

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS SÃO GABRIEL
CURSO DE ENGENHARIA FLORESTAL**

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS,
ANTAGONISTAS À *Pestalotia* sp., PATÓGENO DA
NOGUEIRA-PECÃ**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Franquiéle Bonilha da Silva

**São Gabriel, RS, Brasil
2011**

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS, ANTAGONISTAS
À *Pestalotia* sp., PATÓGENO DA NOGUEIRA-PECÃ**

por

Franquiéle Bonilha da Silva

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia Florestal, da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA, SG), como requisito parcial para obtenção do grau de **Engenheira Florestal.**

Orientador: Prof. Dr. IGOR POLETTO

São Gabriel, RS, Brasil
2011

**Universidade Federal do Pampa
Campus São Gabriel
Curso de Engenharia Florestal**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova o Trabalho de Conclusão de Curso

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS, ANTAGONISTAS À
Pestalotia sp., PATÓGENO DA NOGUEIRA-PECÃ**

elaborado por
Franquiéle Bonilha da Silva

como requisito parcial para obtenção do grau de
Engenheira Florestal

COMISSÃO EXAMINADORA:

Igor Poletto, Dr.
(Presidente/Orientador)

Nirlene Fernandes Cechin, Dr. (UNIPAMPA)

Juliano Tomazzoni Boldo, Dr. (UNIPAMPA)

São Gabriel, 29 de junho de 2011.

RESUMO

Trabalho de conclusão de Curso
Curso de Engenharia Florestal
Universidade Federal do Pampa

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS, ANTAGONISTAS À *Pestalotia* sp., PATÓGENO DA NOGUEIRA-PECÃ

AUTORA: FRANQUIÉLE BONILHA DA SILVA

ORIENTADOR: Prof. Dr. IGOR POLETTTO

Local e Data de Defesa: São Gabriel, 29 de junho de 2011

O Estado do Rio Grande do Sul, a mais de meio século é produtor de noqueira-pecã (*Carya illinoensis*), no entanto, existem poucas pesquisas voltadas ao desenvolvimento de melhorias para a cultura, principalmente, no que se refere ao tratamento de doenças. Dentre as doenças que atacam a espécie, destaca-se a mancha-foliar causada por *Pestalotia* sp., que causa manchas nas folhas e frutos proporcionando sua queda e, também, a diminuição da área fotossinteticamente ativa da planta. A doença também se manifesta em mudas no viveiro florestal, causando queda de folhas, prejudicando seu desenvolvimento. Em função disso, o objetivo deste trabalho foi testar a eficiência de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *Pestalotia* sp. e selecionar fungos presentes na filosfera de noqueira-pecã com potencial para controle biológico. Para isso, foram confrontados *in vitro*, utilizando meio batata-dextrose-ágar (BDA) como meio de cultura, isolados de *Trichoderma* spp. com isolados de *Pestalotia* sp. comprovadamente patogênicos. Quinze isolados de *Trichoderma* spp. e dois de *Pestalotia* sp. foram obtidos na micoteca do Laboratório de Fitopatologia do DFS – UFSM. Além disso, foram coletadas folhas de noqueira-pecã em pomares de alguns municípios do Rio Grande do Sul. Estas folhas foram moídas em liquidificador juntamente com água. A seguir, foram coadas e a solução resultante foi inoculada em placas de Petri com BDA. Os fungos crescidos foram identificados e as colônias de *Trichoderma* spp. foram isoladas para tubos de ensaio com BDA para estudos futuros. Observou-se que a maioria dos isolados de *Trichoderma* teve alto poder antagônico em confronto com os dois isolados de *Pestalotia*, havendo uma variação de resistência ao antagonista entre os dois isolados do fungo patogênico.

Palavras-chave: antagonista, proteção florestal, manejo de doenças

ABSTRACT

Completion of Course Work
Course of Forest Engineering
Universidade Federal do Pampa, RS, Brasil

ISOLATION AND SELECTION OF FUNGI, ANTAGONISTS TO *Pestalotia* sp. PATHOGEN OF WALNUT PECAN

AUTHOR: FRANQUIÉLE BONILHA DA SILVA

ADVISOR: Prof. Dr. IGOR POLETTO

Place and Date: São Gabriel, June 29th, 2011

The State of Rio Grande do Sul, more than half a century is a producer of pecan nut (*Carya illinoensis*), however, there is little research focused on the development of improvements to the culture, especially with regard to treatment of diseases. Among the diseases that attack the species, there is a leaf spot caused by *Pestalotia* sp., which causes spots on leaves and fruits causing its downfall, and also decreasing the photosynthetic active area of the plant. The disease is also manifested in the forest nursery seedlings, causing leaf drop, hindering its development. As a result, the objective is to test the efficacy of isolates of *Trichoderma* spp. as control agents of *Pestalotia* sp. and select fungi present in the phyllosphere pecan nuts with potential for biological control. For this, were confronted *in vitro* using BDA as culture medium, isolates of *Trichoderma* spp. with isolates of *Pestalotia* sp. demonstrably pathogenic. Fifteen isolates of *Trichoderma* spp. and two of *Pestalotia* sp. were obtained in the mycological collection of the Laboratory of Phytopathology DFS - UFSM. In addition, leaves of walnut-pecan were collected in orchards of some municipalities of Rio Grande do Sul. These leaves were ground in a blender with water, then were strained, and the resulting solution was inoculated in Petri plates with BDA. The grown fungi were identified and the colonies of *Trichoderma* spp. were isolated in test tubes with BDA for future studies. It was observed that most isolates of *Trichoderma* had high antagonistic power in confrontation with the two isolates *Pestalotia*, with a variation of resistance to the antagonist between the two fungi isolated from the pathogenic fungus.

Keywords: antagonist, forest protection, disease management

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Gabarito com a escala utilizada para atribuição das notas no teste de pareamento de culturas..... 21
- Figura 2** - Testemunhas. A = *Trichoderma* (AR-OSD), B = *Trichoderma* (ND-ME), C = *Pestalotia* (Pes), D = *Pestalotia* (Pes4)..... 25
- Figura 3** - Confrontos com nota 1 (melhor nota). A = *Trichoderma* (ND-ME) x *Pestalotia* (Pes), B = *Trichoderma* (ND-ME) x *Pestalotia* (Pes4)..... 26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Escala utilizada para o teste de pareamento de culturas.....	21
Tabela 2 - Análise de variância para a média de notas aplicadas aos isolados de <i>Trichoderma</i> confrontados com o isolado Pes.....	24
Tabela 3 - Análise de variância para a média de notas aplicadas aos isolados de <i>Trichoderma</i> confrontados com o isolado Pes4.....	24
Tabela 4 - Comparação de médias entre os isolados de <i>Trichoderma</i> confrontados com os isolados Pes e Pes4 pelo teste de Scott-Knott.....	25
Tabela 5 - Fungos encontrados na filosfera de noqueira-pecã nos diferentes locais de coleta.....	28

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1 – Isolados em placas de Petri no meio BDA. A = <i>Pestalotia</i> (Pes), B = <i>Trichoderma</i> (ND-ME).....	39
Apêndice 2 – Confronto com alta agressividade do antagonista. <i>Trichoderma</i> (GC2 T1) x <i>Pestalotia</i> (Pes).....	39
Apêndice 3 – Confronto com alta produção de metabólitos (coloração amarelada). A = <i>Trichoderma</i> (AC-OSD) x <i>Pestalotia</i> (Pes), B = <i>Trichoderma</i> (AC T1) x <i>Pestalotia</i> (Pes).....	40
Apêndice 4 – Confronto com nota 7 (menos eficiente, segundo a escala de Bell et al. (1982) adaptado por Rodrigues (2010)). <i>Trichoderma</i> (AF-ME) x <i>Pestalotia</i> (Pes4).....	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	09
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo Geral.....	11
2.2 Objetivos Específicos.....	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1 Nogueira-pecã (<i>Carya illinoensis</i>).....	12
3.2 <i>Pestalotia</i> spp.....	13
3.3 Controle biológico de doenças.....	14
3.4 <i>Trichoderma</i> spp. como controlador biológico.....	16
3.5 Seleção de organismos antagonistas na folha.....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Seleção de <i>Trichoderma</i> spp. antagonistas à <i>Pestalotia</i> sp.....	20
4.2 Seleção de fungos da filosfera de noqueira-pecã com potencial para controle biológico de <i>Pestalotia</i> sp.....	22
4.3 Procedimento estatístico.....	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1 Seleção de <i>Trichoderma</i> spp. antagonistas à <i>Pestalotia</i> sp.....	24
5.2 Seleção de fungos da filosfera de noqueira-pecã com potencial para controle biológico de <i>Pestalotia</i> sp.....	27
6 CONCLUSÕES.....	31
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
APÊNDICES.....	38

1 INTRODUÇÃO

O estado do Rio Grande do Sul a mais de meio século é produtor de noqueira-pecã (*Carya illinoensis*). Pomares domésticos da espécie encontram-se espalhados por todo estado e os plantios comerciais, com maiores extensões de área plantada, encontram-se, principalmente, nas regiões do Vale do Taquarí, Rio Pardo e Centro do Estado. No entanto, o cultivo desta espécie ficou desacreditada por algumas décadas e muitos povoamentos ficaram abandonados. O abandono destes contribuiu para o surgimento de pragas e, principalmente, doenças foliares. Porém, nos últimos cinco anos, o plantio da espécie, para fins comerciais, têm se intensificado por parte dos produtores rurais e empresários, incentivados pelo preço pago pela fruta, tornando-se umas das culturas mais lucrativas por área cultivada no estado.

