

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Tropicó Úmido

Controle biológico de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet agente causal da sigatoka-negra da bananeira (*Musa* spp.) com *Trichoderma* spp.

Poholl Adan Sagratzki Cavero

**Manaus-Amazonas
Fevereiro 2011**

POHOLL ADAN SAGRATZKI CAVERO

Controle biológico de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet agente causal da sigatoka-negra da bananeira (*Musa* spp.) com *Trichoderma* spp.

Orientador : Dr. Rogério Eiji Hanada
Co-orientador : Dr. Luadir Gasparotto

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia ATU/INPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

Manaus-Amazonas
Fevereiro 2011

C379

Cavero, Poholl Adan Sagratzki

Controle biológico de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet agente causal da sigatoka-negra da bananeira (*Musa* spp.) com *Trichoderma* spp / Poholl Adan Sagratzki Cavero. -- Manaus : [s.n.], 2011. viii, 42f. : il. (algumas color.)

Dissertação (Mestrado em Agricultura no Trópico Úmido)--INPA, Manaus, 2011.

Orientador: Dr. Rogério Eiji Hanada

Co-orientador: Dr. Luadir Gasparotto

1. *Mycosphaerella fijiensis* Morelet - Controle biológico. 2. Bananeira - Doenças e pragas. 3. Plantas - Efeito dos fungicidas. 4. *Trichoderma harzianum*. I. Título.

CDD 19ª ed. 634.77294

Sinopse:

Estudou-se o potencial de 29 isolados de *Trichoderma* spp. no controle da sigatoka-negra em condições de campo. Aspectos como severidade, produção de inóculo e sensibilidade a fungicidas foram avaliados.

Palavras chave: antagonistas, produção massal, sensibilidade a fungicidas, *Trichoderma harzianum*

Dedico

**A minha mãe Yolanda Cavero Villacrez pelo incentivo para
realização desse trabalho, amo você.**

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pelo dom da vida e pelas bênçãos derramadas a todo instante.
- Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e ao curso de Agricultura no Trópico Úmido (ATU) pela oportunidade.
- Ao EMBRAPA, pela logística para instalação do experimento.
- A FAPEAM, pelo financiamento da bolsa de estudos no mestrado.
- Ao Dr. Rogério Eiji Hanada, pela valiosa orientação e pelo exemplo de profissionalismo.
- A Dra Rosalee Coelho Neto do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pelo apoio na execução deste trabalho.
- Ao pesquisador Dr. Luadir Gasparotto da Embrapa pelo apoio na execução do trabalho.
- Ao Dr. Alan Pomella pela doação de alguns isolados de *Trichoderma* spp.
- Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido.
- Aos colegas Igor e Everton pela leitura e sugestões da dissertação.
- Aos técnicos da Embrapa: Ricardo e Seabra pelo apoio na execução do trabalho no Campo.
- A minha querida família pelo amor e carinho.
- Ao meu colega e amigo Daniel Lopez Pinto pela sua colaboração e apoio na coleta dos meus dados.
- A todos aqueles que, direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Controle biológico de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal da sigatoka-negra da bananeira (*Musa spp.*) com *Trichoderma spp.*

O principal problema fitossanitário da cultura da bananeira no Brasil e também em outros países é a sigatoka-negra, causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, que pode ocasionar perdas de até 100% da produção. A medida mundialmente mais utilizada no controle deste problema em bananais comerciais têm sido pulverizações com fungicidas. Na Amazônia, o uso de fungicidas para o controle da sigatoka-negra torna-se econômica e ecologicamente inviável, face aos custos e aos impactos ambientais. No intuito de evitar tais problemas, produtos de origem biológica como fungos do gênero *Trichoderma* vêm sendo utilizados no controle de vários fitopatógenos em diversas culturas, ganhando mercado e credibilidade por seus baixos impactos sobre o meio ambiente e à saúde humana. Este trabalho teve como objetivo determinar o potencial de 29 isolados de *Trichoderma spp.* no controle da sigatoka-negra em bananeiras da cultivar Prata Anã em condições de campo. Na seleção de antagonistas, os 29 isolados de *Trichoderma spp.*, cedidas pela Coleção de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), foram testados em plantas da cultivar Prata Anã com dois meses de idade, aparentemente livres da doença, plantadas entre linhas de um cultivo de bananeira altamente infestadas com *M. fijiensis*, localizado na Estação Experimental da Embrapa Amazônia Ocidental em Manaus, AM. Para determinar o potencial dos antagonistas (*Trichoderma spp.*), foi aplicada uma suspensão de 10^7 conídios mL⁻¹ de cada isolado para cada tratamento, pulverizando-se a folha vela e as folhas um, dois e três. As pulverizações foram repetidas a cada dez dias durante um período de três meses. Posteriormente, realizou-se outro experimento com os quatro isolados que apresentaram melhor eficiência de controle, seguindo-se a mesma metodologia. Testes adicionais foram realizados com o antagonista avaliando a produção massal de conídios em substrato de arroz e de compatibilidade deste com os seguintes fungicidas (Clorotalonil, Flutriafol, Oxychloride e Azoxystrobin). Os resultados obtidos em campo indicaram que o isolado 2.047, identificado como *Trichoderma harzianum* Rifai, apresentou potencial no controle da sigatoka-negra quando comparado aos outros isolados e ao tratamento controle, não apresentando diferença estatística com o fungicida (Azoxystrobin), recomendado no controle da doença. Na produção massal de conídios, *T. harzianum* demonstrou ser possível produzi-lo em larga escala por métodos artesanais, sem o uso de técnicas especiais. No teste de sensibilidade, apresentou compatibilidade com todos os fungicidas testados, possibilitando assim sua aplicação em conjunto com esses produtos. Com todas estas prerrogativas, surgem novas perspectivas para o isolado 2.047 ser utilizado como agente controlador da sigatoka-negra da bananeira.

Palavras chave: antagonistas, produção massal, sensibilidade a fungicidas, *Trichoderma harzianum*

ABSTRACT

Biological control of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, causal agent of black sigatoka in banana plants with *Trichoderma* spp.

The black sigatoka disease caused by the fungus *Mycosphaerella fijiensis* Morelet is the main disease problem of banana culture in Brazil and in many other Latin American countries, causing losses that can reach up to 100% of the production. The most widely used measure in the control of black sigatoka in commercial plantations of banana has been the use of sprayed fungicides. In the Amazon region, the use of fungicide to control black sigatoka is economically and ecologically unfeasible due to its cost and its environmental impact. In order to avoid such problems, products of biological origin like fungi of the *Trichoderma* genus, have been used to control plant pathogens in several different cultures, gaining market share and credibility for their low impact on environment and human health. This study aimed to determine the potential of 29 isolates of *Trichoderma* spp. in the control of black sigatoka in the banana cultivar Prata Anã under field conditions. In the selection of antagonists, 29 isolates of *Trichoderma* spp., courtesy of the Collection of Microorganisms of Agroforestry Interest of the National Institute for Amazon Research (INPA), were tested on plants of the cultivar Prata Anã, with two months old, apparently free of the disease and planted between rows of banana plant cultivation highly infested with *M. fijiensis*, located at the Experimental Station of the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA), Manaus, AM. To determine the potential OF THE antagonist (*Trichoderma* spp.) a suspension of 10^7 conidia mL⁻¹ of each isolate was applied for each treatment, by spraying the candle leaf and leaves one, two and three. The spraying was repeated every 10 days during a period of three months. Subsequently, another experiment with the four isolates was carried out, which showed better control efficiency, following the same methodology procedures. Additional tests were conducted with the antagonist to evaluate massal production of conidia on rice substrate and its compatibility with the following fungicides (Clorotalonil, Flutriafol, Oxychloride and Azoxystrobin). The results obtained in the field indicate that the 2.047 isolate, identified as *Trichoderma harzianum* Rifai presented potential to control of black sigatoka, when compared to other isolates and the control treatment, showing no statistical difference with the chemical treatment (Azoxystrobin), recommended to control the disease. In massal production of conidia, it was shown that *T. harzianum* can be produced in large scale by artisanal methods, without any special techniques. In the sensitivity test it showed compatibility with all fungicides, thus enabling its application in conjunction with these products. With all these prerogatives new perspectives can be envisaged for the strain 2.047 to be used as a biocontrol agent of black sigatoka disease in banana plants.

Keywords: antagonists, *Musa* sp., massal production, fungicide sensitivity, *Trichoderma harzianum*

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Bananeira.....	5
2.1.1. Importância econômica.....	5
2.1.2. Exigências edafoclimáticas da bananeira.....	6
2.2. Sigatoka-negra.....	7
2.2.1. Sintomatologia.....	8
2.2.2. Ciclo da doença.....	8
2.2.3. Epidemiologia.....	9
2.2.4. Controle.....	10
2.3. Controle biológico.....	11
2.4. <i>Trichoderma</i> spp. como agente biocontrolador de fitopatógenos.....	11
2.4.1. Mecanismos de biocontrole pelo <i>Trichoderma</i> spp.....	12
2.4.2. Produtos comerciais a base de <i>Trichoderma</i> spp.....	13
3. OBJETIVOS	15
3.1. Objetivo geral.....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1. Obtenção e preservação de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	16
4.2. Preparação do inóculo de <i>Trichoderma</i> spp.....	16
4.3. Seleção de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. com potencial para o biocontrole de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> no campo.....	17
4.4. Avaliação de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. que apresentaram potencial como agente biocontrolador de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> no campo.....	18
4.5. Produção de inóculo do isolado 2.047 em substrato de arroz.....	18
4.6. Estudo da sensibilidade do isolado 2.047 a fungicidas.....	19
4.7. Identificação do antagonista selecionado.....	20
5. RESULTADOS	21
5.1. Seleção dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. para biocontrole de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> no campo.....	22
5.2. Avaliação dos quatro isolados de <i>Trichoderma</i> spp. que apresentaram potencial para biocontrole de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> no campo.....	23
5.3. Produção de inóculo do isolado 2.047 em arroz.....	23
5.4. Compatibilidade do isolado 2.047 com fungicidas.....	25
5.5. Identificação morfológica do isolado 2.047.....	25
6. DISCUSSÃO	26
7. CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1. INTRODUÇÃO

A banana é uma das frutas mais consumidas no Brasil e no mundo. Segundo dados do IBGE (2008), a bananeira (*Musa spp.*) ocupa o segundo lugar no ranking das fruteiras tropicais com um volume de produção de 6,9 milhões de toneladas, perdendo apenas para a cultura da laranjeira com 18,5 milhões de toneladas.

Na região Norte, o Amazonas e o Pará concentram 88% da produção de bananas, sendo o Amazonas o segundo maior produtor. A bananicultura é uma das atividades de maior relevância para o agronegócio da região Norte do Brasil, principalmente para o Estado do Amazonas, onde o consumo per capita gira em torno de 60 kg ano⁻¹. A banana, portanto, faz parte da base alimentar da população amazonense (Gasparotto *et al.*, 2006).

São vários os problemas que afetam a bananicultura da região Norte, que se caracteriza pelo baixo nível técnico empregado nos cultivos, resultando em baixa produtividade e má qualidade dos frutos. Além disso, os problemas fitossanitários relacionados às doenças como sigatoka-negra, mal-do-panamá, moko, nematóides e viroses contribuem, em alguns casos, com grandes perdas na produção (Gasparotto *et al.*, 2010). Sendo a sigatoka-negra causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (fase anamórfica *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton), considerada a doença mais destrutiva da cultura da bananeira no Brasil e em muitos outros países da América latina (Senhor *et al.*, 2009).

