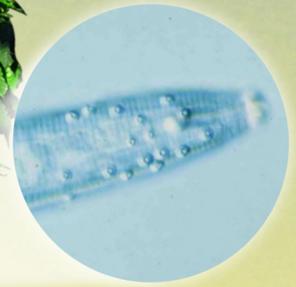




Organizado por
Núcleo de Estudos em Fitopatologia
Universidade Federal de Lavras

CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS: INTEGRANDO TÉCNICAS PARA ENTREGAR RESULTADOS



EDITORES

Flávio Henrique Vasconcelos Medeiros
Manoel Batista da Silva Júnior
Priscilla de Fátima Pereira
Acleide Maria Santos Cardoso
Amanda Flausino de Faria
Stélio Jorge Castro Gadaga
Poliana Patrícia Lima
Breno Cezar Marinho Juliatti
André Luís Faustino Luz
Gizeli de Souza Santos
Camila Primieri Nicolli

REVISORES

Acleide Maria Santos Cardoso
Camila Primieri Nicolli
Carolina da Silva Siqueira
Cláudio Ogoshi
Flávio Henrique Vasconcelos Medeiros
Manoel Batista da Silva Júnior
Murillo Lobo Junior
Poliana Patrícia Lima
Priscilla de Fátima Pereira
Sarah da Silva Costa
Silvino Intra Moreira
Yasmim Freitas Figueiredo
Wagner Bettiol

COORDENAÇÃO NEFIT / GESTÃO 2016

Flávio Henrique Vasconcelos Medeiros (Coordenador docente)

Agrônomo pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (2004). Mestre em Agronomia/ Fitopatologia pela Universidade Federal de Lavras (2005). Doutor em Agronomia/ Fitopatologia pela mesma instituição (2009). Atualmente é professor Adjunto do Departamento de Fitopatologia na Universidade Federal de Lavras.

Manoel Batista da Silva Júnior (Coordenador geral)

Agrônomo pela Universidade Federal de Lavras (2012). Mestre em Agronomia / Fitopatologia também pela Universidade Federal de Lavras (2013). Doutorando em Agronomia/ Fitopatologia na mesma instituição.

Priscilla de Fátima Pereira (Vice-coordenadora geral)

Agrônoma pela Universidade Federal de Lavras (2012). Mestre em Agronomia / Fitopatologia também pela Universidade Federal de Lavras (2015).

Acleide Maria Santos Cardoso (Coordenadora administrativa e secretária)

Engenheira Agrônoma pela Universidade Estadual de Montes Claros (2012). Mestre em Agronomia / Fitopatologia pela Universidade Federal de Lavras (2015). Doutoranda em Agronomia / Fitopatologia na mesma instituição.

Amanda Flausino de Faria (Vice-coordenadora administrativa e secretária)

Estudante de graduação em Agronomia pela Universidade Federal de Lavras.

Stélio Jorge Castro Gadaga (Coordenador técnico-científico)

Agrônomo pela Faculdade de Estudos Administrativos de Minas Gerais (2007). Mestre em Agronomia / Fitopatologia pela Universidade Federal de Lavras (2009). Doutorando em Agronomia / Fitopatologia na mesma instituição.

Poliana Patrícia Lima (Vice-coordenadora técnico-científica)

Engenheira Agrônoma pela Universidade José do Rosário Vellano (2012). Mestre em Agronomia / Fitopatologia pela Universidade Federal de Lavras (2015). Doutoranda em Agronomia / Fitopatologia na mesma instituição.

Breno Cezar Marinho Juliatti (Coordenador de finanças e tesouraria)

Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal de Uberlândia (2012). Mestre em Agronomia / Fitopatologia pela mesma instituição (2014). Doutorando em Agronomia/ Fitopatologia na Universidade Federal de Lavras.

André Luís Faustino Luz (Vice-coordenador de finanças e tesouraria)

Agrônomo pela Universidade Federal de Lavras (2015). Mestrando em Agronomia/ Fitopatologia na mesma instituição.

Gizeli de Souza Santos (Coordenadora sócio-cultural)

Engenheira Agrônoma pela Universidade Estadual de Montes Claros (2012). Mestre em Agronomia / Fitopatologia pela Universidade Federal de Lavras (2015). Doutoranda em Agronomia / Fitopatologia na mesma instituição.

Camila Primieri Nicoli (Vice-coordenadora sócio-cultural)

Engenheira Agrônoma pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2012). Mestre em Agronomia / Fitotecnia pela mesma instituição (2014). Doutoranda em Agronomia/ Fitopatologia na Universidade Federal de Lavras.

© Núcleo de Estudos em Fitopatologia

Capa: Ana Carolina Naves Campelo
Denis Borba Belo da Silva
Flávio Henrique Vasconcelos Medeiros
Manoel Batista da Silva Júnior

Projeto Gráfico / Diagramação: Ana Carolina Naves Campelo

**Ficha catalográfica preparada pela Coordenadoria de
Processos Técnicos da Biblioteca Universitária da UFLA**

Controle biológico de doenças de plantas : integrando técnicas
para entregar resultados / Organizado por Núcleo de
Estudos em Fitopatologia, Universidade Federal de
Lavras. – Lavras: NEFIT, 2016.
254 p. : il.

Bibliografia
ISBN 978-85-69973-01-0

1. Controle biológico. 2. Bioprodutos - Formulação. 3.
Plantas - Proteção. 4. *Trichoderma* sp. I. Universidade Federal
de Lavras, Núcleo de Estudos em Fitopatologia.

CDD – 632

AGRADECIMENTOS

Aos coordenadores do Núcleo de Estudos em Fitopatologia (NEFIT) pelo trabalho incansável na organização da XII Reunião Brasileira de Controle Biológico e XVI Simpósio de Manejo de Doenças de Plantas “Integrando Técnicas para Entregar Resultados”.

Aos palestrantes da XII Reunião Brasileira de Controle Biológico e XVI Simpósio de Manejo de Doenças de Plantas “Integrando Técnicas para Entregar Resultados” pelo empenho e dedicação na elaboração das palestras e dos capítulos presentes neste livro.

Aos revisores pela boa vontade, empenho e pela valiosa contribuição.

À Universidade Federal de Lavras, instituição que tanto nos orgulha e na qual temos o privilégio de estar sediados.

Ao Departamento de Fitopatologia, pela infraestrutura concedida para o trabalho do NEFIT, em especial, ao professor Flávio Henrique Vasconcelos Medeiros, coordenador docente do núcleo, pelo apoio incondicional.

Aos professores Wagner Bettiol, Vicente Paulo Campos e Jorge T. de Souza pelo apoio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio à publicação desta obra.

Aos colaboradores Bayer, Ballagro, Grupo Farroupilha, TecniControl, Satis, Agronômica, Cesis e JuliAgro, pelo apoio financeiro à realização do evento.

Aos amigos que fizeram parte da comissão de apoio: Celismar Ferreira de Oliveira, Fabíola de Jesus Silva, Larissa Carvalho Ferreira, Lucas Gabriel Pimenta Nogueira, Nevenka de Matos Moura, Rafaela Araújo Guimarães, Thaissa de Paula Farias Santos, Yasmim Freitas Figueiredo e a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram na realização do evento e na publicação deste livro.

Manoel Batista da Silva Júnior
Coordenador Geral | Gestão 2016



PREFÁCIO

O Simpósio de Manejo de Doenças de Plantas é um evento tradicional organizado pelo Núcleo de Estudos em Fitopatologia e Departamento de Fitopatologia. Em suas 15 edições anteriores o evento tem ganhado cada dia maiores proporções e abrangência, congregando palestrantes nacionais e internacionais abordando temas de relevância ao agronegócio brasileiro. O evento tem contribuído para difusão de técnicas e tecnologias para o manejo de doenças de plantas e treinamento de discentes para a organização de todas as etapas de um evento destas proporções.

Nesta edição, o evento foi organizado em conjunto com a XII Reunião Brasileira de Controle Biológico e, o enfoque será dado a uma estratégia de manejo: o controle biológico de doenças de plantas.

Apesar do ano conturbado politicamente no Brasil, o evento ganhou proporções internacionais, com participantes nacionais e de diversos países da América Latina. Uma dedicação ímpar também do Dr. Wagner Bettiol, pesquisador da Embrapa Meio Ambiente e idealizador da primeira edição da Reunião de Controle Biológico e dos professores, Vicente de Paulo Campos e Jorge T. Souza do Departamento de Fitopatologia.

Historicamente, o evento conta com uma maioria de participantes de graduação e pós-graduação, mas nesta edição, tivemos participação ativa de profissionais, um resultado do esforço constante da comissão organizadora para trazer palestrantes e temas relevantes ao agronegócio.

Assim como em edições anteriores, os palestrantes convidados se dispuseram a escrever um capítulo referente ao que abordaram em suas palestras. Dentre os participantes, tivemos também sessenta e sete resumos apresentados. Todos os textos e resumos foram revisados por pelos menos dois *ad doc*, compilados e publicados neste livro.

Este livro é impresso em número reduzido de exemplares, mas estará disponibilizado gratuitamente em nosso site (<http://www.nucleoestudo.ufla.br/nefit>) podendo ser apreciado por todos os interessados no assunto.

Esperamos que façam o melhor uso do conteúdo deste livro e que contribuam cada dia mais para pesquisa, difusão e divulgação do controle biológico fazendo com que esta técnica seja cada dia mais adotada no manejo de doenças de plantas.

**Flávio H. V. Medeiros, Professor adjunto - DFP
Coordenador docente do Núcleo de Estudos em Fitopatologia (NEFIT)**

SUMÁRIO

Capítulo 01: Formulación de agentes de control biológico	015
Alba Marina Cotes	
Referências	020
Capítulo 02: Registro de produtos biológicos no Brasil: avanços e desafios	021
Francys Mara Ferreira Vilella	
Produtos inoculantes	022
Produtos agrotóxicos – biológicos	023
Registro federal	024
Registro federal de produtos fitossanitários com uso aprovado para agricultura orgânica	026
Registro estadual	027
Regulamentações indiretamente ligadas ao registro	028
Considerações finais	028
Referências	028
Capítulo 03: Análise comparativa do registro de produtos biológicos na Colômbia, Estados Unidos e na União Europeia	031
Yasmim F. Figueiredo	
Carolina C. A. Nogueira	
Italo A. F. M. Santos	
Flávio H. V. Medeiros	
Introdução	031
Colômbia	032
Estados Unidos	036
Pesticidas bioquímicos	038
Pesticidas microbianos	038
Protetores incorporados a plantas (PIPs)	039
União Europeia	039
Comparativo entre as legislações aqui abordadas e a legislação brasileira	042
Referências	044
Capítulo 04: Biologically based technologies for control of soil-borne plant pathogens of cucumber and oilseed rape	047
Daniel P. Roberts	
Xiaoja Hu	
Dilip K. Lakshman	
Lihua Xie	
Xing Liao	

Introduction	047
Development of additional sustainable disease control technologies is needed	
Biologically based technologies as plant disease control alternatives	048
Combining biologically based technologies for control of soil-borne pathogens of cucumber	048
Isolates of <i>Serratia marcescens</i> for control of <i>P. ultimum</i> damping off of cucumber	050
Cell-free extracts of <i>S. marcescens</i> for control of <i>P. ultimum</i> damping off of cucumber	051
Biologically based technologies for control of <i>R. solani</i> and <i>S. sclerotiorum</i> on cucumber	052
Combining biologically based technologies for control of <i>S. sclerotiorum</i> on oilseed rape	053
Direct protection of oilseed rape plant parts from infection by <i>S. sclerotiorum</i>	053
Reduction of initial inoculum for control of <i>S. sclerotiorum</i> on oilseed rape	054
Integration of a mycoparasitic BCA into an oilseed crop production system for control of <i>S. sclerotiorum</i>	055
Combinations of biologically based technologies and reduced rates of pesticides for more sustainable control of <i>S. sclerotiorum</i> on oilseed rape	055
Summary	056
Literature cited	056

Capítulo 05: The BIOCOTES consortium, a model private-public partnership project 063

Jürgen Köhl

Nora de Rijk

Summary	063
Main objective	064
Choice of new targets for biological control products	064
Building the private-private partnership	065
The workplan	066
The research progress	067
Progress in the development of BCAs for control of diseases	067
Progress in the development of BCAs for control of pests	070
Progress in the development of production technologies of BCAs	073
Biocomes dissemination activities and communication with the Stakeholders ...	073
Acknowledgements	075
Literature cited	075

Capítulo 06: Desarrollo de un producto biológico para el control de <i>Fusarium circinatum</i> en viveros de <i>Pinus radiata</i> en Chile	077
Eugenio Sanfuentes Von Stowasser	
Referencia	079
Capítulo 07: Controle biológico de podridões pós-colheita de frutas tropicais	081
Carlos A. T. Gava	
Paula Fernanda de Souza Tavares	
Controle de podridões pós-colheita	082
Alterações fisiológicas e físico-químicas durante a maturação de frutos	082
Principais agentes de podridões pós-colheita em condições tropicais	085
Métodos de controle	087
Controle biológico de doenças pós-colheita	089
Controle biológico de podridões pós-colheita da manga no Vale do São Francisco	092
Referências	097
Capítulo 08: Controle de qualidade de produtos biológicos à base de fungos	103
Zayame Vegette Pinto	
Celson Alexandre Weiler	
Marcelo Augusto Boechat Morandi	
Cleusa Maria Mantovanello Lucon	
Wagner Bettiol	
Introdução	103
Metodologia	105
Metodologia 1 – número de conídios	106
Metodologia 2 – conídios viáveis	109
Metodologia 3 – unidade formadora de colônia	112
Importância da metodologia no processo produtivo – exemplo: Ballagro Agro Tecnologia	117
Considerações finais	120
Referências	121
Capítulo 09: Desafios para o mais amplo uso do controle biológico no Brasil	123
Pedro A. J. Faria Jr.	
Introdução	123
O registro de produtos biológicos no Brasil e a pirataria	125
Pesquisa e desenvolvimento	128
As deficiências da extensão rural no Brasil	133

Capacitação técnica de agentes comerciais	135
Considerações finais	138
Referências	138
Capítulo 10: Doutor e empreendedor: os desafios para o pós-graduado abrir sua empresa de controle biológico	141
Henrique M. Ferro	
Edgar Zanotto	
Priscilla F. Pereira	
Flávio H. V. Medeiros	
Breve histórico	141
Empreendedorismo e seus desafios	143
Aspectos da indústria de defensivos biológicos	144
Mercado de defensivos biológicos para novas empresas	146
Conclusão	148
Capítulo 11: How microbiome approaches can assist the biological control of plant diseases	151
Gabriele Berg	
Tomislav Cernava	
Henry Müller	
Abstract	151
Introduction	151
The potential of next-generation bio-products	153
Conclusions	155
Literature cited	155
Capítulo 12: Benefits and potential pitfalls of <i>Trichoderma</i> use for plant protection as revealed from its ecological genomics	159
Irina S. Druzhinina	
Why to study ecological genomics of <i>Trichoderma</i>	159
Evolutionary Neighborhood of <i>Trichoderma</i>	160
<i>Trichoderma</i> has a diversity of genomic tools used for mycotrophy	164
The use of mycotrophic opportunistic fungi in agriculture	170
Acknowledgements	173
Literature cited	173
RESUMOS	179

1

Formulación de agentes de control biológico

Alba Marina Cotes

El éxito en campo y la viabilidad económica de los productos para el control biológico, depende de varios factores tales como el efecto sobre la plaga objetivo (fitopatógeno o insecto), el tamaño del mercado, el espectro de plagas afectadas por el agente de biocontrol, la consistencia en el efecto biocontrolador bajo condiciones de campo, los costos de producción, además de aspectos tecnológicos que incluyen la fermentación, la formulación y el sistema de entrega para que el producto sea fácil de aplicar y que idealmente no requiera cadena de frío para su transporte y almacenamiento. Se busca entonces que las formulaciones mejoren la estabilidad del producto en almacenamiento, para que tenga una vida útil superior a un año y que su eficacia sea consistente en campo, cuando éste se aplica a diversos cultivos, contra diversas plagas y bajo diversas condiciones climáticas.

El lento progreso de la investigación en formulación de los bioplaguicidas, se ha considerado como un obstáculo para el posicionamiento de estos productos. Sin embargo, antes de iniciar el proceso de formulación de un microorganismo, se deben definir varios aspectos tecnológicos que son requisito para este tipo de productos. El proceso inicia con la definición del tipo de propágulo que va a constituir el principio activo del producto, por ejemplo, en el caso de bacterias se pueden considerar células vegetativas o esporas y en el caso de hongos, se pueden formular conidios, clamidosporas, micelio etc. Mediante procesos de fermentación en fase sólida, líquida o bifásica se debe producir el propágulo en alta cantidad, con óptima actividad biocontroladora y a bajo costo. Es importante también caracterizar tanto el sitio en donde se llevará a cabo la aplicación del bioplaguicida, como el hospedero en el que éste producto se aplicará. Además es necesario conocer la

Ph.D., Investigadora Senior; Laboratorio de Control Biológico, Centro de Investigación Tibaitatá; Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA. AA 240142, Bogotá. E-mail: amcotes@corpoica.org.co

biología del patógeno, ya que de acuerdo con esta información se debe desarrollar una formulación que permita llegar a los sitios requeridos para prevenir la enfermedad o para interrumpir su ciclo, haciendo fácil su aplicación. Así mismo, se deben conocer las características ecofisiológicas del microorganismo biocontrolador, para definir cómo la temperatura, la humedad, el pH, la radiación ultravioleta (UV), la actividad de agua (A_w) y otros factores, influyen la viabilidad y la actividad del agente de control biológico. De esta forma, la formulación estará direccionada a conferirle al microorganismo tolerancia frente a las condiciones adversas, estabilidad en almacenamiento, facilidad de aplicación y alta efectividad, todo esto bajo parámetros de costo-efectividad.

Con la información ecofisiológica mencionada anteriormente se establecen los parámetros de inestabilidad a los que se enfrentará el microorganismo, cuando sea expuesto a condiciones de campo y de almacenamiento. Adicionalmente se seleccionan los auxiliares de formulación que permitan la obtención de prototipos de bioplaguicidas con adecuadas características y se seleccionan los más estables y eficientes. Basados en los resultados de los estudios de preformulación, se desarrollan los estudios de formulación, cuyo objetivo es lograr la combinación correcta de ingredientes de tal manera que el principio activo junto con los auxiliares de formulación formen un bioplaguicida estable, efectivo, seguro, de fácil aplicación y aceptable para su uso.

El desarrollo de una formulación involucra una etapa previa de preformulación, ésta se define como el conjunto de actividades organizadas conducentes a la determinación de las características del principio activo y de los cambios químicos, físicos y microbiológicos que éste puede sufrir solo o al combinarlo con los auxiliares de formulación necesarios para la elaboración del producto final. La formulación puede mejorar la eficacia del microorganismo, ya que permite una aplicación eficiente de éste, le confiere tolerancia a las condiciones medio-ambientales de campo y de almacenamiento, ayudando a aumentar su vida útil.

Los bioplaguicidas pueden ser formulados en diferentes presentaciones tales como polvo para espolvoreo (DP), polvo mojado (WP), polvo para tratamiento seco de semillas (DS), gránulado (GR), microgránulado (MG), gránulado dispersables (WG), emulsiones (aceite en agua EW o agua en aceite EO), suspensión concentrada (SC), dispersión en aceite (OD), suspo-emulsiones (SE), suspensión de microencapsulados (CS), líquidos de volumen ultra bajo (UL), etc. Por ejemplo, los polvos para espolvoreo se aplican principalmente en forma seca sobre la superficie del suelo o de las plantas. En éstos, la materia activa se encuentra dispersa en un vehículo inerte sólido que puede estar acompañado con agentes de fluidez y diversos estabilizantes. Los polvos mojables son aquellos que se deben reconstituirse en agua para su aplicación. Se presentan en forma de un polvo capaz de ser mojado y mantenerse en suspensión durante un período de tiempo largo. Los granulados son aglomerados de partículas con tamaños que oscilan entre 0,5 y 1,5mm, los cuales contienen el principio activo, un agente aglutinante, los diluentes y otros

coadyuvantes. Dentro de las formulaciones líquidas se destacan los concentrados emulsionables que constan de un principio activo suspendido en un medio graso apropiado que incluye los coadyuvantes necesarios, para que al mezclarlos con agua se produzca una emulsión estable. La mayoría de las formulaciones de bioplaguicidas existentes en el mercado para el control de fitopatógenos están basadas en formas secas, polvos mojables, granulados o polvos de reconstitución en vehículos oleosos. Sin embargo hay aún mucho por explorar en materia de desarrollo de nuevas formulaciones adaptadas a los requerimientos del usuario.

El hecho de que el microorganismo que constituye el principio activo de un bioplaguicida deba permanecer vivo, pero estable genética y fisiológicamente obliga a que éste deba mantenerse en estado latente durante el almacenamiento y que se active cuando sea aplicado para ejercer su actividad biocontroladora. Esto puede ser un reto para el formulador, quien debe considerar los requerimientos y susceptibilidades específicas de cada microorganismo. Varios de los factores que pueden afectarlos positiva o negativamente provienen de la fermentación, ya que al separar el microorganismo de su sustrato de producción, además de la biomasa microbiana pueden quedar materiales extraños que pueden interactuar físicamente con el microorganismo, afectando su viabilidad y actividad biocontroladora y las características fisicoquímicas de la formulación, ya que también pueden interactuar con los auxiliares de formulación.

La mayoría de formulaciones involucra el uso de surfactantes, dispersantes y agentes de suspensión. Los tensioactivos empleados en la formulación pueden ser iónicos, o aniónicos, sirven para humedecer los sólidos y para prevenir la aglomeración de las partículas. En general los tensioactivos aniónicos son adsorbidos por la superficie de las partículas y llevan una carga eléctrica, trabajando a distancia cuando dos partículas se aproximan entre sí para impartir la estabilidad electrostática. Por otra parte, los tensioactivos no iónicos en la superficie de la partícula promueven estabilidad estérica.

Los dispersantes pueden ser polímeros solubles en agua o agentes espesantes necesarios para una formulación estable. Dado su alto peso molecular, actúan principalmente como una barrera física entre las partículas en el medio líquido de dispersión. Estos en general le confieren viscosidad a las suspensiones líquidas en el estado estático (almacenamiento). Frecuentemente se utilizan mezclas de estos con los tensioactivos para darle estabilidad de la formulación resultante.

Los agentes de suspensión, juegan un papel esencial en las formulaciones, en ellos se incluyen arcillas (palygorskita y bentonita) y sílice entre otros. En su mayoría son minerales inorgánicos añadidos al sistema, representados por partículas finas de 1 a 50 μm , que pueden ser hidrófilos o hidrófobos. Ayudan a separar las partículas para que no se aglomeren, modificando la reología y mejorando el flujo del sistema.

En otras presentaciones de bioplaguicidas como los granulados (GR), que tienen aspecto de arenilla con tamaños de partícula que oscilan entre 0,2 y 1,5 mm,

además del principio activo y el vehículo, contienen un adherente. Los granulados dispersables en agua (WG), además de los auxiliares de formulación mencionados, contienen dispersantes.

De otra parte, el uso de protectores de luz UV es cada vez más frecuente en las formulaciones de bioplaguicidas. Ya que la inactivación causada por la radiación solar bajo condiciones de campo es el principal factor ambiental, que limita el uso masivo de estos agentes de biocontrol (Burges, 1998), particularmente, la radiación comprendida entre 280 nm y 310 nm. Esta induce efectos deletéreos en las células como consecuencia de su acción sobre porfirinas, carotenoides, quinonas, esteroides, proteínas y ácidos nucleicos. La radiación solar antes de llegar a la superficie terrestre, viaja a través de la atmósfera donde es absorbida la radiación UV-C y el 90% de la UV-B, mientras que la radiación UV-A es débilmente absorbida, por tal razón la radiación UV disponible en la tierra es 98% UV-A y 2% UV-B (Diffey, 1991). Dentro de los adyuvantes que actúan como protectores se encuentran los filtros solares y las pantallas solares. Los primeros absorben selectivamente la radiación ultravioleta, mientras que los segundos reflejan o dispersan la radiación. Dentro de los filtros solares se encuentran los de bajo espectro como el ácido para-aminobenzoico (PABA) y sus ésteres. Los rangos de absorbancia para el PABA y el aminobenzoato de glicerol está entre 260 y 313 nm en concentraciones del 5 al 15%. Cinamatos y sus ésteres a concentraciones entre el 1 y el 4%, tienen un rango de protección entre 280 y 310 nm y son insolubles en agua. En este grupo también se encuentran los salicilatos y ésteres, cuyo rango de protección está entre 290 y 315 nm (Fargues et al., 1997). Las pantallas solares son generalmente de origen mineral y son efectivas frente a radiación UV de tipo A y B. Los filtros solares físicos más usados son el óxido de zinc (ZnO) y el dióxido de titanio (TiO₂) (Velasquez et al., 1998).

El trabajo de preformulación puede comenzar mezclando un auxiliar de formulación con el microorganismo o usando mezclas del microorganismo con diferentes auxiliares mediante diseños experimentales complejos. Los criterios de evaluación en general consideran el efecto de estos sobre la viabilidad del microorganismo. Una vez seleccionados los auxiliares de formulación que no afectan negativamente la viabilidad de los microorganismos se hacen mezclas complejas para lograr el sistema de entrega definido para el producto y usando como variables de respuesta la viabilidad, las características fisicoquímicas, la actividad biocontroladora y la estabilidad en almacenamiento, mediante un enfoque integral y multidisciplinario que involucra la participación de microbiólogos, químicos farmacéuticos, biólogos, ingenieros agrónomos etc. Una vez seleccionado el prototipo de producto, éste debe ser optimizado durante la fase de formulación.

En Colombia, Corpoica la entidad de gobierno encargada de la investigación agropecuaria, mediante un trabajo multidisciplinario ha desarrollado diferentes tipos de formulaciones que han sido evaluadas exitosamente en campo tanto para

el control de enfermedades como de insectos plaga. Éstas han demostrado su estabilidad en condiciones de almacenamiento y campo y efectividad en condiciones comerciales de producción.

A base del aislamiento nativo Th003 de *Trichoderma koningiopsis* para el control de patógenos del suelo y foliares (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Oidium lycopersici*, entre otros). A base de este hongo se desarrollaron dos prototipos de producto, granulado dispersable y polvo mojable. Ambos contienen fotoprotectores que le confieren tolerancia a la luz UV-B. Se determinó que el producto en polvo tiene una vida útil de 18 meses, almacenado a 18°C y el producto granulado presentó alta viabilidad bajo condiciones de refrigeración (4°C), con una vida útil de 18 meses. Las dos formulaciones del hongo mostraron un efecto estabilizador durante el almacenamiento a las temperaturas de 4°C, 18°C y 28°C, considerando que la vida útil de los conidios sin formular presentó una germinación aceptable sólo hasta los 3,7, 3,3 y 0 meses a estas temperaturas respectivamente, demostrando así los beneficios de la formulación para estabilizar el microorganismo en condiciones de almacenamiento (Santos et al., 2012). Estas formulaciones han sido licenciadas internacionalmente con aplicación exitosa a nivel comercial.

Para el control de *Botrytis cinerea* en campo, a base de la cepa LvCo7 de *Rhodotorula glutinis* se desarrolló un prototipo de formulación líquida con protección ultravioleta, que en condiciones de almacenamiento presentó una pérdida de viabilidad inferior al 10% después de almacenarse durante 6 meses a 8 °C y alta actividad biocontroladora (69 %) al ser aplicado en cultivos de mora en condiciones de producción comercial (Zapata et al., 2013).