Algumas doenças da noqueira-pecã no Brasil foram descritas por Ortiz e Camargo (2005), são elas: **sarna**, causada pelo fungo *Cladosporium caryigenum*, principal doença que ataca tecidos jovens em crescimento tais como folhas, pecíolo, epicarpo dos frutos e amentos; **fumagina**, causada pelo fungo *Capnodium* sp., sendo caracterizada pela formação de uma manta micelial escura e espessa, que faz lembrar fuligem, recobrando principalmente as folhas, mas podendo ocorrer também sobre ramos e frutos, causando bloqueio físico da fotossíntese; **antracnose**, causada pelo fungo *Glomerella cingulata*, forma sexuada de *Colletotrichum gloeosporioides*, o qual manifesta-se na forma de lesões deprimidas, circulares e escuras no fruto, aonde se notam pequenos pontos escuros (corpos de frutificação), sendo que os danos resultam em diminuição do tamanho da amêndoa, abscisão do fruto e o soltamento do epicarpo da casca da noz.

Além destas citadas acima, uma nova doença passou a atacar as plantações de noqueira-pecã no estado do Rio Grande do Sul. Embora não se tenha dados oficiais, relatos de produtores e técnicos da EMATER - RS estimam prejuízos em torno de 50% nas plantações atacadas e, dependendo das condições climáticas, até mais. Em condições de campo, a doença se manifesta na forma de mancha foliar de coloração escura, que evolui para queda das folhas e, conseqüentemente, diminuição da produção de frutos. Eventualmente ocorrem manchas nos frutos proporcionando sua queda. Além de plantas adultas, a doença ataca mudas no viveiro, proporcionando queda das folhas diminuindo seu crescimento. Assim, mudas contaminadas podem transmitir o patógeno para áreas livres da doença. No campo, a doença aparece a partir do mês de janeiro, sendo o período de maior incidência no mês de março. A doença é causada pelo fungo *Pestalotia* sp., o qual possui grande capacidade de disseminação de seus conídios que são produzidos abundantemente (LAZAROTTO et al., 2011).

O combate de doenças em viveiros e em povoamentos de espécies florestais, em nosso país, é dificultado, pois não temos produtos químicos eficientes, como fungicidas e bactericidas, liberados pelo Ministério da agricultura, que possam ser utilizados. Além do mais, a arquitetura e o tamanho da copa das árvores tornariam o uso destes produtos praticamente inviável. Em função disso, os centros de pesquisa relacionados ao tema, se pautam, desde o início da cultura florestal, em tratamentos alternativos para o controle de doenças, baseadas no manejo integrado, como por exemplo, a utilização de medidas silviculturais, a seleção de material genético resistente e, principalmente, o controle biológico, utilizando a seleção de agentes com potencial antagonista ao patógeno, sem causar danos ao hospedeiro.

As principais vantagens do controle biológico pautam-se na não toxicidade dos produtos usados, tanto para quem os manipula como para o meio ambiente. Além disso, o custo total destes produtos é, geralmente, menor e, uma vez aplicados, permanece no ambiente, mesmo na ausência do patógeno, reduzindo a necessidade de aplicações.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo verificar, *in vitro*, a eficiência de fungos com potencial para controle biológico do fungo *Pestalotia* sp., patógeno da noqueira-pecã.

2.2 Objetivos específicos

Testar a eficiência de isolados de *Trichoderma* spp. e produtos comerciais a base de *Trichoderma* spp. no controle de *Pestalotia* sp.

Selecionar fungos presentes na filosfera de noqueira-pecã, com potencial para controle biológico de *Pestalotia* sp.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Nogueira-pecã (*Carya illinoensis*)

A noqueira-pecã (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) é uma espécie da família Juglandaceae com distribuição predominante nas regiões temperadas do hemisfério norte. É árvore de folhas caducas, que pode atingir grande porte, superando os 40 metros de altura, 40 metros de diâmetro de copa e 2 metros de diâmetro de altura do peito (DAP). A longevidade pode superar facilmente os 200 anos, havendo até noqueiras nativas milenares. A noqueira-pecã apresenta flores masculinas e femininas separadas (monóica), sendo a feminina apétala, com um perigônio escamoso, muito insignificante e a flor masculina não tem perigônio, formando amentílios. As folhas são imparipenadas com 9 a 17 folíolos, durando apenas uma estação, que vai de setembro até maio (DIVINUT, 2011). Seu fruto é drupóide seco e normalmente indeiscente, com um único pirênio. Usualmente, origina-se de um ovário ínfero ou semi-ínfero e encontra-se guarnecido por uma estrutura originária do receptáculo chamada cúpula, mas nozes de ovários súperos também existem (GONÇALVES e LORENZI, 2007). Existem mais de 1000 cultivares de noqueira-pecã, que apresentam variação na forma dos frutos, qualidade de noz, arquitetura da árvore e características reprodutivas.

Os principais plantios comerciais no Brasil, especialmente no sul, foram implantados a partir de incentivos governamentais nas décadas de 60 e 70, porém, por um longo período a pecanicultura teve um desestímulo em decorrência das poucas pesquisas contemplando a forma de implantação e condução da cultura frente às condições climáticas da maior parte das regiões brasileiras, fatores que predispõem as plantas ao ataque por patógenos, principalmente fungos, entre outros (ORTIZ e CAMARGO, 2005).

Nos últimos anos, o plantio de noqueira-pecã foi intensificado, principalmente no Rio Grande do Sul, devido a parcerias entre empresas e produtores. As empresas fornecem as mudas, garantindo assim sua qualidade e a compra da produção. As Secretarias da Agricultura de alguns municípios oferecem incentivos para a compra de mudas e a formação de novos povoamentos, além da assistência técnica prestada pela Associação Riograndense de Empreendimentos de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER – RS) (RÁDIO MERIDIONAL LTDA, 2008). Segundo os técnicos da EMATER - RS, os principais cultivares comerciais de noqueira-pecã existentes no Brasil são oriundos dos Estados Unidos e os mais importantes são Mahan, Frotscher, Schley, Success e Moneymaker Barrton, Shawnee,

Cape Fear, Chickasaw e Choctaw, Desirable, Melhorada, Burkett, Chpecear, Shoshone, além de mudas oriundas de pés-franco.

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011), a área plantada no Rio Grande do Sul em 2009, era de 1.413 hectares, concentrado principalmente no vale do Rio Pardo e Vale do Taquari. Somente no município de Cachoeira do Sul, o maior produtor do estado, o valor da produção no mesmo ano chegou a 322 mil reais. Outros estados também são produtores de noz-pecã, só que em menor escala, como São Paulo (697 ha), Paraná (243 ha), Santa Catarina (5 ha) e Minas Gerais (1 ha).

3.2 *Pestalotia* spp.

Na literatura há divergência quanto a classificação de *Pestalotia* a nível de gênero, sendo frequentemente relatada como *Pestalotiopsis* ou então *Pestalotia* como sinônimo de *Pestalotiopsis*. Em função disso, a classificação em nível de espécie se torna difícil e muitos trabalhos publicados podem conter equívocos (KRUSCHEWSKY, 2010).

Colônias de *Pestalotia* sp., isoladas de de noqueira-pecã, analisados por Lazarotto (2011) apresentaram as seguintes características: os conídios são formados por septos transversais, sendo três secções intermediárias escuras e uma em cada extremidade de cor hialina. Em uma das extremidades, nota-se ainda dois a três apêndices filiformes. Inicialmente, o micélio cresce rapidamente em meio batata-dextrose-ágar (BDA), nos primeiros dias do isolamento, apresenta hifas brancas de aspecto cotonoso, logo após alguns dias a esporulação ocorre intensamente com o aparecimento de pontuações negras líquidas.

Pestalotiopsis spp. foram encontradas em várias espécies florestais, como em *Eucalyptus* spp. causando manchas-foliares em forma de lesões necróticas em folhas e hastes de estacas e miniestacas (ALFENAS et al., 2009); Ueno (2008) relata que o patógeno causa mancha-foliar caracterizada pelo aparecimento de pequenas lesões necróticas nas folhas e frutos de amoreira-preta. Sua disseminação é feita, principalmente, pelo vento, insetos e respingos de chuva. Keith et al. (2006), encontraram várias espécies de *Pestalotia*, associadas a manchas foliares e verrugoses em frutos de goiabeira (*Psidium guajava*) no Hawaii. Espinoza e Briceño (2008) encontraram *Pestalotiopsis clavispora*, *P. neglecta* e *Truncatella* (= *Pestalotia*) *angustata* associadas a sintomas de cancos e a morte de plantas de mirtilo (*Vaccinium* spp.) no Chile, sendo comprovada a patogenicidade dos isolados das espécies citadas. Akrofi e Amoah (2009), relataram que *Pestalotia* spp. foi o agente patogênico responsável pelos sintomas de manchas foliares em carité (*Vitellaria paradoxa*) em Ghana, no

continente africano. Rosa e Cavalcanti (2005) verificaram a ocorrência de queda de folíolos causada por *Pestalotiopsis* sp. em *Parkia pendula*.