No Amazonas, um ano após a constatação da sigatoka-negra nos plantios estabelecidos com cultivares suscetíveis, como Prata, Maçã, Nanica, Prata graúda e o plátano D'Angola, as perdas atingiram cerca de 100% e, em pouco tempo, os plantios foram abandonados (Gasparotto *et al.*, 2006). No estado do Acre no período de 2000/2001, foi constatada uma redução na produção de 42% (Cavalcante *et al.*, 2004) e no município de Caroebe, no estado de Roraima, nas cultivares Pacovan, Prata Comum e Maça houve uma redução de 75% no peso dos cachos (Gasparotto *et al.*, 2006).

As estruturas do patógeno responsáveis pela sua disseminação são os ascósporos e os conídios. Os conídios são formados em condição de alta umidade, principalmente se houver a formação de um filme de água sobre a folha, o que favorece também a sua germinação (Marin *et al.*, 2003). Os conídios podem ser disseminados a longa distância pelo vento, em embalagens usadas no transporte de bananas, pelo caminhão transportador, em mudas

infectadas e até por pessoas (aderidos à roupa), que tenham tido contato direto com cultivos de bananeira infectados (Hanada *et al.*, 2002a).

Pulverização com fungicidas tem sido a medida mais utilizada no controle da sigatoka-negra em bananais comerciais em todo o mundo. No Brasil, segundo, Gasparotto *et al.* (2006), em razão do custo, o uso de fungicida só deve ser implementado em bananais nos quais se adotam altos níveis de tecnologia, com alto retorno econômico.

Na Amazônia, o uso de fungicida para o controle da sigatoka-negra torna-se econômica e ecologicamente inviável, face aos custos e ao impacto ambiental. O controle por meio de cultivares resistentes é, sem dúvida, a estratégia ideal, principalmente em relação a questões ambientais. Porém, na utilização de genes de resistência como estratégia de controle da sigatoka-negra, é necessário levar em consideração os aspectos relativos à perenidade da cultura, a estreita base genética, a extensão da área em que é cultivada e, acima de tudo, presença constante de teleomorfo da *M. fijiensis* nos bananais durante todo o ano agrícola. Assim, o risco de ocorrer um efeito vertifolia aumenta, ou seja, a resistência poderá ser quebrada com isolados capazes de vencer os genes de resistência e, desta forma, a doença desenvolverá mais rapidamente do que em cultivares sem genes de resistência.

Devido à praticidade e a eficiência do controle químico e pelo limitado suporte financeiro disponível, torna-se pouco atrativo o estudo de outros métodos de controle. Porém, o uso contínuo indiscriminado de fungicidas, principalmente sistêmicos, tem desenvolvido raças de *M. fijiensis* menos sensíveis ou resistentes a vários produtos, além de causar contaminação ambiental e danos à saúde humana (Marín *et al.*, 2003). Sem dúvida, estes fatores estão contribuindo para o aumento do interesse de controle alternativo da sigatoka-negra nestas últimas décadas.

As bactérias são os principais microrganismos testados para controle biológico da sigatoka-negra. Jiménez *et al.* (1987) avaliando a atividade de 225 bactérias epifíticas de folha de bananeira contra *M. fijiensis*; destas, 12 se mostraram eficientes *in vitro* e apenas um isolado (*Pseudomonas* sp.) foi eficiente em casa-de-vegetação. Dois isolados de *Serratia marcescens* Bizio apresentaram resultados ligeiramente superiores do que o fungicida propiconazole em casa-de-vegetação e, em condições de campo, apresentaram níveis de controle semelhante aos dos fungicidas propiconazole, tridemorf e mancozebe (González *et al.* 1996a). Outra pesquisa realizada com bactérias por Gonzáles *et al.* (1996b), foi conduzida com isolados capazes de produzir enzimas hidrolíticas, tais como quitinase e glucanase, visando o controle da sigatoka-negra.

Mais recentemente, Arzate *et al.* (2006) determinaram a atividade antagonista, *in vitro* e em casa-de-vegetação, de 25 isolados de *Trichoderma* sobre *M. fijiensis*, sendo que oito isolados apresentaram 45% de inibição do crescimento micelial do patógeno. No Brasil ainda não há trabalho publicado envolvendo o controle biológico de sigatoka-negra.

Existem poucos estudos sobre o controle biológico da sigatoka-negra. Esse método de controle, geralmente é aplicado nos patossistemas onde se constataram problemas com resistência a fungicidas (Harman, 2000). Em especial para região Amazônica, este método pode ser uma alternativa viável para os bananicultores, pois a banana constitui uma parte importante da renda dos pequenos produtores e da alimentação da população e, principalmente, para preservação do meio ambiente.

Os produtos de origem biológica vêm ganhando mercado e credibilidade pelos seus baixos impactos sobre o ambiente e pela segurança à saúde humana. O controle biológico de fitopatógenos pode ser realizado de forma direta, quando os biocontroladores atuam diretamente sobre o patógeno, competindo por espaço e nutrientes na planta hospedeira, ou produzindo compostos antimicrobianos e enzimas que degradam a parede celular de fungos fitopatogênicos (De Cal, 2008). O controle pode ocorrer também de forma indireta, pela indução de resistência sistêmica (Dong *et al.*, 2003) ou por uma resposta da planta ao patógeno (Arnold *et al.*, 2001).

O gênero *Trichoderma* é conhecido pelo seu potencial biotecnológico devido a sua fácil manipulação e cultivo *in vitro*, estabilidade e viabilidade das colônias preservadas e por ser um fungo cosmopolita. Como agente de controle biológico de doenças de plantas, o gênero *Trichoderma* tem sido reconhecido em muitos sistemas agrícolas. Desde 1999, tem sido utilizado Tricovab®, fabricado pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (Ceplac), um biofungicida a base de *Trichoderma stromaticum* Samuels e Pardo-Schultheiss, para controlar vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime e Phillips-Mora) em plantações de cacau no sul da Bahia (Pomella *et al.*, 2007). Em outro estudo, Hanada *et al.* (2008, 2009, 2010) citam *Trichoderma martiale* Samuels como um potencial agente para o biocontrole da podridão-parda do cacaueiro causada pelo fungo *Phytophthora* spp. No Estado do Amazonas, especificamente no laboratório de Fitopatologia da Coordenação de Pesquisas em Ciências Agrárias CPCA/INPA, já em fase de campo, isolados de *Trichoderma* spp. estão sendo avaliados para controlar a podridão de *Sclerotium*, causado por *Sclerotium rolfsii* Sacc., considerado um dos mais importantes patógenos de culturas olerícolas da região (Ferreira *et al.*, 2009).

O presente trabalho teve como objetivo determinar o potencial de 29 isolados de *Trichoderma* spp. no controle da sigatoka-negra em plantas de bananeira da cultivar Prata Anã em condições de campo, e avaliar as características do isolado selecionado como agente de controle biológico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Bananeira

A banana é um fruto de origem asiática que, a partir do século XV, teve seu cultivo e uso culinário introduzidos no continente americano. As bananeiras já existiam no Brasil desde muito antes do descobrimento. A expedição encontrou indígenas comendo bananas de um cultivar muito digestivo que se supõe tratar-se do ‘Branca’ e outro, rico em amido, que precisava ser cozido antes do consumo, chamado de ‘Pacoba’ que pode ser a cultivar D`Angola. A palavra pacoba, em tupi-guarani, significa banana. Com o decorrer do tempo, verificou-se que a cultivar Branca predominava na região litorânea e a D`Angola na Amazônica (Moreira, 1999).

As bananeiras produtoras de frutos comestíveis são plantas da classe Monocotyledonea, ordem Scitaminea, família Musaceae, subfamília Musoideae, gênero *Musa*, Subgênero *Eumusa*, espécies comestíveis *M. acuminata* Colla e *M. balbisiana* Colla, ambas com 11 cromossomos (Simmonds, 1973).

2.1.1. Importância econômica

A cultura da bananeira ocupa o segundo lugar em volume de frutas produzidas no Brasil e a terceira posição em área colhida. Está entre as frutas mais consumidas no País, só sendo superada pela laranja. Consumida em todas as classes sociais, a banana se faz presente na mesa dos brasileiros não apenas como sobremesa, mas como alimento, com um consumo per capita em torno de 25 kg ano⁻¹ (Gasparotto *et al.*, 2010).

A produção brasileira de banana está distribuída por todo o território nacional, sendo a região Nordeste a maior produtora (34%), seguida das regiões Norte (26%), Sudeste (24%), Sul (10%) e Centro-Oeste (6%). A bananeira é uma cultura de importância social, no que se refere à alimentação e renda, pois é considerada uma cultura de subsistência. Os produtores, em sua maioria, apresentam propriedades de pequeno porte com baixa infraestrutura tecnológica. O Brasil em 2007 produziu cerca de 7.098.353 toneladas com um rendimento de 13.773,96 kg há⁻¹ (Gasparotto *et al.*, 2010).

A banana é uma cultura de muita importância para a região Norte do país, pois está relacionada à atividade agrícola de milhares de pequenos agricultores. O Estado do Pará é o maior produtor de banana da região com uma produção em 2007 de 570.951 t e um rendimento de 12.815,38 kg ha⁻¹, sendo o Estado do Amazonas o segundo maior produtor com uma produção em 2007 de 235.242 t e rendimento de 10.794,38 kg ha⁻¹ (Gasparotto *et al.*, 2010).

2.1.2. Exigências edafoclimáticas da bananeira

A bananeira é uma planta adaptada a regiões tropicais, a faixa de temperatura ótima para o desenvolvimento das bananeiras comerciais é de 26 - 28 °C, e inclui quase toda a região Norte do Brasil. Temperaturas inferiores a 17 °C e superiores a 37 °C reduzem a velocidade de desenvolvimento da planta, causando distúrbios fisiológicos (Arruda *et al.*, 2010).

Devido a natureza herbácea da planta, sua ampla superfície folhar e seu rápido crescimento, a bananeira precisa de grandes quantidades de água para o seu adequado desenvolvimento. Dependendo da capacidade de retenção de água do solo, precipitações anuais de 1.200 mm a 2.400 mm são suficientes para o adequado desenvolvimento da cultura (Arruda *et al.*, 2010).

A bananeira requer alta luminosidade durante todo o ano, em razão do seu crescimento contínuo. Pomares de bananeira do grupo Cavendish (Grand Naine, Nanica e Nanicão) quando expostos a muita luminosidade podem ser colhidos com mais precocidade (Guerra *et al.*, 2009). Na região Norte, a luz é abundante durante todo o ano, não sendo um fator limitante ao desenvolvimento do cultivo (Arruda *et al.*, 2010).

O vento é um fator climático importante, podendo causar o fendilhamento de folhas, alongamento do ciclo e tombamento de plantas. Ventos inferiores a 30 km h⁻¹, normalmente, não prejudicam a planta; já ventos superiores a 40 km h⁻¹, causam danos em cultivares de porte alto, e a 70 km h⁻¹, em cultivares de porte baixo. Na Amazônia, fenômenos como “corredores de vento”, que são deslocamentos de ar repentinos e localizados, são relativamente comuns e causam grande destruição (Arruda *et al.*, 2010).

A bananeira pode ser plantada em vários tipos de solos, desde os arenosos até solos muito pesados, com alto teor de argila, no entanto, os mais adequados são os areno-argilosos,

férteis, profundos, ricos em matéria orgânica e em cálcio e magnésio, bem drenados e com boa capacidade de retenção de água (Gasparotto *et al.*, 2010).

2.2. Sigatoka-negra

A sigatoka-negra, mancha negra das folhas ou estria negra é causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, que pertence ao filo Ascomycota, ordem Mycosphaerellales, família Mycosphaerellaceae (Kirk *et al.*; 2008), sendo o seu anamorfo *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton. É o principal problema fitossanitário da bananicultura em todos os países onde a doença foi constatada como por exemplo na América Central, México, Colômbia, Equador e países da África e Ásia (Hinz, 2000).