Para el control de patógenos en postcosecha se desarrollaron dos prototipos de bioplaguicida, un granulado dispersable y una suspensión oleosa a base la cepa Lv027 de *Pichia onychis*. Ambos cumplieron con todos los requerimientos físicos y microbiológicos establecidos para este tipo de productos, además de, presentaron alta eficiencia biocontroladora (cerca al 80%) con pérdidas de viabilidad menores al 10% cuando se sometieron a condiciones de refrigeración durante 6 meses. Al evaluar los dos prototipos de bioplaguicida desarrollados a base de esta contra *Rhizopus stolonifer* en frutos de tomate en pruebas semi-comerciales, se determinó que el prototipo granulado se comportó significativamente mejor que el prototipo oleoso con porcentajes de protección entre el 88% y el 90%, seleccionándose éste para posteriores ensayos comerciales (García et al., 2002).

Así mismo, este grupo también ha hecho varios desarrollos para el control de insectos plaga a base de *Lecanicillium lecani* (Cotes et al., 2009), *Metarhizium anisopliae* (Gomez et al., 1997), *Beauveria bassiana*, *Nomuraea rileyi* (Villamizar et al., 2004), granulovirus (Villamizar et al., 2008) y nucleopolihedrovirus (Villamizar et al., 2010) entre otros.

REFERENCIA

- Burges H (1998) Formulation of microbial biopesticide beneficial, microorganisms, nematodes and seed treatments. 2.
- Cotes AM, Espinel C, Villamizar L, Garzón I, Lozano M, López-Ávila A (2009) Biopesticide based on *Lecanicillium lecanii* developed for whiteflies control. IOBC-WPRS Bulletin. 45:263-266.
- Cotes AM, Gil J, Espinel C, Villamizar AM, Gomez M, Zuluaga MV, Torres L, Lopez-Ávila A (2004) Desarrollo de un Insecticida Microbiano para el control biológico del Gusano Blanco de la Papa. Ed. Arte y Fitolito. 75 p.
- Diffey B (1991) Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. Physics in Medicine and Biology 36:299-328.
- Fargues J, Rougie M, Goujet R, Smits N, Coustere C, Itier B (1997) Inactivation of conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by near ultraviolet (UVB and UVA) and visible radiation. J. Invertebr. 69:70-78.
- García P, Diaz A, Gomez M, Cotes AM (2002) Effect of different factors on mass production, formulation and biocontrol activity of the yeast *Pichia onychis* against *Rhizopus stolonifer*, a pathogen of tomato postharvest. IOBC-WPRS Bulletin. 25:7-40.
- Gómez M, Villamizar LF, Cotes AM (1997) Producción masiva y preformulación de *Metarhizium* spp. (Metschnikov) para el control biológico de la langosta Llanera (*Rhammatocerus schistocercoides*, (Rehn)). Revista Colombiana de Entomología. 23:119-124.
- Piedrahita D, Doll C, Romero C, Sierra J (1984) Formulaciones de herbicidas. Guía de estudio. Centro internacional de agricultura tropical (CIAT). p.36.
- Santos A, García M, Cotes AM, Villamizar L (2012) The effect of the formulation on the shelf-life of biopesticides based on Colombian isolates of *Trichoderma koningiopsis* Th003 and *Trichoderma asperellum* Th034. Revista iberoamericana de micología. 29:150-156.
- Velásquez Z, Uribe D, Zuluaga A (1998) Fundamentos de medicina: Terapia dermatológica. Corporación para investigaciones biológicas (CIB) Medellín. 30-36.
- Villamizar L, Arriero C, Bosa F, Cotes AM (2004) Desarrollo de preformulados a base de *Nomuraea rileyi* para el control de *Spodoptera frugiperda*. Revista Colombiana de Entomología. 30:99-105.
- Villamizar L, Barrera L, Cotes AM, Martínez F (2010) Eudragit S100 microparticles containing *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus: Physicochemical characterization, photostability and *in vitro* virus release. Journal of Microencapsulation, 27:314-324.
- Villamizar L, Espinel C, Grijalba E, Cuartas P, López-Ávila A, Cotes AM (2008) Development of a granulovirus based insecticide to control the potato tuber moths, *Tecia solanivora* and *Phthorimaea operculella*. IOBC-WPRS Bulletin. 31:77-82.
- Zapata J, Villamizar L, Díaz L, Uribe L, Bolaños C, Gómez M, Cotes AM (2013) Development of a biopesticide prototype based on the yeast *Rhodotorula glutinis* Lv316 for controlling *Botrytis cinerea* in blackberry. IOBC-WPRS Bulletin. 86:263-269.

2

Registro de produtos biológicos no Brasil: avanços e desafios

Francys Mara Ferreira Vilella

Segundo a Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico (ABCBio), o mercado de controle biológico de pragas e doenças na agricultura vem crescendo entre 10% a 15% ao ano (<http://www.abcbio.org.br/>). Esta é uma ótima notícia, mas ao mesmo tempo implica uma série de desafios a todos os setores envolvidos. Por parte da indústria, podemos destacar a necessidade de estabelecimento e atendimento de padrões mínimos de qualidade e lançamento de novas tecnologias. Por parte do governo, os desafios não deixam de ser menores: combate à venda ilegal, combate à venda de produtos sem registro e atualização do marco legal frente às novas tecnologias disponíveis.

Por definição, os produtos biológicos que tem como objetivo o controle de pragas se enquadram na Lei de Agrotóxicos e Afins, já aqueles que têm como finalidade proporcionar ganho favorável ao crescimento de plantas podem ser considerados Inoculantes e seguem outro arcabouço legal. Ambas as legislações, apesar de complexas e extensas, são passíveis de cumprimento.

O Setor Regulador vem impetrando esforços contínuos para acompanhar as demandas do mercado e modernizar o arcabouço legal dos produtos de uso agrícola. No que concerne os produtos considerados Inoculantes, a Lei que os regulamenta é de 1980, entretanto, seu decreto regulamentador foi publicado em 2004 – Decreto nº 4954/04. Ao longo desse tempo, até o presente momento, o MAPA vem fazendo esforços constantes para modernizar a legislação a fim de torná-la a mais clara possível, pois muitas vezes alguns produtos podem ter interface com a regulamentação de agrotóxicos e afins. Em relação aos produtos enquadrados como Agrotóxicos e Afins, a legislação que regulamentava o setor era extremamente antiga, tendo como base o Decreto nº 24.114/34, e que determinava, inclusive, que

CESIS Assessoria e Treinamento Ltda . SCLN 111, Bl D sl 204 Brasília/DF, 70754-540.
E-mail: francys@cesis.bio.br

a concessão do registro de tais produtos era de competência apenas do Ministério da Agricultura. A Lei nº 7.802/89 trouxe uma série de inovações e benefícios garantindo a segurança da população e do meio ambiente, assegurando padrões de qualidade e eficiência, além do uso seguro dos agrotóxicos no País, envolvendo conjuntamente três órgãos federais como regulamentadores: o Ministério da Agricultura (MAPA), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA). Já nessa Lei e em seu decreto regulamentador notam-se avanços com destaque para a necessidade de publicação de instrumentos jurídicos normativos específicos para produtos considerados de Baixa Toxicidade e Periculosidade e a priorização e avaliação diferenciada dessa categoria de produtos por parte dos reguladores. Ainda cabe ressaltar que houve uma diferenciação, também, no quesito registro de produtos técnicos e formulados. No caso de produtos ditos “químicos convencionais” há a necessidade do registro tanto do produto técnico quanto do produto formulado. Já para os produtos de baixa toxicidade/biológicos esse fato não acontece. A figura do registro do produto técnico pode ser dispensada, já que suas normativas específicas apresentam a possibilidade do registro direto das formulações de pronto uso, sem a necessidade da apresentação do Certificado de Registro do Produto Técnico que embasa a formulação, ficando a critério dos órgãos registrantes determinarem, ou não, esse registro. Até o presente momento nenhum produto considerado biológico necessitou ter seu produto técnico registrado. Essa diferença com os “químicos convencionais” é um fator importantíssimo quando se trata não só da diminuição do tempo de obtenção do Registro Federal, como também, da diminuição dos custos envolvidos no processo de registro.

O Registro de um produto é a maneira legal de se produzir, comercializar, exportar, importar, manipular ou utilizar um agrotóxico, componente ou afim, no país, seja por intermédio de formulação/fabricação dos seus componentes e/ou de importação dos mesmos e é **obrigatório** a todos os produtos destinados a defesa fitossanitária, ou seja, aqueles destinados ao controle de pragas e doenças, sejam eles utilizados na agricultura convencional ou na agricultura orgânica.

O objetivo do registro é principalmente garantir a segurança da população e do meio ambiente, os padrões de qualidade e a eficiência dos mesmos. Vale ressaltar que o Titular do Registro é o detentor dos direitos comerciais do produto.

Para que uma empresa possa buscar o registro de um produto deve primeiro enquadrá-lo corretamente na legislação pertinente. Tal enquadramento se dá em função da sua composição e da finalidade a que se destina.

Produtos inoculantes

Segundo a Regulamentação, entende-se por Inoculante os produtos que contenham microrganismos com atuação favorável ao crescimento de plantas com consequência em aumento de produtividade, como por exemplo, *Bradyrhizobium*

sp. e *Rhizobium* sp. Por esta regulamentação tratar de microrganismos, muitas vezes os produtos à base de fungos e bactérias, com atuação no controle, podem ser confundidos e enquadrados equivocadamente nesta categoria.

É de competência das Superintendências Estaduais do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA) as avaliações sobre os pleitos de Registro de Produtos e Estabelecimentos, bem como os procedimentos de fiscalização. Existem normas específicas para orientar cada uma das categorias de produtos que estão sob a égide da Lei 6.894/80. Cada produto possui uma normatização específica de acordo com sua composição. Existem ainda, normativas que orientam os métodos analíticos e qualitativos a serem utilizados nas análises, limites de contaminantes que determina o controle de qualidade tanto da matéria-prima quanto do produto final, além das diretrizes de importação. Portanto, cada categoria possui exigências próprias, especificações e detalhes singulares, a serem seguidos.

Para se obter o Registro de um Inoculante, a empresa requerente deve possuir o Registro do Estabelecimento Produtor. Como pré-requisito existe a necessidade de cumprimento da legislação ambiental - Licenciamento Ambiental – concedida pelo órgão estadual ambiental competente, ou a dispensa da mesma. Devem ainda ser registrados os estabelecimentos que comercializem, exportem ou importem, estes produtos. O prazo de validade do registro é de cinco anos, renovável por iguais períodos.

Produtos agrotóxicos – biológicos

Um produto é considerado como Agrotóxico ou Afim, conforme mencionado anteriormente, quando se apresenta como *“produto ou agente de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos”*.

Nesse contexto estão os agentes biológicos (entomopatógenos, parasitóides, predadores e nematóides), os semioquímicos, outros bioquímicos, extratos vegetais e minerais, utilizados na agricultura com finalidade de controlar organismos considerados nocivos, além de todos os outros produtos que sejam utilizados no controle de pragas agrícolas e que se enquadrem na definição legal.

No Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento (MAPA), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) são os órgãos federais responsáveis pela Avaliação e o Registro de Agrotóxicos e Afins. Dentre as competências de cada órgão federal, cabe ao MAPA avaliar a eficiência agrônômica

para uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas florestas plantadas e nas pastagens. Ao Ministério da Saúde, por meio da ANVISA, cabe avaliar e classificar toxicologicamente os agrotóxicos, seus componentes e afins; avaliar os produtos destinados ao uso em ambientes urbanos, industriais, domiciliares, públicos ou coletivos, ao tratamento de água e ao uso em campanhas de saúde pública. Compete ao Ministério do Meio Ambiente, por meio do IBAMA, avaliar os agrotóxicos e afins do ponto de vista do perigo ambiental estabelecendo suas classificações quanto ao potencial de periculosidade ambiental.

O primeiro registro a ser conseguido pela empresa é o Registro Especial Temporário (RET) cuja finalidade é conceder autorização temporária para que sejam executados os estudos toxicológicos, ambientais e de eficiência e praticabilidade agrônômica, que subsidiarão o pleito de registro para comercialização do produto. Desta forma, o primeiro passo é conseguir o RET, depois realizar os estudos específicos, após, solicitar o Registro Federal (esse sim, habilitará a empresa a comercializar o produto) e, por fim, proceder ao cadastramento do produto em cada Estado da Federação onde se pretende comercializar o produto.

O RET deve ser solicitado antes do início dos procedimentos de pesquisa e experimentação, inclusive no caso de importação de produtos utilizados com este fim, e está sujeito à aprovação, ou não, dos três órgãos federais, sendo concedido por tempo determinado.

Avanços em relação à Norma, que regulamenta esse registro, têm sido observados, dentre eles a separação na confecção dos processos a serem submetidos, especialmente para aqueles com características distintas dos agrotóxicos convencionais, como, por exemplo, o não enquadramento dos produtos biológicos nas fases em que normalmente os agrotóxicos convencionais são classificados, a depender do tamanho da área a ser testada e da quantidade de produto utilizado. O SISRET é outra inovação, é um sistema eletrônico de requerimento e análise, ancorado no portal eletrônico do IBAMA e utilizado de forma integrada pelo MAPA e ANVISA, que veio para agilizar e qualificar a avaliação preliminar de agrotóxicos. Este sistema foi desenvolvido para oferecer aos interessados no registro de produtos (para pesquisa e experimentação) maior economia e agilidade no atendimento. Uma terceira via de agilidade, implementada pelo Governo, é o que se denomina RET automático, concedido a produtos já registrados e onde a manifestação de concessão, ou não, fica a critério apenas o Ministério da Agricultura.

Registro federal

Para a solicitação de Registro Federal, que autoriza a comercialização do produto, devem ser seguidas as diretrizes da Lei 7.802/89, do Decreto 4074/02 e de cada uma das Portarias, Resoluções e Instruções Normativas Conjuntas vigentes para cada tipo de produto.

Quando se trata de um produto de baixa toxicidade, como os produtos biológicos, por exemplo, há que se solicitar aos órgãos regulamentadores que o produto seja considerado como tal, ou seja, seja enquadrado como um produto de Baixa Toxicidade e Periculosidade, termo citado nos instrumentos legais que norteiam o registro destes produtos. Desta forma, os pleitos submetidos devem demonstrar ao governo que seguirão não a normativa elaborada para a obtenção do registro dos produtos químicos convencionais, mas as diversas normativas hoje publicadas para atender, especificamente, cada um dos produtos considerados de Baixa Toxicidade e Periculosidade visando a avaliação caso a caso. Caso o produto seja considerado como tal, terá também sua análise priorizada. Abaixo citamos as especificidades, para cada uma das categorias até o presente, normatizadas especificamente:

a) Produtos Microbiológicos descritos como sendo os microrganismos vivos de ocorrência natural, bem como aqueles resultantes de técnicas que impliquem na introdução natural de material hereditário, excetuando-se os organismos cujo material genético (ADN/ARN) tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética (OGM).

Cabe salientar que, o registro de produtos microbiológicos é por cepa e não por espécie.

b) Agentes Biológicos de Controle, definidos como organismos vivos, de ocorrência natural, ou obtidos por manipulação genética, introduzidos no ambiente para o controle de uma população, ou de atividade biológica, de outro organismo considerado nocivo, podendo abranger: inimigos naturais (organismos que naturalmente infectam, parasitam, ou predam, uma praga específica, dentre eles, parasitóides, predadores e nematóides entomopatogênicos) e insetos obtidos através da TIE – Técnica do Inseto Estéril (liberação de machos esterilizados por radiação ionizante como método de controle que pode ser usado na supressão ou erradicação de pragas).

c) Produtos Bioquímicos descritos como reguladores de crescimento (hormônios e enzimas), constituídos por substâncias químicas de ocorrência natural e com mecanismo de ação não tóxico, usados no controle de doenças ou pragas.

d) Produtos Semioquímicos descritos como aqueles constituídos por substâncias químicas que evocam respostas comportamentais ou fisiológicas nos organismos receptores e que são empregados com a finalidade de detecção, monitoramento e controle de uma população, ou de atividade biológica de organismos vivos, podendo ser classificados, a depender da ação que provocam, intra ou interespecífica, como feromônios e aleloquímicos, respectivamente.

Conforme já abordado, há requisitos claramente estabelecidos para as diferentes linhas de produtos, inclusive os “químicos convencionais” (que não serão abordados nesse capítulo).

Para a submissão do pleito de Registro Federal faz-se necessária a apresentação de testes de caracterização físico-química dos produtos, bem como de testes

toxicológicos, ambientais, inclusive com organismos não alvo, da genotoxicidade e da eficiência e praticabilidade agrônômica. A obrigatoriedade da apresentação de cada um dos testes está vinculada ao tipo de produto, isto é, se técnico ou formulado, sólido, líquido ou gás, bem como do modo de uso, isto é, se aplicado em pré ou pós-emergência, pré ou pós-colheita, incorporado ao solo, utilizado no tratamento de sementes, utilizado dentro de armadilhas, etc.

As normas específicas que regem cada um dos produtos biológicos/naturais, citados anteriormente, descrevem os diferentes níveis de exigências para apresentação dos parâmetros e está totalmente relacionado às características próprias de cada um desses produtos.

A caracterização físico-química do produto consiste na descrição de sua estrutura molecular, fornecendo dados importantes para corroborar os resultados dos demais parâmetros toxicológicos, ambientais e da genotoxicidade testados. Os resultados obtidos são utilizados pelos três órgãos regulamentadores para embasar os demais resultados apresentados.

Os testes toxicológicos e ecotoxicológicos apresentados à ANVISA e ao IBAMA englobam não somente testes com mamíferos, como também, testes com outros organismos não-alvo, como insetos, aves, organismos aquáticos e de solo, abrangendo assim, diversos níveis tróficos. Além dos testes com organismos não-alvo, os parâmetros ecotoxicológicos abrangem, também, os testes de comportamento ambiental dos produtos, como transporte, mobilidade e adsorção, realizados com solos nacionais.

Todos os testes devem ser realizados sob as normas do Sistema da Qualidade BPL – Boas Práticas de Laboratório, seguindo metodologias reconhecidas nacional ou internacionalmente e adequadamente validadas. No Brasil, o INMETRO é a Unidade de Monitoramento reconhecida que audita os laboratórios quanto à competência na realização destes, dentro do Sistema da Qualidade citado.

Registro federal de produtos fitossanitários com uso aprovado para agricultura orgânica

A via de registro de produtos com uso aprovado para agricultura orgânica pode ser considerada outro grande avanço que veio beneficiar a área dos produtos biológicos. Implementada desde 2009, foi delineada para facilitar e agilizar o registro de produtos cujas informações em termos de segurança ambiental e toxicológica e eficiência agrônômica, já tinham um histórico de conhecimento, por parte dos órgãos regulamentadores. Essa via de registro consiste primeiramente na publicação das Especificações de Referência, por parte do Governo Federal, e onde não existe a obrigatoriedade da apresentação de RET no dossiê de registro, bem como apresentação da grande maioria dos testes exigidos, inclusive de eficiência agrônômica. Os poucos testes exigidos, geralmente referem-se à estabilidade de prateleira, que comprova a validade do produto, pelos interessados no Registro.

Entretanto, uma vez publicadas as Especificações de Referência, não há como o interessado no registro realizar qualquer alteração na formulação que irá pleitear o registro. A empresa interessada deve seguir fidedignamente todas as recomendações publicadas para a composição dos produtos, o tipo de formulação, o modo de uso, aplicação, eficácia referente aos alvos e culturas, bem como doses aplicadas. E é com base nesse fundamento que consiste a dispensa dos testes de eficácia e laboratório, pois o Governo Brasileiro já possui todos os dados necessários à segura avaliação dos produtos.

Vale ressaltar que, também nessa via, os produtos microbiológicos são registrados por cepa.

Até o presente momento foram publicadas as seguintes Especificações de Referência:

- *Cotesia flavipes*
- *Trichogramma galloi*
- *Neoseiulus californicus*
- *Tephrosia cândida*
- *Baculovirus Anticarsia gemmatalis*
- *Baculovirus Condylorrhiza vestigialis*
- *Metarhizium anisopliae*, strain IBCB 425
- *Trichoderma stromaticum*, strain CEPLAC 3550
- *Azadirachta indica*
- *Beauveria bassiana*, strain IBCB 66
- *Phytoseiulus macropilis*
- *Stratiolaelaps scimitus*
- *Deladenus (Beddingia) siricidicola*
- *Cryptolaemus montrouzieri*
- *Trichoderma asperellum*, strain URM-5911
- *Baculovirus Spodoptera frugiperda*

Registro estadual

Após a obtenção do Certificado de Registro em âmbito Federal, a Empresa ainda deverá cadastrar-se nos estados brasileiros onde deseja comercializar os produtos registrados. Enquanto que, em alguns estados este registro ou cadastro pode ser realizado de forma simplificada, apresentando somente a documentação deferida pelos órgãos federais regulamentadores, em outros, são exigidos praticamente todos os procedimentos de registro já realizados quando da submissão do pleito em esfera federal, inclusive com pagamento de taxas referentes à classificação dos produtos, recebida após avaliação dos órgãos federais. Este registro deve seguir legislação estadual específica, observando-se as exigências dos órgãos de meio ambiente, saúde e agricultura de cada estado.

Regulamentações indiretamente ligadas ao registro

As regulamentações abaixo estão também ligadas ao arcabouço legal que permeia o registro de produtos biológicos e devem ser atendidas pela empresa interessada, na medida em que esteja relacionada a sua atividade, que são:

- A Lei 6938/81 de Política Nacional de Meio Ambiente que determina às agências de fomento, a concessão de recursos financeiros somente àquelas instituições e empresas que tenham a Licença Ambiental;

- A Lei 13123 que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade.

- Lei 10.165/00 que determina o cadastramento de todas as instituições públicas e privadas, inclusive de ensino e/ou pesquisa, que realizem as atividades descritas em seu anexo no Cadastro Técnico Federal/IBAMA

- Cumprimento de Resolução ANVISA para comprovação de porte da empresa.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como exposto acima, o marco regulatório que regula os produtos agrícolas, em especial os produtos biológicos, é claramente estabelecido e assegura, tanto ao setor produtivo, quanto ao consumidor, segurança jurídica, toxicológica e ambiental. Muitos avanços tem sido observados nesse repertório, apesar do muito ainda que há de se fazer, para tornar a tramitação dos processos a mais ágil possível dentro dos padrões mínimos de segurança aceitáveis. Portanto, o empreendedor que queira investir nesse mercado extremamente promissor precisa cumprir as regras e continuar investindo em inovação para gerar tecnológicas cada vez mais ambientalmente amigáveis e toxicologicamente seguras.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Lei nº 6.894 de 16 de dezembro de 1980. Dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, estimulantes ou biofertilizantes, destinados à agricultura.

BRASIL. Decreto nº 4.954 de 14 de janeiro de 2004. Aprova o Regulamento da Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980. Dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes ou biofertilizantes destinados à agricultura, e dá outras providências.

BRASIL. Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a

propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências.

BRASIL. Decreto nº 4.074 de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências.

BRASIL. Lei 13123, de 20 de maio de 2015. Regulamenta o inciso II do § 1º e o § 4º do art. 225 da Constituição Federal, o Artigo 1, a alínea *j* do Artigo 8, a alínea *c* do Artigo 10, o Artigo 15 e os §§ 3º e 4º do Artigo 16 da Convenção sobre Diversidade Biológica, promulgada pelo Decreto nº 2.519, de 16 de março de 1998; dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade; revoga a Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001; e dá outras providências.

3

Análise comparativa do registro de produtos biológicos na Colômbia, Estados Unidos e na União Europeia

Yasmim F. Figueiredo¹
Carolina C. A. Nogueira¹
Italo A. F. M. Santos²
Flávio H. V. Medeiros¹

INTRODUÇÃO

A demanda por insumos agrícolas de baixo impacto à saúde humana e ao ambiente cresce constantemente em todo o mundo. Com isso, os agentes de biocontrole de pragas e doenças de plantas vêm ganhando maior visibilidade e mercado. Assim, o mercado mundial e a indústria de produtos de controle biológico têm crescido cinco vezes mais que a de defensivos químicos (ABC BIO, 2015). A comercialização dos agentes de biocontrole exige uma série de normas governamentais que orientam os passos necessários para a regulamentação da produção, armazenamento, comercialização e aplicação dos produtos biológicos. Essas normas garantem ao setor produtivo regras claras para disponibilizar os produtos no mercado, e ao consumidor final, a certeza da disponibilidade de produtos seguros ao ambiente e à saúde pública, utilizando adequadamente a biodiversidade. Portanto, a adequação da legislação para o devido registro se torna extremamente importante para o agronegócio (De Paula Júnior et al., 2013).

Cada país possui uma legislação específica para o registro de produtos biológicos. Entretanto, também pode haver a união de países que seguem a mesma legislação, como ocorre na União Europeia. Nesse capítulo serão abordados

¹Departamento de Fitopatologia

²Departamento de Biologia/Setor de Microbiologia Agrícola
Universidade Federal de Lavras, 372000-000, Lavras, MG, Brasil.
E-mail: flaviomedeiros@dfp.ufla.br

aspectos da legislação Colombiana, Norte Americana e da União Europeia, países que possuem grande quantidade de produtos registrados. A revisão apresentada se baseou na consulta aos sites dos órgãos regulamentadores em cada um dos países, a saber, o Instituto Colombiano Agropecuário, Agência de Proteção Ambiental (EPA nos EUA), e a Comissão Europeia e o Ministério da Agricultura de cada Estado-Membro.

Há algumas diferenças importantes entre as legislações, como, por exemplo, nos Estados Unidos é necessária uma reunião antes do envio de pedido de registro do produto, que tem o objetivo de esclarecer o que é necessário e como deve ser feito o registro. Outro aspecto muito variável no registro é o custo, a Colômbia o custo de registro é compatível com o brasileiro, tendo seu valor mínimo a partir de US\$ 100-761.000, respectivamente. O registro na Europa é mais caro, superior a US\$ 1 milhão, e também o mais demorado, podendo variar entre 2,5 e 4,5 anos, enquanto que nos demais países citados por ser de apenas um ano.

Para a obtenção do registro nesses países são exigidas análises das características morfológicas, físicas, bioquímicas e toxicológicas, além dos impactos ambientais, para resguardar a saúde da população que irá consumir os alimentos tratados com os bioagentes e também das pessoas que terão contato direto com o produto.

As exigências para registro também depende do organismo, sendo que para os microrganismos, principalmente os predadores e parasitoides o registro é bastante simplificado. Por outro lado, para os agentes microbianos as exigências são maiores, justamente devido às diferenças de características de cada grupo de organismos.

Colômbia

A Colômbia possui grande biodiversidade, tendo a peculiaridade de ser o único país da América do Sul banhado por dois oceanos (Câmara, 1999). Este país é considerado por Mittermeier *et al.* (1997) um dos mais ricos em diversidade biológica, junto dos Estados Unidos, México, Venezuela, Brasil, África do Sul, Índia, China, Austrália e outros, denominados países de megadiversidade.