3.3 Controle biológico de doenças

O uso intensivo de agrotóxicos para o controle de doenças, pragas e plantas invasoras na agricultura, tem, reconhecidamente, promovido diversos problemas de ordem ambiental, como a contaminação dos alimentos, do solo, da água e dos animais; a intoxicação de agricultores; a resistência de patógenos, de pragas e de plantas invasoras a certos princípios ativos dos agrotóxicos; o surgimento de doenças iatrogênicas (as que ocorrem devido ao uso de agrotóxicos); o desequilíbrio biológico, alterando a ciclagem de nutrientes e da matéria orgânica; a eliminação de organismos benéficos e a redução da biodiversidade, entre outros. Por outro lado, a proteção de plantas por meio do uso de agrotóxicos, apresenta características atraentes, como a praticidade, a previsibilidade e a necessidade de pouco entendimento dos processos básicos do agroecossistema para a sua aplicação (BETTIOL e GHINI, 2003).

Entretanto, a preocupação da sociedade com o impacto da agricultura no ambiente e a contaminação da cadeia alimentar com agrotóxicos está alterando o cenário agrícola, resultando em mercados de alimentos produzidos sem a utilização de agrotóxicos ou aqueles com selos que garantem que os agrotóxicos foram utilizados adequadamente. Esses aspectos estão fazendo com que a situação do uso dos agrotóxicos permeie a agenda ambiental de diversos países. Dentre as alternativas para a redução do uso de agrotóxicos o controle biológico é um dos mais discutidos, podendo tanto aproveitar o controle biológico natural quanto realizar a introdução de um agente de controle biológico (BETTIOL e MORANDI, 2009).

No contexto do controle biológico, doença é o resultado de uma interação entre hospedeiro, patógeno e diversos não patógenos que também habitam o sítio de infecção e que apresentam potencial para limitar a atividade do patógeno ou aumentar a resistência do hospedeiro. No caso de patógenos foliares, estes coexistem com muitos outros organismos habitantes do filoplano (superfície foliar). Os micro-organismos epifíticos, habitantes das superfícies dos órgãos das plantas, agem como tampão biológico, prevenindo o patógeno de infectar o hospedeiro. Deste modo, conclui-se que o controle biológico ocorre naturalmente (BETTIOL, 1991). Porém, este equilíbrio da população microbiana na superfície foliar, pode ser alterado devido à ação de alguns fatores tais como poluição, aplicação de agrotóxicos,

fitohormônios e fertilizantes. Assim a ocorrência de doenças em plantas sinalizam um desequilíbrio biológico (GRIGOLETTI JÚNIOR; SANTOS; AUER, 2000).

O controle biológico de patógenos de plantas possui uma série de vantagens em relação aos pesticidas convencionais. Enquanto os fungicidas têm somente um efeito temporário e usualmente necessitando de repetidas aplicações durante o período de crescimento da cultura, os agentes de controle biológico são capazes de se estabelecer, colonizar e de se reproduzirem no ecossistema. Devido ao baixo custo, são também importantes no contexto da agricultura familiar, onde a escassez de recursos impossibilita a utilização de alta tecnologia (ÁVILA et al., 2005). Entretanto, o aspecto mais importante a ser considerado, é que esses agentes biológicos constituem alternativa viável para diminuir o potencial de inóculo de patógenos habitantes do solo, sem trazer danos ao meio ambiente (MELLO et al., 2007).

O controle biológico baseia-se na relação antagonica entre microrganismos e fitopatógenos, podendo ser caracterizado por diferentes modos de atuação: antibiose, predação, indução de resistência da planta hospedeira, micoparasitismo, produção de enzimas e toxinas, colonização sistêmica da planta hospedeira, competição de nutrientes e sítios de colonização e liberação de enzimas hidrolíticas que atuam na degradação da parede celular (BETTIOL, 1991; MELO e AZEVEDO, 1998 apud FIGUEIREDO, 2006).

A maneira usual de controlar biologicamente um patógeno do filoplano é através da introdução de antagonistas na folha. Além disso, as chances de obtenção de micro-organismos efetivamente antagonicos aumentam com isolamentos no próprio ambiente onde os antagonistas serão utilizados (BETTIOL e GHINI, 1995).

A introdução de antagonistas adaptados ao microhabitat do patógeno é um aspecto relevante para muitos sistemas planta-patógeno. No entanto, com algumas exceções, antagonistas podem ser introduzidos em outro ambiente diferente daquele onde foram isolados, estabelecerem-se e parasitarem o patógeno. O sucesso do biocontrole, no entanto, dependerá da natureza das propriedades antagonistas e mecanismos de ação do hiperparasita. Muitos fungos e bactérias inibem fitopatógenos pela competição por nutrientes, pelo parasitismo direto e pela produção de metabólitos secundários (enzimas líticas e antibióticos), indução de resistência, entre outros (MELO, 1998; HOWELL, 2003).

3.4 *Trichoderma* spp. como controlador biológico

O gênero *Trichoderma* é formado por um grande número de espécies que atuam como agentes de controle biológico (ACBs) e cujas propriedades antagônicas se baseiam na ativação de mecanismos muito diversos. As espécies de *Trichoderma* podem exercer o biocontrole de fungos fitopatogênicos indiretamente, competindo por espaço e nutrientes, modificando as condições ambientais, estimulando o crescimento das plantas e seus mecanismos de defesa ou produzindo antibióticos, ou diretamente mediante o micoparasitismo. Estes mecanismos podem atuar de forma coordenada e sua importância nos processos de biocontrole depende da espécie de *Trichoderma*, do fungo a que antagoniza, do tipo de cultivo e das condições ambientais tais como disponibilidade de nutrientes, pH do solo, temperatura ou concentração de ferro (BENÍTEZ et al., 2004).

Este gênero possui distribuição bastante ampla, ocorrendo no mundo inteiro, em quase todos os tipos de solos e outros habitats naturais, especialmente naqueles que contém ou consistem de matéria orgânica. Por tratar-se de um micoparasita necrotrófico, apresenta grande eficácia no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos (MELLO et al., 2007).

De acordo com Benítez et al., 2004, o sucesso de variedades de *Trichoderma* no controle biológico é devido à sua alta capacidade de reprodução, habilidade de sobreviver em condições desfavoráveis, eficiência na utilização de nutrientes, capacidade de modificar a rizosfera, ser fortemente agressivo a fungos fitopatogênicos, estimularem o crescimento e mecanismos de defesa das plantas. Junto com a síntese ou estimulação de fitohormônios indutores de crescimento, alguns isolados de *Trichoderma* acidificam o ambiente à sua volta por secreção de ácidos orgânicos resultantes do metabolismo de compostos carbônicos, principalmente glicose, sendo capazes de solubilizar fosfatos e micronutrientes (CARVALHO FILHO, 2008).

Algumas linhagens desses fungos vêm recebendo grande atenção por parte da pesquisa, por sua versatilidade de ação. Estas são capazes de produzir enzimas que degradam paredes celulares de outros fungos e produzem também substâncias antifúngicas (antibióticos), apresentam diversidade de estratégias de sobrevivência que as tornam altamente competitivas no ambiente e extraordinária capacidade de proliferação na rizosfera (MELO, 1996; RESENDE et al., 2004 apud LOUZADA, 2009). A maioria dos isolados de *Trichoderma* produzem metabólitos tóxicos voláteis e não voláteis, os quais atuam na supressão da colonização do organismo atingido. Dentre esses metabólitos, são conhecidos:

ácido harziânico, alamethicinas, tricholina, antibióticos, glisopreninas, ácido heptelídico, gliovirina, viridina e massoilactona (BENÍTEZ et al., 2004).

A literatura disponível enfatiza que os fungos desse gênero possuem amplas possibilidades para aplicação, tanto no biocontrole de patógenos foliares, quanto no de patógenos radiculares (LOUZADA, 2009).

Em fumo, o tombamento causado pelos fungos de solo *Pythium* sp., *Sclerotinia* sp. e *Rhizoctonia* sp. é muito importante nas áreas de cultivo no sul do País. Esses fungos podem ser controlados com produtos biológicos à base de *Trichoderma*. As doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* e *F. solani*, são de grande importância para as culturas de feijão, soja, algodão e milho cultivados no sistema irrigado. Para esses, o controle por meio de fungicidas tem eficiência baixa. Os produtos à base de *Trichoderma* têm uma boa eficiência e são de fácil aplicação, pois podem ser aplicados na água da irrigação ou inoculados nas sementes, e o custo é de aproximadamente, um terço do custo dos fungicidas (MORANDI et al., 2005).

Menezes (2007), testando a introdução de diferentes isolados de *Trichoderma* spp. no substrato para biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*, causador de murcha-vascular em crisântemo, alcançou 100% de controle com o isolado de *Trichoderma* spp. UFSMT15.1. Ethur (2006) observou que a adição de *Trichoderma harzianum* em substrato cultivado com tomateiro e pepineiro reduziu a população de *Fusarium oxysporum* e *F. solani* e foi eficiente na redução da fusariose dessas culturas, além de influenciar no aumento e no estabelecimento da densidade populacional de *Trichoderma* spp. na rizosfera durante o ciclo das culturas.