É conhecida na língua inglesa como black leaf streak e black sigatoka; na espanhola como sigatoka negra, raya negra e rayado negro del platanero e na francesa como cercosporiose noire e maladies desraies noires (Gasparotto *et al.*, 2006).

A sigatoka-negra apresenta uma distribuição geográfica muito ampla, sendo encontrada em praticamente toda a América Central, na América do Sul, na América do Norte, na África, na Ásia e em países da região do Pacífico, como Papua Nova Guiné, Vanatu, Nova Aledônia, entre outros (Stover e Simmonds, 1987; Cavalcante *et al.*, 2004).

Foi identificada pela primeira vez no vale de Sigatoka, em Fiji, em 1963. A sigatoka-negra foi relatada no Hemisfério Ocidental, pela primeira vez em 1972, em Honduras, disseminando-se a partir daí para outros países da América e do Caribe. Na África, sua ocorrência foi registrada em Zâmbia, em 1973, da onde se disseminou para outros países ao sul do Saara (Ploetz, 1999). No Brasil, a sigatoka-negra foi constatada, pela primeira vez, em 1998 no estado do Amazonas (Pereira *et al.*, 1998) e rapidamente disseminou-se para os estados das regiões Norte, Sul, Sudeste e Centro-Oeste, exceto Goiás, Rio de Janeiro, Espírito Santo (Gasparotto *et al.*, 2007).

O patógeno pode infectar outras espécies pertencentes à família Musaceae e recentemente foi constatada infectando *Heliconia psittacorum* L., uma Heliconiaceae (Gasparotto *et al.*, 2005). A doença causa destruição rápida das folhas, afetando o crescimento e a produtividade das plantas, devido ao comprometimento da capacidade fotossintética. As plantas doentes têm a sua produtividade reduzida e a qualidade da fruta é afetada em razão da maturação precoce. Nos países tradicionalmente produtores de banana, a sigatoka-negra modificou drasticamente o sistema de produção e as estratégias de controle, aumentando o

número de pulverizações anuais, tendo os bananicultores de recorrer à utilização de novos princípios ativos e misturas de fungicidas, resultando em incremento no custo de produção (Hinz, 2000).

O patógeno produz ascósporos (esporos produzidos de forma sexuada) e conídios (esporos produzidos assexuadamente), sendo ambos infectivos. Os ascósporos são hialinos bisseriados, gutulados, lisos, retos ou ligeiramente curvados, bicelulares, medindo 11,5-15,5 x 3-5 µm. Os ascósporos são produzidos no interior de pseudotécios, nos quais em condições ambientais favoráveis com elevada umidade, decorrentes de chuva ou orvalho, sofrem pressão interna e são ejetados. Os conídios são hialinos a sub-hialinos de coloração verde-clara, obclavados a cilíndricos obclavados, lisos, retos ou curvos, septados, medem 20-132 x 2,5-5 µm (Gasparotto *et al.*, 2006).

2.2.1. Sintomatologia

Inicialmente são observadas, na face abaxial, via de regra na margem esquerda e próxima à extremidade distal, pequenas pontuações claras ou áreas despigmentadas, essas pontuações progridem dando origem a estrias de coloração marrom-clara, que podem atingir de 2 a 3 mm de comprimento. Com o progresso da doença, essas pequenas estrias se expandem radial e longitudinalmente, ainda com coloração marrom-clara, e já podem ser visualizadas na face adaxial. A partir desse estágio, as estrias só se expandem radialmente e adquirem coloração marrom-escuro na face abaxial, assumindo o formato de manchas irregulares. Estas adquirem coloração negra e coalescem, dando ao limbo foliar uma coloração próxima à negra, justificando o nome atribuído à doença: sigatoka-negra. Nas fases mais avançadas das manchas negras, inicia-se o processo de morte prematura do limbo foliar, a partir das bordas (Gasparotto *et al.*, 2006).

2.2.2. Ciclo da doença

O ciclo da doença se inicia com a germinação dos esporos, que ocorre em até duas horas depois da inoculação, com a emissão de tubos germinativos retos que se ramificam e penetram através dos estômatos em aproximadamente 48 a 72 horas. É preciso água na superfície das folhas para que os esporos germinem e penetrem na planta (Vargas, 1996). A duração do ciclo de vida do patógeno é influenciada pelas condições ambientais e

suscetibilidade do hospedeiro. Os primeiros sintomas podem ser observados de 15 a 20 dias nas bananas verdadeiras e em torno de 29 dias nos plátanos. Quando começam a aparecer os primeiros sintomas, principalmente na face abaxial, a hifa pode crescer intercelularmente, de um estômato para outro, emitindo conidióforos que produzirão conídios, infectando outras folhas da mesma planta ou de outras plantas. Também as hifas podem crescer sobre a folha e penetrar nos estômatos infectando outras áreas do limbo. A formação e liberação dos conídios ocorrem desde o início dos primeiros sintomas visuais (Gasparotto *et al.*, 2006).

A formação dos ascósporos se inicia cerca de três a quatro semanas após o surgimento dos primeiros sintomas; quando a doença já se encontra em fase final, a mancha fica deprimida com coloração cinza-clara e no centro das lesões são observados pontos negros que correspondem aos pseudotécios ou espermagônios (Gasparotto *et al.*, 2006). Os pseudotécios podem liberar os ascósporos a partir dos 49 dias em bananas e de 64 dias nos plátanos após a inoculação (Vargas, 1996).

Os ascósporos atingem as novas folhas, principalmente a folha “vela” ou “bandeira” e as três folhas mais jovens, as quais são as mais suscetíveis ao patógeno. A produção de ascósporos é maior durante a época chuvosa e no período de formação de orvalho (Stover, 1980; Ploetz, 1999; Marin *et al.*, 2003).

2.2.3. Epidemiologia

As condições predisponentes à sigatoka-negra são temperaturas superiores a 21 °C, sendo a temperatura ótima na faixa de 25 a 28 °C, umidade relativa alta e período chuvoso prolongado (Jacome e Schuh, 1992). *Mycosphaerella fijiensis* pode se estabelecer em todas as regiões onde se cultivam plátanos e bananas.

A sigatoka-negra é uma doença policíclica, pois o ciclo de infecção é um processo recorrente capaz de se repetir inúmeras vezes. Tanto conídios como ascósporos podem causar infecção e, por isso, a doença se caracteriza por apresentar um ciclo de infecção assexual e outro sexual (Gasparotto *et al.*, 2006).

Segundo Jacome e Schuh (1993) os conídios e ascósporos são estruturas disseminados principalmente pelo vento, sendo por meio deste depositados nas folhas superiores da bananeira. A forma teleomórfica ou sexuada é considerada a mais importante na disseminação do patógeno (Stover, 1980), em decorrência da alta produção de ascósporos, que pode ser até 100 vezes superior quando comparada à produção de conídios (Vargas, 1996).

Apesar de o vento ser considerado o principal agente de disseminação. Hanada *et al.* (2002a), estudando a sobrevivência de conídios de *M. fijiensis* em diferentes materiais, constataram que os esporos sobrevivem por até 60 dias aderidos a folhas da bananeira e nos tecidos de algodão das roupas dos operários; até 30 dias em papelão, madeira e plástico, usados na confecção de caixas para embalagem dos frutos; até 10 dias em pedaços de ferro; e na casca dos frutos até seu apodrecimento. Estes resultados indicam que os próprios frutos, as embalagens e os veículos que transitam nos bananais afetados, além dos próprios operários, podem disseminar o patógeno a longas distâncias.

2.2.4. Controle

A utilização de cultivares resistentes constitui a estratégia de controle mais econômica e socio-ambientalmente correta, pois é de fácil aplicação, não depende de ações complementares por parte dos bananicultores e é estável do ponto de vista de preservação do meio ambiente.

As cultivares recomendadas pela Embrapa são: Caipira, Thap Maeo, Pacovan, Ken, BRS Caprichosa, BRS Conquista, BRS Garantida, BRS Japira, BRS Vitória, Preciosa, FHIA 01, FHIA 02, FHIA 18, FHIA 20, FHIA 21, Prata Zulu, Pelipita, Figo Cinza e Ouro.

A utilização de produtos químicos no controle da sigatoka-negra é a medida mais adotada em bananais comerciais no mundo todo. Na Amazônia Ocidental e parte da Oriental, o uso de fungicidas é antieconômico e torna-se muito problemático, em face do impacto ambiental. O Amazonas é rico em mananciais e conta com exuberante biodiversidade que poderão ser afetados pelo uso indiscriminado de agrotóxicos. Além disso, os plantios são constituídos por pequenas áreas; a maioria dos produtores não tem tradição no uso de defensivos (Gasparotto *et al.*, 2010).

Os fungicidas avaliados no Campo Experimental da Embrapa Amazônia Ocidental, em Manaus que se mostraram eficientes no controle da sigatoka-negra são: Azoxystrobin, Trifloxystrobin, Pyraclostrobin, Flutriafol, Tetraconazole, Tebuconazole, Propiconazole, Difeconazole, Epoxiconazole, Imibenconazole, Tiofanato Metílico, Bitertanol, Mancozeb e Clorotalonil e as misturas Azoxystrobin + Difeconazole, Pyraclostrobin + Epoxiconazole e Trifloxystrobin + Propiconazole (Gasparotto *et al.*, 2006).

Algumas práticas culturais também são consideradas importantes ferramentas para diminuir a presença de sigatoka-negra, como o controle da drenagem do solo e das plantas

invasoras, para evitar a formação de microclima favorável ao patógeno, plantio em áreas sombreadas, adubação adequada, desfolha fitossanitária e cultivo anual.

2.3. Controle biológico

Visa o controle de pragas e doenças com menor impacto ambiental e com menor risco para o homem, bem como a redução de custos em relação ao emprego de métodos químicos tradicionais (Moraes, 1992).

O controle biológico de fitopatógenos pode ser alcançado por meio de práticas que favorecem antagonistas nativos e também através da introdução de microrganismos selecionados. O sucesso do biocontrole, no entanto, depende da natureza das propriedades e mecanismos de ação do antagonista (Melo, 1998).

Dentre os muitos agentes potenciais de biocontrole, o gênero *Trichoderma* tem sido um dos mais estudados, devido as suas características peculiares de antagonismo em condições naturais, principalmente no solo (Melo, 1991).

2.4. *Trichoderma* spp. como agente biocontrolador de fitopatógenos

O gênero *Trichoderma*, pertencente à Ordem Hypocreales, é representado por fungos não patogênicos que exercem antagonismo a vários fitopatógenos, através do parasitismo antibiose e competição, esses três mecanismos diferem de espécie para espécie (Melo, 1996).

Rifai (1969) descreveu nove agregados de espécies do gênero *Trichoderma*: *T. piluliferum* Webster e Rifai, *T. polysporum* (Link ex Pers.) Rifai, *T. hamatum* (Bom.) Bain, *T. koningii* Oud, *T. aureoviride* Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai, *T. harzianum* Rifai, *T. longibrachiatum* Rifai e *T. viride* Pers. Ex S. F. Gray. Bissett (1984) fez uma revisão do gênero e estabeleceu *Longibrachiatum* como seção do gênero na qual incluía *T. viride*, *T. koningi*, *T. pseudokoningii* e *T. longibrachiatum* e adicionaram duas novas espécies, *T. citrinoviride* Bissett e *T. atroviride* Bissett.