A fim de proteger a diversidade local, estes países criaram mecanismos legais e adotaram a Convenção sobre Diversidade Biológica durante a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento – RIO 92, realizada na cidade do Rio de Janeiro em 1992 (Sandes & Di Blasi, 2000). A aprovação da convenção na Colômbia ocorreu em 9 de novembro 1994 pela Lei de nº 165, demonstrando a consciência da diversidade biológica para qualquer fonte de organismo vivo, de qualquer ecossistema, sendo terrestres, aquáticos e todos os complexos ecológicos presentes. Almejando a obtenção de desenvolvimento baseado em sustentabilidade, por meio de valores ecológicos, sociais, econômicos, científicos, educativos, culturais, recreativos e estéticos.

No ano de 1996, por meio da resolução 1056 de 17 de abril, o governo colombiano cria o Instituto Colombiano Agropecuário – ICA, para realizar o

controle técnico dos insumos agropecuários, que inclui todos os produtos naturais, sintéticos ou biológicos, utilizados para promover a produção agropecuária. A instituição é responsável pelo registro de produção, importação, controle de qualidade e comercialização de insumos agropecuários e por cumprir todas as legislações vigentes no país sobre o tema. Em dezembro de 2008, o ICA sofreu alterações estruturais, por meio do artigo 5º do Decreto 4765, no qual as atividades de pesquisa e de transferência de tecnologia presentes em sua criação, devem ser realizadas em conjunto com pessoas físicas ou jurídicas.

Com base na legislação, o ICA entende como produto biológico em específico, aquele que foi obtido de um organismo vivo, de substâncias derivadas do cultivo destes ou de origem humana ou animal, incluindo organismos e microrganismos empregados no controle biológico de doenças em geral. O controle biológico de doença de plantas está relacionada a área de Fertilizantes e de insumos biológicos agrícolas, por meio do controle técnico-científico de registro, produção, importação, comercialização e uso de fertilizantes, condicionadores de solo e insumos biológicos agrícolas, como os agentes microbianos, inoculantes biológicos e extratos vegetais, para a nutrição das plantas, prevenção, controle e erradicação das pragas, e facilitar o comércio nacional e internacional de produtos de origem agrícola e para melhorar a produção e produtividade agrícola e contribuir para a segurança alimentar.

Em 23 de janeiro de 2003, pela resolução 150, adota-se o Regulamento técnico de fertilizantes a condicionadores de solos para a Colômbia, com isso, o ICA fica responsável em outorgar o registro e exercer o controle legal e técnico destes produtos no país, para obter no setor agropecuário um maior grau de segurança alimentar. O governo colombiano visando obter a qualidade dos produtos de origem ecológica e garantir aos cidadãos o direito de um ambiente saudável, por meio da preservação, conservação e/ou proteção dos recursos naturais renováveis e não-renováveis adotou diretrizes iniciais, envolvendo produção primária, processamento, empacotamento, etiquetamento, certificação, importação, comercialização e estabeleceu o Sistema de Controle de Produtos Agropecuários Ecológicos, por meio da Resolução 187 de 31 de julho de 2006, sendo esta aprimorada pelas resoluções posteriores.

No ano de 2010, devido à necessidade de regularizar o registro de produtos e controle de pessoas que realizam a comercialização de produtos agropecuários e/ou de sementes foi criada a Resolução 1167 de 25 de março de 2010. O ICA foi selecionado como órgão responsável para exercer o controle técnico da comercialização e do uso dos produtos na Colômbia, sendo que as pessoas físicas ou jurídicas que desejem realizar a comercialização deverão se registrar neste órgão, entregar os documentos necessários ao ICA e seguir todas as normas vigentes para obter o registro de comércio, podendo ser inspecionados a qualquer momento.

Havendo a necessidade de uma legislação mais concreta e detalhada para estabelecer os requisitos para registrar departamentos técnicos de ensaio de eficácia, produtores e importadores de insumos biológicos de uso agrícola e ditar outras disposições legais, foi publicado o artigo 7º da resolução 698 de 2011 dita sobre o

registro de produtos de controle biológico. O interessado necessita primeiramente realizar o seu registro como produtor, produtor por contrato, importador e/ou de departamento técnico de ensaio de eficácia com data de expedição de até 90 dias, com isso, até 30 dias depois o ICA realizará uma visita técnica de verificação e emitirá o conceito favorável ou não em 60 dias. O ensaio de eficácia é um experimento de campo, realizado conforme escala experimental, que tem o objetivo de comprovar a eficácia biológica ou agrônômica de um insumo biológico de uso agrícola, conforme as doses e seguindo as recomendações indicadas pelo fabricante e realizadas na Colômbia. Depois de aprovada, o ICA expedirá o registro do produtor em até 30 dias, assim o prazo total de registro do produtor é de 210 dias.

Após a obtenção do registro do produtor, é necessário o registro do produto, com isso se deve solicitar o registro, tendo o relatório de ensaio de eficácia, as recomendações de uso e anexar o certificado de entrega do material de referência no Laboratório Nacional, com as características do seu agente de controle biológico. Há a necessidade de entrega de uma cópia do conceito toxicológico gerado pelo Ministério de Proteção Social ou de alguma entidade capacitada; o projeto de etiqueta ou rótulo do produto, o protocolo de ensaio de eficácia aprovado pelo ICA. A estabilidade do produto deve ser provada por meio de um laboratório registrado no ICA, tendo a avaliação de pelo menos dois lotes do produto (bioensaio, características microbiológicas, $\geq 95\%$ pureza microbiológica, não deve ter organismo contaminantes, determinações físicas e químicas do produto, e em casos biofertilizantes e inoculantes produzidos de suportes não estéreis, deve-se incluir análises de salmonela, coliformes totais e metais pesados para as análises realizadas no tempo zero.

As características morfológicas do ingrediente ativo, os meios de cultivo ou de preparação e condições ótimas para o desenvolvimento e multiplicação, os métodos de análises qualitativos e quantitativos garantindo a composição e a atividade biológica, utilizados para o controle de qualidade do produto, a folha de manejo do produto, o certificado da marca expedido pela Superintendência de Indústria e Comércio, ou alguma entidade com a mesma competência, o certificado do titular do registro em qual conste que foi realizado um contrato de produção em caso de que se realize a produção por contrato com outra pessoa, deverão ser apresentados. Deverá especificar a espécie agrônômica, o tipo de solo para a qual se recomenda o uso do produto, com o certificado de análise do produto e descrição do conteúdo dos materiais aditivos ou auxiliares à formulação nas proporções reais a respeito do ingrediente ativo, o qual deve coincidir com o descrito no conceito toxicológico, com as provas de compatibilidade com agroquímicos, restrições do uso e descrição para a eliminação de produtos vencidos ou fora das especificações técnicas.

No caso de produtos importados, deve apresentar também a autorização do produtor para a comercialização do produto na Colômbia, no qual se inclua o certificado de análises do mesmo e o Certificado de venda livre no país de origem, quando o produto é fabricado no exterior e expedido pela autoridade

nacional competente, o certificado oficial que explique o motivo pelo qual não está registrado, com a data de expedição com no máximo seis meses a solicitação do registro. Este certificado ou documento deve considerar a composição garantida e estar devidamente consolidado e certificado. Devendo também apresentar o recibo de pagamento da tarifa estabelecida pelo ICA.

O pedido de solicitação de registro de produto deve ser feito trinta dias antes da data de iniciação dos Ensaio de Eficácia Agronômica, depois de 15 dias do arquivamento o pedido será aprovado ou não, caso haja alguma alteração a ser feita, terá um prazo de 30 dias para sua realização. Após sua aprovação, terá um prazo de vigência de 3 anos, findado este tempo, deverá realizar ensaios de eficácia em duas zonas agroecológicas diferentes. A etiqueta ou rótulo do produto também devem ser aprovados, 30 dias após a aprovação da etiqueta, é necessário que envie ao Instituto um exemplar da arte final, em meio magnético e físico. Para a expedição do registro do produto, o ICA terá 30 dias após a solicitação do registro para avaliar a informação, documentação e expedir com vigência, mas, caso haja a necessidade de fazer ajustes ou complementar a solicitação, haverá um prazo de no máximo trinta dias para os ajustes.

No caso de modificação dos registros, por modificação de atividade, mudança do local de produção, armazenamento e/ou do departamento técnico, ou mesmo modificação no próprio produto, há um prazo de 10 dias após a circunstância ocorrida. Após o registro do produto, o titular do registro deve cumprir algumas obrigações para manutenção do registro, como enviar a Direção Técnica de Inocuidade e Insumos Agrícolas, um relatório com os dados de comercialização ou serviços prestados no ano imediatamente anterior, até dia 31 de março de cada ano. Todos modelos de solicitação estão presentes no anexo da Resolução 698 de 2011.

Informações necessárias para o registro de produtos podem ser encontradas no site do ICA (<http://www.ica.gov.co>) de forma atualizada na área de Fertilizantes e Insumos Biológicos, com última atualização em 24 de fevereiro de 2016, onde estão disponíveis os Departamentos técnicos para testes de eficácia agrônômica de insumos biológicos registrados; todas as empresas de insumos biológicos; todos os produtos registrados de insumos biológicos, os Laboratórios Registrados e Autorizados pelo ICA e os dados estatísticos de Importação e Exportação de Fertilizantes, condicionadores de solo e Insumos Biológicos, com riqueza de dados e são apresentados em forma de planilha.

Os produtos de Insumos Biológicos são divididos em extratos vegetais, inoculantes biológicos, que podem ser fungos micorrízicos, agente de controle biológico (parasitóide, predador e/ou agente microbiano), bioquímicos e também medidas para a redução de acetileno, para estimular a fixação de nitrogênio (Hardy et al., 1968). São muitos agentes de controle biológico usados na Colômbia. Os principais ingredientes ativos utilizados na fabricação dos produtos são espécies dos gêneros *Trichoderma* (20%) e *Bacillus* (9%), respectivamente.

Estados Unidos

Nos Estados Unidos, o órgão competente pela regulamentação de produtos fitossanitários é a Agencia de Proteção Ambiental (EPA - Environmental Protection Agency). Sua missão é regulamentar e implementar leis ambientais com o intuito de proteger a saúde humana e o meio ambiente.

O registro de pesticidas pela EPA acontece sob duas leis principais. Uma delas é o Ato Federal Inseticida, Fungicida e Raticida (FIFRA - Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act), originalmente promulgada em 1947. A lei promove regulamentações federais quanto a distribuição, venda e uso de pesticidas. Todos devem ser licenciados pela EPA, garantindo não causar efeitos adversos ao ambiente. A FIFRA define esses efeitos adversos como: “(1) nenhum risco despropositado para o homem ou o ambiente, considerando os custos e benefícios econômico, social e ambiental do uso de qualquer pesticida, ou (2) risco à dieta humana devido à resíduos resultantes do uso do pesticida que seja inconsistente sob a seção 408 do Ato Federal de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos (Federal Food, Drug, and Cosmetic Act – FFDC)”.

O Ato Federal de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos (FFDC - Federal Food, Drug, and Cosmetic Act), é a segunda lei maior que rege o registro de produtos fitossanitários. Ela autoriza que a EPA estabeleça limites máximos de resíduos de pesticidas nos alimentos. O alimento deve ser considerado “seguro”, sendo este definido como “certeza razoável de que nenhum mal vai resultar da exposição agregada ao resíduo do pesticida”. Neste caso, a toxicidade dos produtos, exposição agregada aos alimentos e de outras fontes de exposição, e eventuais riscos que representam para a lactentes e crianças são considerados.

Além das leis supracitadas, foi estabelecido o Ato de Proteção da Qualidade dos Alimentos (Food Quality Protection Act – FQPA), uma emenda tanto a FIFRA quanto a FFDC. A lei exige da Agência um padrão de segurança dos pesticidas utilizados em alimentos baseado na garantia da saúde humana: (1) procedendo a uma verificação de segurança ao estabelecer os níveis de tolerância; (2) usando este novo padrão de segurança para reavaliar, ao longo de um período de 10 anos, todas as tolerâncias de pesticidas que estavam em vigor quando o FQPA foi assinado; (3) considerando a suscetibilidade especial das crianças aos pesticidas utilizando, um fator adicional de segurança de dez vezes; (4) considerando o risco agregado da exposição de varias fontes (alimentos, água, fontes residenciais e outros não ocupacional) a um pesticida; e (5) considerar a exposição cumulativa aos pesticidas que têm mecanismos comuns de toxicidade.

A FIFRA prevê diferentes tipos de registros para pesticidas: **Licença para uso experimental**, que permite fabricantes de pesticidas e biopesticidas testarem os mesmos, ainda em desenvolvimento, em campo; **Dispensa de emergência**, que possibilita que as agências estaduais e federais concedam o uso de um pesticida não registrado em uma área geográfica específica durante um tempo limitado, se

existirem condições de pragas de emergência. Além disto as isenções podem ser aprovadas por razões de saúde e quarentena públicas; **Registro específico por Estado**, onde os Estados podem registrar um novo pesticida para qualquer uso, ou um produto registado sob as leis federais para um uso adicional , desde que seja demonstrada “ necessidade local especial” e a tolerância, a isenção de uma tolerância ou outra autorização ao abrigo da lei regulamentadora, e o **Registro**, que objetiva o registro de pesticidas para uso nos Estados Unidos. Sendo que, alguns pesticidas são registrados com uso mais limitado em certos estados. Isto devido ao fato de que que, estados , tribos e territórios pode colocar mais restrições sobre os pesticidas utilizados ou vendidos dentro de suas próprias jurisdições. Neste momento, apenas o **Registro** convencional será abordado.

Antes de montar ou alterar um pedido de registro, o requerente deve primeiro considerar o agendamento de uma reunião de pré-submissão com representantes da EPA. A reunião fornece uma oportunidade para discutir e confirmar os requisitos necessários para a realização do processo que, para prosseguir, deve seguir as exigências regulamentadas em lei.

Perante a lei, é considerado um pesticida “qualquer substância, ou mistura de substâncias, pretendidos a prevenir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga, ou pretendido para ser usado como regulador de planta, defoliante ou dessecante” ([40 CFR] § 152.3). Os biopesticidas, definidos pela EPA como “certos tipos de pesticidas derivados de materiais naturais como animais, plantas, bactérias e alguns minerais”, estão divididos em três grupos principais sob a FIFRA: Pesticidas bioquímicos, pesticidas microbianos e protetores incorporados a plantas (PIPs) ([40 CFR] § 158.2000). Essa divisão se dá em função da composição e finalidade dos produtos.

Por considerar os biopesticidas representantes de pouco ou nenhum risco à saúde humana ou ao ambiente, a EPA tem incentivado o desenvolvimento e uso dos mesmos no lugar de pesticidas químicos convencionais. Tal incentivo é dado com medidas que facilitam o processo de registro dos mesmos. Para pesticidas químicos convencionais, o processo leva mais de três anos, enquanto para biopesticidas o registro é feito, na maioria dos casos, em menos de um ano.

Os requisitos para o registro de biopesticidas são basicamente os mesmos, independente do grupo ao qual pertence (bioquímico, microbiano ou protetores incorporados a plantas). Análises como composição físico-química, limite de resíduos, performance do produto e toxicidade a humanos, animais e ao ambiente são solicitadas em todos os casos. Sendo que, para esta última é adotado o sistema de fases. Nele, os requisitos de dados necessários para o registro são organizados em um sistema de testes com estudos adicionais especificados a níveis mais elevados. Ou seja, testes mais específicos só são requeridos se tais se justificarem por efeitos adversos observados nos estudos de nível inferior. Esta medida torna o registro mais rápido e menos oneroso.

Apesar de similares as informações exigidas para o registro dos grupos de biopesticidas, existe uma diferença nos processos de análise aos quais cada um é

submetido. Cada um possui métodos particulares para a obtenção dos resultados que permitirão ou não a continuidade do processo. Estas informações estão dispostas no Código de Regulamentações Federais - ([40 CFR] § 158.).

• **Pesticidas bioquímicos**

São considerados pesticidas bioquímicos aquelas substâncias naturais que atuam no controle de pragas, como por exemplo semioquímicos (feromônios e caimônios de insetos), reguladores naturais de plantas e insetos, repelentes de ocorrência natural e enzimas. Apesar da classificação dentro dos critérios de pesticidas bioquímicos ser difícil, a FIFRA os define como: (1) substância de ocorrência natural ou estruturalmente similar que possua funcionalidade idêntica a substância de ocorrência natural; (2) histórico de exposição a humanos e ao ambiente que demonstre toxicidade mínima, ou, no caso de um sintético derivado de pesticidas bioquímicos, seja equivalente a substância de ocorrência natural que tenha o mesmo histórico; e (3) modo de ação não tóxico sobre a(s) praga(s) alvo.

Para registro dos bioquímicos, são exigidos dados sobre a análise do produto e a toxicidade sobre mamíferos, onde são requeridas informações sobre a identidade e a composição do produto, o processo de fabricação e uma discussão da formação de impurezas, métodos analíticos de aplicação, análise de certificação dos limites e propriedades físicas e/ou químicas. Além disto, é necessário comprovar que o produto não possui efeitos adversos sobre organismos não-alvo e sua performance.

• **Pesticidas microbianos**

A FIFRA define estes como “agente microbiano pretendido para prevenir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga, ou pretendido para o uso como regulador de plantas, defoliante, ou dessecante que: (1) é um microrganismo eucariótico; (2) é um microrganismo procariótico; ou (3) um elemento microscópico de replicação parasítica, como os vírus”.

No caso dos biopesticidas microbiológicos, o registro ocorre de maneira parecida ao registro dos bioquímicos, existindo a necessidade de se comprovar a eficiência do produto e seus efeitos sobre a saúde humana e o ambiente. O isolado utilizado para a é considerado o ingrediente ativo e deve ser registrado independentemente de qualquer ingrediente ativo microbiano similarmente designado já registrado. Com isto, informações mais precisas sobre a identidade do agente microbiano são requeridas. Para bactérias pode incluir informação de homologia de DNA genético, morfologia, os testes bioquímicos e a sensibilidade a antibiótico. As informações para outros tipos de microrganismos, tais como fungos, vírus e protozoários são geralmente menos extensa, e pode, portanto, envolver outras metodologias de identificação, como sorotipagem, homologia de DNA, mapeamento restrito ou análise de isoenzimas, quando disponível.

Quando o microrganismo ativo é geneticamente modificado, ele está sujeito a informações adicionais dependentes da particularidade do agente microbiano, do

propósito do uso do pesticida e da maneira como o organismo foi geneticamente modificado, o que exige informações sobre as técnicas de engenharia genética utilizadas, identidade do segmento de gene inserido ou eliminado (sequência de base de dados ou mapa da enzima de restrição do gene), informação sobre a região controle da expressão do gene em questão, uma descrição das novas características ou características que se pretende expressar.

• **Protetores incorporados a plantas (PIPs)**

“Protetor incorporado a plantas é substâncias pesticida que se destina a ser produzida e utilizado em uma planta viva, ou no produto da mesma, e o material genético necessário para a produção de uma substância pesticida”- [40 CFR] § 174

O registro dos PIPs segue o mesmo padrão dos biopesticidas microbiológicos, isto porque os protetores registrados até o momento foram desenvolvidos a partir de genes encontrados em microrganismos, como o caso de produtos incorporados com genes de *Bacillus thuringiensis (Bt)*. Os requisitos de dados exatos para cada um dos produtos foram desenvolvidos com base em caso a caso, mas os requisitos gerais seguem a regra do registro para os outros biopesticidas: caracterização do produto, toxicidade em mamíferos, potencial de alérgenos, efeitos sobre organismos não-alvo e destino ambiental. As especificações para cada caso são encontradas no Código de Regulamentações Federais - [40 CFR] § 174.

Todos os testes exigidos para se registrar um produto pela EPA sob a jurisdição da FIFRA devem ser realizados de acordo com as normas de Boas Práticas Laboratoriais ([40 CFR] § 160). Nela são descritas as técnicas para condução de estudos que apoiam os pedidos de investigação para produtos pesticidas regulados pela Agência.

Até o momento, entre os produtos de biocontrole registrados nos Estados Unidos pela EPA, destaca-se aqueles que tem espécies do gênero *Bacillus* como agente antagonista, seguido por espécies do gênero *Pseudomonas*. Apesar de apresentar um grande potencial como agente de biocontrole, espécies do gênero *Trichoderma* são base de apenas 7% dos produtos registrados.

União Europeia

Ainda em vigência, o Regulamento (CE) n.º 1107/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia, de 21 de outubro de 2009, estabelece as regras aplicáveis à autorização dos produtos fitofármacos sob a forma comercial, bem como à sua colocação no mercado, utilização e controle na Comunidade, objetivando o alto nível de proteção da saúde humana e animal e do ambiente, sem deixar de lado a competitividade agrícola. No âmbito da aplicação, fitofármacos designa-se, dentre outras coisas, produtos, na forma em que são fornecidos ao agricultor, que contêm ou são constituídos por substâncias ativas e se destinam a proteger os vegetais ou os produtos vegetais contra organismos nocivos ou prevenir a ação desses organismos.

O ato legislativo eliminou vários obstáculos ao comércio de produtos fitofármacos, simplificando e estabelecendo regras harmonizadas, juridicamente vinculadas e aplicadas em todos os Estados-Membros, para a aprovação de substâncias ativas (substâncias, incluindo microrganismos, com ação geral ou específica contra organismos nocivos ou sobre os vegetais, parte de vegetais ou produtos vegetais) e colocação no mercado, assegurando a coerência em todos os Estados-Membros. Além disso, o regulamento teve como grande evolução, o incentivo a colocação no mercado de produtos fitofármacos naturais de baixo risco como alternativa aos pesticidas químicos, tornando mais fácil e rápida a aprovação (Regulamento n° 1107/2009 da Comissão Europeia).

Juntamente com o Regulamento (CE) n.º 1107/2009, foi aprovada a Diretiva 2009/128/CE, que estabeleceu ações para utilização sustentável dos pesticidas, promovendo o manejo integrado e abordagens das técnicas alternativas não químicas. Métodos não químicos podem ser entendidos como técnicas agrônomicas ou métodos físicos, mecânicos ou biológicos de controle de pragas, visando o cultivo sustentável com a menor perturbação possível dos ecossistemas agrícolas incentivando os mecanismos naturais de controle fitossanitário. Desde Janeiro de 2014, a União Europeia (UE) obriga a implementação do manejo integrado de pragas (MIP) a todos os profissionais que utilizam pesticidas, sendo apoiados pelos Estados-Membros com serviços de consultoria e ferramentas de monitoramento de pragas (Matyjaszczyk, 2015; Diretiva 2009/128/CE da Comissão Europeia). Nesse contexto, produtos fitofármacos à base de agentes biológicos desempenham um papel importante, por serem eficazes, geralmente com diferentes modos de ação, seguros e com intervalo de reentrada baixo, após aplicação (Villaverde et al., 2014).

Os requisitos em matéria de dados aplicáveis às substâncias ativas compostas por microrganismos, inclusive vírus, são estabelecidos na parte B do anexo do Regulamento (UE) n.º 283/2013 da CE, de 1 de março de 2013, em conformidade com o Regulamento (CE) n.º 1107/2009. Todos os dados disponíveis e informações publicadas dos microrganismos, que são objeto de pedido, devem ser fornecidos, como identificação (nome e descrição da espécie) e caracterização (morfologia, bioquímica, sorologia e identificação molecular) devendo o microrganismo ser depositado numa coleção de cultura reconhecida internacionalmente. A composição do produto formulado deverá ser especificada: concentração do microrganismo (mínimo e máximo); identificação e teor de impurezas, aditivos e microrganismos contaminantes; e características analíticas dos lotes. Propriedades biológicas do microrganismo também devem ser informadas: origem e sua utilização, ocorrência natural e distribuição geográfica; informações sobre o organismo ou organismos visados (modo de ação); grau de especificidade do hospedeiro e efeitos em espécies diferentes do organismo prejudicial visado; fase de desenvolvimento/ciclo de vida do microrganismo; infectividade e capacidade de dispersão e colonização; relações com agentes patogênicos conhecidos dos vegetais, dos animais ou do homem; estabilidade genética e fatores que a afetam; informações sobre a produção de

metabólitos (especialmente toxinas), antibióticos e outros agentes antimicrobianos; além de informações adicionais (descrever a utilização, a dose e o modo de uso, e especificar o método e precauções normais a seguir), métodos de análise, efeito na saúde humana, resíduo, destino e comportamento no ambiente, efeito em organismos não visados, resumo e avaliação do impacto ambiental.

No que se refere aos requisitos em matéria de dados aplicáveis aos produtos fitofármacos, o Regulamento (UE) n.º 284/2013 da CE, de 1 de março de 2013, em conformidade com o Regulamento (CE) n.º 1107/2009, na parte B do anexo, aborda as preparações de microrganismos incluindo vírus. De acordo com Matyjaszczyk (2015), mesmo com a harmonização das regras de colocação de produtos fitofármacos no mercado, dependendo do Estado-Membro, elas podem variar significativamente, dificultando o registro e a comercialização. No entanto, vários Estados-Membros anunciaram planos de incentivo ao controle biológico como, por exemplo: Bélgica (NAPAN, 2013); Alemanha (NAP, 2013); Portugal (PANUSPF, 2013) e Reino Unido (UK NAP, 2013) gerando perspectiva de crescimento no mercado de controle biológico e maior investimento, por parte das empresas de agroquímicos, nessa tecnologia verde (Le Mire et al., 2016).

Toda substância ativa, microbiana ou não, para compor um produto fitofármaco na UE, deve ser aprovada pela Comissão Europeia (CE). Para isso, deve-se apresentar benefício no que se refere à produção vegetal sem qualquer efeito nocivo à saúde humana ou animal, nem efeito inaceitável no ambiente. Uma substância ativa não será considerada de baixo risco se é ou vai ser classificada pelo menos numa das seguintes categorias: cancerígena; mutagênica; tóxica para a reprodução; químicos sensibilizantes; muito tóxica ou tóxica; explosiva e corrosiva. Também não será considerada de baixo risco se: for persistente (meia-vida no solo superior a 60 dias); for considerada um desregulador endócrino, ou se tiver efeitos neurotóxicos ou imunotóxicos (Regulamento n.º 1107/2009 da Comissão Europeia).

Há poucas diferenças nas exigências da UE para aprovação de produtos fitofármacos à base de agentes biológicos em comparação as substâncias químicas. Por exemplo, devido ao fato de produtos microbianos poderem utilizar a literatura, não precisando realizar alguns testes, o custo de registro é reduzido. Ainda assim, estima-se que os custos totais podem se aproximar a um milhão de euros, sem contar com o custo de desenvolvimento do produto. Portanto, mesmo com os avanços da atual legislação, no tocante aos incentivos aos produtos microbianos, o custo e formalidades para a colocação no mercado ainda criam barreiras e impedem o registro de valiosos produtos fitofármacos de baixo risco (Matyjaszczyk, 2015).

A partir da data de admissibilidade do pedido, a publicação de um regulamento que aprova uma nova substância ativa pode levar de 2,5 a 3,5 anos. No entanto, esse tempo varia muito, conforme quão complexo e completo o processo está (Comissão Europeia). Assim que a substância é aprovada pela CE, o controle do uso e da colocação no mercado de produtos fitofármacos é decidido pelos Estados-Membros. A fim de facilitar o registro, há uma cooperação na avaliação dos produtos

fitofármacos entre os países de zonas climaticamente semelhantes (“ecozonas”) da UE (Norte, Central e do Sul) (Chandler et al., 2011). Para produtos que contêm microrganismo e sua utilização será como fitofármaco, ele deverá ser registrado para tal. Produtos fitofármacos de baixo risco, o Estado-Membro decide se aprova o pedido de autorização no prazo de 120 dias, concedendo o registro por um prazo máximo de quinze anos (Regulamento n.º 1107/2009 da Comissão Europeia).