Em cacauzeiros, *Trichoderma stromaticum* promoveu redução expressiva na produção de basidiomas de *Crinipellis pernicioso*, fungo causador da doença vassoura-de-bruxa. Essa redução foi de 99,7% no número de basidiomas em vassouras deixadas em serrapilheiras e de 56,6% em vassouras penduradas nas copas dos cacauzeiros (COSTA et al., 1998; BASTOS, 2000 apud BASTOS, 2009). Isolados de *Trichoderma* spp. utilizados por Bonfim (2007) para controle de *R. stolonifer*, agente causador da podridão-floral de maracujazeiro-amarelo, mostraram-se eficientes, elevando a porcentagem de pegamento dos frutos para 75%.

Através da técnica de pareamento de culturas, Poletto (2010) observou a eficiência de isolados de *Trichoderma* spp. no biocontrole de *Fusarium* spp., fungo associado à podridão-de-raízes em erva-mate. Ávila et al., (2005) avaliando o efeito antagonista de isolados de *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotium rolfsii* em plantas de soja e feijão, observaram redução na doença de 75% a 100%, obtendo assim, maiores porcentagens de plantas sobreviventes.

Segundo Melo (1998), as chances de sucesso no controle biológico, entre outros fatores, estão fundamentadas na escolha do patossistema apropriado e na escolha acertada do agente de biocontrole para as condições em que a doença é prevalecente.

3.5 Seleção de organismos antagonistas na folha

Os microorganismos presentes na microflora epifítica das plantas são compostos de microorganismos residentes e transeuntes ou causadores de doenças (fitopatogênicos). Estes microorganismos, presentes na filosfera, consistem basicamente de bactérias, fungos filamentosos e leveduras, sendo intensas as interações entre eles como competição por nutrientes, antibiose e parasitismo (BETTIOL et al. 1991).

Os estudos dos endofíticos em plantas tropicais têm recebido ultimamente muita atenção, possivelmente pela diversidade, pelo excelente potencial de fonte de novos compostos biologicamente ativos e pelos benefícios que podem proporcionar às plantas (PHOTITA et al., 2001). Microrganismos endofíticos são aqueles que passam grande parte do seu ciclo de vida ou seu ciclo por completo, colonizando intra ou intercelularmente os tecidos saudáveis da planta hospedeira, sem causar sintomas de doenças (SOUZA et al., 2010). De acordo com Peixoto-Neto et al. (2002) estes podem se tornar patogênicos aos hospedeiros, em condições de desequilíbrio. Existem casos descritos de proteção indireta, induzida por fungos endofíticos, em que metabólitos produzidos por estes aumentaram a resistência à nematóides entomopatogênicos, que por sua vez deixaram o hospedeiro mais resistente às pragas (KUNKEL et al., 2004).

Para o controle biológico de doenças, as chances de obtenção de agentes antagônicos são maiores, quando os isolamentos são feitos a partir do ambiente onde serão usados. Assim, os originários do filoplano e também endofíticos serão os mais adequados a esse ambiente. Entretanto, antagonistas de outros habitats podem ser empregados com sucesso (BETTIOL e KIMATI, 1989).

A filosfera é um ambiente complexo que sofre variações intermitentes de umidade, temperatura, incidência de radiação, ventilação, composição e quantidade de nutrientes disponíveis (WILSON et al., 1999), o que dificulta o estabelecimento de populações no filoplano. Estes fatores fazem com que, muitas vezes, agentes de biocontrole promissores sejam ineficientes, por serem incapazes de sobreviver ou manter suas populações em alta densidade, o que os impede de exercer suas funções no controle de doenças (LEBEN, 1985).

Desta forma, obter antagonistas com maior capacidade de sobrevivência, pode ser um fator que determine sua efetividade em condições de campo. Além da questão da sobrevivência, um outro fator que pode ser essencial para que um antagonista seja eficaz é o seu estabelecimento no mesmo local que o patógeno, desenvolvendo-se nas mesmas condições ambientais ideais para a ocorrência da doença.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção de *Trichoderma* spp. antagonistas à *Pestalotia* sp.

Para os ensaios experimentais, foram utilizados 15 isolados de *Trichoderma* spp., provenientes de diferentes fontes, como solo, folhas, sementes, raízes, substrato e frutos, depositados na micoteca do Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e isolados de *Pestalotia* sp. Os isolados de *Pestalotia* sp., oriundos de folhas de pomares de noqueira-pecã com a presença da doença. Assim, cada isolado de *Pestalotia* sp. foi confrontado com todos isolados de *Trichoderma* spp.

Para a seleção de *Trichoderma* spp., antagonistas à *Pestalotia* sp., foi utilizado o teste de pareamento de culturas. Para isso, um disco de meio de cultura BDA (10 mm de diâmetro) contendo micélio do patógeno foi colocado a uma distância de 0,5 cm do bordo da placa de Petri, com diâmetro de 9,0 cm. As placas foram incubadas por 48 h a temperatura de 24°C, com fotoperíodo de 12 h. Após esse período, foi colocado um disco de meio de cultura (10 mm de diâmetro) contendo micélio de *Trichoderma* spp. na outra extremidade da placa (ETHUR, 2006). As placas foram incubadas em câmara de crescimento a 24 °C, com fotoperíodo de 12 h, por sete dias. Cada confronto teve quatro placas (repetições). Além dos tratamentos foram confeccionados tratamentos testemunha, somente com *Pestalotia* sp. e somente com *Trichoderma* spp.

Para obtenção dos discos de meio de cultura com os fungos, os isolados foram cultivados em placas de Petri com meio de cultura BDA e incubados a 24°C com fotoperíodo de 12 h por 10 dias (Apêndice 1).

Para avaliação dos testes de pareamento de culturas foi utilizado o modelo de notas de Bell et al. (1982), adaptado por Rodrigues (2010), atribuindo notas que variam de 1 a 7 (Tabela 1).

Tabela 1 - Escala utilizada para o teste de pareamento de culturas.

Notas	Escala de avaliação proposta por Rodrigues (2010)
1	Antagonista cresce por toda a placa de Petri e sobre o disco do patógeno;
2	Antagonista cresce por toda a placa de Petri, porém não se sobrepõe sobre o disco do patógeno;
3	Antagonista cresce sobre 3/4 da placa de Petri;
4	Antagonista cresce sobre 2/3 da placa de Petri;
5	Antagonista e patógeno crescem até a metade da placa de Petri;
6	Patógeno cresce sobre 2/3 da placa de Petri;
7	Patógeno cresce por toda a placa de Petri.

No momento da avaliação, quando as notas foram atribuídas, buscando uma melhor uniformidade nas avaliações, foi utilizado um gabarito sob o fundo das placas, em que foi possível visualizar a olho nu, as notas conforme o crescimento das colônias (Figura 1).

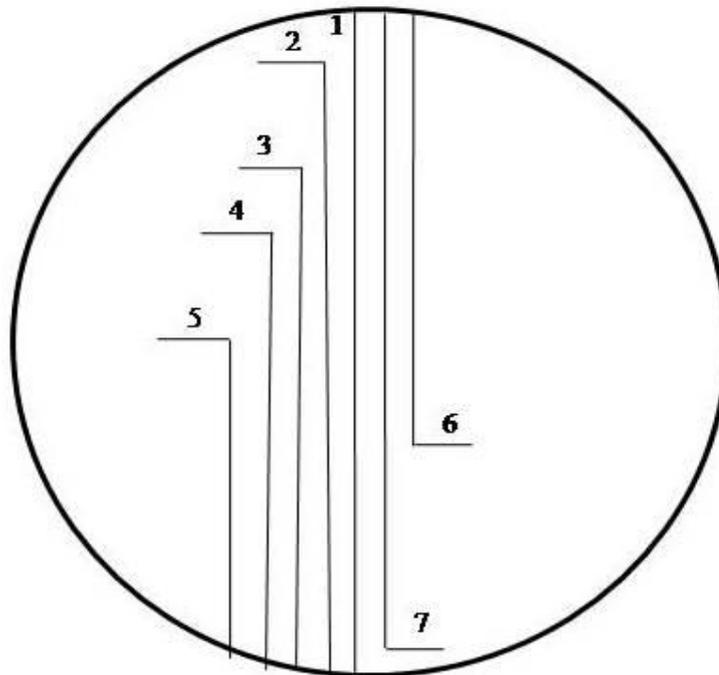


Figura 1 - Gabarito com a escala utilizada para atribuição das notas no teste de pareamento de culturas. Fonte: Rodrigues (2010).

4.2 Seleção de fungos da filosfera de noqueira-pecã com potencial para controle biológico de *Pestalotia* sp.

Para a seleção de fungos da filosfera de noqueira-pecã com potencial para controle biológico de *Pestalotia* sp., foram coletadas folhas da copa de árvores adultas e também folhas caídas no chão em alguns dos municípios produtores de nozes no RS. A coleta foi realizada nos meses de março e abril em Santa, São Gabriel, e Anta Gorda, sendo neste último município feita em quatro propriedades diferentes, denominadas IP, NS, IT, e PT, respectivamente.