Trichoderma spp. é um micoparásita necrotrófico eficaz no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos, principalmente aqueles com estruturas de resistência consideradas difíceis de serem atacadas por microrganismos, como esporos, escleródios, clamidósporos e microescleródios. *Trichoderma harzianum* tem sido a espécie mais estudada do ponto de vista

de biocontrole, mas outras espécies como *T. koningii*, *T. viride*, *T. hamatum* e *T. pseudokoningii* também têm sido isoladas e estudadas. Sucesso maior com o uso de *Trichoderma* tem sido documentado para patógenos habitantes do solo, como *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Sclerotium rolfsii* Sacc, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Fusarium* spp. e *Phythium* spp. (Melo, 1996). O uso de *Trichoderma* também tem sido efetivo contra patógenos da parte aérea, como *Venturia* spp., *Botrytis* spp. (Lisboa *et al.*, 2007), *M. pernicioso*, agente causal da vassoura-de-bruxa do cacau em (Sanogo *et al.*, 2002). No controle de muitas doenças de plantas pode-se usar uma espécie de *Trichoderma*, ou uma combinação entre outras espécies do mesmo gênero (Ozby e Newman, 2004).

Várias formas de ação estão associados com a efetividade dos *Trichoderma* spp. para controlar doenças, como na forma direta através da antibiose, competição pelos nutrientes e espaço físico, micoparasitismo e inativação das enzimas do fitopatógeno e indireta através da indução de resistência e tolerância ao estresse.

2.4.1. Mecanismos de biocontrole pelo *Trichoderma* spp.

O gênero *Trichoderma* engloba várias espécies que podem atuar como agentes de biocontrole utilizando diversos mecanismos nas suas propriedades antagônicas:

Antibiose: muitas espécies já estudadas possuem a capacidade de produzir metabólitos secundários, tais como antibióticos antifúngicos como as pironas, isocianatos, tricotecenos, dentre outros (Schirmbock *et al.*, 1994) capazes de inibir e destruir propágulos de fungos fitopatogênicos.

Competição: a competição representa uma relação negativa entre duas populações, em que ambas são adversamente afetadas com respeito à sobrevivência e ao crescimento. A competição ocorre entre microrganismos, quando espaço ou nutrientes são limitantes (Melo, 1998). Microrganismos que têm capacidade de competir por sítios de infecção e usar nutrientes disponíveis podem deslocar o patógeno por impedir a germinação de propágulos ou a infecção (Punja e Utkhede, 2003).

Micoparasitismo: este mecanismo consiste na utilização do fitopatógeno como alimento por seu antagonista, *Trichoderma* spp. pode detectar e localizar hifas de fungos suscetíveis, crescendo em sua direção, presumivelmente em resposta a estímulos químicos produzidos pela hifa hospedeira, geralmente enrolando-se fortemente em toda sua extensão, para depois haver, então, penetração e destruição da hifa (Melo, 1996).

Muitas espécies de *Trichoderma* têm capacidade de produção de diversas enzimas líticas, como por exemplo, celulasas, hemicelulasas, glucanases, tanto extra como intracelularmente, conferindo-lhes uma excelente capacidade de degradação de celulose e, conseqüentemente, a degradação de paredes celulares de fungos. É muito provável, pois, que o micoparasitismo seja o resultado da ação isolada ou conjunta de enzimas líticas capazes de digerir a parede celular do patógeno (Melo, 1998).

Inativação das enzimas do fitopatógeno: as enzimas de alguns fitopatógenos são responsáveis pela hidrólise dos componentes pécticos da parede celular das plantas. Quando presente, *T. harzianum* secreta proteases sobre a superfície da planta que inibem a ação das enzimas hidrolíticas dos fitopatógenos (Elad *et al.*, 1999).

Indução de resistência: quando *Trichoderma* spp. entra em contato com a planta, esta ativa o seu sistema de defesa, fundamentalmente por indução do sistema enzimático oxidativo, preparando-a aos possíveis ataques de patógenos (Melo, 1998).

Os mecanismos de ação anteriormente expostos podem atuar isoladamente ou de forma sinérgica no controle de patógenos. A importância relativa de cada um deles depende do sistema antagonista-patógeno, já que nem todos isolados de *Trichoderma* apresentam a mesma capacidade antagonica frente a um patógeno determinado.

2.4.2. Produtos comerciais a base de *Trichoderma* spp.

O gênero *Trichoderma* agrupa diversas espécies e cada uma delas apresenta uma afinidade diferente para determinados fungos fitopatógenos e, de igual forma, requerem diferentes condições ambientais.

Vários são os produtos formulados a partir de *Trichoderma* spp. registrados, ainda em fase de registro ou estudo no Brasil e em outros países. Os mais conhecidos e comercializados no Brasil são: Trichodermil (Itaforte BioProdutos, Adamantina, SP), contra vários fungos habitantes do solo; Biotrich (Biovale Produtos Agropecuários Ltda, Venancio Aires, RS), com ação preventiva contra os gêneros *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Phytium*, *Phomopsis* e *Rosilinia*; Biomix (Terraviva Ind. e Com. de Insumos Orgânicos, Cotia, SP) utilizado para o controle de Oídio, *Uncinula necator*, em videira; Tricovab (fabricado pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira CEPLAC, BA), controla *M. perniciosa*, agente etiológico da vassoura-de-bruxa em cacau ou entre outros (Lucon, 2008).

Em relação ao controle de *M. fijiensis* utilizando *Trichoderma* spp. existem apenas estudos preliminares. Arzate *et al.* (2006) selecionaram dois isolados de *Trichoderma* (J7 e J11) em casa-de-vegetação que inibiram o desenvolvimento de *M. fijiensis* em mudas de bananeira da cultivar Valery, mencionado que esses isolados apresentam potencial antagônico e recomenda fazer avaliações em condições de campo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial dos isolados de *Trichoderma* spp. no controle da sigatoka-negra da bananeira em condições de campo.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Selecionar isolados de *Trichoderma* spp. com potencial de controlar a sigatoka-negra da bananeira em um plantio experimental em condições de campo.
- 2) Avaliar as características do isolado selecionado como agente de controle biológico.
- 3) Identificar o isolado selecionado

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Fitopatologia da Coordenação de Pesquisas em Ciências Agronômicas (CPCA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e na Estação Experimental da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM.

4.1. Obtenção e preservação de isolados de *Trichoderma* spp.

Os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados neste trabalho foram obtidos da Coleção de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), depositados no Laboratório de Fitopatologia da Coordenação de Pesquisas em Ciências Agronômicas (CPCA)

Foram selecionados 50 isolados para serem cultivados em placas de Petri contendo meio de Batata-Dextrose-Agar (BDA) por um período de 10 dias a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 h, para posterior preservação em sílica-gel (Dhingra e Sinclair, 1995). Para cada placa de Petri, colonizada por cada isolado, foram adicionados 10 mL de água esterilizada, para o preparo de uma suspensão de estruturas de fungos em crescimento. Em cada placa contendo a suspensão foram colocados 30 discos de papel filtro esterilizado com 5 mm de diâmetro. Após cinco minutos, os discos de papel filtro umedecidos com esta suspensão foram transferidos para frascos de vidro com capacidade de 10 mL contendo a metade do volume com sílica-gel desidratada.

4.2. Preparação do inóculo de *Trichoderma* spp.

Para obtenção de inóculo dos antagonistas, 29 isolados de *Trichoderma* spp. preservados em sílica-gel, foram incubados em placas de Petri contendo meio de BDA, a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 h, por um período de 10 dias. Após o período de incubação, foi preparada uma suspensão na concentração de 10^7 conídios mL⁻¹, para cada isolado.

4.3. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. com potencial para o biocontrole de *Mycosphaerella fijiensis* no campo.

Para avaliação do potencial dos isolados de *Trichoderma* spp. como biocontroladores de *M. fijiensis* em condições de campo foram utilizadas mudas de bananeira da cultivar Prata Anã, com dois meses de idade, provenientes do viveiro da Embrapa Amazônia Ocidental, aparentemente livres da doença. As mudas foram plantadas entre as linhas em um plantio de bananeira, localizado na mesma estação experimental, altamente infectado com *M. fijiensis*, com distanciamento de 3 m x 1,5 m para favorecer a ocorrência de infecção natural de *M. fijiensis* nas bananeiras.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com cinco repetições, composto de 30 tratamentos, sendo uma testemunha, e 29 isolados de *Trichoderma* spp.

Para determinar o potencial dos antagonistas (*Trichoderma* spp.) foi pulverizada uma suspensão 10^7 conídios mL^{-1} de cada isolado sobre as folhas: vela, um, dois e três. Nas plantas testemunhas foi aplicada apenas água destilada. As pulverizações foram realizadas tanto na face abaxial como na face adaxial e repetidas a cada 10 dias durante um período de três meses. As pulverizações foram feitas a partir das 16 horas.

A severidade da doença na bananeira foi avaliada conforme o método descrito por Gauhl (1990). Que utiliza uma escala de notas que varia de zero a seis, sendo: 0 – sem sintomas; 1 – menor de 1% de lâmina foliar lesionada (presença de no máximo 10 manchas); 2 – de 1 a 5% da lâmina foliar lesionada; 3 – de 6 a 15% da lâmina foliar lesionada; 4 – de 16 a 33% da lâmina foliar lesionada; 5 – de 34 a 50% da lâmina lesionada; 6 – de 51 a 100% da lâmina foliar lesionada.

Para análise estatística, os dados da severidade obtidos na quinta folha aos 60 e 90 dias após a primeira aplicação, foram submetidos à transformação, utilizando a equação angular arco seno raiz quadrada de $X/100$. A comparação da média de severidade da doença dos tratamentos foi feita pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.4. Avaliação de isolados de *Trichoderma* spp. que apresentaram potencial como agente biocontrolador de *Mycosphaerella fijiensis* no campo

Nesta etapa foram utilizados quatro isolados que obtiveram melhores resultados de controle de *M. fijiensis* no primeiro ensaio descrito no item 4.3. Tanto os procedimentos da preparação das bananeiras como as suspensões dos inóculos de *Trichoderma* spp. foram semelhantes ao experimento anterior. A pulverização do antagonista ocorreu tanto na face abaxial como na face adaxial nas folhas: vela, um, dois e três. No entanto, o intervalo de pulverização foi a cada sete dias durante um período de dois meses.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos sendo: uma testemunha, um fungicida (Azoxystrobin) e quatro isolados de *Trichoderma* spp. que apresentaram potencial de biocontrole. Cada tratamento constou de dez repetições, a unidade experimental foi constituída de uma planta. Nas plantas testemunhas foi aplicada apenas água destilada. O fungicida foi aplicado na concentração de 0,25 mL L⁻¹ aplicado da mesma forma que os antagonistas no campo. A severidade da doença na bananeira foi avaliada conforme o método descrito por Gauhl (1990). Para análise estatística, os dados de severidade obtidos na sexta folha, aos 60 dias após a primeira aplicação, foram submetidos à transformação utilizando a equação angular arco seno raiz quadrada de $x + 0,5/100$. A comparação da média de severidade da doença dos tratamentos foi feita pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

4.5. Produção de inóculo do isolado 2.047 em substrato de arroz

Para produção do inóculo do o isolado 2.047 foram utilizados sacos de polipropileno com capacidade de dois quilos contendo 200 gramas de arroz em grão, umedecido com água destilada em diferentes concentrações de acordo com os tratamentos. Os sacos foram vedados com grampos e autoclavados (120 °C durante 25 minutos). Posteriormente, cinco discos de 5 mm de diâmetro contendo crescimento micelial desenvolvido em meio de cultura BDA foram transferidos para cada saco.

Para este ensaio foram utilizados os seguintes tratamentos:

T1 = 200 g de arroz com 30% de água e sacos abertos após três dias

T2 = 200 g de arroz com 30% de água, CaCO₃ (3%) e sacos abertos após três dias

T3 = 200 g de arroz com 50% de água e sacos abertos após três dias.

T4 = 200 g de arroz com 50% de água, CaCO₃ (3%) e sacos abertos após três dias.

T5 = 200 g de arroz com 70% de água e sacos abertos após três dias.