Para alguns agentes de controle biológico, a aprovação pode ser mais difícil, seja por algumas regras ainda mantidas para substâncias ativas de baixo risco, ou diferenças intrínsecas às diferentes substâncias ativas dos produtos (natural, organismo vivo ou convencional) dificultando o estabelecimento de critérios de risco. Reflexo de um sistema regulatório originalmente desenvolvido para pesticidas químicos, que ainda dificulta e onera a indústria de biopesticidas (Villaverde et al., 2014; Chandler et al., 2011). A principal dificuldade de registro de biopesticidas na UE é a exigência de meia vida no solo inferior a 60 dias, isso causa problemas para alguns agentes de controle biológico, tais como antagonistas da rizosfera. Por exemplo, espécies de fungos *Trichoderma*, utilizadas como biopesticidas contra fungos fitopatogênicos do solo (Chandler et al., 2011).

O controle biológico, no contexto do aumento populacional e conscientização ambiental, oferece uma ferramenta muito importante na produção sustentável, podendo ser amplamente utilizada com sucesso, numa base comercial (Le Mire et al., 2016). No entanto, na legislação Europeia, além de cair nas mesmas regras dos produtos fitofármacos químicos, procedimentos longos e onerosos dificultam a aprovação e o registro, que deixam os fabricantes relutantes nessa alternativa (Villaverde et al., 2014). Portanto, novas atualizações na legislação, voltadas aos produtos microbianos, são determinantes para o desenvolvimento e colocação no mercado de novos produtos, favorecendo o setor e o agricultor na implementação do manejo integrado.

Comparativo entre as legislações aqui abordadas e a legislação brasileira

O uso de produtos biológicos vem crescendo ao longo dos anos com o objetivo de reduzir o uso de agroquímicos e auxiliar no combate a doenças e pragas. No Quadro 1 são apresentadas as diferenças entre o registro de biopesticidas entre a Colômbia, Estados Unidos, União Europeia e Brasil.

QUADRO 1. Comparativo entre o registro de produtos microbianos de controle biológico na Colômbia, Estados Unidos, União Europeia e Brasil

Parâmetros Analisados	Países			
	Colômbia	Estados Unidos	União Europeia	Brasil
Número de produtos registrados para controle biológico	90	1401	Itália (69) França (34) Croácia (34) Holanda (32) Dinamarca (28) Espanha (25) Reino Unido (22) Suécia (22) Grécia (19) Alemanha (14) Bélgica (13) Chipre (13) Hungria (12) Eslováquia (12) Áustria (11) Portugal (9) Polônia (8) Luxemburgo (7) Eslovênia (6) Bulgária (6) Finlândia (6) Irlanda (6) Romênia (5) República Checa (4) Estônia (4) Letônia (3) Lituânia (2) Malta (0) www.eppo.int/PP PRODUCTS/infor mation/informatio n_ppp	124
Tempo médio para registro	375 dias	210-570 dias	2,5-4,5 anos	>365 dias
Órgãos reguladores	Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) www.ica.gov.com	Agencia de Proteção Ambiental (EPA) www.epa.gov	Comissão Europeia e Ministério da Agricultura de cada Estado-Membro www.ec.europa.eu/food/plant/pesticides/index en.htm	Ministério da Agricultura (MAPA) www.agricultura.gov.br Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) www.anvisa.gov.br Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) www.ibama.gov.br
Custo médio de registro de produto biológico	US\$ 761,00	US\$ 33,800 – 64,000	US\$ 1,110.000,00 – 1,200.000,00	US\$ 100,00 – 123.680,00
Principais gêneros de agentes de controle	<i>Trichoderma</i> (20%) <i>Glomus</i> (11%) <i>Bacillus</i> (9%) <i>Azotobacter</i> (9%)	<i>Bacillus</i> (63%) <i>Pseudomonas</i> (9%) <i>Trichoderma</i> (7%)	<i>Bacillus</i> (37%) <i>Trichoderma</i> (12%) <i>Beauveria</i> (6%) <i>Pseudomonas</i> (5%)	<i>Bacillus</i> (46%) <i>Metarhizium</i> (13%) <i>Trichoderma</i> (11%) <i>Beauveria</i> (9%)

REFERÊNCIAS

ABC BIO. Associação brasileira das empresas de controle biológico. Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico projeta expansão de mercado. Disponível em: <http://www.abcbio.org.br/conteudo/publicacoes/associacao-brasileira-das-empresas-de-controle-biologico-projeta-expansao-de-mercado/>. Acesso em 20 de agosto de 2016.

Chandler D, Bailey AS, Mark Tatchel G, Davidson G, Greaves J, Grant WP (2011) The development, regulation, and use of biopesticides for integrated pest management. *Phil. Trans. R. Soc. B* 1987-1998.

Colômbia. Resolução nº 698 de 04 de fevereiro de 2011.

Colômbia. Decreto nº 4765 de 18 de dezembro de 2008.

Colômbia. Resolução nº 150 de 21 de janeiro de 2003.

Colômbia. Resolução nº 1056 de 17 de abril 1996.

Colômbia. Lei nº 165 de 9 de novembro de 1994.

Commission Regulation (EU) No 283/2013 of 1 March 2013 setting out the data requirements for active substances, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market. *Off J Eur Union L* 93/1, 2013.

Commission Regulation (EU) No 284/2013 of 1 March setting out the data requirements for plant protection products, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market. *Off J Eur Union L* 93/85, 2013.

De Paula Júnior TJ, Venzon M, Teixeira H, Bettiol W, Morandi MAB, Vilela FMF, De Castro MLMP (2013) Regulamentação e uso de produtos à base de agentes biológicos para o controle de doenças de plantas e pragas no Brasil. *Informe Agropecuário* 34: 50-57.

Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. *Off J Eur Union L* 309/71, 2009.

Estados Unidos. Environmental Protection Agency. Biopesticides Registration. Disponível em: <https://www.epa.gov/pesticide-registration/biopesticide-registration>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2016.

Estados Unidos. Environmental Protection Agency. PRIA Fee Category Table - Biopesticides Division - New Active Ingredients. Disponível em: <https://www.epa.gov/pria-fees/pria-fee-category-table-biopesticides-division-new-active-ingredients>. Acesso em 29 de outubro de 2016.

Estados Unidos. Environmental Protection Agency. PRIA Fee Category Table - Biopesticides Division - New Uses. Disponível em: <https://www.epa.gov/pria-fees/pria-fee-category-table-biopesticides-division-new-uses>. Acesso em 29 de outubro de 2016.

Estados Unidos. Environmental Protection Agency. PRIA Fee Category Table - Biopesticides Division - New Products. Disponível em <https://www.epa.gov/pria-fees/pria-fee-category->

table-biopesticides-division-new-products. Acesso em 29 de outubro de 2016.

Estados Unidos. Environmental Protection Agency. What are Biopesticides?

Disponível em: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/what-are-biopesticides>. Acesso em 29 de janeiro de 2016.

Estados Unidos. Electronic Code of Federal Regulations (e-CFR). Subchapter E – Pesticide Programs. Disponível em: <http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=d5190f0e0f3e5689ffd7aa19350e122c&mc=true&tpl=/ecfrbrowse/Title40/40CISubchapE.tpl>. Acesso em: 20 de outubro de 2016.

ICA. Instituto Colombiano Agropecuario. Fertilizantes e Insumos Biológicos. Disponível em: <http://www.ica.gov.co/getdoc/a5c149c5-8ec8-4fed-9c22-62f31a68ae49/Fertilizantes-y-Bio-insumos-Agricolas.aspx>. Acesso em: 02 março de 2016.

Hardy RW, Holsten RD, Jackson EK, Burns RC (1968) The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology* 43: 1185-1207.

Le Mire G, Nguyen MI, Fassotte B, Du Jardin P, Verheggen F, Delaplace P, Jijakli MH (2016) Implementing plant biostimulants and biocontrol strategies in the agroecological management of cultivated ecosystems. A review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 299-313.

Matyjaszczyk E (2015) Products containing microorganisms as a tool in integrated pest management and the rules of their Market placement in the European Union. *Pest Management Science* 71: 1201-1206.

Ministério do Meio Ambiente Secretaria de Biodiversidade e Florestas Programa Nacional de Conservação da Biodiversidade. Elaboração da estratégia nacional brasileira: Análise comparativa das estratégias nacionais de diversos países. Brasília, 1999.

Mittermeier RA, Robles-Gil P, Mittermeier CG (1997) Megadiversity. Earth's Biologically Wealthiest Nations. CEMEX/Agrupacion Sierra Madre.

Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. *Off J Eur Union L* 309/1, 2009.

Sandes ARR, Di Blasi G (2000) Biodiversidade e diversidade química e genética. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 13:28-32.

Villaverde JJ, Sevilha-Morán B, Sandín-España P, López-Goti C, Alonso-Prados JL (2014) Biopesticides in the framework of the European Pesticide Regulation (EC) N.º 1107/2009. *Pest Management Science* 70:2-5.

4

Biologically based technologies for control of soil-borne plant pathogens of cucumber and oilseed rape

Daniel P. Roberts¹
Xioajia Hu²
Dilip K. Lakshman¹
Lihua Xie²
Xing Liao²

INTRODUCTION

The global human population is expected to increase in number and affluence by the middle of this century (Godfray et al. 2010), with estimates of the world's population in 2050 ranging between 8 and 10 billion. Feeding the human population in the future will place unprecedented and changing demands on agriculture and our natural resources. Recent estimates indicate agricultural production must roughly double to meet projected demands for food (Foley et al. 2011). We will need to increase food production while at the same time decreasing the negative impacts of agriculture on land, water, biodiversity, and climate (Foley et al. 2011). This will require sustainable intensification in food production. One aspect of this is the development of sustainable control measures for plant diseases that cause severe economic losses on agricultural crops. Here we discuss our work on development of sustainable disease control measures for soil-borne pathogens of 1) cucumber and other vegetables grown in the United States, and 2) oilseed rape grown in China. We are focusing our efforts on developing sustainable, biologically based control measures for *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, and *Sclerotinia sclerotiorum*; important pathogens on these crops.

¹Sustainable Agricultural Systems Laboratory, USDA-ARS, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, MD 20705-2350, E-mail: Dan.Roberts@ARS.USDA.GOV and ²Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Oil Crops, Ministry of Agriculture, Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan, 430062, People's Republic of China.

Development of additional sustainable disease control technologies is needed

Fumigant and non-fumigant pesticides are the primary methods for disease control of soil-borne pathogens in the United States and elsewhere. However, there are concerns regarding the future availability, the effectiveness, and the impact of these pesticides on the environment. Fumigants that have demonstrated some technical and economic feasibility for soil-borne plant pathogens include 1,3-dichloropropene (DCP) + chloropicrin (Pic), DCP + Pic followed by dimethyl disulfide, and dimethyl disulfide applied alone. In regions where DCP use is prohibited due to karst topographical features, metam sodium can be recommended (Roskopf et al. 2005; Zasada et al. 2010). Increased public awareness regarding the hazards associated with the use of fumigants has resulted in a more stringent regulatory environment. This has led to a situation where there is no guarantee that registered chemical compounds currently in use or nonregistered compounds in development will be available for commercial growers in the not-so-distant future (Noling 2002; Ruzo 2006; Sande et al. 2011). In addition to this concern 1) the above compounds are not registered for use in all relevant states in the United States, 2) their efficacy can decline after repeated applications, and 3) some are effective only under certain conditions. For example, in Maryland and Delaware DCP, Pic, and metam sodium use is hindered by environmental conditions, high water tables, and water-logged soils.

Soil application of non-fumigant pesticides is problematic due to inconsistency of control and the large quantities of pesticide required (Clarkson & Whipps 2002). In many cases these non-fumigant pesticides also do not provide broad spectrum control of soil-borne plant pathogens. For example, anastomosis groups of *R. solani* vary in sensitivity to fungicides and no single fungicide is effective against all *R. solani* anastomosis groups (Csinos & Stephenson 1999; Martin et al. 1984; Virgen-Vargas 2000). Additionally, recent reports indicate that *R. solani* is rapidly developing resistance to pesticides (Bennett 2012; FRAC 2012). Diminished pesticide effectiveness has been reported due to resistance in *S. sclerotiorum* and in populations of oomycetes as well (Brantner & Windels 1998; Fernando et al. 2007; Lamour & Hausbeck 2001; Parra & Ristaino 2001; Yin et al. 2010).

Other more sustainable, conventional control tactics for *P. ultimum*, *R. solani*, and *S. sclerotiorum* are also problematic. Crop rotation can be ineffective due to the wide host range of *P. ultimum* and *S. sclerotiorum*, and the long persistence of pathogen resting structures in soil (Nelson 1988). Use of resistant varieties is a powerful tool for management of soil-borne diseases. However, screening germplasm for resistance to *Pythium* is in its infancy (Louws et al. 2010) and identification and selection of highly effective physiological resistance to *S. sclerotiorum* has proven to be challenging. As a consequence, commercial cultivars that show high levels of resistance to *S. sclerotiorum* are relatively uncommon. There are few resistant varieties with moderate resistance to

Rhizoctonia. Alternative technologies need to be developed for control of these and other soil-borne plant pathogens.

Biologically based technologies as plant disease control alternatives

Biologically based technologies, such as microbial biological control agents (BCAs) and cover crops, are thought to provide safe and environmentally friendly alternatives to the use of pesticides for control of soil-borne plant pathogens. Unfortunately, inconsistent performance in different soils has hampered their commercial development and grower use (Fravel 2005; Glare et al. 2012; Roberts & Kobayashi 2011). Inconsistent performance by BCAs has been attributed to biotic and abiotic factors in soil that impact colonization, persistence, and expression of genes involved in biological control by BCAs (Roberts & Kobayashi 2011). Biotic factors that can vary in different soils include interactions with non-target organisms in the indigenous microbial community, lack of activity against non-target plant pathogens that cause disease on the crop, initial population densities and genetic diversity of the target pathogens, and varying rhizosphere or soil colonization by the BCA. Host plant species and cultivar also may impact performance of BCAs (Compant et al. 2005). Abiotic factors that vary in different soils include the chemical composition of the soil or rhizosphere, osmotic conditions, and soil moisture (Roberts & Kobayashi 2011). Soil factors (e.g., pH, metal ions) have been shown to influence secondary metabolite production (Haas & Défago 2005) and disease suppression by BCAs (Duffy & Défago 1997; 1999; Duffy et al. 1997; Haas & Défago 2005). Bacteria and fungi in soil affect the decomposition of cover crops and other organic amendments (McSorley 2011). Variation in the soil microbial community will lead to variation in their decomposition and release of inhibitory compounds.

A number of researchers have indicated that BCAs and cover crops need to be implemented as components of disease management strategies, not as standalone tactics for suppression of plant disease (Lemanceau & Alabouvette 1991; Pierson & Weller 1994; Raupach & Kloepper 1998). This is to overcome inconsistencies in performance resulting from variations in the soil environment (Jacobsen et al. 2004; Roberts & Kobayashi 2011). It is thought that a combination of tactics with different mechanisms for disease control is more likely to control more pathogens over a variety of soils (Roberts & Kobayashi 2011).

Combining biologically based technologies for control of soil borne pathogens of cucumber

One of our long-term goals is to develop biologically based measures, combined in multi-tactic disease controls strategies, for *P. ultimum*, *R. solani*, and *S. sclerotiorum* on cucumber and other cucurbits. Although a number of BCAs

have been reported to be effective against these soil-borne plant pathogens, and commercial products are available (de Vrije et al. 2001; Martin & Loper 1999; Fravel 2005), the development of additional biologically based technologies that can be applied in combination with existing control tactics should improve disease control performance.

Isolates of *Serratia marcescens* for control of *P. ultimum* damping off of cucumber

We initially targeted seed treatment with BCAs for control of *P. ultimum*. A number of bacterial and fungal strains were found that effectively controlled this pathogen on cucumber; with isolates of *S. marcescens* being the most effective (Roberts et al. 2005; 2007). *S. marcescens* is ubiquitous in the environment and a number of isolates of this organism have been shown to have potential as BCAs (Grimont & Grimont 1992; Kobayashi & El-Barrad 1996; Press et al. 1997; Someya et al. 2000). Unfortunately, it is unlikely that live isolates of *S. marcescens* will be granted registration for agricultural use by the U.S. Environmental Protection Agency as certain isolates are considered opportunistic human pathogens (Roberts et al. 2007).

A second concern regarding the use of isolates of *S. marcescens*, as well as other BCAs, in multi-tactic biologically based disease control strategies is the potential of these isolates to inhibit a co-applied BCA. Several researchers have indicated that components of multitactic, biologically based controls must be compatible for increased disease suppression to occur (Baker 1990; Janisiewicz 1996; Janisiewicz & Bors 1995; Raupach & Kloepper 1998; Roberts et al. 2016) and combining BCAs has resulted in decreased performance in some cases (Xu et al. 2011). Incompatibility among these components is possible because BCAs, cover crops, etc. are typically selected based on their general antagonistic activity toward microbes.

For example, isolates of *Serratia* produce a number of inhibitory metabolites including pyrrolnitrin, oocycin A, carbapenem, prodigiosin, and serrawettin as well as chitinase and other cell-wall- and cell membrane-degrading enzymes (Asano et al. 1999; Kamensky et al. 2003; Lindum et al. 1998; McGowan et al. 1999; Strobel et al. 1999). At least one of these compounds, prodigiosin, has been reported to have broad-spectrum antibiotic activity, including anti-fungal, anti-bacterial, anti-protozoal, and anti-insectal activity (Someya et al. 2001; Tsuji et al. 1992; Williams & Quadri 1980). We performed cucumber rhizosphere colonization/ persistence experiments where live isolates of *S. marcescens* were co-applied with *Trichoderma* isolates to determine the compatibility of these *S. marcescens* and *Trichoderma* isolates. It was found that isolates of *S. marcescens* were inhibitory to certain *Trichoderma* isolates in some instances (Roberts et al. 2005). The *Trichoderma* isolates were below detectable thresholds after three weeks when co-applied with *S.*

marcescens but maintained at consistent levels when applied with the water control. The co-location of live *S. marcescens* cells with co-applied BCAs in the rhizosphere may have led to inhibition of the BCA due to production of broad-spectrum inhibitory metabolites. It is also possible that competition for resources, such as reduced carbon root exudates, led to this inhibition of the co-applied *Trichoderma* BCA.

Cell-free extracts of *S. marcescens* for control of *P. ultimum* damping off of cucumber

Our strategy to harness the biotechnological potential of *S. marcescens* is to use cell-free extracts of this bacterium as a cucumber seed treatment (Roberts et al. 2007). As discussed above, isolates of *S. marcescens* produce a number of metabolites, some of which inhibit a broad spectrum of microbes. These metabolites can potentially be coated onto cucumber seeds for disease control. Certain crops, such as cucumber, have a very short window of vulnerability to *P. ultimum* damping-off; after which time they become less susceptible to this disease (Hadar et al. 1983; Roberts et al. 1997). The rapid germination of sporangia of *P. ultimum* and subsequent seed colonization (Fukui et al. 1994; Nelson 1988; Windstam & Nelson 2008), coupled with this short window of vulnerability, limit the infection court in space and time. This makes it potentially possible to inundate the infection court with the cell-free extract of *S. marcescens* at seed treatment. This strategy would 1) minimize risk to human health associated with *S. marcescens* as live cells of this organism are not used and 2) minimize co-location of inhibitory metabolites produced by *S. marcescens* with a co-applied BCA.

To test this strategy cell-free extracts of *S. marcescens* in sterile distilled water, ethanol, ethyl acetate, acetone, and methanol were used as seed treatments for control of damping-off of cucumber caused by *P. ultimum* in growth chamber pot assays performed in commercial potting mix (Roberts et al. 2007). Extracts of *S. marcescens* in ethanol and acetone provided superior disease control while extracts in sterile distilled water, ethyl acetate, and methanol were not nearly as effective. It was decided to pursue work with the extracts in ethanol as this application of ethanol is approved by the Organic Materials Review Institute for use in organic crop production (www.omri.org/omri-lists). This potentially allows development of a disease control strategy incorporating ethanol extracts of *S. marcescens* for use in both conventional and organic production of cucumber and other cucurbits.

A second set of experiments was conducted to determine the commercial potential of this application of ethanol extracts of *S. marcescens* (Roberts et al. 2014). For this we: 1) compared disease control by these extracts with that of the commercial seed treatment pesticide Thiram, and 2) determined the shelf-life of these extracts. In growth chamber pot assays, conducted with commercial potting mix, control of damping-off of cucumber caused by *P. ultimum* by ethanol extracts

of *S. marcescens* was equivalent to that provided by seed treatment application of Thiram. We also demonstrated that cucumber seed treated with these extracts had a shelf-life of at least 14 weeks; a trait important in commercialization of biologically based technologies (Schisler et al. 2004; Leggett et al. 2011). Treated cucumber seed incubated in the dark at 4 °C for 14 weeks had an associated plant stand that was similar to that associated with the healthy check (Roberts et al. 2014).

We are currently determining the consistency of control of damping-off on cucumber with ethanol extracts of *S. marcescens* in natural soils that differ in texture, pH, organic matter, etc. (Roberts et al. 2016; Roberts et al. unpublished). In initial experiments it was found that seed treatment with these extracts provided effective control of cucumber damping-off caused by *P. ultimum* that was equivalent to seed treatment with Thiram in a sandy loam soil. However, seed treatment with these extracts did not consistently provide effective disease control in all soils tested. Seed treatments with this ethanol extract were not effective in a loam soil (Roberts et al. 2016).

In other experiments we tested the compatibility of seed treatment with ethanol extracts from *S. marcescens* with other BCAs (Roberts et al. 2016). Unlike live cells of *S. marcescens* the ethanol extract of *S. marcescens* was never incompatible with two *Trichoderma* BCA isolates. These extracts did not affect *in vitro* or *in situ* colonization of cucumber by these BCAs. Additionally, control of damping-off of cucumber was never diminished when these BCAs, applied in furrow, were combined with seed treatment application of ethanol extracts of *S. marcescens*. Therefore, removal of live cells of *S. marcescens*, which can effectively colonize cucumber rhizosphere (Roberts et al. 2007), may have improved compatibility by localizing inhibitory molecules produced by this bacterium on the seed coat. We currently are determining if combining the ethanol extract with the *Trichoderma* BCAs, or with cover crops shown to control damping-off of cucumber caused by *P. ultimum*, provides more consistent control of this pathogen over multiple soils that differ in biotic and abiotic properties (Roberts et al. unpublished).

Biologically based technologies for control of *R. solani* and *S. sclerotiorum* on cucumber

Initial work developing biologically based technologies for control of *R. solani* on cucumber has not progressed rapidly. Although studies with *T. virens* isolates showed promise for control of this disease (Roberts et al. 2005) consistent control with BCAs has proven elusive. We are currently looking at control of *R. solani* through reduction of initial inoculum with mycoparasites along with a similar approach for control of *S. sclerotiorum*. The use of mycoparasites to kill or weaken sclerotia to reduce initial inoculum is an often used strategy for control of *Sclerotinia* spp. (Adams 1990; Clarkson & Whipps 2002; Zhou & Boland 1998) and a commercial product based on *Coniothyrium minitans* based on this approach

is available (Contans®). In future experiments we will look at combining the biologically based control tactics developed for control of *P. ultimum* with those developed for *R. solani* and *S. sclerotiorum*, including commercially available BCA products, in a multi-tactic disease control strategy for all three pathogens.

Combining biologically based technologies for control of *S. sclerotiorum* on oilseed rape

A second long-term goal is to develop biologically based measures, combined in multi-tactic disease control strategies, for *S. sclerotiorum* on oilseed rape. *S. sclerotiorum* overwinters as sclerotia in soil which, upon germination, produce apothecia or directly produce mycelia. Ascospores released from apothecia are the primary inoculum for most diseases of *S. sclerotiorum* and require senescing or dead tissue of the host for germination and saprophytic colonization (Abawi & Grogan 1979; Boland 2004). These ascospores generally germinate on senescing flower petals on oilseed rape (Turkington & Morrall 1993) and infection of healthy foliar tissues follows (Abawi & Grogan 1979; Boland 2004). Mycelia produced directly from germinating sclerotia can also infect the plant at the soil line. The disease cycle of *S. sclerotiorum* affords multiple possibilities for enhancing consistency of biological control performance through the combination of biologically based technologies. These possibilities include: 1) combining multiple BCAs into individual biological control formulations targeting one portion of the pathogen disease cycle (seed treatment, spray at flowering, application of mycoparasite to sclerotia in the field prior to sowing oilseed rape) and 2) combining applications of biologically based technologies to target multiple portions of the disease cycle (Ji et al. 2006; Wilson 1996; 1997).

Direct protection of oilseed rape plant parts from infection by *S. sclerotiorum*

We have isolated *Bacillus subtilis* and *B. megaterium* strains which provide control of *S. sclerotiorum* on oilseed rape in the field (Hu et al. 2011; 2013a; 2014). *B. subtilis* and related isolates are excellent candidates for commercial development as they produce heat- and desiccation-resistant endospores that allow them to be formulated into stable products with an adequate shelf-life (Leggett et al. 2011). For example, seed treatment formulations of our *B. subtilis* isolate, Tu-100, were stable and viable for a period of six months (Hu et al. 2011). Additionally, no genes associated with human virulence have been detected in *B. subtilis* (Earl et al. 2008). Also, isolates of *B. subtilis* typically devote approximately 5 % of their genome to antibiotic biosynthesis and together these isolates have the potential to produce more than two dozen structurally diverse anti-microbial compounds (Stein 2005) some of which have anti-fungal and anti-bacterial activity (Koumoutsis et al. 2004; Ongena & Jacques 2007; Romero et al. 2007). Direct genetic evidence has demonstrated the

involvement of certain of these compounds (iturins, mycosubtilin) in suppression of plant disease (Asaka & Shoda 1996; Leclère et al. 2005) and others (fengycin lipopeptides) have been implicated in inducing systemic plant resistance (Ongena et al. 2005; Ongena & Jacques 2007).

Our *Bacillus* strains were shown to control *S. sclerotiorum* on oilseed rape by directly protecting the plant from infection in field trials conducted at multiple locations. For example, two seed treatment formulations of *B. subtilis* BY-2 and of *B. subtilis* Tu-100, and spray applications of these two isolates at flowering, resulted in significantly lower disease incidence than the non-treated control and a significantly greater seed yield than this control. Control by these strains compared favorably to that by the chemical spray treatment applied at flowering (Hu et al. 2011; 2014). Therefore, we have the tools to test combining multiple BCAs into individual biological control formulations for improved disease control as strains BY-2 and Tu-100 have unique attributes and both strains provide disease control (Hu et al. 2014). Preliminary pot experiments and field trials showed increased seed yield and decreased disease incidence with increased number of strains in individual seed treatment preparations in four different natural soils (Hu et al. unpublished).

We also have the tools to test the strategy which combines multiple methods of applying BCAs to directly protect the plant for improved disease control performance as both of these strains provided disease control when applied as seed treatments and as a spray at flowering (Hu et al. 2014). A significant decrease in disease incidence or a significant increase in seed yield with the combined spray and seed treatment applications of these strains was not seen when compared with individual spray or seed treatment applications of these strains in field experiments in three of four site-years. However, the combined applications did perform better in one of four site-years when compared with individual applications. Continued testing at multiple locations over several years will be required to determine if this combination of application methods does provide more consistent disease control.