As folhas coletadas foram armazenadas em sacos plásticos estéreis, vedados, identificados e imediatamente enviados ao laboratório, onde permaneceram armazenadas em refrigerador (± 4 °C) até sua análise.

Inicialmente, porções de folhas (cerca de 5 folhas) foram processadas em liquidificador juntamente com 500 ml de água destilada. A água foi escoada e a partir desta solução, foi retirada uma alíquota de suspensão e inoculada em quatro placas de Petri (0,5 mL placa⁻¹) contendo meio BDA, suplementado com 4,0 mg de estreptomicina (concentração de 70%)/100 mL de meio. As placas inoculadas foram mantidas em câmara de crescimento por seis dias a 24°C, com fotoperíodo de 12 horas e, após esse período, os fungos presentes foram isolados e identificados, em nível de gênero, pelas observações das placas diretamente no microscópio estereoscópico e com confecção de lâminas para observação em microscópio óptico, com base na bibliografia especializada (BARNETT e HUNTER, 1999; LUZ et al., 2001).

As colônias de fungos isoladas foram purificadas de acordo com a metodologia descrita por Fernandes (1993) e, em seguida, repicadas para tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA, devidamente identificados e armazenados para estudos posteriores.

Para os primeiros testes, foi dada prioridade aos isolados de *Trichoderma* spp., que é um gênero estudado em todo o mundo e eficiente no controle de patógeno. Para testes futuros, serão isolados outros fungos, relatados na literatura com possível potencial para controle biológico.

4.3 Procedimento estatístico

As notas obtidas nos testes de pareamento de culturas foram transformadas para Raiz $(x + k)$ com $k = 0,5$, para aproximação da curva normal. A partir dos dados referentes ao teste de pareamento de culturas foi realizada a análise da variância e, nos casos de significância estatística, foi aplicada a comparação de médias pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. Para estas análises foi utilizado o software estatístico SASM-Agri 3.2.4 (ALTHAUS et al, 2001).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção de *Trichoderma* spp. antagonistas à *Pestalotia* sp.

Nas tabelas 2 e 3, estão apresentados os valores de significância obtidos na análise da variância para os diferentes isolados de *Trichoderma*, confrontados com os isolados de *Pestalotia* Pes e Pes4. Observa-se que o efeito dos tratamentos foi estatisticamente significativo. Os coeficientes de variação apresentaram valores médios (8,67% para Pes e 6,86% para Pes4), indicando boa homogeneidade dos dados.

Tabela 2 - Análise de variância para a média de notas aplicadas aos isolados de *Trichoderma* confrontados com o isolado Pes

Causa da Variação	QM	Fc	Ft
Blocos	0,0273	2,17	2,83
Tratamentos	0,0682	5,42	1,94*
Resíduo	0,0126		
CV%	8,67		

Onde: * = Efeito significativo a 5% de probabilidade de erro; QM = Quadrado médio; Fc = distribuição F calculado; Ft = distribuição F tabelado; CV = coeficiente de variação.

Tabela 3 - Análise de variância para a média de notas aplicadas aos isolados de *Trichoderma* confrontados com o isolado Pes4

Causa da Variação	QM	Fc	Ft
Blocos	0,0444	3,77	2,83
Tratamentos	0,8525	72,33	1,94*
Resíduo	0,0118		
CV%	6,86		

Onde: * = Efeito significativo a 5% de probabilidade de erro; QM = Quadrado médio; Fc = distribuição F calculado; Ft = distribuição F tabelado; CV = coeficiente de variação.

A partir dos 15 isolados de *Trichoderma* foram obtidas testemunhas, no qual todas obtiveram média igual a 1,00 (cresceram por toda a placa), assim também foi para as duas testemunhas de *Pestalotia* (Figura 2).

Na Tabela 4 são apresentados os valores obtidos para os 15 isolados de *Trichoderma* e a comparação de médias, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Ethur (2006), selecionando isolados de *Trichoderma* spp. pelo teste de confrontação direta, classificou como “eficientes” aqueles que apresentaram notas de 2,0 a 2,5 e “muito eficientes” aqueles com notas de 1,0 a 1,5.

Tabela 4 - Comparação de médias entre os isolados de *Trichoderma* confrontados com os isolados Pes e Pes4 pelo teste de Scott-Knott.

	Pes				Pes4		
	Média t	Média	S-K (5%)		Média t	Média	S-K (5%)
Tri ND-ME	1,22	1,00	c	Tri ND-ME	1,22	1,00	e
Tri AR-OSD	1,22	1,00	c	Tri AR-OSD	1,22	1,00	e
Tri AF-ME	1,22	1,00	c	Tri SRI	1,22	1,00	e
Tri AC-OSD T2	1,22	1,00	c	Tri SP-SFE T1	1,22	1,00	e
Tri SRI	1,22	1,00	c	Tri AM-OSD	1,22	1,00	e
Tri SP-SFE T1	1,22	1,00	c	Tri NS T1	1,22	1,00	e
Tri JD	1,22	1,00	c	Tri LP T1	1,22	1,00	e
Tri AM-OSD	1,22	1,00	c	Tri CG2 T1	1,22	1,00	e
Tri NS T1	1,22	1,00	c	Tri JD	1,31	1,25	e
Tri LP T1	1,22	1,00	c	Tri AC-OSD T2	1,87	3,00	d
Tri CG2 T1	1,22	1,00	c	Tri DC-ME	1,93	3,25	d
Tri AC T1	1,40	1,50	b	Tri AC T1	2,00	3,50	d
Tri SP-OSD T1	1,40	1,50	b	Tri SP-OSD T1	2,12	4,00	c
Tri DC-ME	1,48	1,75	b	Tri AF-ME	2,28	4,75	b
Tri LE T1	1,65	2,25	a	Tri LE T1	2,44	5,50	a

Média t = média transformada, S-K (5%) = Scott-Knott a 5% de probabilidade



Figura 2 - Testemunhas. A = *Trichoderma* (AR-OSD), B = *Trichoderma* (ND-ME), C = *Pestalotia* (Pes), D = *Pestalotia* (Pes4)

Observa-se que o teste de comparação de médias distinguiu os isolados em diferentes grupos, sendo três para o isolado Pes e cinco para o isolado Pes4. Para Pes, todos os isolados de *Trichoderma* foram relativamente eficazes ao impedir o desenvolvimento do patógeno. Pode-se observar que dos 15 isolados 11 (ND-ME, AR-OSD, AF-ME, AC-OSD T2, SRI, SP-SFE T1, JD, AM-OSD, NS T1, LP T1 e CG2 T1), obtiveram média 1,00 (Figura 3 A), sendo considerados muito eficientes, seguindo dos demais com média de 1,50 até 2,25, sendo considerados eficientes.

Para o isolado Pes4, houve uma redução, na eficiência dos isolados de *Trichoderma*. Oito dos quinze isolados (ND-ME, AR-OSD, SRI, SP-SFE T1, AM-OSD, NS T1, LP T1 e CG2 T1) em confronto com Pes4 obtiveram a melhor média (1,00) (Figura 3 B), e o isolado JD se também apresentou uma boa média (1,25), mas houve uma maior variação de notas chegando até 5,50 para o menos eficiente (LE T1).

Além disso, foram observadas características como: agressividade do antagonista (Tri JD x Pes, CG2 x Pes) que pode ser visto devido o elevado crescimento de esporodóquios (estrutura em forma de “árvore”, onde ocorre o crescimento de esporos), sobre o micélio do patógeno (Apêndice 2); produção de metabólitos (Tri AF-ME x Pes, Tri AC-OSD T2 x Pes, Tri AC T1 x Pes, Tri AC T1 x Pes4), podendo ser verificada a partir da coloração amarelada do meio (Apêndice 3); no confronto Tri AF-ME x Pes4, uma das quatro repetições teve nota 7, ou seja, o crescimento do patógeno por toda a placa de Petri (Apêndice 4).

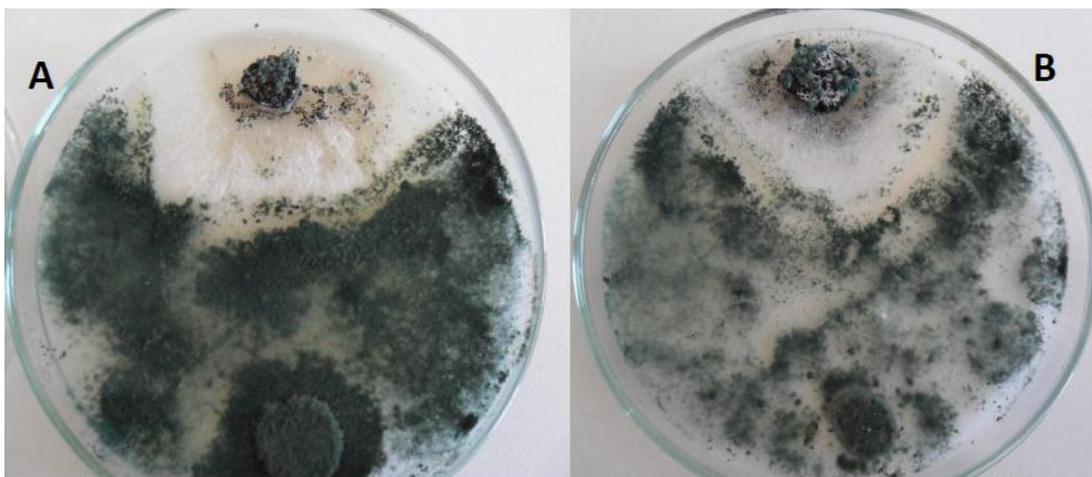


Figura 3 - Confrontos com nota 1 (melhor nota). A = *Trichoderma* (ND-ME) x *Pestalotia* (Pes), B = *Trichoderma* (ND-ME) x *Pestalotia* (Pes4)

Carvalho Filho et al. (2008), utilizando o método de pareamento de culturas em meio BDA, de 12 isolados de *Trichoderma* spp. contra *Cylindrocladium scoparium*, observou que cinco destes apresentaram grau máximo (nota 1) na escala de Bell et al. (1982), reduzindo o crescimento de ambos os isolados do patógeno e esporulando sobre toda a superfície das placas. Além disso, apenas um dos isolados não exerceu atividade antagônica contra os isolados do patógeno nos testes de pareamento de culturas, uma vez que estes avançaram sobre ele e colonizaram a maior superfície do meio.