T6 = 200 g de arroz com 70% de água, CaCO₃ (3%) e sacos abertos após três dias.

T7 = 200 g de arroz com 30% de água e sacos fechados.

T8 = 200 g de arroz com 30% de água, CaCO₃ (3%) e sacos fechados.

T9 = 200 g de arroz com 50% de água e sacos fechados.

T10 = 200 g de arroz com 50% de água, CaCO₃ (3%) e sacos fechados.

T11 = 200 g de arroz com 70% de água e sacos fechados.

T12 = 200 g de arroz com 70% de água, CaCO₃ (3%) e sacos fechados.

O delineamento utilizado nesse experimento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 x 3, sendo o primeiro fator representado por sacos fechados ou sacos abertos após três dias; o segundo fator representado pela adição ou não de CaCO₃; o terceiro fator representado pela umidade de 30%, 50% e 70%, com três repetições por tratamento.

A cada dois dias, os substratos foram revolvidos, para quebrar os micélios e aumentar a superfície de contato do fungo com os substratos para a produção mais elevada de conídios (Jackson, 1997).

Após sete dias de incubação quantificou-se a produção de inóculo. Para tanto, foi pesado 1 grama do substrato colonizado com *Trichoderma* sp. e diluído em 50 mL de água destilada. A partir da suspensão de propágulos, foi determinada a quantidade de conídios produzidos com auxílio de uma câmara de Neubauer. De cada saco foram feitas três réplicas e obtida a média.

A comparação das médias dos tratamentos foi feita pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

4.6. Estudo da sensibilidade do isolado 2.047 a fungicidas

Neste experimento foram avaliados os efeitos dos fungicidas: Clorotalonil (1,2 g L⁻¹), Flutriafol (0,075 mL L⁻¹), Oxychloride (1,4 g L⁻¹) e Azoxystrobin (0,25 mL L⁻¹) na germinação conidial do isolado 2.047. Para tanto, suspensões de 10⁷ conídios mL⁻¹ do isolado foram preparadas em soluções com cada um dos fungicidas descritos acima, e em água destilada estéril como controle. Em seguida, alíquotas de 100 µL das suspensões foram semeadas, nos tempos de 0, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos, em placas de Petri contendo meio de BDA, mantidas a 25 °C.

O delineamento utilizado nesse experimento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6 x 6, sendo o primeiro fator representado por seis intervalos de tempo e o segundo fator representado por fungicidas e controle, com três repetições por tratamento.

Para cada tempo de incubação foram feitas três réplicas. Dezesesseis horas após a distribuição das suspensões nas placas, realizaram-se contagens de 100 conídios, com auxílio de um microscópio estereoscópico na objetiva de 40 x, contabilizando conídios germinados e não germinados.

Para análise estatística, dados referentes a porcentagem de germinação foram submetidos à transformação, utilizando a equação angular arco seno raiz quadrada de $X+0,5/100$. A comparação da média dos tratamentos foi feita pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.7. Identificação do antagonista selecionado

O isolado 2.047 que apresentou potencial como agente de biocontrole de *M. fijiensis* foi submetido à identificação a nível de espécie baseada nas características morfológicas. Lâminas semipermanentes foram preparadas a partir das colônias crescidas em placas de Petri, contendo meio de BDA, mantidas a 25 °C, com 7 a 10 dias de repicagem. As mesmas foram observadas sob microscópio de luz, visualizando as estruturas vegetativas e reprodutivas do fungo. Também, foram efetuadas 30 medições das estruturas com auxílio de uma ocular micrométrica.

A descrição da cultura do *Trichoderma* sp. foi feita a partir das colônias cultivadas no meio de BDA. Discos de micélio de 5 mm de diâmetro retirados da periferia da colônia do fungo em crescimento ativo, em meio de BDA foram transferidos para o centro de cinco placas de Petri contendo 20 mL do meio de BDA, cada. Posteriormente, as placas foram mantidas em 25 °C, sob luz branca por 24 horas. O diâmetro das colônias foi medido quando uma delas atingiu a borda da placa. As colônias foram descritas observando-se: a textura, composição, cor, liberação de pigmentos, esporulação, aparência da massa de conídios, produção de setos, presença de zonação diurna, como outras características.

Os aspectos morfológicos e biométricos das estruturas foram comparados com os descritos em chaves taxonômicas, assim como, as comparações das características culturais (Rifai, 1969; Bisset, 1984, 1991).

5. RESULTADOS

Para os testes em campo foram selecionados apenas os isolados que produziram acima de 10^7 conídios mL^{-1} numa placa de Petri de 9 cm, contendo meio de cultura BDA. A concentração de esporos foi determinada utilizando uma câmara de Neubauer numa suspensão de 50 mL de água destilada (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados de *Trichoderma* spp utilizados no experimento.

Isolados	Substrato	Localidade
1.340	Madeira	Manaus - AM
1.351	Solo	Manaus - AM
1.416-1	Solo	Manaus - AM
1.432	Solo	Manaus - AM
1.435	Solo	Manaus - AM
1.439	Solo	Manaus - AM
1.439-B	Desconhecido	Desconhecida
1.572-3	Desconhecido	Desconhecida
1.589-B	Desconhecido	Desconhecida
1.598-B	Desconhecido	Desconhecida
1.599	Solo	Manaus - AM
1.601-B	Solo	Manaus - AM
1.611	Solo	Manaus - AM
2.041	Serragem de madeira	Manaus - AM
2.047	Bagaço da cana-de-açúcar	Manaus - AM
2.048	Serragem de madeira	Manaus - AM
2.109	Desconhecido	Laboratorio de Biocontrole Farroupilha - MG
2.111	Desconhecido	Laboratorio de Biocontrole Farroupilha - MG
2.113	Desconhecido	Laboratorio de Biocontrole Farroupilha - MG
2.114	Desconhecido	Laboratorio de Biocontrole Farroupilha - MG
2.115	Desconhecido	Laboratorio de Biocontrole Farroupilha - MG
2.116	Desconhecido	Laboratorio de Biocontrole Farroupilha - MG
2.117	Desconhecido	Laboratorio de Biocontrole Farroupilha - MG
2.121	Desconhecido	Laboratorio de Biocontrole Farroupilha - MG
2.122	Madeira	Manaus - AM
2.123	Madeira	Manaus - AM
2.124	Madeira	Manaus - AM
2.125	Madeira	Manaus - AM
2.126	Madeira	Manaus - AM

5.1. Seleção dos isolados de *Trichoderma* spp. para biocontrole de *Mycosphaerella fijiensis* no campo

De acordo com os resultados obtidos no teste de média na primeira avaliação, aos 60 dias após a aplicação dos antagonistas, praticamente não houve diferença significativa entre os tratamentos. No entanto, o teste de média para segunda avaliação, aos 90 dias, o tratamento 20, que corresponde o isolado 2.047, apresentou na quinta folha, diferença significativa em relação aos demais tratamentos com uma severidade média de 4,05% (Tabela 2).

Tabela 2. Severidade da sigatoka-negra em bananeiras tratadas com isolados de *Trichoderma* spp.

*Isolados	**Severidade (%)	
	60 dias	90 dias
1.416	21,59 ab	28,04 ab
1.340	23,21 ab	19,96 abc
1.601-B	28,03 ab	29,66 ab
2.113	29,66 ab	31,81 ab
2.041	22,11 ab	31,81 ab
1.611	21,59 ab	25,89 abc
2.122	18,91 ab	27,51 ab
2.116	23,21 ab	27,52 ab
1.435	24,54 ab	25,89 abc
1.439-B	23,21 ab	14,56 abc
2.124	16,98 ab	28,04 ab
2.111	18,02 ab	25,89 abc
2.126	17,81 ab	25,89 abc
2.125	28,84 ab	22,11 abc
1.439	31,81 ab	31,81 ab
1.351	23,74 ab	29,66 ab
2.048	25,36 ab	22,11 abc
1.432	38,25 a	33,96 a
2.117	29,66 ab	31,81 ab
2.047	12,69 b	4,05 c
2.115	20,77 ab	28,03 ab
2.121	21,59 ab	31,81 ab
2.109	27,52 ab	30,18 ab
1.599	15,12 b	11,06 bc
1.572-3	20,77 ab	21,06 abc
1.589-B	22,39 ab	28,83 ab
2.114	23,21 ab	31,81 ab
2.123	25,36 ab	22,11 abc
1.598-B	27,52 ab	31,81 ab
Testemunha	19,42 ab	30,18 ab
CV (%) = 40,39		CV(%) = 35,25

*Tratamentos: T1 – Testemunha (aplicação apenas com água destilada); T2 a T30 (isolados de *Trichoderma*); **Dados da severidade transformados pela equação angular arco seno raiz quadrada $X/100$. ***Médias seguidas de mesma letra, na vertical, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV = Coeficiente de variação.

5.2. Avaliação dos quatro isolados de *Trichoderma* spp. que apresentaram potencial para biocontrole de *Mycosphaerella fijiensis* no campo

No teste de média para avaliação de isolados de *Trichoderma* spp. que apresentaram potencial para biocontrole de *M. fijiensis*, observou-se que a menor severidade da doença foi apresentada quando as plantas foram tratadas com o isolado 2.047 (*Trichoderma harzinum*) quando comparado com os outros isolados, sendo este estatisticamente igual com o tratamento com fungicida e com o isolado 1.340 (Tabela 3).

Tabela 3. Severidade de sigatoka-negra em bananeiras tratadas com isolados de *Trichoderma* spp. e um fungicida

Tratamentos	Severidade (%)
Testemunha	79,84 a
Isolado 1.340	52,16 ab
Isolado 1.439-B	73,88 a
Isolado 1.599	66,85 a
Isolado 2.047	27,10 bc
Azoxistrobin	13,80 c

CV (%) = 41,45

*Dados da severidade transformados pela equação angular arco seno raiz quadrada $X+0,5/100$. **Médias seguidas de mesma letra, na vertical, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV = Coeficiente de Variação.

5.3. Produção de inóculo do isolado 2.047 em arroz

Na Tabela 4 podemos observar as comparações dos resultados de esporulação feitas para cada tratamento, avaliados de forma independente. Com o tratamento 50% de água, 3% de CaCO_3 e sacos abertos após três dias obteve-se maior produção de conídios em relação aos demais tratamentos ($23,2 \times 10^8$ conídios mL^{-1}), sendo diferente estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. A maior produção de conídios foi obtida quando os sacos foram abertos após três dias. Com incorporação de CaCO_3 os resultados foram melhores que sem a aplicação de CaCO_3 . A concentração de 30% de umidade foi a que apresentou melhores resultados.

Tabela 4. Produção de conídios do isolado 2.047 em arroz com diferentes tratamentos

Concentração de conídios ($\times 10^8$ conídios g^{-1})	
Com sacos abertos	14,22 a
Com sacos fechados	6,40 b
Sem $CaCO_3$	9,20 b
Com $CaCO_3$	11,40 a
Porcentagem de água	
30%	12,00 a
50%	10,35 b
70%	8,55 c

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados por tratamento nesse trabalho quando avaliados de forma combinada, demonstraram que a maior concentração de conídios foi obtida quando os sacos foram abertos após três dias. Nesses ambientes quando os tratamentos foram enriquecidos com $CaCO_3$ agiram positivamente. Não obstante os melhores resultados de esporulação foram encontrados na concentração de 50% de umidade (Figura 1).

