sementes com os isolados de *Trichoderma* spp. na sobrevivência de plântulas de tangerina Sunki e de limão Cravo, em substrato contaminado com *P. nicotianae*, foi possível observar o potencial de controle da maioria dos isolados testados (Tabela 23 e 24). Resultados similares foram obtidos por Amorim (1997) que observou controle *in vivo* de *P. citrophthora* e *P. parasítica* com isolados de *Trichoderma* spp., avaliado pela porcentagem de mortalidade de plantas em substrato pré-infestado com o patógeno. De um modo geral, a microbiolização das sementes com agentes de biocontrole protege as plantas contra os patógenos, favorece a germinação, emergência e desenvolvimento das sementes, podendo ser uma tecnologia alternativa no tratamento de sementes (HARMAN et al., 2000; LUZ, 2001; JETIYANON; KLOEPPER, 2002; AMORIM; MELO, 2002; CHEN et al., 2012). Segundo Harman et al. (2004), a capacidade de espécies de *Trichoderma* spp. competirem pelos exsudados de sementes, que estimulam a

germinação de propágulos de fungos patogênicos de plantas no solo, favorece, na maioria das vezes, o biocontrole.

Embora ACB-14 tenha sido o único a não proporcionar controle ao patógeno nos testes *in vivo*, no teste de pareamento, o mesmo proporcionou 84% de inibição à colônia de *P. nicotianae*. A ineficiência de alguns isolados em controlar patógenos de solo pode ser devido a diversos fatores, tais como, falha na colonização da semente que, conseqüentemente, leva a não manutenção da densidade microbiana inicial; perda da habilidade de competir com outros microrganismos em conseqüência de sucessivas repicagens realizadas previamente em laboratório e/ou pelo longo período de estocagem (LUZ, 1993).

Apesar dos resultados positivos obtidos com o emprego dos agentes biológicos do gênero *Trichoderma* spp. para a promoção de crescimento de plantas de citros e com relação ao biocontrole de *P. nicotianae*, pesquisas precisam ser incrementadas, principalmente às relacionadas a adaptação destes microrganismos às diversas condições ambientais, bem como, ao processo industrial, tolerância aos agroquímicos comumente aplicados no campo e aceitabilidade dos agricultores.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

- a) Espécies de *Trichoderma* têm potencial para promover crescimento de porta-enxertos cítricos, assim como, induzir resistência sistêmica à *P. nicotianae*, porém, as respostas variam de acordo com o genótipo da planta e com o isolado do antagonista utilizado;
- b) Considerando-se a maioria dos parâmetros analisados, este estudo mostrou que os isolados de *Trichoderma* spp.: ACB-33, ACB-34, ACB-37, ACB-43, ACB-183/5, ACB-T002, ACB-T1, ACB-T6 podem ser indicados para a promoção de crescimento de Citrumelo Swingle. Os isolados ACB-32 e ACB-38 podem ser recomendados para Tangerina Sunki, enquanto que, ACB-03, ACB-04 e ACB-05 para Limão Cravo;
- c) Os isolados de *Trichoderma* spp. que podem ser indicados para indução de resistência de porta-enxertos à *P. nicotianae*, são: ACB-04, ACB-33 e ACB-40 para tangerina Sunki e os isolados ACB-03, ACB-14, ACB-36, ACB-37, ACB-42, ACB-T6 e a Mistura para citrumelo Swingle;
- d) A maioria dos isolados de *Trichoderma* spp. testada foi capaz de controlar *P. nicotianae* em plantas de tangerina Sunki e limão Cravo.

7 LITERATURA CITADA

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5th. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.

AGUILAR-VILDOSO, C.I.; POMPEU JUNIOR, J. Inoculação de *Phytophthora parasitica* em caules de variedades cítricas, pelo método do palito. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 240, 1997. (Suplemento)

ALABOUVETTE, C.; OLIVAIN, C.; STEINBERG, C. Biological control of plant diseases: the European situation. **European Journal of Plant Pathology**, Londres, v.114, p. 29–341, 2006.