Santos et al. (2007), após confrontar 20 isolados de *Trichoderma* spp. de diferentes linhagens, com *Cylindrocladium* sp. advindo de viveiros de eucalipto no sul do Brasil, observou que todos os isolados apresentaram alto poder antagônico, mas apenas três desses isolados tiveram poder antagônico próximo a 100%, sendo estes três selecionados para experimentos em casas de vegetação e a campo.

5.2 Seleção de fungos da filosfera de noqueira-pecã com potencial para controle biológico de *Pestalotia* sp.

Na Tabela 5, estão apresentados os gêneros fúngicos encontrados nas folhas de noqueira-pecã para os diferentes locais de coleta. Entre os sete locais de coleta foram encontrados apenas dez gêneros fúngicos, demonstrando que houve a ocorrência dos mesmos gêneros em todos os locais, indicando que pode ocorrer uma preferência por noqueira-pecã.

Observou-se a ocorrência de fungos com potencial fitopatogênico como *Fusarium* sp., *Pestalotia* sp., *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., assim como fungos de potencial antagônico como, *Penicillium* sp., e *Trichoderma* sp. Também foram encontrados fungos cujo gênero possui tanto espécies antagônicas como fitopatogênicas como *Aspergillus* sp. e *Verticillium* sp.

Em um estudo realizado por Luz et al. (2006), em oito amostras de plantas aparentemente saudáveis de maracujazeiro-amarelo, foram obtidos 93 isolados de fungos endofíticos, sendo 45 destes nas folhas, os gêneros mais presentes foram *Fusarium* e *Colletotrichum*.

Tabela 5 - Fungos encontrados na filosfera de nogueira-pecã nos diferentes locais de coleta.

Local de Coleta	Fungos encontrados
Santa Maria (Bairro Camobi)	<i>Alternaria</i> sp.
	<i>Aspergillus</i> sp.
	<i>Cladosporium</i> sp.
	Copa <i>Fusarium</i> sp.
	<i>Penicillium</i> sp.
	<i>Trichoderma</i> sp.
	<i>Verticillium</i> sp.
	<i>Alternaria</i> sp.
	<i>Aspergillus</i> sp.
	Chão <i>Cladosporium</i> sp.
<i>Penicillium</i> sp.	
<i>Rhizopus</i> sp.	
Santa Maria (Campus - UFSM)	<i>Alternaria</i> sp.
	<i>Cladosporium</i> sp.
	Copa <i>Nigrospora</i> sp.
	<i>Penicillium</i> sp.
	<i>Trichoderma</i> sp.
	<i>Verticillium</i> sp.
	<i>Alternaria</i> sp.
	<i>Aspergillus</i> sp.
	Chão <i>Fusarium</i> sp.
	<i>Penicillium</i> sp.
<i>Rhizopus</i> sp.	
São Gabriel (Arborização Urbana)	<i>Alternaria</i> sp.
	Copa <i>Cladosporium</i> sp.
	<i>Pestalotia</i> sp.
	<i>Alternaria</i> sp.
	<i>Cladosporium</i> sp.
	<i>Fusarium</i> sp.
	Chão <i>Penicillium</i> sp.
	<i>Pestalotia</i> sp.
	<i>Rhizopus</i> sp.
	<i>Trichoderma</i> sp.
Anta Gorda (IP)	<i>Alternaria</i> sp.
	<i>Aspergillus</i> sp.
	Copa <i>Cladosporium</i> sp.
	<i>Penicillium</i> sp.
	<i>Rhizopus</i> sp.

continua...

Continuação

Tabela 5 - Fungos encontrados na filosfera de nogueira-pecã nos diferentes locais de coleta.

Anta Gorda (IP)	Chão	<i>Alternaria</i> sp.
		<i>Aspergillus</i> sp.
		<i>Cladosporium</i> sp.
		<i>Fusarium</i> sp.
		<i>Penicillium</i> sp.
		<i>Pestalotia</i> sp.
		<i>Rhizopus</i> sp.
<i>Trichoderma</i> sp.		
		<i>Verticillium</i> sp.
Anta Gorda (NS)	Copa	<i>Alternaria</i> sp.
		<i>Cladosporium</i> sp.
		<i>Fusarium</i> sp.
		<i>Nigrospora</i> sp.
Anta Gorda (NS)	Chão	<i>Alternaria</i> sp.
		<i>Cladosporium</i> sp.
		<i>Penicillium</i> sp.
		<i>Rhizopus</i> sp.
		<i>Verticillium</i> sp.
Anta Gorda (IT)	Copa	<i>Alternaria</i> sp.
		<i>Cladosporium</i> sp.
		<i>Fusarium</i> sp.
		<i>Penicillium</i> sp.
		<i>Rhizopus</i> sp.
		<i>Trichoderma</i> sp.
		<i>Verticillium</i> sp.
Anta Gorda (IT)	Chão	<i>Alternaria</i> sp.
		<i>Cladosporium</i> sp.
		<i>Fusarium</i> sp.
		<i>Nigrospora</i> sp.
		<i>Penicillium</i> sp.
		<i>Pestalotia</i> sp.
		<i>Rhizopus</i> sp.
Anta Gorda (PT)	Copa	<i>Alternaria</i> sp.
		<i>Aspergillus</i> sp.
		<i>Penicillium</i> sp.
		<i>Pestalotia</i> sp.
		<i>Rhizopus</i> sp.
		<i>Trichoderma</i> sp.
		<i>Verticillium</i> sp.

continua...

Continuação

Tabela 5 - Fungos encontrados na filosfera de noqueira-pecã nos diferentes locais de coleta.

Anta Gorda (PT)	Chão	<i>Alternaria</i> sp.
		<i>Cladosporium</i> sp.
		<i>Fusarium</i> sp.
		<i>Nigrospora</i> sp.
		<i>Penicillium</i> sp.
		<i>Pestalotia</i> sp.
		<i>Rhizopus</i> sp.
		<i>Verticillium</i> sp.

Copa = Coletadas na copa da árvore, Chão = Coletadas no chão.

Souza et al. (2010), observaram a frequência de colonização de *Colletotrichum dematium* (56%) e *Colletotrichum gloeosporioides* (44%) em 60 fragmentos de folhas de *Psidium araca* conhecido popularmente como araçá-verdadeiro.

Em estudos utilizando 100 folhas de erva-mate de plantios nativos e 100 folhas de plantios cultivados, Pimentel et al. (2006), isolaram um total de 133 colônias de fungos endofíticos, dentre eles, fungos patogênicos dos gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium* e *Rhizoctonia*, assim como fungos com potencial antagônico como *Trichoderma* e *Verticillium*, encontrados principalmente nos plantios nativos, o que poderia explicar a menor quantidade de pragas e doenças em relação aos plantios cultivados.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados encontrados no teste de pareamento de culturas e na seleção de fungos na filosfera de noqueira-pecã, pode-se concluir que:

- A maioria dos isolados de *Trichoderma* apresentou alta capacidade antagônica.
- Houve uma variação na capacidade antagônica de *Trichoderma* em relação aos dois tipos de *Pestalotia*, havendo uma maior resistência do isolado Pes4 em relação ao isolado Pes.
- Em todos os locais de coleta foi encontrada uma quantidade considerável de fungos com potencial antagônico, bem como fungos com potencial fitopatogênico.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em estudos futuros serão realizados:

- Testes *in vitro*, priorizando os isolados de *Trichoderma*, a partir dos isolados selecionados da filosfera de noqueira-pecã com potencial antagonico.
- Testes *in vivo* em mudas no viveiro com os isolados que apresentarem potencial antagonico *in vitro*, para comprovar sua eficiência como antagonistas.
- Coleta de folhas em um maior número de locais produtores de noqueira-pecã para aumentar as possibilidades de encontrar antagonistas eficientes.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKROFI, A. Y.; AMOAH, F. M. *Pestalotia* spp. causes leaf spot of *Vitellaria paradoxa* in Ghana. **African Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 4, p. 330-333. 2009.