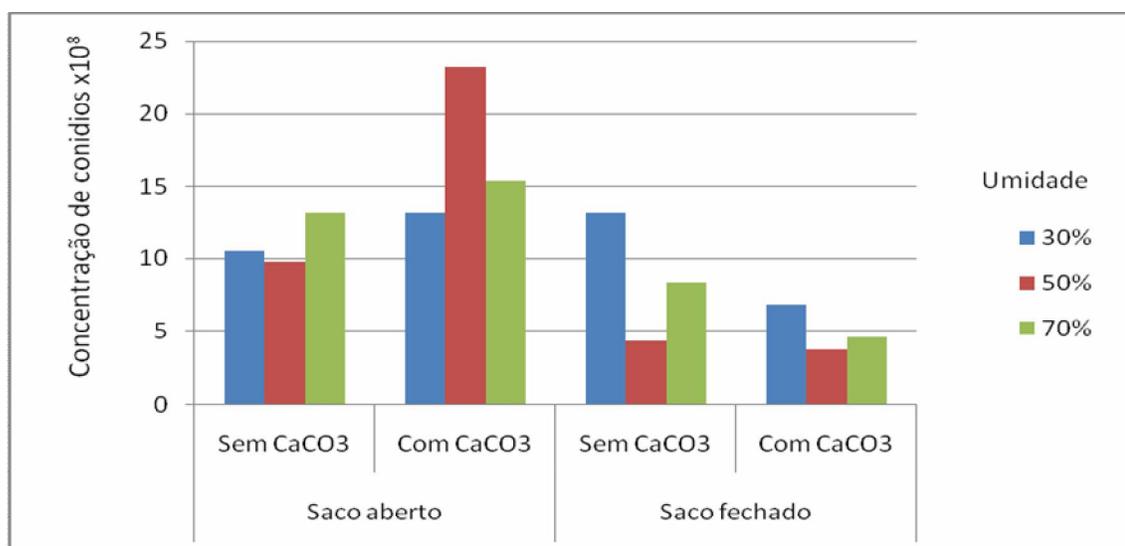


Figura 1. Produção de conídios do isolado 2.047 em substrato de arroz com diferentes tratamentos.

5.4. Compatibilidade do isolado 2.047 com fungicidas

O isolado 2.047 não demonstrou sensibilidade aos fungicidas Clorotalonil, Flutriafol, Oxychloride e Azoxystrobin, na concentração testada e nos diferentes tempos de incubação. Não apresentando diferença estatística quando comparados com o controle

5.5. Identificação morfológica do isolado 2.047

O isolado foi obtido a partir de bagaço de cana-de-açúcar e a cultura apresentou crescimento rápido (9 cm de diâmetro em três dias), micélio aéreo, cotonoso (flocoso na periferia), colônia branca no centro e na periferia esverdeada, devido a esporulação, com reverso branco a verde claro sem pigmentação, ausência de zonação concêntrica, com esporulação abundante a partir do sétimo dia. Presença de clamidósporos terminais e intercalares, globoso, 6 a 10 μm de diâmetro, hialino e liso. Micélio ramificado, septado, hialino com 1,8 x 2,0 μm de diâmetro; conidióforos alongados, finos, sem prolongamento estéril, fiálides não densamente agrupados, células conidiogênicas intercalares e terminais, fialídicas (fiálides na maioria das vezes regularmente dispostas), ampuliformes, 4,0-7,0 x 2,5-3,5 μm , hialinas e lisas; conídios secos, isolados, asseptados, globosos a elipsóides, 2,5-3,5 x 2,0-3,0 μm , hialinos, lisos. Estas características morfológicas, medidas biométricas e as características culturais apresentam semelhanças com as descritas para *Trichoderma harzianum* Rifai (Rifai, 1969; Bissett 1984, 1991). Este isolado encontra-se depositado na Coleção de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, com o número de registro de 2.047.

6. DISCUSSÃO

O controle biológico é uma alternativa promissora para reduzir o uso de produtos químicos (Alabouvette *et al.*, 2006). Fungos do gênero *Trichoderma* têm sido extensivamente empregados como agentes de controle biológico de outros fungos fitopatogênicos (Rakholiya, 2010). Com isso, a seleção de isolados de *Trichoderma* que possuem atividades supressoras de fitopatógenos, é uma estratégia interessante para reduzir o aumento do uso de pesticidas químicos e minimizar os impactos ambientais causados por estes.

Entre os 29 isolados testados, o 2.047 foi o mais eficiente no controle da sigatoka-negra nos experimentos realizados. No primeiro experimento, o isolado 2.047 foi aplicado numa concentração de 10^7 conídios mL^{-1} a cada 10 dias, diretamente nas folhas (vela, 1, 2 e 3) das bananeiras em forma de pulverização. Para análise estatística avaliou-se a quinta folha, pois foi a primeira folha que apresentou diferença estatística significativa pelo teste Tuckey ao nível de 5% de probabilidade, em comparação com os outros isolados e com o tratamento controle. Pois, até então, a vela e as quatro primeiras folhas não apresentaram diferenças estatisticamente.

No segundo experimento, foram avaliados os quatro isolados mais eficientes no controle da sigatoka-negra do primeiro experimento e foi acrescentado o tratamento químico. Também foram feitas outras adequações na metodologia, visando obter resultados mais promissores. Com isso, a pulverização dos antagonistas passou a ser feita a cada sete dias em vez de dez e o número de repetições dobrou, passando de cinco para dez plantas.

Novamente o isolado 2.047 foi o mais eficiente no controle de *M. fijiensis*, com relação aos outros isolados testados, sendo estatisticamente superior. Porém mostrou-se inferior ao tratamento químico, quando a análise estatística foi feita com a severidade avaliada na quinta folha. No entanto quando analisada a severidade na sexta folha, o isolado 2.047 não diferiu estatisticamente pelo teste Tukey a 5% com tratamento químico. Provavelmente este resultado entre os dois tratamentos que ocorreram na sexta folha seja devido ao Azoxystrobin ser mais fungistático e não fungicida, ou seja, inibe o crescimento mais não mata o patógeno. *Mycosphaerella fijiensis* permanece vivo e a partir do momento que não se aplica mais o fungicida, o fungo retoma a colonização e as lesões começam a se expandir. Por outro lado, apesar do patógeno infectar apenas as folhas novas, a vela e no máximo 1 e 2 (Gasparotto *et al.*, 2006), e ter sido aplicado o antagonista nas folhas vela, 1, 2 e 3, o isolado 2.047 pode ter colonizado o limbo foliar e/ou produzido metabólitos secundários que reduziram a velocidade

da colonização. É importante salientar que nos dois tratamentos a severidade da doença continuou em expansão.

Não existem estudos de controle biológico de *M. fijiensis*, em condições de campo. Os estudos foram efetuados em condições controladas (casa-de-vegetação e laboratório). Arzate *et al.* (2006) avaliando, em casa de vegetação, isolados de *Trichoderma* spp. como antagonistas a *M. fijiensis*, selecionaram dois isolados que apresentaram os menores percentuais de infecção sob o desenvolvimento de *M. fijiensis*. Bizerra *et al.* (2006), testando 29 isolados de *Trichoderma* spp. quanto a inibição do crescimento da colônia de *M. fijiensis* por pareamento em placa de Petri contendo meio BDA, constataram que 45% dos isolados de *Trichoderma* inibiram o crescimento de *M. fijiensis* e 10 isolados testados, produziram metabólitos voláteis e em quantidades suficientes para inibir o crescimento do fitopatógeno.

Altas concentrações do inóculo do patógeno podem inundar o sistema, dificultando a expressividade do agente antagonista, uma vez que só as plantas relativas ao experimento foram pulverizadas. Como nesse trabalho as plantas tratadas foram somente as que estavam sendo avaliadas, as outras plantas ao redor continuavam disseminando propágulos de *M. fijiensis* sem nenhum controle. É possível que nessas condições os antagonistas tenham muito mais dificuldades de controlar do que em outras circunstâncias.

Não existe dúvida do sucesso de *Trichoderma* spp. como agentes de controle biológico de diversos fitopatógenos que vem sendo confirmando a cada ano, em vários trabalhos publicados. Portanto, na literatura existem vários exemplos de patógenos, tanto habitantes do solo como da parte aérea, que são controlados por espécies de *Trichoderma*. Como exemplos de patógenos de solo, *Rhizoctonia solani* Kuhn (Cúndom *et al.*, 2003), *Phytophthora* spp. (Ezziyyani *et al.*, 2007) e *Fusarium solani* (Mart.) Sacc (Rojo *et al.*, 2007); e da parte aérea como *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime e Phillips-Mora, agente causal da vassoura-de-bruxa do cacauero (Bezerra *et al.*, 2003), *Botrytis cinerea* Persoon ex Fries (Lisboa *et al.*, 2007) e *Phytophthora palmivora* Butler (Hanada, 2010).

Alguns estudos, não apenas mencionam *Trichoderma* como um agente biocontrolador de fitopatógenos, mas também especulam quais são os principais mecanismos de ação do antagonista. Sempere e Santamarina (2010) comprovaram que *T. harzianum* possui capacidade de exercer dois mecanismos (micoparasitismo e competição por espaço e nutrientes) no biocontrole de *Fusarium culmorum* (W.G. Smith.) Sacc., por meio de observação em microscópio eletrônico de varredura e pareamento das culturas em placas de Petri com meio de cultura. Os autores sugerem que o antagonista produziu metabólitos

extracelulares para degradar a parede celular, pois constataram a degradação da parede celular do fitopatógeno. Em outro trabalho, Guedez *et al.* (2009), estudando o mecanismo de ação do *T. harzianum* sobre diversos patógenos pós-colheita de morango (*Fragaria vesca* L.) por meio do pareamento em meio de cultura em placas de Petri e após 96 horas de incubação, concluíram que o antagonista micoparasitava os fitopatógenos. Neste trabalho o pareamento não foi realizado, devido a diferença na velocidade de crescimento entre *M. fijiensis* e *T. harzianum*.

Isolados de *T. harzianum* são considerados como os melhores fungicidas biológicos, pelo seu poder antagonico contra fungos fitopatogênicos, mediante a produção de enzimas líticas que degradam as paredes celulares dos patógenos, provocando a morte (Serrano e Galindo, 2006). No entanto, a capacidade de parasitismo deste gênero depende da espécie ou isolado; *T. harzianum* apresenta alta eficiência como um micoparasita em relação às outras espécies testadas por Markovich e Kononova (2003). Neste trabalho não foi realizada nenhuma análise sobre a produção lítica do isolado 2.047. Contudo, o comportamento da severidade da doença durante o período de avaliação e das colocações feitas pelas referências sobre os mecanismos de ação efetuada pelo *T. harzianum*, indica que provavelmente houve três ações: competição por espaço, micoparasitismo e produção de substâncias metabólicas secundárias.

A possibilidade de combinação de agentes de biocontrole (ABC) e de fungicidas químicos é importante para um manejo integrado de doenças, porque os níveis de supressão de determinada doença por aplicações combinadas são geralmente iguais ou superiores ao uso do ABC (Hidalgo *et al.*, 2003; Deberdt *et al.*, 2008). Quando a pressão do inóculo do patógeno aumenta, os níveis máximos de proteção são necessários, de modo que os fungicidas químicos tendem a exibir um efeito de controle eficiente em curto prazo, que pode ser mais tarde sustentada pelo agente de biocontrole (Harman, 1996; Whipps e Lumsden, 2001; Backman e Sikora, 2008). A combinação eficaz dos produtos químicos e os agentes de biocontrole em programas de manejo integrado de doenças tende a reduzir o impacto negativo sobre o meio ambiente por meio da redução do número de aplicações de produtos químicos (Melo, 1998).

Para o desenvolvimento de uma tecnologia que possibilite a combinação de diferentes métodos de controle, é importante a realização de estudos sobre seus efeitos associados. No caso do controle biológico, é de fundamental importância a avaliação dos efeitos sobre o agente de biocontrole, dos diversos produtos químicos que são comumente utilizados na

cultura. Esses estudos têm a finalidade de determinar a compatibilidade entre esses produtos e o agente de biocontrole e, se possível, estabelecer as concentrações adequadas para cada caso (Mello *et al.*, 2003). O gênero *Trichoderma* está entre os microrganismos mais resistentes às toxinas e produtos químicos naturais e aqueles sintetizados pelo homem, capazes até mesmo de degradar alguns compostos como hidrocarbonetos e pesticidas (Harman, 2006).