Reduction of initial inoculum for control of *S. sclerotiorum* on oilseed rape

Reduction of initial inoculum through inhibition of germination of sclerotia of *S. sclerotiorum* should be readily combined with the second tactic of protection of the plant through seed treatment or spray application of our *Bacillus* isolates. Toward this end we are field testing mycoparasites of sclerotia of *S. sclerotiorum* for control of this pathogen on oilseed rape that were shown to inhibit germination of sclerotia of *S. sclerotiorum* *in vitro* and in the field (Hu et al. 2013b). Spray application of one such isolate, *Aspergillus* Asp-4, to the soil prior to sowing rice in a rice-oilseed rape rotation resulted in a significant reduction in incidence of Sclerotinia stem rot on oilseed rape compared with the non-treated control in two field trials. This application of Asp-4 also resulted in a significant reduction in germination of sclerotia relative to the non-treated control in these field trials,

suggesting that this reduction in sclerotial germination led to disease control (Hu et al. unpublished). Although we have not demonstrated it yet, these different strains (*Bacillus* isolates A6, BY-2, and Tu-100; *Aspergillus* Asp-4) and application methods (seed treatment, spray onto plant canopy at flowering, application prior to planting) should be compatible as they target different aspects of the cropping and disease cycles and are separated temporally and spatially. In future work we will determine if combinations of these strains and application methods result in more consistent disease control over a variety of environmental conditions (soil-type, temperature, soil moisture, etc.) than the use of individual strains or application methods.

Integration of a mycoparasitic BCA into an oilseed crop production system for control of *S. sclerotiorum*

A possible means to increase grower use of biologically based disease control technologies is to directly integrate them into existing components of production systems. We performed experiments demonstrating that a treatment containing components of a rice-oilseed rape production system used in China, augmented with the mycoparasite *Trichoderma* sp. Tri-1 (Tri-1), has promise for control of *S. sclerotiorum* on oilseed rape. This multi-component treatment used the residual rice straw remaining after the rice harvest as well as the oilseed rape seedcake fertilizer used in the oilseed rape production system as a formulation for Tri-1 (Hu et al. 2015). This treatment increased oilseed rape seed yield and decreased disease incidence relative to the nontreated and fungicide controls in fields containing sclerotia of this pathogen.

In addition to activity by Tri-1, increases in oilseed rape seed yield associated with this multi-component treatment was probably due, in part, to the impact of this treatment on soil microbial activity (Hu et al. 2015). Application of the treatment containing the non-inoculated fertilizer formulation (no Tri-1) to fields containing residual rice straw resulted in reduced incidence of disease and increased soil microbial activity as evidenced by increased acid phosphatase, invertase, and urease activity in soil (Hu et al. 2015). Increased microbial activity in soil has been associated with general suppression of soilborne plant pathogens (Weller et al. 2002).

Combinations of biologically based technologies and reduced rates of pesticides for more sustainable control of *S. sclerotiorum* on oilseed rape

Combinations of *Trichoderma* sp. Tri-1, formulated with oilseed rape seedcake and straw, were tested with reduced application rates of the chemical pesticide carbendazim for control of *S. sclerotiorum* on oilseed rape (Hu et al. 2016). The treatment containing the recommended rate of carbendazim provided

the greatest reduction in disease when compared with treatments containing individual applications of lower rates of this pesticide or the formulated Tri-1 treatment (described above) in all field experiments. However, treatments containing formulated Tri-1 combined with carbendazim applied at 75% the recommended rate reduced incidence of disease to levels statistically similar to the treatment containing carbendazim applied at the recommended rate in field where a rice-oilseed rape rotation was used and where a soybean-oilseed rape rotation was used. These experiments indicate that integration of a biologically based control tactic, such as formulated Tri-1, into a disease management strategy can increase oilseed rape production sustainability through reduction in the quantity of chemical pesticide used.

SUMMARY

Sustainable intensification of food production is necessary if we are to feed the world's future population and maintain the resources required to produce this food. Biologically based technologies for disease control, such as BCAs and cover crops, can be integral to achieving this goal of sustainable intensification of food production as they can be more environmentally friendly than the use of synthetic pesticides. However, combinations of these biologically based disease control technologies will be necessary to provide consistency of control performance required for grower acceptance. Researchers must develop strategies for combining these biologically based control technologies that maximize the effectiveness of these combination treatments while minimizing antagonism amongst the individual components of these multi-tactic disease control methods.

LITERATURE CITED

- Abawi GS and Grogan RG (1979) Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology*. 69: 899–904.
- Adams PB (1990) The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*. 28: 59-72.
- Asaka O and Shoda M (1996) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied Environment Microbiology*. 62: 4081–4085.
- Asano S, Ogiwara K, Nakagawa Y, Suzuki K, Hori H, Watanabe T (1999) Prodigiosin produced by *Serratia marcescens* enhances the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin (Cry1C) against common cutworm, *Spodoptera litura*. *J. Pest. Sci.* 24: 381–385.
- Baker R (1990) An overview of current and future strategies and models for biological control.

In: Hornby, D. (Ed.), *Biological Control of Soilborne Plant Pathogens*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 375–388.

Bennett D (2012) Fungicide-resistant *Rhizoctonia solani* found in Louisiana. Delta Farm Press Exclusive Insight;1/13/2012, p3. (<http://deltafarmpress.com/ric/fungicide-resistant-rhizoctonia-solani-found-louisiana>).

Boland GJ (2004) Fungal viruses, hypovirulence, and biological control of *Sclerotinia* species. *Can. J. Plant Pathol.* 26: 6-18.

Brantner JR and Windels CE (1998) Variability in sensitivity to metalaxyl in vitro, pathogenicity, and control of *Pythium* spp. on sugar beet. *Plant Dis.* 82: 896-899.

Clarkson J and Whipps J (2002) Control of sclerotial pathogens in horticulture. *Pest. Outlook* 13: 97-101.

Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA (2005) Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant disease: principles, mechanisms of action, and future prospects. *App. Environ. Microbiol.* 71: 4951-4959.

Csinos AS, Stephenson MG (1999) Evaluation of fungicides and tobacco cultivar resistance to *Rhizoctonia solani* incited target spot, damping off and sore shin. *Crop Protect.* 18: 373-377.

De Vrije T, Antoine N, Buitelaar RM, Bruckner S, Dissevelt M, Durand A, Gerlagh M, Jones EE, Lüth P, Oostra J, Ravensberg WJ, Renaud R, Rinzema A, Weber FJ, Whipps JM (2001) The fungal biocontrol agent *Coniothyrium minitans*: production by solid-state fermentation, application and marketing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 58-68.

Duffy BK and DeFago G (1999) Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2429-2438.

Duffy BK and Défago G (1997) Zinc improves biocontrol of *Fusarium* crown and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis. *Phytopathology.* 87: 1250-1257.

Duffy BK, Ownley BH, Weller, DM (1997) Soil chemical and physical properties associated with suppression of take-all of wheat by *Trichoderma koningii*. *Phytopathology* 87: 1118-1124.

Earl AM, Losick R, Kolter R (2008) Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol.* 16: 269–275.

Fernando WGD, Nakkeeran S, Zhang Y, Savchuk S (2007) Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. *Crop Protect.* 26: 100-107.

Foley JA (2011) Solutions for a cultivated planet. *Nature*. Doi:10.1038/nature10452.

FRAC. Fungicide Resistance Action Committee (2012) List of pathogens with field resistance towards QoI fungicides. www.frac.info.

Fravel DR (2005) Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 337–359.

Fukui R, Campbell, GS, Cook, RJ (1994) Factors influencing the incidence of embryo

infection by *Pythium* spp. during germination of wheat seeds in soils. *Phytopathology*. 84: 695-702.

Glare T, Caradus J, Gelernter W, Jackson T, Keyhani N, Köhl J, Marrone P, Morin L, Stewart A (2012) Have biopesticides come of age? *Trends Biotechnol.* 30: 250–258.

Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, Robinson S, Thomas SM, Toulmin C (2010). Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science*. 237: 812-818.

Grimont F and Grimont PAD (1992) The genus *Serratia*. In: Ballows, A. (Ed.), *The Prokaryotes-A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, second ed., vol. III. Springer, New York, NY, pp. 2823–2848.

Haas D and Défago G (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Rev. Microbiol.* 3: 307-319.

Hadar Y, Harman GE, Taylor, AG, Norton, GM (1983) Effects of pregermination of pea and cucumber seeds and of seed treatment with *Enterobacter cloacae* on rots caused by *Pythium* spp. *Phytopathology*. 73: 1322-1325.

Hu X, Roberts DP, Xie L, Yu C, Li Y, Qin L, Hu L, Zhang Y, Liao, X (2016) Use of formulated *Trichoderma* sp. Tri-1 in combination with reduced rates of chemical pesticide for control of *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape. *Crop Prot.* 79:124-127.

Hu X, Roberts DP, Xie L, Maul JE, Yu C, Li Y, Zhang Y, Qin L, Liao X (2015) Components of a rice-oilseed rape production system augmented with *Trichoderma* sp. Tri-1 control *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape. *Phytopathology*. 105: 1325-1333.

Hu X, Roberts DP, Xie L, Maul JE, Yu C, Li Y, Jing M, Liao X, Che X, Liao X (2014) Formulations of *Bacillus subtilis* BY-2 suppress *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape in the field. *Biol. Contrl.* 70: 54-64.

Hu X, Roberts DP, Xie L, Maul JE, Yu C, Li Y, Zhang S, Liao X (2013) *Bacillus megaterium* A6 suppresses *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape in the field and promotes oilseed rape growth. *Crop Protect.* 52: 151–158.

Hu X, Webster G, Xie L, Yu C, Liao X (2013) A new mycoparasite, *Aspergillus* sp. ASP-4, parasitizes the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Crop Protect.* 54: 15-22.

Hu X, Roberts DP, Maul JE, Emche SE, Liao X, Guo X, Liu X, McKenna LF, Buyer JS, Liu S (2011) Formulations of the endophytic bacterium *Bacillus subtilis* Tu-100 suppress *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape and improve plant vigor in field trials conducted at separate locations. *Can. J. Microbiol.* 57: 539–546.

Jacobsen BJ, Zidack NK, Larson BJ (2004) The role of *Bacillus*-based biological control agents in Integrated Pest Management Systems: plant diseases. *Phytopathology*. 94: 1272-1275.

Janisiewicz W (1996) Ecological diversity, niche overlap, and coexistence of antagonists used in developing mixtures for biocontrol of postharvest diseases of apples. *Phytopathology* 86: 473–479.

Janisiewicz W Bors B (1995) Development of a microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound-invading postharvest pathogens of fruits. *Applied Environ. Microbiol.* 61: 3261–3267.

Ji P, Campbell HL, Klopper JW, Jones JB, Suslow TV, Wilson M (2006) Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. *Biol. Control* 36: 358–367.

Kamensky M, Ovadis M, Chet I, Chernin L (2003) Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. *Soil Biol. Biochem.* 35: 323–331.

Kobayashi DY and El-Barrad N (1996) Selection of bacterial antagonists using enrichment cultures for the control of summer patch disease in Kentucky Bluegrass. *Current Microbiol.* 32: 106–111.

Koumoutsi A, Chen XH, Henne A, Liesegang H, Hitzeroth G, Franke P, Vater J, Borriss, R (2004) Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.* 186: 1084–1096.

Lamour KH and Hausbeck MK (2001) The dynamics of Mefenoxam insensitivity in a recombining population of *Phytophthora capsici* characterized with amplified fragment length polymorphism markers. *Phytopathology* 91: 553–557.

Leclère V, Béchet M, Akram A, Guez JS, Wathelet B, Ongena M, Thonart P, Gancel F, Chollet-Imbert M, Jacques P (2005) Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4577–4584.

Leggett M, Leland J, Kellar K, Epp B (2011) Formulation of microbial biocontrol agents – an industrial perspective. *Can. J. Plant Pathol.* 33: 101–107.

Lemanceau P and Alabouvette C (1991) Biological control of Fusarium diseases by fluorescent Pseudomonas and non-pathogenic *Fusarium*. *Crop Prot.* 10: 279–286.

Lindum PW, Anthoni U, Christophersen C, Eberl L, Molin S, Givskov M (1998) N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol.* 180: 6384–6388.

Louws FJ, Rivard CL, Kubota C (2010) Grafting fruiting vegetables to manage soilborne pathogens, foliar pathogens, arthropods and weeds. *Sci. Hort.* 127: 127–146.

Marten FN and Loper JE (1999) Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: ecology, epidemiology, and prospects for biological control. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18: 111–181.

Martin SB, Lucas LT, Campbell CL (1984) Comparative sensitivity of *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia*-like fungi to selected fungicides in vitro. *Phytopathology.* 74: 778–781.

McGowan SJ, Holden TG, Bycroft BW, Salmond GPC (1999) Molecular genetics of carbapenem antibiotic biosynthesis. *Ant. Leeuwen.* 75: 135–141.

McSorley R (2011) Overview of organic amendments for management of plant-parasitic nematodes, with case studies from Florida. *J. Nematol.* 43: 69–81.

Nelson B (1998) Biology of *Sclerotinia*. Pages 1–5 in: Proceedings of the 10th International *Sclerotinia* Workshop, 21 January 1998, Fargo, North Dakota, USA. North Dakota State University Department of Plant Pathology, Fargo, N.D.

- Nelson EB (1988) Biological control of *Pythium* seed rot and preemergence damping-off of cotton with *Enterobacter cloacae* and *Erwinia herbicola* applied as seed treatments. *Plant Dis.* 72:140-142.
- Noling JW (2002) The practical realities of alternatives to methyl bromide: concluding remarks. *Phytopathology.* 92: 1373-1375.
- Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B, Arpigny JL, Thonart P (2007) Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* 9: 1084–1090.
- Ongena M, Jacques P, Touré Y, Destain J, Jabrane A, Thonart P (2005) Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 29–38.
- Parra G and Ristaino JB (2001) Resistance to mefenoxam and metalaxyl among field isolates of *Phytophthora* blight of bell pepper. *Plant Dis.* 85: 1069-1075.
- Pierson EA and Weller DM (1994) Use of mixtures of fluorescent pseudomonads to suppress take-all and improve the growth of wheat. *Phytopathology.* 84: 940–947.
- Press C, Wilson M, Tuzun S, Kloepper JW (1997) Salicylic acid produced by *Serratia marcescens* 90-166 is not the primary determinant of induced systemic resistance in cucumber or tobacco. *Molec. Plant–Microbe Interact.* 10: 761–768.
- Raupach GS and Kloepper JW (1998) Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology.* 88: 1158–1164.
- Roberts DP, Lakshman DK, McKenna LF, Emche SE, Maul JE, Bauchan G (2016) Seed treatment with ethanol extract of *Serratia marcescens* is compatible with *Trichoderma* isolates for control of damping-off of cucumber caused by *Pythium ultimum*. *Plant Dis.* 100: 1278-1287.
- Roberts DP, Lakshman DK, Maul JE, McKenna LF, Buyer JS, Fan B (2014) Control of damping-off of organic and conventional cucumber with extracts from a plant-associated bacterium rivals a seed treatment pesticide. *Crop Prot.* 65: 86-94.
- Roberts DP and Kobayashi DY (2011) Impact of Spatial Heterogeneity within Spherosphere and Rhizosphere Environments on Performance of Bacterial Biological Control Agents. Pp. 111-130. In: *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems* (D. K. Maheshwari, ed). Springer Verlag, 434 pp.
- Roberts DP, McKenna LF, Lakshman D, Meyer SLF, Kong H, de Souza JT, Lydon J, Baker CJ, Buyer JS, Chung S (2007) Suppression of damping-off of cucumber caused by *Pythium ultimum* with live cells and extracts of *Serratia marcescens* N4-5. *Soil Biol. Biochem.* 39: 2275-2288.
- Roberts DP, Lohrke SM, Meyer SLF, Buyer JS, Bowers JH, Baker CJ, Li W, de Souza JT, Lewis JA, Chung S (2005) Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soilborne diseases of cucumber. *Crop Protection* 24: 135–141.
- Roberts DP, Dery PD, Hebbar PK, Mao W, Lumsden RD (1997) Biological control of damping-off of cucumber caused by *Pythium ultimum* with a root-colonization-deficient strain of *Escherichia coli*. *J. Phytopathol.* 145: 383–388.

Romero D, de Vicente, A, Rakotoaly RH, Dufour SE, Veening JW, Arrebola E, Cazorla FM, Kuipers OP, Paquot M, Pérez-García A (2007) The iturin and fengycyn families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20: 430–440.

Roskopf EN, Chellemi DO, Kokalis-Burelle N, Church GT (2005) Alternatives to methyl bromide: A Florida perspective. www.apsnet.org/online/feature/methylbromide/

Ruzo LO (2006) Physical, chemical and environmental properties of selected chemical alternatives for the pre-plant use of methyl bromide as soil fumigant. *Pest Man. Sci.* 62: 99–113.

Sande S, Mullen J, Wetzstein M, Houston J (2011) Environmental impacts from pesticide use: A case study of soil fumigation in Florida tomato production. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 8: 4649–4661.

Schisler DA, Slininger PJ, Behle RW, Jackson MA (2004) Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology.* 94: 1267–1271.

Someya N, Kataoka N, Komagata T, Hirayae K, Hibi T (2000) Biological control of cyclamen soilborne diseases by *Serratia marcescens* strain B2. *Plant Dis.* 84: 334–340.

Stein T (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molec. Microbiol.* 56: 845–857.

Strobel G, Li JY, Sugawara F, Koshino H, Harper J, Hess WM (1999) Oocydin A, a chlorinated macrocyclic lactone with potent antioomycete activity from *Serratia marcescens*. *Microbiology* 145: 3557–3564.

Tsuji RF, Yamamoto M, Nakamura N, Kataoka T, Magae J, Nagai K, Yamasaki M (1990) Selective immunosuppression of prodigiosin 25-C and FK506 in the murine immune system. *J. Antibiotics (Tokyo)* 43: 1293–1301.

Turkington TK and Morrall RAA (1993) Use of petal infestation to forecast Sclerotinia stem rot of canola: the influence of inoculum variation over the flowering period and canopy density. *Phytopathology* 83: 682–689.

Virgen-Calleros G, Olalde-Portugal V, Carling DE (2000) Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* on potato in Central Mexico and potential for biological and chemical control. *Am. J. Potato Res.* 77: 219–224.

Weller DM, Raaijmaker JM, McSpadden Gardener BB, Thomashow LS (2002) Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40: 309–348.

Williams RP and Quadri SM (1980) The pigments of *Serratia*. In: Von Graevenitz, A., Rubin, S.J. (Eds.), *The Genus Serratia*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 31–75.

Wilson M (1996) An integrated biological control strategy for foliar bacterial diseases of tomato. *IOBC Bull.* 19:57.

Wilson M (1997) Biocontrol of aerial plant diseases in agriculture and horticulture: current approaches and future prospects. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19: 188–191.

Windstam S and Nelson EB (2008) Differential interference with *Pythium ultimum* sporangium activation and germination by *Enterobacter cloacae* in the corn and cucumber spermospheres. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4285–4291.

Xu XM, Jeffries P, Pautasso M, Jeger MJ (2011) Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathology*. 101: 1024-1031.

Yin Y, Liu X, Shi Z, Ma Z (2010) A multiplex allele-specific PCR method for the detection of carbendazim-resistant *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pest. Biochem. Physiol.* 97: 36-42.

Zasada IA, Halbrendt JM, Kokalis-Burelle N, LaMondia J, McKenry MV, Noling JW (2010) Managing nematodes without methyl bromide. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48: 311-328.

Zhou T and Boland GJ (1998) Biological control strategies for *Sclerotinia* diseases. Pages 127-156 in: *Plant-Microbe Interactions and Biological Control*. C.J. Boland, and L.D. Kuykendall, eds. Marcel Dekker, New York.

5

The BIOCOTES consortium, a model private-public partnership project

Jürgen Köhl
Nora de Rijk

SUMMARY

The objective of BIOCOTES (www.biocotes.eu) is to develop 11 new biological control agents (BCAs) for key markets in European agriculture and forestry. BCAs were identified through market analysis by six manufacturers of biological control products. BCAs will primarily be for use in open field crops of vegetables (3), of which 2 are also for use in protected crops, arable crops (3), fruit crops (3), and three different types of forests (2). Primary targeted pests are: gypsy moth (*Lymantria dispar*), pine weevil (*Hylobius abietis*), tomato pinworm (*Tuta absoluta*), white flies, aphids of fruit tree crops and *Mamestra brassicae*. Primary targeted pathogens are: damping-off diseases in forest nurseries, soilborne pathogens of oilseed rape and cereals, brown rot (*Monilinia* spp.) of stone fruit, and powdery mildew of cereals (*Blumeria graminis*). The economic sustainability during the entire development process will be assessed by the responsible industrial partners. The environmental sustainability will be quantified for each BCA by means of the Sustainable Process Index method. The entire developmental process for each of the 11 BCA products is guided by a consultancy partner specialized and leading in (bio-) pesticide registration including risk assessments for European (bio-) pesticide industries. In vitro production of entomopathogenic viruses as new innovative technique will be developed aiming at a breakthrough in economic production. Downstream-technology and shelf life for entomopathogenic nematodes will be improved. BIOCOTES will communicate project results with all stakeholders

Wageningen University and Research centre – Biointeractions and Plant Health
E-mail: jurgen.kohl@wur.nl

with special attention to European IPM networks throughout the whole project duration. BIOCOMES combines the expertise of 10 industrial SME partners, 3 larger industrial partners and 14 research partners with 38% of the requested EU contribution supporting SMEs. All 11 BCA solutions will be novel IPM tools and new alternatives to replace major pesticide applications in European agriculture and forestry.

Main objective

The project supports the policy of the European Commission to apply the general principles of integrated pest management (Directive 2009/128/EC) by contributing to the development of 11 new biological control agents (BCA) to the stage close to implementation. BCAs and targeted diseases and pests have been selected by the industrial participants after thorough evaluation of commercial parameters including market potential. Main targeted production areas are arable crops, field-grown vegetable crops, fruit production and forestry in all European climatic zones. The new BCAs will partly substitute the use of major groups of insecticides and fungicides. In particular, entomopathogenic nematodes will substitute the use of soil insecticides. New microbial insecticides and macrobial beneficials will replace canopy treatments with insecticides. Biological fungicides will replace synthetic fungicides used for seed and seedling treatments. Foliage treatments with microbial BCAs will replace synthetic fungicides and insecticides in major fruit and arable crops. At the end of BIOCOMES, the new BCAs will reach the stage for implementation in IPM programs, which already exist or are under development in various national and international IPM initiatives.

Choice of new targets for biological control products

Biological control products are currently not available for the control of a range of important pests and pathogens that cause high economic losses. Targeted pests and diseases, suitable new BCAs and production technologies to be developed in BIOCOMES were selected on basis of a market driven approach. The following factors were considered by the biological control enterprises: the market studies by the biological control enterprises for new BCAs; the market size and amounts of chemical pesticides to be replaced; market segment(s) targeted by the individual biological control enterprises; markets of existing BCAs and on-going research on BCAs; new trends in biocontrol markets; and expected shifts in agricultural and forestry production and in the importance of specific pests and diseases. BIOCOMES especially targets the markets in open crops, including arable crops and forestry where use of BCAs is far behind compared to protected crops. Field crops including oilseed crops are expected to be the emerging crop segments in biopesticide markets. Considering

The BIOCOTES consortium, a model private-public partnership project

the huge acreages grown with arable and open field vegetable crops and forests, enormous markets are still not reached by BCAs offering excellent opportunities for increasing sales of BCAs with an expected significant impact on the market positions of the involved biocontrol SMEs and larger biocontrol industries as part of the European Knowledge Based Bio-Economy.

Building the private-private partnership

After the biocontrol enterprises had selected BCAs and production technologies, the needs for research were identified. The needs depended on the stage of development already achieved, and the available technological and scientific information. For each BCA or production technology, the research expertise and potential of the involved industries was complemented by partners with specific expertise, e.g. in plant pathology, fermentation technology, taxonomy or field testing. This resulted in teams consisting of three to nine participants who will develop together a specific new BCA or production technology. Each of the teams is organized in a work package (WP) to allow optimum collaboration between partners under the leadership of a WP leader, in most cases the industrial partner. Besides such teams developing a new BCAs in a partnership of a biocontrol enterprise with other private or public partners, BIOCOTES developed a common infrastructure across the BCA teams with partners supporting all teams with their expertise in field testing (Fig. 1), molecular identification, registration issues, economics, environmental sustainability, communication and dissemination and overall project management and administration.



FIGURE 1 - The BIOCOTES partnership: Locations for field testing of new BCAs.

The BIOCOTES consortium consists of 6 biological control enterprises, 2 enterprises evaluating potential risks and other registration related issues as well as the ecological sustainability of the use of the new BCAs, 5 enterprises with the expertise and facilities to conduct various field trials and 14 research institutes or universities. The partners from 14 different countries are: Wageningen UR, The Netherlands; Andermatt Biocontrol, Switzerland; Biogard, Italy; E-nema, Germany; OpenNatur, Spain; Bayer CropScience Biologics, Germany; Viridaxis, Belgium; AgroPlantarum, Sweden; ARA Testing Facility, Italy; Volcani Centre, Israel; COILLTE Teoranta, Ireland; University of Belgrade, Serbia; Research Institute of Organic Agriculture (FiBL), Switzerland; GAB, Germany; HELLAFARM, Greece; Instytut Badawczy Lesnictwa, Poland; National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA), Spain; Institute for Food and Agricultural Research and Technology (IRTA), Spain; Julius Kühn-Institut, Germany; National University of Ireland Maynooth, Ireland; pcfuit, Belgium; SEKEM Energy, Austria; Graz University of Technology, Austria; Universidade dos Acores, Portugal; University of Padova, Italy; Public University of Navarre, Spain; and Zurich University of Applied Sciences, Switzerland.

The workplan

BIOCOTES expects to develop 11 new BCAs to a stage close to implementation and to achieve major breakthroughs in two production technologies for BCAs during the project period of 4 years. New technologies are developed for the cost effective production of biological control agents. *In vitro* production of nucleopolyhedroviruses in insect cell lines will allow large-scale production of the entomopathogenic virus LdMNPV for gypsy moth control in forests. Downstream processing, storage and formulation of entomopathogenic nematodes are investigated to improve harvest technology and prolong the shelf-life of entomopathogenic nematode products by technical and genetic approaches. New BCAs for control of forest pests and diseases are under development. The research focuses on gypsy moth (*Lymantria dispar*) control by LdMNPV and pine weevil (*Hyllobius abietis*) control by entomopathogenic nematodes. The potential of three different BCAs to control several soilborne pathogens of tree seedlings is evaluated in nurseries. Microbial antagonists are used for seed applications. A seed treatment for oilseed rape and *Brassica* vegetables based on the combined use of already selected strains of *Serratia plymuthica* HRO-C48 and *Paenibacillus polymyxa* is being developed for the control of soil borne diseases. A seed treatment for maize and other cereals for control of *Fusarium* spp. is under development based on an already selected strain *Trichoderma harzianum*. Spray applications of microbial antagonists will target several diseases and pests. Brown rot in stone fruit is targeted by the biocontrol agents *Penicillium frequentans* and *Bacillus subtilis*. A new BCA

The BIOCOMES consortium, a model private-public partnership project

is being selected for control of powdery mildew in wheat and other small grain cereals. Efficacy, mass production and formulation for use by end-users, and safety, sustainability and economics will be considered. A microbial BCA product based on the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* will be developed for control of pest insects of vegetables under different environmental conditions in greenhouse and open field. A baculovirus based BCA targets tomato leaf miner and potato moths. New products based on parasitoids of aphids in fruit tree crops and of *Mamestra brassicae* in *Brassica* crops will be ready for us at the end of the project. Risks assessments guide the product development and the ecological and economic sustainability of the new BCAs will be known at the end of the project.