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2 ed. Viçosa: Editora UFV, 2009. 500 p.

ALMEIDA, F. A. et al. Diagnóstico e quantificação de doenças fúngicas da acerola no estado da Paraíba, Lavras, MG. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 173-179. 2003.

ALTHAUS, R. A.; CANTERI, M. G.; GIGLIOTI, E. A. Tecnologia da informação aplicada ao agronegócio e ciências ambientais: sistema para análise e separação de médias pelos métodos de Duncan, Tukey e Scott-Knott, Parte 1. In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10., 2001, Ponta Grossa. **Anais...** Ponta Grossa, 2001. p. 280-281

ÁVILA, Z. R. de et al. **Seleção de Isolados de *Trichoderma ssp.* antagonísticos a *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum***, Brasília: Embrapa recursos genéticos e Biotecnologia, 2005. 30 p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 117).

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4. ed. Minnesota: American Phytopathology Society, 1999. 218 p.

BASTOS, C. N. et al. Ocorrência de *Pestalotiopsis cruenta* em Mangostão, Lavras, MG. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 779. 2001.

BASTOS, C. N. **Controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacaueteiro: passado e presente**. Disponível em: <<http://www.ceplacpa.gov.br/site/wp-content/uploads/2009/08/BT-23-CONTROLE%20BIOLOGICO%20DA%20VB.pdf>>. Acesso em: 07 de fevereiro de 2011.

BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, p. 379-382, 1982.

BENITÉZ T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, p. 249-260, 2004.

BETTIOL, W. Controle biológico de doenças do filoplano. In: BETTIOL, W. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-Cnpda, 1991b. 338 p. (Embrapa-Cnpda. Documentos, 15).

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Eds.) **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 2, p. 717-728.

BETTIOL, W.; KIMATI, H. Seleção de microrganismos antagonísticos à *Pyricularia oryzae* para o controle da brusone do arroz. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 15, n. 3-4, p.257-266, 1989.

BONFIM, M. P. **Antagonismo *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em Maracujazeiro Amarelo.** 2007. 75 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2007.

CARVALHO, A. C. **Bioprospecção de isolados de *Trichoderma stromaticum* para controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauero.** 2006. 82 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2006.

CARVALHO FILHO, M. R. de et al. **Avaliação de isolados de *Trichoderma* no controle da mancha foliar do eucalipto *in vitro* e quanto a esporulação em dois substratos sólidos.** Brasília: Embrapa recursos genéticos e Biotecnologia, 2008. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 225).

CARVALHO FILHO, M. R. de. ***Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole de *Cylindrocladium scoparium* e como promotores de crescimento em mudas de eucalipto.** 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

DIVINUT. **Divinut:** Saúde, sabor e requinte. A noqueira-pecã. Disponível em: <http://www.divinut.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=48&Itemid=58>. Acesso em: 22 de maio de 2011.

ESPINOZA, J. G.; BRACEÑO, E. X. Canker and twig dieback of blueberry caused by *Pestalotiopsis* spp. and a *Truncatella* sp. in Chile. **Plant Disease**, v. 92, n. 10, p. 1407-1414, 2008.

ETHUR, L. Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro.** 2006. 154 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

FERNANDES, M. R. **Manual para Laboratório de Fitopatologia.** Passo Fundo – RS: EMBRAPA – CNPT, 1993. 128 p.

FIGUEIREDO, J. A. G. **Bioprospecção, caracterização morfológica e molecular de endófitos de *Maytenus ilicifolia*, com ênfase em *Pestalotiopsis* spp.** 2006. 152 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

GAMS, W.; BISSET, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: HARMAN, G. & KUBICET, C.P. ***Trichoderma* and *Gliocladium*: Basic Biology, Taxonomy and Genetics**, Taylor & Francis, Londres, p. 3-34, 1998.

GONÇALVES, E. G; LORENZI, H. **Morfologia Vegetal:** Organografia e dicionário ilustrado de Morfologia de Plantas Vasculares. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2007.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SANTOS, A. F. dos.; AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 30, n. 1/2, p. 155-165, 2000.

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

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **O Brasil estado por estado**. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=rs&tema=lavourapermanente2009>>. Acesso em: 28 de jan. de 2011.

KARAKAYA, A. First Report of Infection of Kiwifruit by *Pestalotiopsis* sp. in Turkey. **Plant Disease**, v. 85, n. 9, p. 1028, 2001.

KEITH, L. M.; VELASQUEZ, M. E.; ZEE, F. T. Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava, *Psidium guajava*, in Hawaii. **Plant Disease**, v. 90, n. 1, p 16-23, 2006.

KRUSCHEWSKY, M. C. **Taxonomia e ecologia do gênero *Pestalotiopsis* no Brasil, com ênfase para a Mata Atlântica do sul da Bahia**. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, 2010.

KUNKEL, B. A.; GREWAL, P. S.; QUIGLEY, M. F. A mechanism of acquired resistance against an entomopathogenic nematode by *Agrotis ipsilon* feeding on perennial ryegrass harboring a fungal endophyte, **Biological Control**, San Diego, v. 29, n. 1, p. 100-108, 2004.

LAZAROTTO, M.; et al. First report of *Pestalotiopsis* sp. causing leaf-spots in *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, 2011. (em tramite de publicação).

LOUZADA, G. A. S. et al, **Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani***. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/bn/v9n3/v9n3a14.pdf>>. Acessado em: 07 de fevereiro de 2011.

LUZ, E. D. M. N. et al. **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2001. 754 p.

LUZ, J. S. et al. Atividade Enzimática de Fungos Endofíticos e Efeito na Promoção do Crescimento de Mudanças de Maracujazeiro-Amarelo. **Revista Caatinga**, v. 19, n. 2, p. 128-134, 2006.

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

MELO, I. S. de. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S. de; MELLO, S. C. M. et al, Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc., **Fitosanidad**, v. 11, n. 1, p 3-10, 2007.

MELO, I. S. de. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de. (Eds) **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. p. 17-67.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 4, p. 261-295. 1996.

MENEZES, J. P. **Caracterização populacional e molecular, e seleção de *Trichoderma* spp. para biocontrole de *Fusarium* sp. em crisântemo.** 2007. 133 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W.; GHINI, R. Situação do controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: VENZON, M.; JÚNIOR, T. J. de P.; PALLINI, A. **Controle alternativo de pragas e doenças.** Viçosa: EPAMIG/CTZM/UFV, p. 247-267. 2005.

ORTIZ, E. R. N.; CAMARGO, L. E. A. Doenças da noqueira-pecan (*Carya ilioensis*). In: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas.** 4. ed., São Paulo: Editora Agrônômica Ceres, 2005. p. 501-505.

PEIXOTO-NETO, P. A. S. P. et al. Microrganismos Endofíticos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento.** Brasília, n. 29, p. 62-76, 2002.

PESSOA, L. S. et al. Ocorrência de *Pestalotiopsis palmarum* em *Caryota mitis*. Botucatu, SP. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n.1, 2008.

PHOTITA, W. et al. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. **Mycological Research**, London, v. 105, p. 1508-1513, 2001.

PIMENTEL, I. C. et al. Fungos Endofíticos em folhas de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). **Revista Floresta**, Curitiba - PR, v. 36, n. 1, 2006.

POLETTO, I. **Caracterização e manejo do patossistema erva-mate/podridão-de-raízes.** 2010. 102 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

RÁDIO MERIDIONAL LTDA. Disponível em: <<http://www.radiocachoeira.com.br/default/valor.php?noticia=8170>>. Acesso em 17 de abril de 2010.

RESENDE, M. de L. et al. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento, Lavras, MG. **Ciências Agrotécnicas**, v. 28, n. 4, p. 793-798. 2004.

RIFAI, M. A. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological Papers**, Wallingford, v. 16, p. 1-56, 1969.

RODRIGUES, J. ***Trichoderma* spp. associado a níveis de adubação NPK no patossistema *Sclerotinia sclerotiorum* – feijoeiro.** 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

ROSA, R. C. T.; CAVALCANTI, V. A. L. B. Queda de Folíolos em *Parkia pendula* Causada por *Pestalotiopsis* sp.no Brasil, Lavras, MG. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 6, p. 672-672, 2005.

SANTOS, M. S.; SILVA, G. B.; LUSTOSA, D. C. Avaliação in vitro *Trichoderma* spp. a diferentes isolados fúngicos da região amazônica. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRA, 6.; SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA

AMAZÔNIA ORIENTAL, 12., 2008. **Anais...** Belém: Universidade Federal Rural da Amazônia, 2008.

SANTOS, R. P. dos. et al. **Variabilidade entre isolados de *Trichoderma spp.* quanto à capacidade de inibir o crescimento de *Cylindrocladium sp.* em cultivo pareado.** Brasília: Embrapa recursos genéticos e Biotecnologia, 2007. 10 p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 186).