O isolado 2047 demonstrou compatibilidade com todos os fungicidas testados no experimento, recomendados para controlar sigatoka-negra, com exceto o Cuprocarb, que é recomendado para o controle de fungos como *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, *Hemileia vastatrix* Berk e Br, *Alternaria solani* (Ell. e Mart.) Jones e Grout. Após três horas de incubação não houve redução na germinação de conídios do isolado 2.047 na suspensão com os fungicidas, sendo o tempo necessário, em média, para misturar e dispersar o fungo e/ou os pesticidas no campo. Isto sugere que as estratégias de aplicação combinada são promissoras para o controle de *M. fijiensis* a partir de uma perspectiva de manejo integrado de doenças. O manejo integrado com a utilização de produtos fitossanitários seletivos em conjunto com fungos antagonistas, pode ser uma estratégia muito eficiente. Entretanto, alguns produtos fitossanitários podem afetar o crescimento vegetativo e a conidiogênese dos fungos antagonistas, ou até alterar sua composição genética (Alves *et al.*, 1998).

O arroz é um substrato comum para a produção em massa de agentes de controle biológico no Brasil (Faria e Magalhães, 2001), eficiente para a produção de conídios, barato e facilmente encontrado nos mercados locais. Também tem sido utilizado com sucesso na fabricação de Tricovab (CEPLAC, Bahia) a base de *Trichoderma*, um produto de controle biológico contra a vassoura de bruxa em cacauzeiro (Pomella *et al.*, 2007).

Estudos sobre sistemas de fermentação em estado sólido demonstraram que sais de cálcio melhoraram a esporulação e produção de determinadas enzimas (Chiu *et al.*, 1998; Saxena *et al.*, 2001; Wuyep *et al.*, 2003.), provavelmente devido aos efeitos sobre o pH e a nutrição mineral (Horst *et al.*, 2005; Krishna, 2005). Nas condições deste estudo, constatou-se o efeito positivo e significativo de CaCO₃ sobre o aumento da produção de conídios de *T. harzianum*.

Os fungos dependem de água para seu crescimento e desenvolvimento. A maioria também depende do oxigênio para a respiração, sendo, portanto, aeróbicos. Muitos, entretanto, são anaeróbicos facultativos, isto é, respiram na presença de oxigênio e fermentam na ausência. Nesse sentido os fungos do gênero *Trichoderma* são considerados anaeróbicos

facultativos, sendo que nesse experimento *T. harzianum* produziu maior quantidade de esporos em condições de ambiente aberto.

A esporulação de alguns fungos pode ser afetada pelo teor de água no substrato. *Trichoderma harzianum* quando submetido a teores diferentes de umidade, apresentou melhores resultados com 30% de umidade. No entanto, quando os tratamentos foram comparados em forma de interações os melhores resultados foram obtidos com a aplicação de 50% de umidade.

Neste trabalho, a produção massal de inoculo de *T. harzianum* em grandes quantidades pode ser obtida, usando métodos de produção artesanal, sem o uso de técnicas especiais. *Trichoderma harzianum* é um fungo de fácil cultivo e de manutenção, sendo uma alternativa de baixo custo e de fácil implantação quando comparado com o controle químico que requer a obtenção de moléculas complexas que demandam um grande período de tempo e tem um custo muito elevado, além dos impactos ambientais que causam.

Apesar de não ter sido realizado estudo econômico do custo de produção massal de inóculo desse fungo, a tecnologia desenvolvida nesse trabalho não requer muito recurso financeiro. Este processo de produção em larga escala, e as características do produto podem facilitar a comercialização do agente biológico (Moraes *et al.*, 1991). Vale a pena salientar que este ensaio teve resultados similares com os obtidos por Hanada (2009) para produção de conídios de *T. martiale* em arroz utilizando diferentes enriquecimentos nutricionais.

O presente trabalho abre novas perspectivas para o uso do controle biológico da sigatoka-negra. O isolado 2.047 apresentou qualidades e deve ser mais estudado como biocontrolador da sigatoka-negra. Até o momento, não se têm dados sobre a aplicação de antagonistas para o controle de *M. fijiensis* em condições de campo. Pesquisas deverão ser realizadas para confirmar e otimizar o uso do isolado 2.047 para o controle da sigatoka-negra da bananeira visando a sua aplicação no campo.

Apesar do isolado 2.047 ter sido estatisticamente mais eficiente no controle da sigatoka-negra da bananeira, este é um trabalho inicial de prospecção do uso de isolados de *Trichoderma* spp. como agente de controle biológico de *M. fijiensis*. Assim, outros estudos ainda precisam ser implementados para elucidar os mecanismos envolvidos nessa interação, para ampliar os conhecimentos a respeito do antagonista e melhorar a sua eficiência por meio de técnicas biotecnológicas.

7. CONCLUSÃO

O isolado 2.047, identificado como *Trichoderma harzianum* Rifai, apresentou características desejáveis como agente controlador biológico da sigatoka-negra em condições de campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alabouvette, C.; Olivain, C.; Steinberg, C. 2006. Biological control of plant diseases: The European situation. *European Journal of Plant Pathology*, 114: 329–341

Alves, S.B.; Moino, A.; Almeida, J.E.M. 1998. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: Alves, S.B (Ed). *Controle microbiano de insetos*. FEALQ. Piracicaba. p. 217-238.

Andrade, M.C.N.; Graciolli, L.A. 2005. Controle de fungos contaminantes no cultivo do cogumelo comestíveis shiitake em toro de eucalipto. *Acta Scientiarum Agronomy*, 27(2): 293-299.

Arnold, D.L.; Jackson, R.W.; Fillingham, A.J.; Goss, S.C.; Taylor, J.D. 2001. Highly conserved sequences flank avirulence genes: isolation of novel avirulence genes from *Pseudomonas syringae* pv. *psis*. *Microbiology*, 147: 1171–1182.

Arruda, M.R.; Pereira, M.C.N.; Moreira, A. 2010. Exigências edafoclimáticas e escolha da área de plantio. In: Gasparotto, L.; Pereira, J.C.R. (Eds). *A cultura da bananeira na região Norte do Brasil*. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, Distrito Federal. p. 63-70.

Arzate, J; Michel, A.C.; Dominguez, V.C. 2006. Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka negra del Plátano (*Musa* sp.) in vitro e invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatologia*, 24(2): 98-104.

Backman, P.A.; Sikora, R.A. 2008. Endophytes: an emerging tool for biological control. *Biological Control*, 46: 1–3.

Bezerra, J.L; Costa, J.C.B; Bastos, C.N; Faleiro, F.G. 2003. *Hypocrea stromatica* sp. nov. teleomorfo de *Trichoderma stromaticum*. *Fitopatologia Brasileira*, 28: 408-412.

Bissett, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. *Canadian Journal of Botany*, 62: 924-931.

- Bissett, J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*, 69: 2357-2372.
- Bissett, J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Sect. *Pachybasium*. *Canadian Journal of Botany*, 69: 2373-2417.
- Bizerra, S.M.; Costa, F.P.; Kupper, K.C. 2006. Potencialidade de diferentes isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal da Sigatoka negra. *Biológico*, 68(1): 29-86.
- Burmeister, L.; Hau, B. 2009. Control of the bean rust *Uromyces appendiculatus* by means of *Trichoderma harzianum*: leaf disc assays on the antibiotic effect of spore suspensions and culture filtrates. *Biocontrol*, 54(4): 575-578.
- Cavalcante, M.J.B; Sá, C.P.; Gomes, F.C.R.; Gondin, T.M.S.; Cordeiro, Z.J.M.; Hessel, J.L. 2004. Distribuição e impacto da Sigatoka negra na bananicultura do estado do Acre. *Fitopatologia Brasileira*, 29: 544-547.
- Chiu, S.W.; Chan, Y.H.; Law, S.C.; Cheung, K.T.; Moore, D. 1998. Cadmium and manganese in contrast to calcium reduce yield and nutritional values of the edible mushroom *Pleurotus pulmonarius*. *Mycological Research*, 102: 449-457.
- Cúndom, M.A.; Mazza, S.M.; Gutierrez, S.A. 2003. Selection of *Trichoderma* spp. isolates against *Rhizoctonia solani*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1(4): 79-81.
- Deberdt, P.; Mfegue, C.V.; Tondje, P.R.; Bon, M.C.; Ducamp, M.; Hurard, C.; Begoude, B.A.D.; Ndoumbe-Nkeng, M.; Hebbbar, P.K.; Cilas, C. 2008. Impact of environmental factors, chemical fungicide and biological control on cacao pod production dynamics and black pod disease (*Phytophthora megakarya*) in Cameroon. *Biological Control*, 44: 149-159.
- De Cal, A.; Redondo, C.; Szejnberg, A.; Malgarejo, P. 2008. Biocontrol of powdery mildew by *Penicillium oxalicum* in open-field nurseries of strawberries. *Biological Control*, 47: 103-107.

- Dhingra, O.D.; Sinclair, J.B. 1995. Basic plant pathology methods. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida. 434 pp.
- Druzhinina, I.; Kubicek, C.P. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters. *Journal of Zhejiang University*, 6(2): 100-112.
- Dong, H.; Li, W.; Zhang, W. T. 2003. Differential expression of induced resistance by an aqueous extract of killed *Penicillium chrysogenum* against *Verticillium* wilt of cotton. *Crop Protection*, 22: 129-134.
- Elad, Y.; Kapat, A. 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 177-189.
- Ezziyyani, M.; Requena, M.E.; Egea-Gilabert, C.; Candela, M.E. 2007. Biological control of *Phytophthora* root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. *Journal of Phytopathology*, 155(6): 342-349.
- Faria, M.R.; Magalhães, B.P. 2001. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil – situação atual e perspectivas. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 22: 18–21.
- Ferreira, A.A.B.; Hanada, R.E.; Coelho Neto, R.A. 2009. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para controle biológico da podridão-de-*Sclerotium* em pimentão. In: 61^a Reunião Anual da SBPC, Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, Amazonas, Brasil.
- Gauhl, F. 1990. *Epidemiologia y Ecología de la Sigatoka negra (Mycosphaerella fijiensis Morelet) en plátano (Musa sp.) en Costa Rica*, UPEB. Panamá, Panamá. 126 pp.
- Gasparotto, L.; Pereira, J.C.R.; Urban, A.F.; Hanada, R.E. 2005. *Heliconia psittacorum*: hospedeira de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal da Sigatoka negra da bananeira. *Fitopatologia Brasileira*, 30(4): 423-425.

Gasparotto, L.; Pereira, J.C.R.; Hanada, R.E; Montarroyos, A.V.V. 2006. *Sigatoka negra da bananeira*. Embrapa Amazônia Ocidental. Manaus, AM.177 pp.

Gasparotto, L.; Pereira, J.C.R.; Hanada, R.E. 2007. Situação atual da Sigatoka negra no Brasil. In: Poltroneli, L.S.; Verzignassi, J.R. (Eds). *Fitossanidade na Amazônia: inovações tecnológicas*. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará. p. 37-51.

Gasparotto, L.; Pereira, J.C.R. 2010. A cultura da bananeira na região Norte do Brasil. Embrapa Informação Tecnológica. 310 pp.

González, R.; Bustamante, E.; Shannon, P.; Okumoto, S.; Leandro, G. 1996a. Evaluación de microorganismos quitinolíticos en el control de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. *Manejo Integrado Plagas*, 40: 12-16.