The research progress

The progress of the work in the development of new BCAs for control of diseases and pests and the development of new production technologies for BCAs has been reported in a first publishable summary report in 2015 (BIOCOMES, 2015).

Progress in the development of BCAs for control of diseases



Brown rot. Relevant metabolites produced by *Penicillium frequentans* and *Bacillus subtilis* have been characterized and the mode of action from both biocontrol

agents has been determined. In view of the optimization of formulation processes, researchers have been developing new formulations for *Penicillium frequentans* application as well as liquid and solid formulations for *Bacillus subtilis* which did show good survival results. Two formulations of each biological control agent have been tested under field conditions in preliminary assays. Further improvement of formulations will be carried out followed by new field trials.





Fungal root diseases in forestry. Several strains of biological control agents were tested against pathogens causing damping-off. The strains were tested

on seedlings of Scots pine, common beech and pedunculate oak in Poland in greenhouse experiments. Strains of *Serratia plymuthica*, *Paenibacillus polymyxa* and *Trichoderma harzianum* have been used. The experiments will be repeated, because of a very large variation in the results until now. The effect of the potential biological control agent *Trichoderma harzianum* has also been investigated in more detail by checking for the presence of *Trichoderma harzianum* strain INAT 11 and other naturally occurring *Trichoderma* strains in nursery soil samples. Also root colonization by strain INAT 11 was evaluated on root samples of seedlings of common beech, pedunculate oak, and Scots pine. After setting up an adequate study protocol, the inoculum of INAT 11 has been assessed in soil used in nursery trials of the tree species. Treatments with control soil and inoculated soil have been carried out. Soil and root samples were collected and analysed for the colonization of *Trichoderma harzianum*. So far we can conclude that the *Trichoderma harzianum* strain INAT 11 did survive in inoculated soil in which the 3 tree species were grown. It colonized the common beech, pedunculate oak and Scots pine seedlings well and could therefore be a potential biocontrol product to control damping-off.



***Fusarium* spp.** In the first year of the BIOCOTES project, DNA primers for *Trichoderma harzianum* strain INAT 11 have been developed to allow strain-specific detection. Afterwards

the influence of environmental factors such as temperature, water activity (a_w) and acidity (pH) on the growth of *Trichoderma harzianum* strain INAT 11 have been investigated. Lab experiments could show that temperature, a_w and pH were

limiting factors for fungal growth, however pH had no effect on the survival rate of this antagonist in soil. In vitro trials were carried out to determine the influence of selected fungicides, herbicides and insecticides on mycelial growth of *Trichoderma harzianum* strain INAT 11. All fungicides tested up to date were toxic to the strain at the dose of 1 ppm, while one of the two insecticides and two out of five herbicides tested did not affect mycelial growth. Experiments to define the minimum effective dose of *Trichoderma harzianum* strain INAT 11 and its effect on root colonization by *Fusarium* spp. just started. Seed treatment and semi-field tests will be performed in the course of 2015.

The potential of developing an effective commercial formulation of *Trichoderma harzianum* strain INAT 11 and the optimization of shelf-life have been investigated. *Trichoderma harzianum* can be produced by liquid or solid fermentation. The spores have to be mixed with adequate co-formulants in order to produce a proper formulation. Further formulation experiments will focus on improving shelf-life, long spore viability and easy distribution on seeds.



Powdery mildew. In 2014 leaf samples were collected from cereal crops, grasses and other plant species affected by powdery mildews. 504 leaf samples were

collected in the Netherlands, Northeast-, Central- and Western Germany and Southern Sweden. 1.237 fungal isolates could be obtained from the pustules of the powdery mildew fungus *Blumeria graminis*. Almost 900 isolates have been screened with the selection criteria for this including mass production, safety, cold-



drought tolerance and UV-B resistance. Identification of selected isolates was achieved by ITS amplification and sequencing. The next steps are a risk assessments of each identified species, the optimization of the bioassay for antagonist efficacy screening and investigation of the potential of selected isolates for mass production.

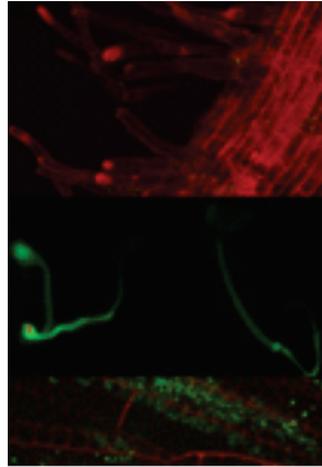


Soil-borne Verticillium wilt. Ten bacterial strains of the genera *Serratia* sp. and *Paenibacillus* sp. were pre-selected for their anti-fungal activity and are being

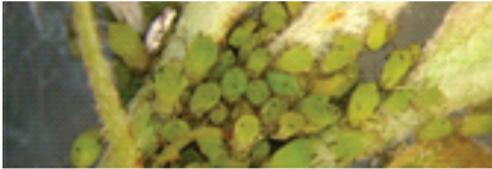
tested for potential application on oilseed rape and cauliflower. Previously the research team aimed to find the optimal plant colonizer and plant growth-promoting in a set of ten bacterial strains. The goal was the selection of one strain per genus and the development of them into a biological control agent for seed treatment.

Based on plant growth promoting effects on oilseed rape and cauliflower in sterile germination pouches, and on the ability to suppress growth of a pathogenic *Verticillium* strain *in vitro*, two potential biocontrol strains have now been selected. The beneficial effect on plant growth by these potential biocontrol strains were tested further on oilseed rape in a sterile and an unsterile soil system. In order to gain a better understanding of the mode of action of these potential biocontrol agents towards pathogens and their hosts, the genomes of the selected strains were sequenced. The genomes revealed several genes that might contribute to its antagonistic and plant growth promoting activity.

The biocontrol efficacy of the different selected antagonistic bacterial strains are being investigated in the greenhouse using pot experiments with cauliflower and oil seed rape. First field trials are also planned for next year.



Progress in the development of BCAs for control of pests



Aphids. From an extensive literature survey 201 tritrophic (plant-aphid-parasitoid) associations could be determined in Europe on *Prunus* (peach, plum and cherry), *Malus* (Apple)

and *Pyrus* (Pear) species with 32 aphid species present on those fruit tree crops. 21 parasitoid species were identified as potentially parasitizing those 32 aphid species. Among the 21 parasitoids identified in the literature review, 10 were selected as potential new biological control agent for the natural aphid control in commercial fruit tree orchards. Those 10 target species will be collected in the field and screened in the laboratory on parasitism efficiency (for the most problematic aphid species in commercial fruit tree orchards) and on production efficiency (small scale first). The best species will then be tested on plants (in cages first and then in the field). Until now 94 samples with parasitoids have been received. The samples came from Belgium, Serbia and Sweden. The first production tests and parasitism efficiency tests done on these samples look promising for some parasitoid species and the first tests on plants will be carried out next year.



Cabbage moth. During the first year of BIOCOTES information about the parasitoid *Telenomus* sp was collected. Researchers have worked on the characterization of *Telenomus* sp. population

structures. Due to the small size of this parasitoid (<1mm) identification of the species is very difficult. Therefore a species specific primer has been developed as a tool for species determination. The primer will also be used for population characterisation throughout Europe to understand the potential use of *Telenomus* sp. as a biological control agent. The laboratory reared lepidoptera eggs will be dispatched into the field to collect naturally occurring egg parasitoids. After that the developed primer will be used to identify *Telenomus* sp. among all the collected egg parasitoids and amplicons belonging to *Telenomus* sp. will be used to determine the intraspecific variability within the different European populations.



Gypsy moth. At two different experimental sites in Poland with 30 year old black alder (*Alnus glutinosa*) stands egg masses of the gypsy moth have been collected in March 2014 to

estimate the occurrence of wild virus in the tested population of gypsy moths. In April 2014 20 trees were sprayed with suspensions in two different concentrations of the entomopathogenic virus at these locations. Three to five weeks after these treatments alder leaves were collected. Damage caused by the caterpillars appeared to be reduced 2-3 fold after treatments. Three weeks after the treatments also caterpillars were collected. These caterpillars have been reared for 2 weeks in the laboratory. After two weeks the mortality appeared to be 3-4 fold higher among caterpillars from the treated trees than in those from the untreated trees.



Large pine weevil. In the first year two entomopathogenic nematode species (*Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis downesi*) were compared in their capability to suppress

pine weevil in roots of stumps. The effect of soil type is being investigated, because nematodes are predicted to be more effective in deep peat soils. Also the application method of the biological control agent has to be assessed and optimized. Three small scale field trials have taken place in Ireland and in Poland. In Ireland the *Steinernema* and *Heterorhabditis* nematode species appeared effective in deep peat soils in field tests. The effectiveness in shallow peat is still under investigation. In Poland the use of nematodes caused 15-17% mortality of *Hylobius* larvae developing in treated stumps. A low level of parasitism was caused by unfavourable conditions for nematode development (drought). In the next year, different methods of nematode application will be tested to minimize the impact of weather conditions on the nematode activity. The best application method of the nematode treatment appeared to be different for the two nematode species: *Heterorhabditis downsi* provided better control when applied on top whereas *Steinernema carpocapsae* provided better control when applied around the stump. The application method on dispersal and efficacy of both species are being further investigated in field trials in Poland and Ireland.



Potato moth and Tomato leaf miner. During the first year naturally occurring virus isolates were gathered in Greece, Italy and on the Canary Islands. Soil samples and infested potatoes were collected. After that the biological activity of isolates in terms of virulence and host range will be determined using bioassays. A bioassay protocol has been developed to test for specific virulence of the PhopGV isolates towards potato

moths and tomato leaf miner. Molecular methods will be applied for strain identification.



White fly. The overall objective is to develop a microbial biological control product based on the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* for the control of white

The BIOCOTES consortium, a model private-public partnership project

fly in vegetables under different environmental conditions in the greenhouse and in the open field. In the first year growth temperature and humidity requirements of *Isaria fumosorosea* isolates were compared. Trials under controlled laboratory conditions trials will be performed with the two most promising isolates to assess the control efficacy of the strains against white fly. The potential of the *Isaria fumosorosea* isolates to produce high spore yields and maximum shelf life was determined. Fungal growth at different environmental conditions, sporulation in solid state fermenter systems and the biological efficacy against several pest insects and beneficial insects were compared for the different *Isaria fumosorosea* isolates. Three strains fulfilled the criteria for further investigation. Some strains showed good efficacy against a range of pest insects but the conidia yield on solid substrates was not sufficient and vice versa. For some strains the standard processing protocol was not feasible. Because the strain preferences for virulence and productivity did not correspond, strains were selected with acceptable virulence and yield. The development of specific markers for two strains is in progress.

Progress in the development of production technologies of BCAs

In the first year of the project a *Lymantria dispar* cell line for the *in vitro* production of entomopathogenic viruses has been established. Shaking rate, inoculum cell density and filling volume were tested. Results show that high cell densities were obtained which provides a basis for future large scale production of the virus.



Research to trace the responsible genes for desiccation tolerance has been started with entomopathogenic nematodes. About one hundred differentially expressed genes have been identified between virulent and nonvirulent strains, these could serve as genetic markers in order to support the genetic selection.

Biocomes dissemination activities and communication with the Stakeholders

The overall objective of the dissemination activities is to increase the impact of the project. There are 3 specific objectives: (1) to raise awareness of the new biological control opportunities and project results of BIOCOTES among scientists developing new IPM methods and technologies so that BIOCOTES BCAs will directly be included in IPM projects on the development of new IPM strategies; (2) to inform end users and influencers of end users about the important role of biological

pest control as an environmental-friendly and effective way; and (3) to train young scientists in the development of economically and ecologically sustainable BCAs.

The target groups for the dissemination activities are (1) European IPM networks and scientific communities like EPSO and IPM scientists; (2) influencers of end users: professional agricultural and industrial associations, retail organizations, extension/advisory services in Europe; (3) government and regulators/policy makers at European and national levels, incl. certification authorities like FSC, SKAL etc.; (4) agro-chemical industries; (5) end users: all farmers and foresters, especially innovators and early adopters among farmers and foresters; and (6) media: general national newspapers, (inter)national scientific and technical journals, as well as social media: Twitter and LinkedIn.

Main tools for communication with the target groups are the project website www.biocomes.eu, quarterly newsletters, videos explaining the use of biologic control, articles and interviews about the ongoing research and results in agricultural magazines, online slideshare presentations about the ongoing research and results, workshop(s) about the development of microbial biological control products for young scientists, and posters and oral presentations at scientific congresses and other meetings with BIOCOTES target groups.

The communication activities reach a broad group of stakeholders. Since the beginning of the project the BIOCOTES website had ca 80.000 pageviews (63.000 unique pageviews) (Fig. 2). Demographic top 3 were USA (13% of the visitors), India, Russia, the Netherlands (9%) and Germany (5%). The BIOCOTES newsletter started with 144 subscribers (February 2015) and had 339 subscribers in August 2016.

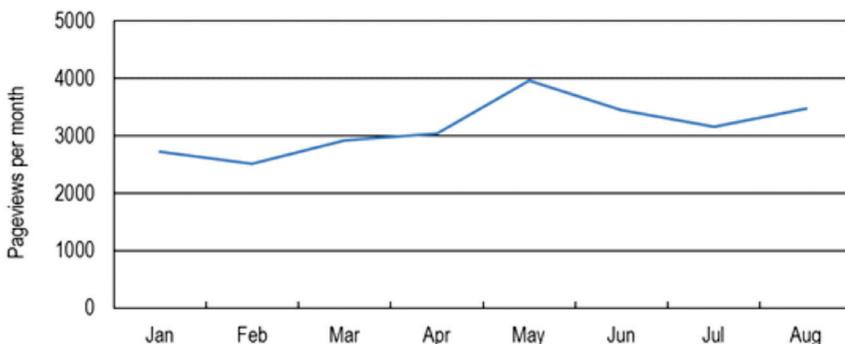


FIGURE 2 - The BIOCOTES website: Overview of the number of pageviews per month in 2016.

The BIOCOMES consortium, a model private-public partnership project

ACKNOWLEDGEMENTS

The project BIOCOMES has received funding from the European Union's Seventh Framework Programme for research, technological development and demonstration under grant agreement n° 612713 and by the Dutch Ministry of Economic Affairs.

LITERATURE CITED

BIOCOMES. Website www.biocomes.eu

BIOCOMES. Publishable summary report (2015): http://www.biocomes.eu/wp-content/uploads/2015/06/BIOCOMES-18M-Periodic-Report_publishable-summary.pdf.

Köhl J, Zingg D, Benuzzi M, Ehlers RU, Perdrix V, Eiben U, Rosemeyer V, Wikström M, Azzaro A, Glazer I, O'Tuama P, Tomanovic Z, Tamm L, Hauschild R, Antonakou M, Skrzecz I, De Cal A, Teixidó N, Jehle J, Griffin C, Beliën T, Birnstingl B, Berg G, Simões N, Causin R, Munoz D, Eibl R (2014) BIOCOMES (EU project 612713) develops new biological control products for Integrated Pest Management in agriculture and forestry (2016). IOBC-WPRS Bulletin 115: 251-253.

6

Desarrollo de un producto biológico para el control de *Fusarium circinatum* en viveros de *Pinus radiata* en Chile

Eugenio Sanfuentes Von Stowasser

El reciente ingreso a Chile del hongo patógeno *Fusarium circinatum*, ha significado pérdidas severas en la producción de plantas y una amenaza potencial a plantaciones comerciales de *Pinus radiata*. Los viveros afectados concentran sobre el 50% de la producción de plantas de la especie, y la mortalidad ha alcanzado hasta 40% en algunos casos. Otro tipo de pérdidas, es la eliminación de lotes de plantas sanas, debido al muestreo efectuado por el servicio cuarentenario del país (SAG) y problemas en los programas de forestación. A la fecha, no existen productos registrados que permitan la aplicación del control químico de *F. circinatum*, además de presentar restricciones debido a normativas ambientales. La resistencia genética no constituye una alternativa de control a corto plazo, debido al periodo de tiempo requerido para liberar materiales resistentes con características comerciales. El control a través de manejo del cultivo ha demostrado ser ineficaz. Debido a los problemas que presentan los métodos de control antes mencionados, el control biológico, a través de la utilización de microorganismos antagonistas al patógeno, surgió como una estrategia razonable para el manejo de esta enfermedad en viveros y reducir la diseminación del patógeno hacia las plantaciones.

En una primera etapa en el desarrollo del producto biológico, entre los años 2010-2012, se ejecutó el proyecto “Desarrollo de herramientas biotecnológicas para el control de *Fusarium circinatum* en viveros de *Pinus radiata*” (INNOVA 08-PCS1-312), obteniéndose los primeros resultados en esta línea de investigación. Se obtuvo una colección de más de 3.000 aislados entre hongos y bacterias, obtenidos desde distintos órganos, especies vegetales y ambientes. La mayoría de los aislados

Laboratorio de Patología Forestal, Facultad de Ciencias Forestales, Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción. E-mail: esanfuen@udec.cl

(90%) fueron caracterizados en su capacidad de antagonismo contra *F. circinatum* en ensayos *in vitro* seleccionándose hongos y bacterias que inhibieron el crecimiento micelial del patógeno sobre 70%, además de algunos aislados presentando otras formas de antagonismo, micoparasitismo, antibiosis y lisis de hifas (enzimas quitinolíticas). Entre los hongos y bacterias que tuvieron mayor efecto en ensayos *in vitro* (300 aislados), fueron probadas en varios ensayos de invernadero, con sustrato natural e infestado con el patógeno, con ocho aislados de hongos que tuvieron niveles de control sobre 90%, al reducir la mortalidad de plántulas de *P. radiata* causada por *F. circinatum*. En esta fase también se realizaron los primeros ensayos en condiciones de viveros. Al final de este proyecto fueron seleccionados tres aislados, *Clonostachys*, *Gliocladium* y *Trichoderma*, que presentaban un alto nivel de control de *F. circinatum* (sobre el 90%).

En una segunda etapa, entre los años 2014-2015, se ejecutó el proyecto “Desarrollo de un bioproducto para el control de *Fusarium circinatum* en viveros de *Pinus radiata* (Fondef IdeA IT13I10057). Durante este proyecto se trabajó en; a) seleccionar el ingrediente activo (i.a.) del producto, consistiendo en determinar el efecto de control de los aislados seleccionados en forma individual y en mezclas, b) formulación del bioproducto, probando formulaciones simples (sólido o líquido) que proporcione al ingrediente activo seleccionado la mayor eficacia de control en el tipo de producción de plantas, c) caracterización de la formulación, para determinar la viabilidad, pureza de la formulación en diferentes tiempos de almacenamiento y potencial de biocontrol contra otros patógenos comunes del vivero y d) determinar una oportunidad y frecuencia de aplicación, que indicaría el inicio de la aplicación del producto en el sustrato y la frecuencia de aplicación en vivero, que permita el mayor nivel de control del patógeno en viveros. Los resultados obtenidos en todos los ensayos *in vitro* y de invernadero permitieron generar un producto biológico, prototipo denominado M3, basado en la mezcla de los tres aislados con nivel de control sobre 70%. La formulación seleccionada para el bioproducto correspondió a suspensión acuosa de esporas en partes iguales para los aislados. Para control de calidad del prototipo del bioproducto, están siendo aplicados los procedimientos desarrollados por EMBRAPA (Bettiol & Morandi, 2009). La oportunidad de aplicación de M3 al sustrato de producción de plantas ha demostrado tener importancia, así es como, se verificó que al aumentar el tiempo de incorporación al sustrato antes de la siembra de *P. radiata*, incrementa la eficacia del control de *F. circinatum*. Una vez realizada la siembra se determinó que una frecuencia quincenal de aplicación del bioproducto M3 se registra una menor incidencia del patógeno en las plantas de *P. radiata*.

Los satisfactorios resultados obtenidos con el bioproducto (prototipo M3) en el control de la enfermedad causada por *F. circinatum* en la producción de plantas de *P. radiata* en contenedores, durante el desarrollo de los proyectos de investigación, ha generado un interés por parte de empresas forestales para su utilización a mayor escala. En la temporada de viveros 2014-2015, el bioproducto fue proporcionado a

dos viveros comerciales, para tratar sustrato correspondiente a aproximadamente 7.000.000 de plantas. En esta temporada, se está considerando aumentar en 50% el número de plantas tratadas con el bioproducto. Para los próximos desarrollos y producción del bioproducto fue creada recientemente una empresa para tales efectos denominada Emprobiol SpA. El bioproducto desarrollado constituye una tecnología novedosa para enfrentar enfermedades en cultivos forestales, especialmente considerada en el contexto de manejo integrado, y además, contribuyendo a reducir el uso de productos químicos en viveros forestales.

REFERÊNCIA

Bettiol W, Morandi MAB (Eds.) (2009) Biocontrol de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 341.

FONDEF. Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico. Disponible: <http://www.conicyt.cl/fondef/>

SAG. Servicio cuarentenario del país del Chile - Servicio Agrícola y Ganadero. Disponible: <http://www.sag.cl/>

7

Controle biológico de podridões pós-colheita de frutas tropicais

Carlos A. T. Gava¹
Paula Fernanda de Souza Tavares²

A fruticultura é um segmento importante da agricultura mundial, com produtos de alto valor agregado e elevado custo de produção quando comparado às commodities. O Brasil apresenta grande diversidade edafoclimática, uma vantagem competitiva que o torna um grande produtor de frutos de qualidade de uma variedade de espécies (Fachinello et al., 2008). Nos últimos anos, o uso de estratégias associando o manejo da água e a aplicação de reguladores de crescimento permitiu ampliar a área produtiva e escalonar a produção ao longo do ano. No entanto, este escalonamento passou a representar um desafio fitossanitário.

A tecnologia empregada na cadeia produtiva desenvolveu-se rapidamente, tornando o Brasil um importante *trader* no mercado mundial. Contudo, as perdas pós-colheita nas diferentes cadeias de produção são muito elevadas, aumentando os custos de produção de hortaliças e frutas (HF) e reduzindo o poder de negociação dos produtores. Existem algumas desordens fisiológicas, mas destacam-se as podridões causadas por fitopatógenos, principalmente de origem fúngica (Oliveira et al., 2006).

A eficiência do controle de podridões pós-colheita em HF pode ser comprometida por uma série de fatores. Embora pareça ficção, ocorrem erros de diagnósticos que levam ao uso de fungicidas inadequados. Além disso, alguns dos patógenos mesmo infectando os frutos ainda no campo, somente passam a produzir sintomas durante a maturação. A inadequação da cadeia de frio durante o transporte

¹Pesquisador, Lab. Controle Biológico – Embrapa Semiárido. Cx Postal 23, Petrolina – PE, 56302-970. E-mail: carlos.gava@embrapa.br; ²Mestranda, Horticultura Irrigada – Universidade do Estado da Bahia – UNEB, Campus Juazeiro, Rua Edgard Chastinet, S/N, Juazeiro – BA.

e armazenamento pode acelerar o desenvolvimento dos patógenos. Além disso, há limitações legais quanto ao registro de princípios ativos eficientes e preocupação dos consumidores com os riscos de resíduos, principalmente considerando que o consumo de frutos está associado a uma busca por alimentação mais saudável.

A seguir abordaremos alguns aspectos das podridões, com um pouco mais de detalhes no que concerne a aspectos fisiológicos dos frutos; bioecologia de patógenos e estratégias de controle aplicando agentes de controle biológico. As principais considerações se referem à patossistemas associados à manga, que será utilizada como modelo para discorrer sobre o controle de podridões pós-colheita em frutos tropicais e que podem ser aplicados, também, a frutos normalmente considerados hortaliças.

Controle de podridões pós-colheita

Podridões pós-colheita são responsáveis por perdas elevadas em HF em todo o mundo, podendo chegar a 20-25% da produção em regiões tropicais (Wisniewski et al., 2007; FAO, 2010). Em geral, isto se deve a problemas relacionados ao controle deficiente de patógenos em pré-colheita, a danos mecânicos na colheita e transporte e inadequação do armazenamento (Barkai-Golan, 2001; Snowdon, 2010). As infecções podem ocorrer tanto em pré quanto pós-colheita, no entanto nas principais cadeias HF as maiores perdas são causadas por patógenos que infectam resíduos florais, como *Botrytis cinerea*, e outros, como *Colletotrichum gloeosporioides*, que são capazes de produzir infecções quiescentes (Viret et al., 2004; Snowdon, 2010).

Grandes investimentos têm sido feitos em tecnologia de embalagem, transporte e armazenamento em ambiente resfriado e atmosfera modificada, o que reduziu significativamente a incidência de podridões. A aplicação pós-colheita de produtos alternativos como cloreto de cálcio (CaCl_2), quitosana, extratos vegetais, óleos essenciais, sanitizantes (NaOCl), e de métodos físicos, como tratamento térmico, aplicação de radiação ionizante (gama e ultravioleta) têm sido alternativas em uso ou em avaliação para diferentes cadeias de produção de frutas (Camili et al., 2007; Cia et al., 2009; Santos et al., 2010). No entanto, o grau de sucesso tem sido extremamente dependente do patossistema. De fato, o controle efetivo de podridões pós-colheita necessariamente demandará a combinação de diversas medidas que deverão ter início na pré-colheita.

Alterações fisiológicas e físico-químicas durante a maturação de frutos

As alterações fisiológicas e bioquímicas que ocorrem na maturação dos frutos têm controle hormonal e resultam em características físico-químicas completamente diferentes dos frutos “verdes”. Fisiologicamente o processo de maturação pode ser dividido em climatérico e não-climatérico: os primeiros, como tomate, banana, kiwi, maçã, manga e mamão, apresentam um pico de respiração e de produção de etileno

no início da maturação; os não-climatéricos, como morango, melão, melancia, laranja e uva, não apresentam aumento significativo da respiração na maturação e a produção de etileno se mantém em níveis basais (Cherian et al., 2014).

A posição do fruto no ramo, o clima, nutrição mineral e de carboidratos, bem como a condição hídrica da planta, são fatores que podem ocasionar desordens no desenvolvimento de frutos e aumentar a sua suscetibilidade às podridões (Ferguson & Woolf, 1999). A ocorrência de fissuras em virtude de problemas nutricionais e desequilíbrio hídrico, abrasões e danos em lenticelas, por exemplo, são comumente descritos como pontos de infecções (Snowdon et al., 2010).

Parte das infecções por patógenos que resultam em podridões pós-colheita podem ter início no campo e não apresentar sintomas até a maturação, as infecções quiescentes. Prusky et al., (2013) apresentam uma excelente revisão do tema quiescência. Os autores consideram que se trata de um estado que precisa de definição específica para cada patossistema, no entanto difere significativamente dos hemibiotrófos. Por exemplo: em patossistemas envolvendo a infecção de frutos verdes por espécies de *Colletotrichum* spp, há uma fase biotrófica, com a produção de apressórios que, com a maturação, se diferenciam em hifas necrotróficas (O'Connell et al., 2012). *Botrytis cinerea*, por outro lado, não apresenta a fase biotrófica. Em alguns patossistemas há uma suspensão do crescimento do patógeno ficando este em estado latente, e em outros *B. cinerea* já foi relatado colonizando endofiticamente os tecidos sem causar sintomas até a maturação (Sowley et al., 2010).