AMORIM, E. P. R. **Controle biológico de *Phytophthora nicotianae* var *parasitica* Dastur E *Phytophthora citrophthora* (Smith & Smith) Leonian em plântulas de citros**. 1997. 111f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agronômicas do Câmpus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1997.

AMORIM, E. P. R.; MELO, I. S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* p. e *citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s010029452002000200058&script=sci_arttext>. Acesso em: 20 mar. 2013.

AMORIM, L.; PASCHOLATI, S.F. Ciclo de relações patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. v.1. cap. 4. p. 59-98.

BASSAN, M.M.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; FREIRE, B.F.S.; CANTUARIAS-ÁVIES, T.E.; BELTRAME, A.B. Reação de híbridos somáticos de citros à infecção por *Phytophthora nicotianae*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.32, p. 429-435, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v32n2/aop07210.pdf>>. Acesso em: 03 abr. 2014.

BEDENDO, I.P.; MASSOLA JUNIOR, N.S.; AMORIM, L. Controle cultural, físico e biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. v.1. cap. 17. p. 367-387.

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

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, A.; REZENDE, J.A.M. Importância das doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO,

A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. v.1, cap. 2. p. 19-36.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Impacto das mudanças climáticas sobre o controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. cap. 3. p. 29-48.

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. cap. 1. p. 7-14.

BOMFIM, M. P.; SÃO JOSÉ, A. R.; REBOUÇAS, T. N. H.; ALMEIDA, S. S.; SOUZA, I. V. B.; DIAS, N. O. Avaliação antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v.36, n.1, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010054052010000100011>. Acesso em: 29 jan. 2014.

BOX, G. E. P.; COX, D. R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical society: Series B (Methodological)**, Londres, v.26, n.2, p.211-252, 1964. Disponível em: <<http://www.ime.usp.br/~abe/lista/pdfQWaCMboK68.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

CHEN, M-H; JACK, A. L. H.; MCGUIRE, I. C.; NELSON, E. B. Seed-colonizing bacterial communities associated with the suppression of *Pythium* seedling disease in a municipal biosolids compost. **Biological Control**, Orlando, v.102, n.5, 2012.

CHET, I.; BENHAMOU, N.; HARAN, S. Mycoparasitism and lytic enzymes. In: HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. (Ed.). **Trichoderma and Gliocladium: enzymes, biological control and commercial applications**. London: Taylor & Francis, 2002. v.2. cap.7. p. 134-157. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=aBsu0560nYIC&pg=PA149&dq=Chet,+It+richoderma+application+1987&hl=ptBR&sa=X&ei=PyZHU6DuM9TG0AG5wYDwBg&ved=0CD0Q6AEwAg#v=onepage&q=Chet%2C%20lrichoderma%20aplication%201987&f=false>>. Acesso em: 10 abr. 2014.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra Brasileira de laranja**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_05_14_09_38_01_boletim_laranja__1_2013.pdf>. Acesso em: 03 abr. 2014.

CORRÊA, E. B.; KUPPER, K. C.; GOES, A. Controle biológico da podridão radicular em plantas de limão Cravo. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.32, n.3, p. 127-132, 2011.

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

DENNIS, C., WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, Manchester, v.57, n.3, p. 359-363, 1971c.

DINIZ, K. A.; SILVA, P. A.; OLIVEIRA, J. A.; EVANGELISTA, J. R. E. Sweet pepper seed responses to inoculation with microorganisms and coating with micronutrients, aminoacids and plant growth regulators. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.66, n.3, p. 293-297, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/sa/v66n3/02.pdf>>. Acesso em: 08 abr. 2014.

DJONOVIC, S.; VARGAS, W. A.; KOLOMIETS, M. V.; HORNDESKI, M.; WEIST, A.; KENERLEY, C. M. A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for systemic resistance in maize. **Plant Physiology**, Rockville, USA, v.145, p. 875–889, 2007. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/content/145/3/875.full.pdf+html?with-ds=yes>>. Acesso em: 15 abr. 2014.