González, R.; Bustamante, E.; Shannon, P.; Okumoto, S.; Leandro, G. 1996b. Selección de microorganismos quitinolíticos en el control de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. *Manejo Integrado Plagas*, 40: 6-11.

Grondona, I.; Hermosa, R.; Tejada, M.; Gomis, M.D.; Mateos, P.F.; Bridge, P.D.; Monte, E.; Garcia-Acha, I. 1997. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3189-3198.

Guedez, C.; Canizales, L.; Castillo, C.; Olivar, R. 2009. Efecto antagonico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patogenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp.). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiologia*, 29(1): 34-38.

Guerra, A.G.; De Medeiros, A.A.; Moreira, M.A.B. 2009. Tecnologia para o cultivo da bananeira. Empresa de Pesquisa Agropecuária do RN. Natal, RN. 42pp.

Harman, G.E. 1996. *Trichoderma* for biocontrol of plant pathogens: from basic research to commercialized products. Cornell Community – Conference on Biological Control. (www.nysaes.cornell.edu/ent/bcconf/talks/harman.html). Acesso em: 12/01/2010.

- Harman, G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84: 377-393.
- Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96: 190-194.
- Hanada, R.E.; Gasparotto, L.; Pereira, J.C.R. 2002a. Sobrevivência de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes materiais. *Fitopatologia Brasileira*, 27(4): 408-411.
- Hanada, R.E.; Gasparotto, L.; Pereira, J.C.R. 2002b. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em meio de cultura. *Fitopatologia Brasileira*, 27(1): 170-173.
- Hanada, R.E.; De Souza, J.T.; Pomella, A.W.V.; Hebbar, K.P.; Pereira, J.O.; Ismaiel, A.; Samuels, G.J. 2008. *Trichoderma martiale* sp. nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* and a potential agent of biological control. *Mycological Research*, 112:1333-1345.
- Hanada, R.E.; Pomella, A.W.V.; Ramirez, W.S.; Loguercio, L.L.; Pereira, J.O. 2009. Biocontrol potential of *Trichoderma martiale* against black-pod disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao. *Biological Control*, 50: 143-149.
- Hanada, R.E.; Sales-Campos, C.; Abreu, R.L.S.; Ludwig, P. 2003a. Fungos emboloradores e manchadores de madeira em toras estocadas em indústrias madeiras no município de Manaus, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, 33(3): 483-488.
- Hanada, R. E.; Pomella, A.W.V.; Costa, H.S.; Bezerra, J.L.; Loguercio, L.L.; Pereira, J.O. 2010. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potencial for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. *Mycological Research*, 114: 901-910.

Hanada, R.E. 2011. Ocorrência de *Trichoderma* spp. em substrato de cultivo de fungo comestível *Pleurotus ostreatus* (Jack.:Fr.) Kumm. In: Sales-Campos, C; Varejão, M.J.C. Workshop de Bioconversão de Resíduos Lignocelulolíticos da Amazônia para cultivos de cogumelos comestíveis. p. 60-65.

Haran, S.; Schickler, H.; Chet, I. 1996. Molecular mechanism of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, 142: 2321-2331.

Haolong, Y.; Jiguang, W.; Xiaolan, S. 2010. Investigation on *Trichoderma* resources in forest soil of Northern Guangxi. *Guangxi Agricultural Sciences*, 41(7): 703-706.

Hermosa, M.R.; Grondona, I.; Iturriaga, E.A.; Diaz-Minguez, J.M.; Castro, C.; Monte, E.; Garcia-Acha, I. 2000. Molecular characterization and indentification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1890-1898.

Hidalgo, E.; Bateman, R.; Krauss, U.; Ten Hoopen, G.M.; Martínez, A. 2003. A field investigation into delivery systems for agents to control *Moniliophthora roreri*. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 953-961.

Hinz, R.H. 2000. Moko e Sigatoka negra. In: *Curso sobre doenças da bananeira*. Jataí - GO: DFA/GO. 9pp.

Horst, L.E.; Locke, J.; Krause, C.R.; McMahan, R.W.; Madden, L.V.; Hoitink, H.A.J. 2005. Suppression of *Botrytis blight* of begonia by *Trichoderma hamatum* 382 in peat and compost-amended potting mixes. *Plant Disease*, 89: 1195-1200.

IBGE, 2008. Censo Agropecuario. (www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric). Acesso: 17/10/2009.

Jackson, M.A. 1997. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 19(3):180-187.

Jacome, L.H.; Schuh, W. 1993. Spore production and artificial inoculation techniques for *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. *Tropical Agriculture*, 70: 33-38.

Jacome, L.H.; Schuh, W. 1992. Effects of leaf wetness duration and temperature of development of black Sigatoka disease on banana infected by *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. *Phytopathology*, 82(5): 515-520.

Jeng, W.Y.; Wang, N.C.; Lin, M.H.; Lin, C.T.; Liaw, Y.C.; Chang, W.J.; Liu, C.I.; Liang, P.H.; Wang, A.H.J. 2011. Structural and functional analysis of three β -glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. *Journal of Structural Biology*, 173(1): 46-56.

Jiménez, J.M.; Galindo, J.J.; Ramírez, C. 1987. Estudios sobre combate biológico de *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* mediante bacterias epífitas. In: Galindo, J.J.; Jaramillo, R. (Eds.). VII Reunion Acorbat. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica. p. 105-109.

Kirk, P.M.; Cannon, P.F.; David, J.C.; Stalpers, J.A. 2008. *Dictionary of the Fungi*. 10th edition. CABI International, Wallingford. 771 pp.

Krishna, C. 2005. Solid-state fermentation systems – an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25: 1–30.

Larralde-Corona, C.P.; Santiago-Mena, M.R.; Sifuentes-Rincón, A.M.; Rodriguez-Luna, I.C.; Rodriguez-Pérez, M.A.; Shirai, K.; Narváez-Zapata, J.A. 2008. Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Microphomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80: 167-177.

Lim, G.; Lim, K.Y.; Tan, K.K. 1990. Fungal contaminants of shiitake “logs” in Singapore. *Mushroom Journal for the Tropics*, 10: 101-104.

Lisboa, B.B.; Bochese, C.C.; Vargas, L.K.; Silveira, J.R.P. 2007. Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na redução da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. *Ciência Rural*, 37(5): 1255-1260.

Lucon, C.M.M. 2008. *Trichoderma* no controle de doenças de plantas causadas por patógenos de solo. Instituto Biológico (www.biológico.sp.gov.br). Acesso: 15/12/2010.

Markovich, N.A.; Kononova, G.L. 2003. Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense from fungal diseases. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 39(4): 341–351.

Marín, D.H.; Romero, R.A.; Guzmán, M.; Sutton, T.B. 2003. Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease*, 87(3): 208-222.

Melo, I.S. 1998. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. (Eds). *Controle Biológico*. Vol. 1. Embrapa – CNPMA. Jaguariúna, SP. p. 17-68.

Melo, I.S. 1991. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: Bettioli, W. *Controle Biológico de Doenças de Plantas*. Embrapa-CNPDA. Jaguariúna, SP. p. 7-23.

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

Mello, S.C.M.; Ávila, Z.R.; Oliveira, C.; Hatano, L.T. 2003. Avaliação do efeito de pesticidas no crescimento de *Cercospora caricis*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico 94. Brasília, DF. 4 pp.

Miyazaki, K.; Tsuchiya, Y.; Okuda, T. 2009. Specific PCR assays for the detection of *Trichoderma harzianum* causing green mold disease during mushroom cultivation. *Mycoscience*, 50: 94-99.

Moraes, I.O.; Capalbo, D.M.F.; Moraes, R.O. 1991. Multiplicação de agents de controle biológico. In: Bettiol, W. (Ed). *Controle biológico de doenças de plantas*. Embrapa-CNPMA. Jaguariuna. p. 253-272.

Moraes, W.B.C. 1992. Controle alternativo de fitopatógenos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 27: 175-190.

Moreira, R.S. 1999. *Banana - teoria e prática de cultivo*. 2.ed. Fundação Cargill, São Paulo. 1 CD-ROM.

Ozbay, N; Newman, S.B. 2004. Biological control with *Trichoderma* spp. with emphasis on *T. harzianum*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(4): 478-84.

Pandy, M; Tewari, R.P. 1990. Antagonism of *Pleurotus sajor-caju* by some weed fungi. *Mushroom Journal for the Tropics*, 10: 101-104.

Pereira, J.C.R; Gasparotto, L.; Coelho, A.F.S.; Urban, A.F. 1998. Ocorrência da Sigatoka negra no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 23: 295. Resumo.

Ploetz , R. 1999. La mas importante enfermedad de la fruta más importante; la sigatoca negra del banano. (www.iicasaninet.net). Acesso 10/10/2009

Pomella, A.W.V.; de Souza, J.T.; Niella, G.R.; Bateman, R.P.; Hebbar, P.K.; Loguercio, L.L.; Lumsden, R.D. 2007. The use of *Trichoderma stromaticum* in the management of witches' broom disease of cacao in Bahia State, Brazil. In: Vincent, C.; Goettel, M.; Lazarovits, G. (Eds.) *Biological Control: A global perspective - case studies from around the world*. CABI Publishing, Wallingford, UK. p. 210-217.

Punja, Z.K; Utkhede, R.S. 2003. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology*, 21: 400-407.

Rakholiya, K.B. 2010. Efficacy of fungicides against *Trichoderma harzianum* and *Sclerotium rolfsii*. *International Journal of Plant Protection*, 3(2): 406-407.

- Rifai, M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*, 116: 1-56.
- Rojo, F.G.; Reynoso, M.M.; Ferez, M.; Chulze, S.N.; Torres, A.M. 2007. Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop protections*, 26(4): 549-555.
- Sanogo, S.; Pomella, A.; Hebbar, P.K. 2002. Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipelis pernicioso* on cacao. *Phytopathology*, 92(10): 1037-1047.
- Saxena, R.K.; Sangeetha, L.; Vohra, A.; Gupta, R.; Gulati, R. 2001. Induction and mass sporulation in lignin degrading fungus *Ceriporiopsis subvermispora* for its potential usage in pulp and paper industry. *Current Science*, 81: 591-594.
- Schirmbock, M.; Lorito, M.; Wang, Y.L. 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Applied and Environmental Microbiolog.* 60: 4344-4370.
- Sempere, F.; Santamarina, M.P. 2010. Efficacy of *Trichoderma harzianum* in suppression of *Fusarium culmorum*. *Annals of Microbiology*, 60: 335-340.
- Senhor, R.F.; De Carvalho, J.N.; De Sousa, P.A. 2009. Manejo integrado de Sigatoka negra. *Revista Verde*, 4(3): 7-12.
- Simmonds, N.W. 1973. *Los plátanos*. Editorial Blume, Barcelona, Espanha. 539 pp.
- Stover, R.H. 1980. Sigatoka leaf spots of banana and plantains. *Tropical Agriculture Research Services* 64:750-756.
- Stover, R.H.; Simmonds, N.W. 1987. Bananas. 3.ed. Longman Scientific & Technical. New York. 468 pp.

Vargas, V.M.M. 1996. Prevencion y manejo de la sigatoka negra. ICA. Caldas, Colombia. 30p.

Whipps, J.M.; Lumsden, R.D. 2001. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. *In*: Butt, T.M., Jackson, C.W., Magan, N. (Eds.). *Fungi as biocontrol agents – progress, problems and potential*. CABI Publishing. Wallingford, UK. p. 9–22.

Wuyep, P.A.; Khan, A.U.; Nok, A.J. 2003. Production and regulation of lignin degrading enzymes from *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Singer and *Psathyrella atroumbonata* Pegler. *African Journal of Biotechnology*, 2 (44): 444–447.