Na fase imatura ou “verde”, os frutos apresentam características físico-químicas que restringem o desenvolvimento do patógeno, tais como:

- Paredes celulares compactas e rígidas;
- Baixo pH da polpa;
- Elevadas concentrações de compostos fenólicos, fitoalexinas e outros compostos fungitóxicos na casca e polpa;
- Elevadas concentrações de ácidos orgânicos;
- Amido como principal carboidrato de reserva.

A casca da manga, por exemplo, enquanto verde é rica em polifenóis e enzimas associadas à sua biossíntese (polifenoloxidase e peroxidase) (Ajila et. al, 2007). Os principais polifenóis presentes em mangas são o ácido gálico, vanílico e protocatecóico, seguido por taninos hidrolisáveis (HT) (Kim et. al, 2007; Palafox-Carlos et. al.,2012). Após a maturação, ainda se mantém concentrações elevadas de compostos fenólicos, no entanto há alterações qualitativas que reduzem o seu potencial antimicrobiano (Ribeiro et. al, 2007).

As alterações envolvidas no amadurecimento de frutos são desencadeadas pela expressão de genes que codificam enzimas específicas (Seymour et al., 2013). Estas enzimas catalisam um conjunto de reações que resultam em mudanças na

composição e estrutura dos polissacarídeos em paredes celulares; degradação de clorofila; conversão do amido em açúcares; síntese e alteração de ácidos orgânicos, lipídios, compostos fenólicos e voláteis, que definem a composição e teor característico das diferentes espécies e até mesmo variedades (Figura 1); que, por fim, definirão a coloração, firmeza da casca e polpa e o equilíbrio acidez/açúcar (Herianus et al., 2003; Bouzayen, 2010). Os principais açúcares solúveis presentes nos frutos maduros são glicose, frutose e sacarose e o sabor característico de cada espécie é dado pelo equilíbrio entre os açúcares e os ácidos orgânicos, como o cítrico e o málico (Chitarra & Chitarra, 1990).

Na maturação ocorre a expressão de genes específicos envolvidos na síntese e ativação de endoglucanases, glicosidase, transglicosilases, esterases e acetilases, alterando as propriedades físicas dos polímeros da parede celular, alterando a viscosidade da matriz ou o padrão de ligação da hemicelulose/celulose (Goulao & Oliveira, 2008; Cherian et al., 2014). As enzimas pectinametilesterase (PME), poligalacturonase (PG), glucanases e galactosidase também apresentam aumento de atividade durante os últimos estágios de maturação, reduzindo a rigidez da parede celular e tornando os frutos macios (Yashoda, 2005; Gonzalez-Aguilar et al., 2008).

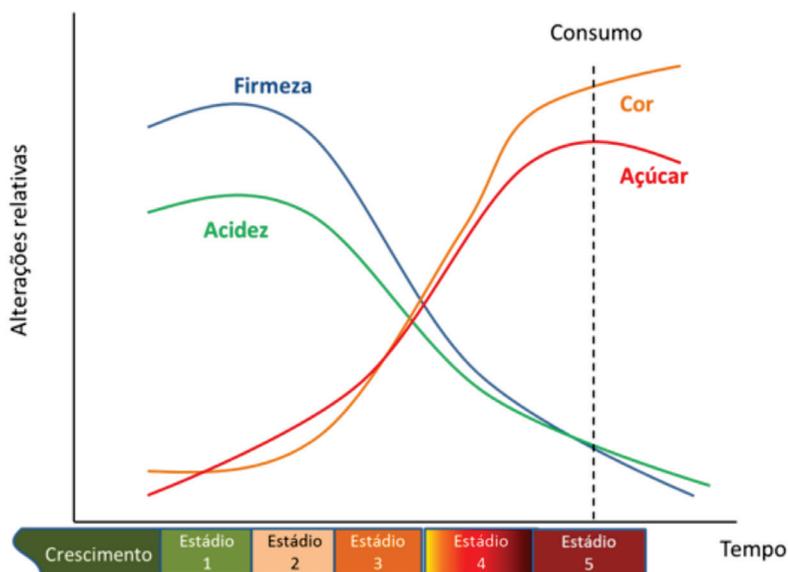


FIGURA 1 - Curva teórica das alterações relativas que se desencadeiam ao longo do processo de maturação de frutos de manga ao longo de diferentes estádios de evolução. As alterações bioquímicas a partir do início da maturação resultam em coloração, textura e teores de açúcares específicos para as diferentes variedades.

Um estudo realizado por Lima et. al. (2001) com manga cv. Tommy Atkins, por exemplo, demonstrou que a fase climatérica dos frutos é marcada por aumento na atividade de amilases, decréscimo no teor de amido e aumento da quantidade de açúcares redutores e não redutores. No estágio máximo de maturação da manga, além da redução do teor de fenóis, aumento do teor de açúcar, o teor ácido cítrico, o ácido orgânico mais abundante em frutos verdes, diminui acentuadamente, enquanto o teor de alanina aumenta logo após a fase inicial de maturação (Lima et al., 2001). Além do efeito direto sobre os patógenos, a alteração de paredes celulares e fibras na casca e poupa aumenta sensibilidade de frutos em geral ao manuseio, armazenamento e transporte (Hoa et al., 2002).

Como resultado, o ambiente na polpa dos frutos passa a ser adequado para a explosão de crescimento de fungos. Estes patógenos, que produziam infecções quiescentes, passam a se desenvolver rapidamente produzindo lesões com diferentes graus de severidade (Prusky et. al, 2013). Na maioria das vezes, é impossível identifica-las ainda durante o processamento e embalagem, o que causa prejuízos econômicos e degrada a imagem do produtor.

Principais agentes de podridões pós-colheita em condições tropicais

Doenças de origem fúngica causam a maioria das perdas durante o armazenamento, distribuição e consumo de frutos frescos e hortaliças (Spadaro & Droby, 2016). Fungos quiescentes são capazes de colonizar endofiticamente o tecido de frutos imaturos, no entanto as características físico-químicas reinantes e as respostas do complexo de defesa do hospedeiro impedem seu desenvolvimento até que as alterações bioquímicas da maturação tornem o habitat propício ao seu desenvolvimento (Alkan, 2015). Além dos patógenos quiescentes, patógenos secundários podem usar infecções que têm início após a colheita (Cavalcanti et. al, 2005).

Fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Diplodia* e *Penicillium* são considerados espoliativos e capazes de causar podridões com infecções que, na maioria das vezes, ocorrem após a colheita. A contaminação de embalagens reaproveitadas, containers e contentores, câmaras frias e do ambiente de exposição nas centrais de comercialização e mercado são a causa de inúmeras infecções por estes fungos cosmopolitas. Outros fungos, como *Alternaria* spp. e *Colletotrichum* spp podem ser oriundos do campo, mas também podem causar infecções pós-colheita ao colonizarem ambientes e utensílios de processamento e armazenamento.

Antracnose, causada por espécies de *Colletotrichum* spp., é uma importante doença que afeta a qualidade pré e pós-colheita em diversos frutos (Ploetz, 2003). A doença é importante na fase pós-colheita por se tratarem de patógenos quiescentes (Silva, 2013). No campo, *Colletotrichum* spp. provocam infecções graves que podem destruir toda a inflorescência. O fungo tolera uma ampla faixa de temperatura,

podendo colonizar ramos, folhas e resíduos de cultura, mas o processo infectivo é dependente de umidade ambiental é transportado em aerossóis durante a chuva ou irrigação. Em infecções severas, os frutos jovens podem desenvolver manchas pretas com centro esbranquiçado, em outros casos causam perdas consideráveis durante o transporte e armazenamento (Haggag, 2010).

De forma similar, *Botrytis cinerea*, é o agente causal de podridões pós-colheita em uma série de frutos, como morango, uva, cereja, kiwi, pêra, pêssego e maçã, mas também em hortaliças tomate, berinjela, pepino, pimentão, abobrinha (Elad et al., 2015). O fungo é um problema em frutos que passam por período prolongado em armazenamento em câmara fria, pois consegue desenvolver-se mesmo em temperatura muito baixas e infectar os tecidos em processo de maturação (Droby & Lichter, 2007). *B. cinerea* é capaz de sobreviver no campo como saprófita em folhas e ramos mortos, resíduos florais, fragmentos de frutos e outros tecidos em decomposição. *B. cinerea* dá início à fase patogênica do ciclo na floração, pode permanecer latente nos estames ou sépalas, e infectar os frutos na proximidade ou logo após o início da maturação. A colonização de resíduos florais em morango e videira, por exemplo, é considerado como o mais importante método de infecção por *B. cinerea* (Romanazzi et al., 2016).

A família Botryosphaeriaceae engloba uma diversidade de fungos que podem causar severos problemas em pós-colheita, com espécies endofíticas e também saprófitas (Phillips, 2013). Espécies de Botryosphaeriaceae como *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusicoccum aesculli*, *Neofusicoccum parvum* e *Botryosphaeria dothidea* vêm sendo relatadas como agentes causais de podridão peduncular em frutos em diversos países como Brasil, Estados Unidos, Taiwan e Austrália (Costa et al., 2010; Sakalidis et al., 2011; Trakunyingcharoen et al., 2014; Chen et al., 2014). A virulência das espécies pode variar em função do clima local, espécie e cultivar das fruteiras.

Estes fungos têm uma distribuição cosmopolita, ocorrendo predominantemente em locais quentes e úmidos, e podem atingir diversos hospedeiros (Trakunyingcharoen, 2014). No Brasil, *B. dothidea*, *N. parvum*, *F. aesculli* e *L. theobromae* foram encontrados nos principais polos produtores de manga e sua prevalência depende de cada região (Marques et al., 2013). Estes fungos podem sobreviver saprofiticamente em restos de cultura, e colonizar panículas, ramos, frutos e folhas causando sintomas de queima, ou podem colonizar de forma endofítica os botões florais (Batista et al., 2012). Acredita-se que as infecções ocorrem predominantemente através da transmissão horizontal, por meio de esporos, e sua disseminação é promovida pelo vento, água de chuva e/ou irrigação e insetos (Batista et al., 2009; 2012; Slippers, 2016). Em frutos, os sintomas incluem manchas na epiderme, no entanto a podridão peduncular é o sintoma mais característico, e as infecções podem ocorrer ainda no período de floração, causando abortos de flores e frutíolos. Em mangueira, o patógeno coloniza o ráquis da panícula, penetrando nos frutos em qualquer fase do

desenvolvimento e produzindo o sintoma característico de lesões com afundamento do tecido na interface com o pedicelo (Batista, 2012).

Um grande problema ao manejo adequado de podridões pós-colheita são os enganos no diagnóstico dos agentes etiológicos. As lesões nos frutos, mesmo causadas por diferentes patógenos, podem ter sintomas muito similares. Na manga, embora os sintomas de podridão do colo ou peduncular sejam característicos, podridões nas laterais dos frutos podem ser causadas por *Alternaria alternata*, *Colletotrichum* spp, *L. theobromae*, *B. dothidea* e *N. parvum*. No Vale do São Francisco, por exemplo, *B. dothidea* e *N. parvum* foram mais frequentes que *L. theobromae* (Costa et. al, 2010). A confusão causada pela identificação apenas pela observação dos sintomas, sem análise laboratorial, pode causar perdas decorrentes da aplicação de produtos inadequados aos verdadeiros agentes etiológicos.

Métodos de controle

O controle efetivo de podridões pós-colheita demanda a adoção de um conjunto de táticas de controle cultural, físico, químico e biológico. Entretanto o sucesso do controle pode variar de acordo com a cultivar, o estágio de maturação e as características bioquímicas do fruto (Barkai-Golan, 2011).

O controle cultural trata de um conjunto de técnicas que objetivam reduzir a pressão de inóculo do patógeno presente nas áreas de produção. Nesse contexto, englobam ações como eliminação de resíduos vegetais (restos de podas) e frutos apodrecidos do chão e assepsia dos instrumentos de podas (Tavares, 2004). Resíduos de poda da mangueira sob irrigação são a maior fonte de inóculo de *L. theobromae* no Vale do São Francisco, daí a recomendação de remoção dos resíduos para as entre-linhas das culturas onde permanecem desidratados (Batista et al., 2011).

Os métodos de controle físico não têm restrições legais, são efetivos para uma grande diversidade de microrganismos, não deixam resíduos e, se adequadamente aplicados, não afetam a qualidade final do fruto (Rivera-Pastrana, 2007). Entre as táticas de controle físico, o resfriamento e o tratamento hidrotérmico têm sido utilizadas em *packing houses* para tratamento de uma variedade de frutos. Por outro lado, uma das primeiras providências após a colheita é o resfriamento imediato dos frutos para o retardamento dos processos fisiológicos e redução da taxa de crescimento de microrganismos (Snowdon, 2010). Nas áreas de produção de uva, manga e maçã, por exemplo, os frutos passam por resfriamento em túnel de ventilação forçada antes mesmo do processamento e embalagem, seguindo para câmaras-frias com temperatura adequada (Snowdon, 2010; Batista et al., 2011).

O tratamento hidrotérmico consiste em imergir o fruto em água, adicionada ou não de adjuvantes, em altas temperaturas para eliminar propágulos fúngicos. O binômio temperatura x tempo é definido em função das dimensões dos frutos e da tolerância do patógeno. Em maçã, por exemplo, o tratamento para *Cryptosporiopsis perennans* consiste na aspersão de água a 50 °C por 12 segundos na linha de

processamento (Bartnicki et al., 2011). A aplicação de radiação ionizante, UV-C e radiação gama, tem sido utilizada para o controle de patógenos pós-colheita. A UV-C, com menor risco, vem sendo proposta para aplicação na linha de processamento em *packing house* (Nascimento et al., 2014). No entanto, as doses de radiação podem causar danos aos frutos quando as doses precisam ser muito elevadas (Santos et al., 2013; Terao et al., 2015).

O resfriamento é uma das tecnologias mais eficientes empregadas para a conservação de frutos, tendo efeito tanto sobre o retardamento do processo fisiológico de maturação, quanto de eliminação ou redução da taxa de crescimento dos microrganismos. A eficiência do resfriamento é dependente de uma série de fatores e técnicas específicas têm sido validadas para diferentes frutos (Teruel et al., 2001; Usall et al., 2016). O pré-resfriamento para a redução rápida da temperatura, ou retirada do “calor de campo” é uma estratégia que tem se propagado, principalmente entre frutos de cutícula sensível como goiaba, morango e uva, mas também para manga e maçã (Bautista-Baños et al., 2013). No entanto, os produtores têm enfrentado problemas relativos ao custo da cadeia de frio, que inclui o pré-resfriamento, resfriamento de galpões de processamento e de transporte (caminhões e containers). Um problema significativo na cadeia de frio é a tentativa de economia de combustível por parte dos transportadores, que desligam o sistema de refrigeração em parte da viagem.

A principal estratégia de controle de podridões pós-colheita recai sobre o uso integrado de refrigeração e a aplicação de fungicidas sintéticos, tanto em pulverizações pré-colheita quanto no processamento pós-colheita. Seu uso é simples, com efeito em curto prazo, previsível e tem sido aplicado sem grandes conhecimentos relacionados aos processos básicos do agroecossistema (Bettiol, 2009; Snowdon, 2010). Os principais produtos disponíveis para aplicação em pós-colheita são formulações de cobre, imazalil e tiabendazol (Salles Junior et al., 2009). Apesar da eficiência, a utilização inadequada resulta em resíduos tóxicos nos frutos e os patógenos podem desenvolver resistência.

No entanto, há uma demanda global para a redução do uso de pesticidas nas cadeias produtivas de HF, principalmente em pós-colheita, devido à preocupação com resíduos em produtos para consumo *in natura* (Abeer et al., 2013). Este é um movimento global, em diferentes estágios de evolução, que tem levado a restrições cada vez maiores ao uso de defensivos na agricultura de modo geral. Com isto, tanto os órgãos governamentais de saúde quanto a rede de distribuição de frutas tem exercido pressões sobre os produtores, para que restrinjam o uso de fungicidas em pós-colheita. No que tange à exportação de frutas, principalmente às cadeias de maçã, mamão, manga, melão e uva, as estratégias de controle esbarram em diferenças nas grades de agroquímicos registrados nos diferentes países. Além disso, os limites máximos de resíduos (LMR) têm sido utilizados como barreiras não alfandegárias em alguns dos principais mercados importadores de frutos do Brasil.

Neste contexto, o controle biológico pode ser uma alternativa eficaz, tanto para uso exclusivo como implementado em um programa de manejo integrado de podridões pós-colheita. Apresenta custo compatível, não apresenta risco de resíduos e é de fácil aplicação em diversas culturas.

Controle biológico de doenças pós-colheita

Segundo Baker e Cook (1983), “controle biológico é a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocados por um patógeno ou parasita”. Nesse contexto, os componentes do controle biológico são o patógeno, o hospedeiro e os antagonistas, sob a influência do ambiente, todos interagindo num sistema biológico complexo (Cook; Baker, 1983). Mais recentemente o conceito de controle biológico foi alterado e passou a incluir o “uso de organismos naturais ou modificados, de genes ou seus produtos para reduzir o efeito indesejável de organismos (pragas, doenças e plantas invasoras) e para favorecer o desenvolvimento de organismos desejáveis com culturas, árvores, animais e microrganismos e insetos benéficos” (NAS, 1987).

O estudo para o controle biológico de patógenos passou de poucos e tímidos artigos publicados até a década de 1970, para uma linha de pesquisa com grande número de pesquisadores e artigos publicados na última década. Ao contrário do campo, o uso de antagonistas para controle de doenças pós-colheita tem uma grande vantagem de poder ser aplicado em um ambiente controlado (principalmente temperatura e umidade), que pode afetar profundamente sua sobrevivência e eficiência (Wisniewski et al., 2007). De acordo com Sharma et al. (2009), há duas abordagens para o uso de microrganismos antagonistas: microrganismos pré-existentes na superfície de frutos que, após o isolamento são reaplicados para o controle de doenças; microrganismos de origens diversas que são introduzidos a partir do isolamento em diversas origens. No primeiro caso encontram-se leveduras antagonistas isoladas a partir da superfície de frutas (Chalutz & Wilson, 1990). Enquanto no segundo caso podem ser listados diversos fungos e bactérias oriundos do solo e que têm sido aplicados para o controle de patógenos pós-colheita. *Bacillus* spp (Hong et al., 2014, Wang et al., 2013) e até mesmo isolados de *Trichoderma* (Valenzuela et al., 2015) são exemplos de microrganismos oriundos do solo e que tem sido aplicados no controle de patógenos pós-colheita.

As leveduras possuem potencial para o controle de infecções fúngicas pós-colheita. São encontradas naturalmente na superfície de frutos e já encontram um grande número de aplicações em alimentos, tornando-as mais aceitáveis pelos consumidores. As leveduras são fungos unicelulares, heterotróficos e são encontradas no solo ou em tecidos de plantas. Podem atuar sobre os patógenos utilizando diferentes mecanismos de ação como antibiose e competição por nutrientes, entre outros (Bettiol, 1991). Por exemplo, as leveduras *Pichia guilliermondii* Wiskerham, *Candida oleophila* Montrocher, *Candida sake* Saito and Ota, *Candida formata*

Meyer & Yarrow, *Candida saitonae* Nakase & Suzuki, *Debaryomyces hansenii* Lodder & Kre-Van Rij, *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud, *Pantoea agglomerans* (Ewing & Fife) Gavini et al., *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, *Metschnikowia fructicola* Kurtzman & Droby e *M. pulcherrima* Pittes & Miller tem sido aplicadas com sucesso em diferentes frutos como citros, tomate, pera, manga, pêssego e maçã (Sharma et al., 2009).

Os principais mecanismos de ação utilizados pelos agentes de controle biológico (ACB) são: a antibiose, competição nutricional e por espaço, parasitismo direto e indução de resistência. Estes mecanismos de ação são detalhadamente revistos em Spadaro et al. (2002), Sharma et al. (2009) e Liu et al., (2013).

A competição por espaço e nutrientes é resultante da colonização preferencial da superfície dos frutos pelo antagonista, com a exaustão de nutrientes (carboidratos, nitrogênio e fatores de crescimento) e oxigênio. Portanto, o ACB deve estar adaptado para sobrevivência e crescimento no ambiente representado pela superfície dos frutos. A manipulação do ambiente para aumentar a colonização pelo ACB aumenta a eficiência de controle. Embora não seja obrigatória, aparentemente a adesão dos ACBs às hifas dos patógenos confere vantagens ecológicas, facilitando o consumo dos nutrientes (Droby et al., 1998). A produção de antibióticos, ou antibiose, se refere à produção de metabólitos microbianos que conferem uma vantagem competitiva pelos sítios de colonização pelo ACB. Existem diversos casos relatados na literatura, no entanto em se tratando de aplicações pós-colheita, pode haver dificuldades no registro de ACBs com mecanismo de ação baseado na produção de compostos antimicrobianos, requerendo testes toxicológicos complexos.

Embora haja poucas informações disponíveis relativas ao parasitismo direto de patógenos em doenças pós-colheita, este mecanismo de ação tem sido indicado em alguns estudos (Wisniewski et al., 1991; Bonaterra et al., 2003). O parasitismo envolve a produção e secreção de enzimas como gluconases, quitinases e proteases pelos ACBs que provocariam a lise e extravasamento de conteúdos celulares usados como nutrientes. Bonaterra et al. (2003), por exemplo, relataram que o parasitismo era o principal mecanismo de ação envolvido no controle de *Monilia laxa* e *Rhizopus stolonifer* em ameixa e pêssego.

Junto com a competição, a indução de resistência é um dos mecanismos de ação mais interessantes para o controle de podridões pós-colheita. Principalmente por não envolver a produção de antibióticos. Este mecanismo de ação foi detalhadamente descrito em Romanazzi et al. (2016a). A resistência natural, pré-existente, pode ser complementada pela ativação de mecanismos latentes, acionados apenas quando uma infecção é reconhecida, ou artificialmente por diferentes meios, entre eles a aplicação de ACBs ou elicitores por eles produzidos. Nos frutos, por exemplo, a elicitação da resistência induzida pode levar ao acúmulo de compostos fenólicos e outros antioxidantes (Soresh et al., 2010).

Algumas enzimas estão diretamente relacionadas às respostas de indução de resistência: peroxidase (POX), polifenol oxidase (PPO) e fenilalanina amônia-liase (PAL). A atividade das PPOs são geralmente detectadas em tecidos infectados por patógenos e tem envolvimento direto nos mecanismos de defesa ou na senescência de frutos (Romanazzi et al., 2016a; Spadaro & Droby, 2016). Considerando a resistência existente ao uso de microrganismos que produzem antibióticos, a competição e a indução de resistência seriam os mecanismos mais interessantes a serem buscados em um possível ACB.

Atendendo aos critérios propostos por Wilson & Wisniewski (1989) e Barkai-Golan (2001), um ACB ideal para aplicação em pós-colheita teria as seguintes características: 1. Estabilidade genética; 2. Efetividade em baixas concentrações; 3. Tolerância a condições ambientais adversas; 4. Tolerância a pesticidas, podendo ser usado em estratégias de manejo integrado; 5. Não causar danos diretos ou indiretos aos seres humanos; 6. Não patogênico ao hospedeiro; 7. Permitir formulação para aplicação e armazenamento eficientes; 8. Compatibilidade com outras técnicas físicas e químicas de controle.

Embora o controle biológico de doenças pós-colheita tenha evoluído muito rapidamente, a seleção de um ACB eficiente e com atividade de amplo espectro contra a os principais patógenos é difícil e restringe o desenvolvimento de produtos comerciais. Interações abióticas (susceptibilidade à radiação UV, temperatura e UR) e bióticas (características da superfície dos frutos, competição com os microrganismos autóctones) restringem a colonização do fruto e reduz a eficiência de controle. Uma estratégia recente tem sido a aplicação de misturas de ACBs compatíveis que podem promover: rápida utilização do substrato disponível; remoção de substâncias inibitórias ao crescimento do ACB; levando à formação de comunidades microbianas mais estáveis que permitam a exclusão de outros microrganismos, incluindo os patógenos (Sharma et al., 2009; Romanazzi et al., 2016b).

O último passo no desenvolvimento de um produto é a formulação dos ACBs, com a qual se busca o aumento do período de armazenamento, alcançando períodos viáveis comercialmente; oferta de proteção ao ACB logo após a aplicação, até a colonização dos micronichos na superfície dos frutos. Além disso, podem ser incluídos outros aditivos que permitam o aumento da eficiência de controle (Borges, 2012). Por último, mas não menos importante, o controle biológico deve ser parte de um conjunto de estratégias a ser empregado no manejo integrado de patógenos causadores de podridões pós-colheita. A aplicação de métodos físicos (radiação ionizante, frio, tratamento térmico), a sanitização dos frutos em pós-colheita e, ainda, o uso de fungicidas compatíveis em pré- ou pós-colheita podem promover um efeito sinérgico com a aplicação de ACBs. Mesmo em sistemas orgânicos ou ecológicos, deverão ser empregadas medidas que permitam a redução do potencial de inóculo no campo, e outras que restrinjam o desenvolvimento do patógeno e/ou processo de maturação dos frutos.

Controle biológico de podridões pós-colheita da manga no Vale do São Francisco

Os primeiros estudos com o controle biológico de podridão pós-colheita da manga no Vale do São Francisco foram realizados na década de 1990 (Michereff et al., 1997). Naquele momento, a exigência por qualidade dos frutos, definidas exclusivamente pela aparência, e a inexistência das limitações atuais quanto a resíduos de fungicidas nos frutos não deram suporte à continuidade dos estudos. Neste período de intervalo, alguns estudos esporádicos foram realizados, como a aplicação de *Trichoderma harzianum* LCB51 para o controle da antracnose e prolongamento da vida útil em mamão formosa produzido nas condições do pólo frutícola de Mossoró-Açú (RN). Quase duas décadas depois a mudança ocorrida no cenário de exportação de frutas levou à retomada da linha de pesquisa em novas bases.