DONADIO, L.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MOREIRA, C.S. In: de MATOS JÚNIOR, D.; de NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC/FUNDAG, 2005. v. 1. 929 p.

ETHUR, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International microbiology**, Madri, v. 7, p. 249-260, 2004. Disponível em:<www.im.microbios.org >. Acesso em: 05 maio 2013.

FEICHTENBERGER, E.; ROSSETI, V.; POMPEU JR, J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; FIGUEIREDO, J.O. Evaluation of tolerance of citrus in Brazil: a review. **Proceedings of International Society of Citriculture**, Acireale, Itália, v.2, p. 854-858, 1992.

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: LUZ, E. D. M. N. et al. (Ed.). **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Rural, 2001. p. 283-332.

FREITAS, S. S.; AGUILAR VILDOSO, C. I. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciências do solo**, Viçosa, v.28, n.6, p. 989-994, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01000683200400060007>. Acesso em: 30 abr. 2013.

FRIGHETTO, R. T. S.; MELO, I. S. de. Produção de antibióticos por microrganismos. In: MELO, I. S. de.; SANHUEZA, R. M. V. (Coord.). **Métodos**

de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1995. p. 40-46. (Manual Técnico).

FUTCH, S.H.; GRAHAM, J.H. **Field diagnosis and management of *Phytophthora* diseases.** Gainesville: University of Florida. 2012. (HS-1015). Disponível em: <<https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/HS/HS26100.pdf>>. Acesso em: 03 abr. 2014.

GLIESSMAN, S. R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável.** Porto Alegre: UFRGS, 2001.

GONÇALVES, S.; ENGELMANN, S. A. A agroecologia e a restauração do desenvolvimento rural. **CAMPO – TERRITÓRIO: Revista de geografia agrária,** Uberlândia, v.4, n.8, p. 29-51, 2009. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/campoterritorio/article/viewFile/11947/6978>>. Acesso em: 08 maio 2014.

GRAHAM, J.H. Evaluation of tolerance of citrus rootstocks to *Phytophthora* root rot in chlamydospore-infested soil. **Plant Disease,** Saint Paul, v.74, p. 743-746, 1990. Disponível em: <https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1990Articles/PlantDisease74n10_743.pdf>. Acesso em: 08 abr. 2014.

GRAHAM, J.H. Root regeneration and tolerance of citrus rootstocks to root rot caused by *Phytophthora nicotianae*. **Phytopathology,** Saint Paul, v.85, p. 111-117, 1995.

GRAHAM, J. H.; MENGE, J. A. Root diseases. In: TIMMER, L. W.; DUNCAN, L. W. **Citrus health management.** Saint Paul: American Phytopathology Society, 1999. cap.12. p. 126-135. Disponível em: <http://www.crec.ifas.ufl.edu/academics/classes/PMA5205/PDF/Root_diseases_Ch12.pdf>. Acesso em: 07 abr. 2014.

GRAHAM, J.H.; TIMMER, L.W. ***Phytophthora* diseases of citrus.** Gainesville: University of Florida, 2003. (SL-127). Disponível em: <http://orange.ifas.ufl.edu/mg/mg_compendium/pdffiles/ch/CH08700.pdf>. Acesso em: 03 abr. 2014.

GRAHAM, J.H.; TIMMER, L.W.; DEWDNEY, M.M. **Florida citrus pest management guide: *Phytophthora* foot rot and root rot.** Gainesville: University of Florida, 2013. (PP-156). Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/CG/CG00900.pdf>>. Acesso em: 03 abr. 2014.

GRAHAM, J. H.; TIMMER, L. W.; DROUILLARD, D. L.; PEEVER, T. L. Characterization of *Phytophthora* spp. causing outbreaks of citrus brown rot in Florida. **Phytopathology,** Saint Paul, v.88, p. 724-729, 1998. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.1998.88.7.724>>. Acesso em: 03 abr. 2014.