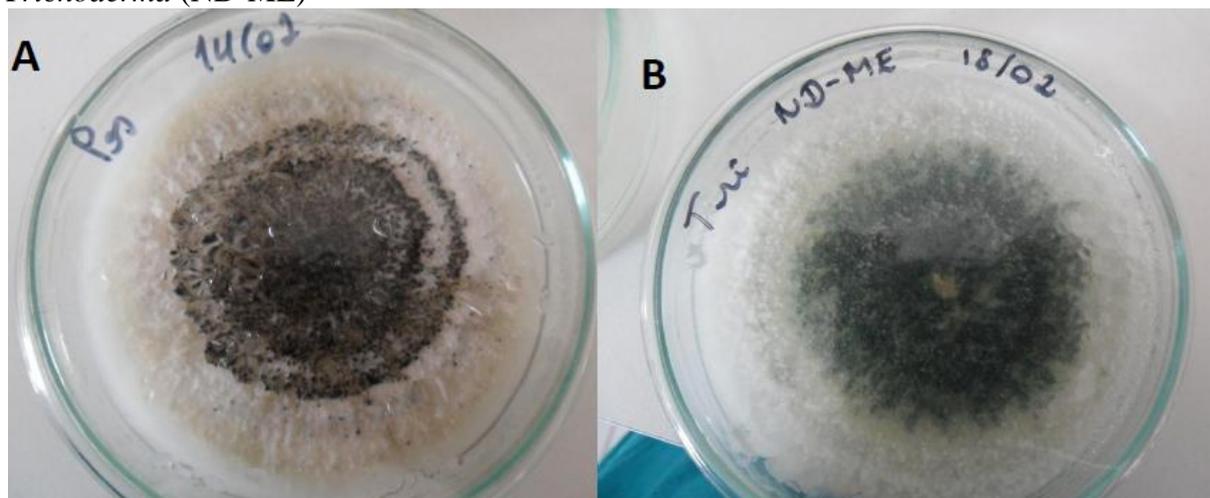
SOUZA, R. M. et al. Fungos Endofíticos de *Psidium araca* Raddi e seu Potencial Antimicrobiano. **62^a Reunião Anual da SBPC**, 2010. Disponível em <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/62ra/resumos/resumos/5832.htm>>. Acesso em 07 de junho de 2011.

UENO, B. Doenças fúngicas. In: ANTUNES, L. E. C. (Ed. Tec.). **Sistema de produção da amoreira-preta.** Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 2008. (Sistemas de Produção, 12).

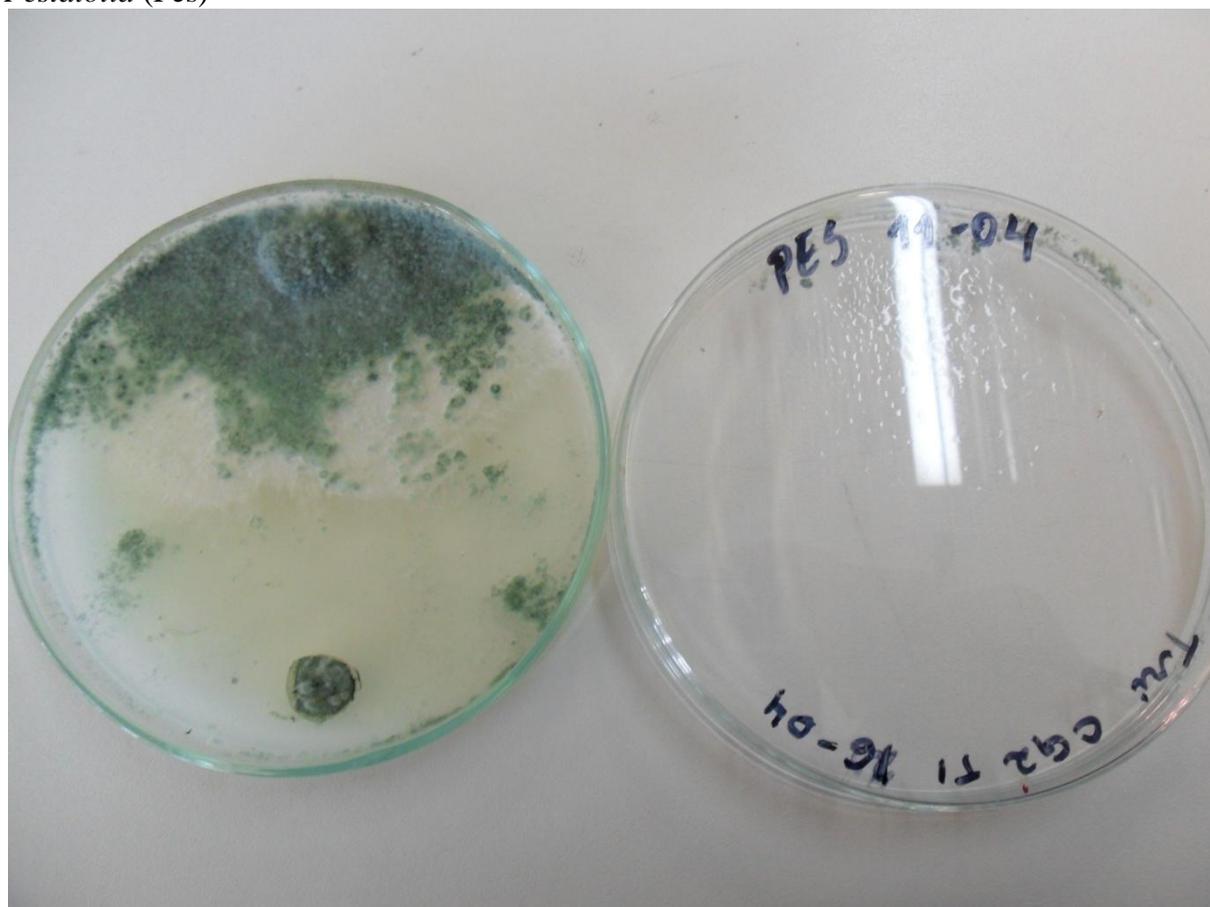
WE, J. G. et al. *Endophytic Pestalotiopsis* species associated with plants of *Podocarpaceae*, *Theaceae* and *Taxaceae* in southern China, **Fungal Diversity**, v. 24, p. 55-74, 2007.

APÊNDICES

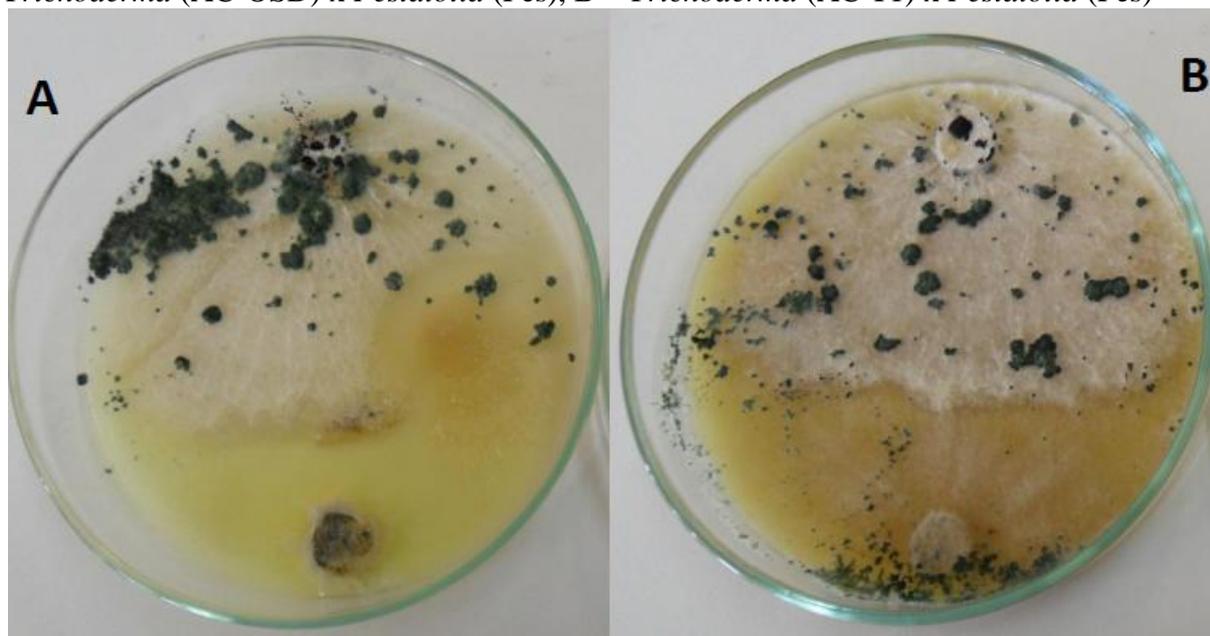
Apêndice 1 – Isolados em placas de Petri no meio BDA. A = *Pestalotia* (Pes), B = *Trichoderma* (ND-ME)



Apêndice 2 – Confronto com alta agressividade do antagonista. *Trichoderma* (GC2 T1) x *Pestalotia* (Pes)



Apêndice 3 – Confronto com alta produção de metabólitos (coloração amarelada). A = *Trichoderma* (AC-OSD) x *Pestalotia* (Pes), B = *Trichoderma* (AC T1) x *Pestalotia* (Pes)



Apêndice 4 – Confronto com nota 7 (menos eficiente), segundo a escala de Bell et al. (1982) adaptado por Rodrigues (2010)). *Trichoderma* (AF-ME) x *Pestalotia* (Pes4)