HANSON, L. E.; HOWELL, C. R. Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.94, p. 171-176, 2004.

HARAN, S.; SCHICKLER, H.; CHET, I. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. **Microbiology**, Londres, v.142, p. 2321-2331, 1996. Disponível em: <<http://mic.sgmjournals.org/content/142/9/2321.full.pdf>>. Acesso em: 30 jan. 2014.

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, p. 377-393, 2000. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.2000.84.4.377>>. Acesso em: 29 jan. 2014.

HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, p. 190-194, 2006. Disponível em: <<http://www.hort.cornell.edu/departament/faculty/harman/pubs/06APSSymp.pdf>>. Acesso em: 09 abr. 2014.

HARMAN, G. E.; BJÖRKMAN, T.; ONDIK, K.; SHORESH, M. Changing paradigms on the mode of action and uses of *trichoderma* spp. for biocontrol. **Outlooks on Pest Management**, Saffron Walden - Inglaterra, p. 1-6, 2008. Disponível em: <<http://www.hort.cornell.edu/bjorkman/lab/pubs/PDFs/Outlooks08.pdf>>. Acesso em: 29 jan. 2014.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Review Microbiology**, Londres, v.2, p. 43–56, 2004.

HARMAN, G.E.; SHORESH, M. The mechanisms and applications of opportunistic plant symbionts. In: VURRO, M.; GRESSEL, J. (Ed.). **Novel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management**. Amsterdam: Springer, 2007. p.131–157.

HEIDEGGER, M. **Ensaios e conferências**. 3. ed. Petrópolis: Vozes, 2006. 137p. Disponível em: <<http://gmeaps.files.wordpress.com/2014/02/martin-heidegger-ensaios-e-conferc3aancias-1.pdf>>. Acesso em: 07 maio 2014.

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.

HOWELL, C. R.; HANSON, L. E.; STIPANOVIC, R. D.; PUCKHABER, L. S. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani*

by seed treatment with *Trichoderma virens*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.90, n.3, p. 248-252, 2000. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.2000.90.3.248>>. Acesso em: 14 abr. 2014.

JETIYANON, K.; KLOEPPER, J. W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. **Biological control**, Orlando, v. 24, p. 285-291, 2002.

LARANJEIRA, F. F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; COLLETA FILHO, H. D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: de MATOS JÚNIOR, D.; de NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC/FUNDAG, 2005. v.1. 929 p.

LONGA, C.M.O.; SAVAZZINI, S.; PERTOT, I. Monitoramento de *Trichoderma atroviride* SC1 em um vinhedo no nordeste da Itália: considerações sobre impacto ambiental e controle biológico de *Armillaria mellea*. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. cap. 11. p. 73-86.

LOPES, R.B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. cap. 2. p.15-28.

LOUZADA, G. A. S.; CARVALHO, D. D. S.; MELLO, S. C. M.; JÚNIOR, M. L.; MARTINS, I.; BRAUNA, L. M. Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, Campinas, v.9, n.3, 2009. Disponível em: <www.biotaneotropica.org.br/v9n3/en/abstract?article+bn02509032009>. Acesso em: 05 maio 2013.

LUZ, W. C. Microbiolização de sementes para o controle de doenças de plantas. In: FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. (Ed.). **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo, p. 33-77, v. 1., 1993.

LUZ, W. C. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010041582001000100003&script=sci_arttext>. Acesso em: 29 jan. 2014.

MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R.S.; BARACAT-PEREIRA, M.C.; LANNA-FILHO, R.; BATISTA, G.S.; POMELLA, A.W.V. Activity of enzymes associates of induced resistance on cocoa seedlings exposed of two actinomycetes phylloplane residents. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 1, 2008. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052008000100007>>. Acesso em: 18 mar. 2013.

MASSOLA JR., N. S.; KRUGNER, T. L. Fungos fitopatogênicos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. v.1. cap. 8. p. 149-206.

MAY, L. L. **Controle biológico, físico e químico de *Phytophthora parasítica* Dastur em plântulas de citros**. 1994. 89f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

MEDINA FILHO, H. P.; BORDIGNON, R.; SIQUEIRA, W. J.; FEICHTENBERGER, E.; CARVALHO, M. R. T.; SOBRINHO, J. T. Resistência de clones e híbridos de porta-enxertos de citros à gomose de tronco causada por *Phytophthora parasítica*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 5, p. 534-540, 2003.

MEDINA FILHO, H. P.; BORDIGNON, R.; SIQUEIRA, W. J.; FEICHTENBERGER, E.; CARVALHO, M. R. T. Tolerância de híbridos e de clones de porta-enxertos de citros à infecção de raízes por *Phytophthora nicotianae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 169-178, 2004.

MELO, I.S. de. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna : EMBRAPA-CNPDA, 1991. cap. 9. 388p.

MONTE, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. **International microbiology**, Madri, v.4, p. 1-4, 2001. Disponível em: <<http://revistes.iec.cat/index.php/IM/article/viewFile/4c457c1f26018.002/9293>>. Acesso em: 05 mai. 2013.

MORETO, K. C. K. **Controle biológico da queda prematura dos frutos cítricos, causada por *Colletotrichum acutatum***. 2000. 130f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2000.

MORETTO, K.C.K.; GIMENES-FERNANDES, N.; SANTOS, J.M. dos. Influence of *Trichoderma* spp. on *Colletotrichum acutatum* mycelial growth and morphology and on infection of ‘Tahiti’ lime detached flowers. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.27, n.4, p. 357-364, 2001.

NEVES, M.F. **Doutor Agro: conheça o setor brasileiro mais admirado no mundo**. São Paulo: Gente, 2012.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. São Paulo: Independente, 2010. v. 1. 137 p. Disponível em:

<http://www.citrusbr.com.br/download/biblioteca/o_retrato_da_citricultura_brasileira_baixa.pdf>. Acesso em: 03 abr. 2014.

PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. v.1. cap. 35. p. 593-636.

POMELLA, A. W. V.; RIBEIRO, R. T. S. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas: uma visão empresarial. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. cap. 15. p. 239-244.

POMPEU JÚNIOR, J. Porta enxertos. In: de MATOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC/FUNDAG, 2005. v.1. 929 p.

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

RAUPACH, G. S.; KLOEPPER, J. W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, p. 1158-1164, 1998.

REIS, E. M. Solos supressivos e seu aproveitamento no controle de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPDA, 1991. p. 181-193.

REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W. Viroses. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. v.1. cap. 31. p. 501-507.

SABA, H.; VIBHASH, D.; MANISHA, M.; PRASHANT, K. S.; FARHAN, H.; TAUSEEF, A. *Trichoderma*: a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. **Mycosphere**, Chiang Rai, Tailândia, v.3, n.4, p. 524–531, 2012.

SAITO, L. R.; SALES, L. L. S. R.; MARTINCKOSKI, L.; ROYER, R.; RAMOS, M. S.; REFFATTI, T. Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, Guarapuava, v.2, n.3, p. 203-208, 2009. Disponível em:< <http://revistas.unicentro.br/index.php/repaa/article/viewFile/1515/1393>>. Acesso em: 05 mai. 2013.

SAKSIRIRAT, W.; CHAREERAK, P.; BUNYATRACHATA, W. Induced systemic resistance of biocontrol fungus, *Trichoderma* spp. against bacterial and gray

leaf spot in tomatoes. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**, Bangkok, Tailândia, special issue, S99-S104, 2009.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, Londres, v. 52, p. 591-611, 1965. Disponível em: < <http://sci2s.ugr.es/keel/pdf/algorithm/articulo/shapiro1965.pdf>>. Acesso em 20 jan. 2014.

SHORESH, M.; HARMAN, G. E. The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomic approach. **Plant Physiology**, Rockville, USA, v.147, p. 2147–2163, 2008. Disponível em: <<http://www.plantphysiology.org/content/147/4/2147.full.pdf+html>>. Acesso em: 14 abr. 2014.

SHORESH, M.; YEDIDIA, I.; CHET, I. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, p. 76-84, 2005. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-95-0076>>. Acesso em: 14 abr. 2014.

SILVA, K. S.; REBOUÇAS, T. N. K.; BOMFIM, M. P.; SILVA, D. S.; SÃO JOSÉ, A. B.; BENETT, C. G. S. Atividade antagônica in vitro de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 749-754, 2008.

SIVIERO, A.; SANTOS, F.A.; FURTADO, E.L.; MACHADO, M.A. Avaliação in vitro de porta-enxerto de citros a gomose causada por *Phytophthora parasítica*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 395, 2001.

SIVIERO, A.; SANTOS, F.A.; FURTADO, E.L.; MACHADO, M.A. Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasítica* em plântulas e plantas jovens de citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 6, p. 574-580, 2002.

TEIXEIRA, D. A.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; MAFFIA, L. A.; FERREIRA, E. M. Evidências de indução de resistência sistêmica à ferrugem do eucalipto mediada por rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, n.4, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01004158200500040003>. Acesso em: 05 maio 2014.

TIMMER, L.W.; SANDLER, H.A.; GRAHAM, J.H.; ZITKO, S.E. Sampling citrus orchards in Florida to estimate populations of *Phytophthora parasítica*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.78, p. 940-944, 1988.

TUCCI, M.; RUOCCO, M.; MAIS, L.; PALMA, M.; LORITO, M. The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. **Molecular plant pathology**, Oxford, v.12, n.4, p. 341-354, 2011.

YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; AND 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. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/65/3/1061.full.pdf+html>>. Acesso em: 10 abr. 2014.

YEDIDIA, I.; SHORESH, M.; KEREM, K.; BENHAMOU, N.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and the accumulation of phytoalexins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 7343-7353, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC309998/>>. Acesso em: 10 abr. 2014.

WIDMER, T.L.; GRAHAM, J.H.; MITCHELL, D.J. Histological comparison of fibrous root infection of disease-tolerant and susceptible citrus hosts by *P. nicotianae* and *P. palmivora*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, n.5, p. 389-395, 1998.

WOOD, T. M.; MACRAE, S. The cellulase of *Trichoderma koningii*. Purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase. **Biochemical Journal**, Londres, v. 171, p. 61-72, 1978.

ZALDÍVAR, M.; VELÁSQUEZ, J. C.; CONTRERAS, I.; PÉREZ, L. M. *Trichoderma aureoviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, Chile, v. 4, n. 3, 2001. Disponível em: <<https://tspace.library.utoronto.ca/retrieve/2423/ej01029.pdf>>. Acesso em: 30 jan. 2014.

APÊNDICE

Teste em duplicata:

✓ **Influência dos isolados de *Trichoderma* spp. no crescimento micelial de *Phytophthora nicotianae***

Tabela 25 - Porcentagem de inibição da colônia de *Phytophthora nicotianae* após cultivo pareado com os isolados de *Trichoderma* spp. (Duplicata).

Isolados	Diâmetro médio da colônia	% de inibição
Controle	6,00 a	0,00
ACB-34	2,74 b	54,33
ACB -183/5	2,47 bc	58,83
ACB -40	2,09 bcd	65,16
ACB-05	1,97 bcd	67,16
ACB-03	1,86 bcde	69,00
ACB-37	1,79 bcde	70,16
ACB-T1	1,75 bcde	70,83
ACB-32	1,74 bcde	71,00
ACB-04	1,70 bcde	71,66
ACB-T6	1,57 bcde	73,83
ACB-33	1,54 bcde	74,33
ACB-36	1,53 bcde	74,50
ACB-43	1,37 cde	77,16
ACB-14	1,40 cde	76,66
ACB-T002	1,25 cde	79,16
ACB-38	1,02 de	83,00
ACB-02	1,06 de	82,33

CV = 8.09%

¹ Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

Dados transformados: BoxCox com $\lambda = 0,29$