Nos novos estudos se buscou atender aos critérios estabelecidos por Wilson & Wisniewski (1989) e Barkai-Golan (2001), previamente relacionados. Assim, se elegeu selecionar isolados nativos de leveduras por apresentarem menor risco de rejeição entre os consumidores. Os resultados mostraram a existência de um pequeno grupo de leveduras epifíticas e endofíticas de frutos nativos (umbu, cajá e mandacaru) e cultivados (manga, melão e uva) com potencial de reduzir a incidência e a severidade *in vivo* de podridões em manga causados por *L. theobromae*, *N. aesculi* e *Botriospheria dothidae*. A figura 2 mostra o comportamento seis dos isolados em experimentos *in vivo* com a inoculação de manga cv. ‘Tommy Atkins’ com suspensões de esporos de *L. theobromae* (Castro et al., 2013)

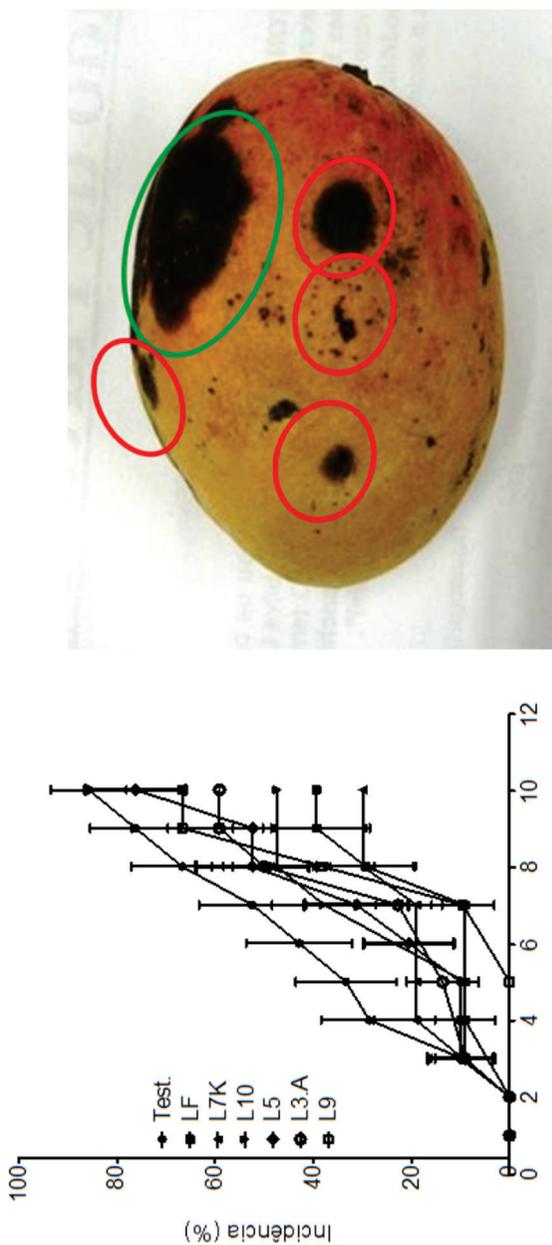


FIGURA 2 - Evolução da incidência de podridão em mangas cv. 'Tommy Atkins' tratadas com isolados de leveduras previamente selecionados e inoculadas com suspensão de esporos de *Lasiodiplodia theobromae* e incubação por dez dias à temperatura ambiente (24 – 28 °C). A figura ao lado apresenta fruto utilizado no experimento com sintomas de podridões fora da área de inoculação (círculo vermelho), prováveis pontos de ocorrência de infecções quiescentes.

Os resultados iniciais foram promissores, permitindo identificar seis isolados que entre outras características não produziram metabólitos antibióticos em testes de cultivo pareado. Nos estudos que se seguiram, os isolados foram identificados como *Saccharomyces* sp. (L7K, L9 e L10) e *Pichia* sp. (LF). Entre estes, L7K e L9 apresentaram alta homologia com *S. cerevisiae* e *S. boulardi*, respectivamente, enquanto LF apresentou homologia próxima a 99% com *P. kudriavzevi*. No entanto, um resultado inesperado deixou patente que os tratamentos pós-colheita isoladamente não seriam suficientes para alcançar controle efetivo das podridões. Mesmo nos tratamentos referência, utilizando um fungicida sintética (Imazalil) ou um ACB comercial (*B. subtilis*), mesmo os tratamentos com sucesso na redução da incidência ou severidade da podridão no ponto de inoculação não impediam o desenvolvimento de sintomas em outras áreas dos frutos, provavelmente com ocorrência de infecções quiescentes oriundas do campo (Castro, 2015).

Esta constatação e o conhecimento pré-existente dos patossistemas quiescentes que resultam nas podridões pós-colheita em manga levaram a necessidade de incorporação de práticas de manejo integrado destes patógenos. Assim, às recomendações foram incorporadas práticas discutidas anteriormente, que incluem o controle cultural para, a redução do potencial de inóculo, e a aplicação preventiva de fungicidas, com princípios ativos adequados aos diferentes estágios de desenvolvimento da cultura.

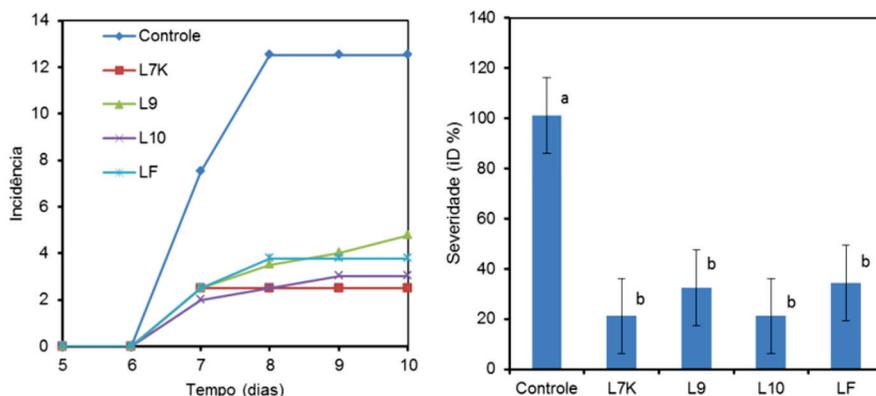


FIGURA 3 - Incidência e severidade da ocorrência natural de podridões em manga cv. "Tommy Atkins" com a aplicação de isolados de leveduras em tratamento pós-colheita ao longo de dez dias de armazenamento em temperatura ambiente (Castro et al., 2014).

Considerando apenas o controle biológico, demonstrou-se que a aplicação nos estágios iniciais de desenvolvimento dos frutos, iniciada logo após a abertura total das flores, alcançou a maior eficiência de controle (Figura 4). No entanto, a eficiência de controle foi influenciada pelo agente de controle aplicado. Estudos mais detalhados mostraram que os isolados apresentam diferentes graus de tolerância às condições ambientais (Gava et al., 2014). Resultados similares foram obtidos com a aplicação de produto comercial a base de *Bacillus subtilis* (Serenade®). Embora *B. subtilis* seja um habitante comum do solo, provavelmente pouco adaptado à colonização do filoplano ou da superfície dos frutos, assim como as leveduras apresentou elevada eficiência de controle quando aplicado a partir do início da fase de maturação (Figura 5). Assim, ficou estabelecido que a pulverização com ACBs a partir do máximo desenvolvimento dos frutos ou início da maturação podem ser incorporados ao manejo integrado da doença. Este período, coincide com o maior risco de contaminação dos frutos com fungicidas, deixando poucas opções aos produtores.

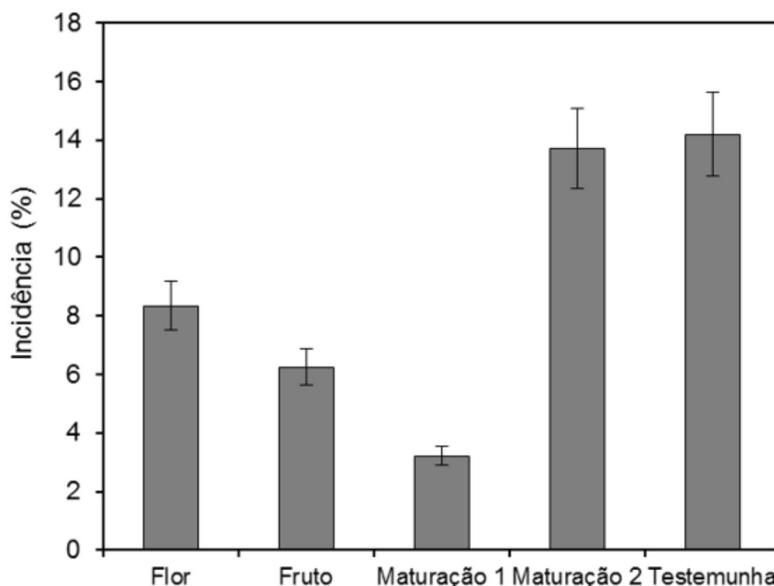


FIGURA 4 – Incidência de ocorrência natural de podridões pós-colheita em manga cv. “Kent” com a aplicação de isolados de levedura em diferentes fases de desenvolvimento dos frutos (Castro et al., 2014). Após a colheita os frutos foram submetidos assepsia, armazenamento em câmara fria (10 °C; UR 90%) por 15 dias e em incubação (24-28 °C) por dez dias.

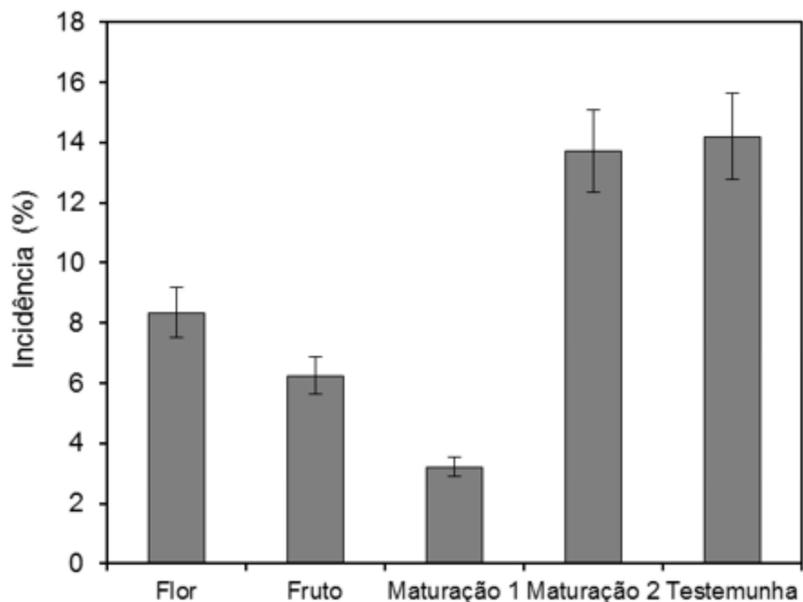


FIGURA 5 – Incidência natural de podridões pós-colheita em manga cv. “Palmer” em experimento com a aplicação de *Bacillus subtilis* (Serenade®) em pomar comercial. Após a colheita, os frutos foram submetidos ao processamento normal em *packing house*, armazenamento em câmara fria (10 °C; UR 90%) por 20 dias e em condições ambiente (24-28 °C) por dez dias.

Os estudos em andamento buscam a incorporação dos ACBs aos sistemas convencionais e orgânicos de produção de manga. Nos cultivos convencionais, prevê-se a aplicação dos fungicidas registrados para a mangueira e a sua substituição pela aplicação de formulações dos microrganismos a partir dos períodos com elevado risco de contaminação. Em outra abordagem, os isolados estão sendo reaplicados aos frutos após as operações de assepsia química ou física (termoterapia ou radiação ionizante) antes da embalagem e armazenamento. Os experimentos indicaram que os isolados de levedura têm tolerância às temperaturas comumente utilizadas em câmaras para armazenamento de manga (Gava et al., 2014). Os estudos futuros preveem a microformulação em matrizes polissacarídicas que possam ser utilizadas como filmes a serem aplicados à superfície dos frutos e permitam a sua manutenção nas condições de armazenamento e comercialização.

REFERÊNCIAS

- Abeer H, Abd-Allah EF, Al-Obeed RS, Mridha MAU, Al-Huqail AA (2013) Non-chemical strategies to control postharvest losses and extend the shelf life of table grape fruits. *Biological Agriculture & Horticulture*. 29: 82-90.
- Ajila CM, Bhat SG, Prasada Rao UJS (2007). Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chemistry*. 102: 1006-1011.
- Alkan N, Friedlander G, Ment D, Prusky D, Fluhr R (2015) Simultaneous transcriptome analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* and tomato fruit pathosystem reveals novel fungal pathogenicity and fruit defense strategies. *New Phytologist*. 205: 801-815.
- Barkai-Golan R (2011) Postharvest disease of fruit and vegetables: development and control. Elsevier: Amsterdam. 418.
- Bartnicki VA, Valdebenito-Sanhueza RM, Amarante CVTD, Steffens CA (2011) Hydrothermal and UV-C radiation treatments for postharvest control of bull's-eye rot of apples in a commercial packing line. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 33: 737-745.
- Batista DDC, Barbosa M, Costa VDO, Silva F, Terao D (2009) Diagnose e perdas na cadeia produtiva da manga causadas por *Neofusicoccum parvum*. *Embrapa Semiárido*. Comunicado Técnico.
- Batista DC (2012) Cultivo da mangueira: doenças. 2. ed. Embrapa Semiárido (Sistemas de Produção, 2) Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira_2ed/doencas.htm> . Acesso em 13 de Agosto de 2016.
- Batista DC, Barbosa MAG, Terao D (2011) Epidemiologia e manejo de fungos associados com morte descendente e podridão peduncular em mangueira. *Tropical Plant Pathology*. 36 (Suplemento): 1365-1366.
- Bautista-Baños S, Sivakumar D, Bello-Pérez A, Villanueva-Arce R, Hernández-López M (2013) A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. *Crop Protection*. 49: 8-20.
- Bettiol W, Morandi MAB (2009) Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectiva. *Jaguariúna: Embrapa meio ambiente*. 341.
- Bonaterre A, Mari M, Casalini L, Montesinos E (2003) Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism. *International Journal of Food Microbiology*. 84: 93–104.
- Bouzayen M, Latché A, Nath P, Pech JC (2010) Mechanism of fruit ripening. In: PUA EC, DAVEY MR *Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives*. 1: 319-339.
- Burges HD (2012) Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. *Springer Science & Business Media*.
- Camili EC, Benato EA, Pascholati SF, Cia P (2007) Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis cinerea*. *Summa phytopathol.*, 33: 215-221.
- Castro APC, Pereira CA, Paz CD, Gava CAT (2013) Prospecting yeasts isolates for biological

control agents of postharvest diseases in mango. In: X Simposio Internacional de Mango, 2013, Dominican Republic. X International Symposium of Mango. CD.

Castro AP (2015) Estratégia de aplicação de leveduras para o controle de podridões pós-colheita da manga no Vale do São Francisco. Dissertação (Mestrado em Horticultura Irrigada) - Universidade do Estado da Bahia, Juazeiro. 82.

Cavalcanti LS, Di Piero RM, Cia P, Pascholati SF, Resende MLV, Romeiro RS (2005) Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. 263.

Chalutz E, Wilson CL (1990) Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruit by *Debaryomyces hansenii*. Plant Disease. 74: 134–137.

Chen S, Morgan DP, Hasey JK, Anderson K, Michailides TJ (2014) Phylogeny, morphology, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae from English walnut in California. Plant disease. 98: 636-652.

Cherian S, Figueroa CR, Nair H (2014) ‘Movers and shakers’ in the regulation of fruit ripening: a cross-dissection of climacteric versus non-climacteric fruit. Journal of experimental botany.

Chitarra MIF, Chitarra AB (1990) Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. Lavras: ESAL, Fundação de Apoio, Pesquisa e Extensão ao Ensino.

Cia P, Benato EA, Valentini SRT, Anjos VDA, Ponzo FS, Sanches J, Terra MM (2009) Radiação ultravioleta no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em uva ‘niagara rosada’. Bragantia. 68: 1009-1015.

Cook RJ, Baker KF (1983) The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

Costa VSO, Michereff SJ, Martins RB, Gava CAT, Mizubuti ESG, Câmara MPS (2010) Species of Botryosphaeriaceae associated on mango in Brazil. Eur. J. Plant. Pathol. 127: 509-519.

Droby S, Cohen A, Weiss Horev B, Chalutz E, Katz H, Keren-Tzur M, Shachnai A (1998) Commercial testing of aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. Biological Control. 12: 97–100.

Droby S, Lichter A (2007) Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management. In Botrytis: Biology, pathology and control. Springer, Netherlands. 349-367.

Elad Y, Vivier M, Fillinger S (2015) *Botrytis*: the good, the bad and the ugly. In: Fillinger, S., Elad, Y., Vivier, M. (Eds.), Botrytis—the Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems. Springer, Heidelberg, Germany. 1–15.

Fachinello JC, Nachtigal JC, Kersten E (2008) Fruticultura fundamentos e práticas. Pelotas: Editora UFPEL. 176.

Gava CAT, Pereira CA, Castro APC (2015) Isolation and selection of yeasts for biological control of postharvest decay of mango. In: III International Symposium on Postharvest Pathology. Bari. Using Science to Increase Food Availability. Leuven, Belgica: International Society for Horticultural Science. Disponível em: <http://www.ishs.org/symposium/501>. Acesso em 13 de Agosto de 2016.

Gonzalez-Aguilar GA, Celis J, Sotelo-Mundo RR, De La Rosa LA, Rodrigo-Garcia J, Alvarez-Parrilla E (2008) Physiological and biochemical changes of different fresh-cut

mango cultivars stored at 5 °C. *International journal of food science & technology*. 43: 91-101.

Goulao LF, Oliveira CM (2008) Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science & Technology*. 19: 4-25.

Haggag WM (2010) Mango diseases in Egypt. *Agriculture and Biology Journal of North America*. 1: 285-289.

Herianus JD, Singh LZ, Tan SC (2003) Aroma volatiles production during fruit ripening of Kensington Pride mango. *Postharvest Biol. Technol.* 27: 323-336.

Hoa TT, Ducamp MN, Lebrun M, Baldwin EA (2002) Effect of different coating treatments on the quality of mango fruit. *Journal of Food Quality*. 25: 471-486.

Hong P, Hao W, Luo J, Chen S, Hu M, Zhong G (2014) Combination of hot water, *Bacillus amyloliquefaciens* HF-01 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest decay of mandarin fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 88: 96-102.

Kim Y, Brecht JK, Talcott ST (2007) Antioxidant phytochemical and fruit quality changes in mango (*Mangifera indica* L.) following hot water immersion and controlled atmosphere storage. *Food Chemistry*. 105: 1327-1334.

Lima LCO, Chitarra AB, Chitarra MIF (2001) Changes in amylase activity starch and sugars contents in mango fruits pulp cv. Tommy Atkins with spongy tissue. *Brazilian Archives of Biology and technology*. 44: 59-62.

Liu J, Sui Y, Wisniewski M, Droby S, Liu Y (2013) Review: utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*. 167: 153-160.

Marques MW, Lima NB, de Moraes Jr MA, Michereff SJ, Phillips AJ, Câmara MP (2013) *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* and *Pseudofusicoccum* species associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity*. 61: 195-208.

Michereff SJ, Silva JB, Silveira NSL, Pedrosa RA, Mariano RLR, Tavares LA, Tavares S (1997) Biocontrole pós-colheita da podridão de *Lasiodiplodia* em manga por leveduras saprofitas. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*. 40: 29-37.

Nascimento FV, Santos MCD, Valdebenito-Sanhueza RM, Bartnicki VA (2014) Hydrothermal and UV-C radiation in control of pathogens of mango and melon. *Summa Phytopathologica*. 40: 313-317.

Nascimento SRC, Peixoto AMS, Aroucha EMM, Gava CAT (2006) Controle de patógenos e prolongamento da vida útil pós-colheita do mamão Formosa “Tauning 01” através de tratamentos biológicos e químicos. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2006, Salvador BA. *Fitopatologia Brasileira Tropical Plant Pathology* (Impresso). Brasília DF: SBF, 31: 163-163.

NAS-USA National Academy of Science (1987). *Research Briefing: Report of the Panel on Biological Control in Managed Ecosystems*. Washington, DC: National Academy Press. 206.

O’Connell RJ, Thon MR, Hacquard S, Amyotte SG, Kleemann J, Torres MF, Damm U, Buiate EA, Epstein L, Alkan N et al. (2012) Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nat. Genet.* 44: 1060–1065.

OECD-FAO. Perspectivas agrícolas no Brasil: desafios da agricultura brasileira. In: OECD-FAO. Perspectivas agrícolas 2015-2024, 61-108, 2015. Disponível em: www.agri-outlook.org. Acesso em 13 de Agosto de 2016.

Oliveira SMA et al. (2006) Patologia Pós-colheita. In: Oliveira SMA, Terao D, Dantas SAF, Tavares SCCH. Patologia póscolheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica.

Palafox-Carlos H, Yahia EM, González-Aguilar GA (2012) Identification and quantification of major phenolic compounds from mango (*Mangifera indica*, cv. Ataulfo) fruit by HPLC–DAD–MS/MS-ESI and their individual contribution to the antioxidant activity during ripening. *Food chemistry*. 135: 105-111.

Phillips AJL et al. (2013) The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*. 76: 51-167.

Ploetz RC (2003) Diseases of mango. In: PLOETZ, R.C. (Ed.) Diseases of tropical fruit crops. Wallingford: CAB International. 327-363.

Prusky D, Alkan N, Mengiste T, Fluhr R (2013) Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development. *Annual Review of Phytopathology*. 51: 155-176.

Ribeiro SMR, Queiroz JH, Queiroz MELR, Campos FM, Sant’ana HMP (2007) Antioxidant in Mango (*Mangifera indica* L.) Pulp. *Plant Foods for Human Nutrition*. 62: 13-17.

Rivera-Pastrana DM, Béjar AAG, Martínez-Telles MA, Rivera-Domínguez M, González-Aguilar GA (2007) Postharvest biochemical effects of UV-C irradiation on fruit and vegetables. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 30: 361-372.

Rodríguez-Gálvez E, Guerrero P, Barradas C, Crous PW, Alves A (2016) Phylogeny and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of mango in Peru. *Fungal Biology*.

Romanazzi G, Sanzani SM, Bi Y, Tian S, Martínez PG, Alkan N (2016) Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.08.003.

Romanazzi G, Smilanick JL, Feliziani E, Droby S (2016) Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biology and Technology*. 113: 69-76.

Sakalidis ML, Ray JD, Lanoiselet V, Hardy GE, St J, Burgess TI (2011) Pathogenic Botryosphaeriaceae associated with *Mangifera indica* in the Kimberley Region of Western Australia. *European Journal of Plant Pathology*. 130: 379-391.

Sales Júnior R, Nunes GHS, Lima LL, Guimarães IM, Morais PLD (2009) Controle químico da podridão peduncular causada por *Lasiodiplodia theobromae* em mangas. *Rev. Bras. Frutic*. 31: 907-910.

Sales Júnior R, Nunes GHS, Lima LL, Guimarães IM, Morais PLD (2009) Controle químico da podridão peduncular causada por *Lasiodiplodia theobromae* em mangas. *Rev. Bras. Frutic*. 31: 907-910.

Santos AMF, Oliveira SMA, Silva JM, Terao D (2010) Podridão por *Fusicoccum* em mangas submetidas a baixas doses de radiação gama. *Pesq. Agropec. Bras*. 45: 1066-1072.

Santos LO, Durigan JF, Martins RN, Morgado CMA (2013) Conservation and quality of

'Palmer' mangoes submitted to treatment with fungicides and hydrothermal. *Ciência e Agrotecnologia*. 34: 1514-1521.

Seymour GB, Ostergaard L, Chapman NH, Knapp S, Martin C (2013) Fruit development and ripening. *Annual review of plant biology*. 64: 219-241.

Sharma RR, Singh D, Singh R (2009) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological control*. 50: 205-221.

Shoresh M, Harman GE, Mastouri F (2010) Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48: 21-43.

Snowdon A (2010) A color atlas of post-harvest disease and disorders of fruits and vegetables. Vol. 1: General introduction and fruits. London: Manson Publishing.

Sowley ENK, Dewey FM, Shaw MW (2010) Persistent, symptomless, systemic, and seed-borne infection of lettuce by *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 126: 61-71.

Spadaro D, Droby S (2016) Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends Food Sci. Technol.* 47: 39-49.

Spadaro D, Vola R, Piano S, Gullino ML (2002) Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biology and Technology*. 24: 123-134.

Terao D, de Carvalho-Campos JS, Benato EA, Hashimoto JM (2015) Alternative Strategy on Control of Postharvest Diseases of Mango (*Mangifera indica* L.) by use of low dose of ultraviolet-C irradiation. *Food Engineering Reviews*, 7: 171-175.

Teruel B, Cortez LA, Leal P, Lima AG (2001) Estudo teórico do resfriamento com ar forçado de frutas de geometrias diferentes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 21: 228-235.

Trakunyingcharoen T, Cheewangkoon R, To-Anun C, Crous PW, Van Niekerk JM, Lombard L (2014) Botryosphaeriaceae associated with diseases of mango (*Mangifera indica*). *Australasian Plant Pathology*. 43: 425-438.

Usall J, Ippolito A, Sisquella M, Neri F (2016) Physical treatments to control postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. doi. org/10.1016/j.postharvbio.2016.05.002.

Valenzuela NL, Angel DN, Ortiz DT, Rosas RA, García CFO, Santos MO (2015) Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma* spp. on maradol papaya fruit. *Biological Control*. 91: 88-93.

Viret O, Keller M, Jaudzems VG, Cole FM (2004) *Botrytis cinerea* infection of grape flowers : light and electron microscopical studies of infection sites. *Phytopathology*. 94: 850-857.

Wang X, Wang J, Jin P, Zheng Y (2013) Investigating the efficacy of *Bacillus subtilis* SM21 on controlling *Rhizopus* rot in peach fruit. *International journal of food microbiology*. 164: 141-147.

Wisniewski M, Biles C, Droby S (1991) The use of yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent: characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. In: Wilson CL, Chalutz E (Eds.), *Biological Control of Postharvest Diseases of Fruit and Vegetables*. Proc. Workshop, US Department of Agriculture. 92: 167-183.

Wisniewski M, Wilson C, Droby S, Chalutz E, El-Ghaouth A, Stevens C, Lazarovits G (2007) Postharvest biocontrol: new concepts and applications. In: Vincent C, Goettel MS, Lazarovits G. Biological control: A global perspective. London, CAB International. 262-273.

Yáñez-Mendizábal V, Zerriouh H, Viñas I, Torres R, Usall J, de Vicente A, Teixidó N (2012) Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. European Journal of Plant Pathology. 132: 609-619.

Yashoda HM, Prabha TN, Tharanathan RN (2005) Mango ripening - chemical and structural characterization of pectic and hemicellulosic polysaccharides. Carbohydrate Research. 340: 1335-1342.

Controle de qualidade de produtos biológicos à base de fungos

Zayame Vegette Pinto¹
Celson Alexandre Weiler¹
Marcelo Augusto Boechat Morandi²
Cleusa Maria Mantovanello Lucon³
Wagner Bettiol²

INTRODUÇÃO

Os primeiros estudos de controle biológico de pragas com fungos no Brasil datam de 1932, sendo *Metarhizium anisopliae* e *Beuveria bassiana* os principais entomopatógenos estudados e produzidos por empresas privadas e usinas de açúcar e álcool (Alves et al., 2008). O primeiro produto biológico para o controle de doenças de plantas comercializado no Brasil foi formulado em 1987, embora somente em 2008 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) emitiu o primeiro registro de um antagonista para o controle de doenças (Bettiol et al., 2014).

Em 2012, foi realizado um levantamento dos produtos biológicos para o controle de doenças de plantas comercializado no mundo. Neste levantamento, foi constatado que no Brasil se comercializava 17 produtos biológicos, sendo 12 à base de *Trichoderma* spp., dois de *Clonostachys rosea*, dois de *Paecilomyces lilacinus* e um de *Pochonia chamydosporica* (Bettiol et al., 2012). Atualmente, estão registrados 35 produtos biológicos à base de fungos, indicados para o controle de pragas e doenças de plantas no mercado brasileiro (Agrofit, 2016). Os fungos presentes nos produtos são *Metarhizium anisopliae* (18), *Beuveria bassiana* (8), *Aspergillus*

¹Ballagro Agro Tecnologia Ltda, Cx. Postal 139, 12955-000 Bom Jesus dos Perdões, SP, E-mail: zayame@ballagro.com.br; ²Embrapa Meio Ambiente, Cx. Postal 69, 13820-000 Jaguariúna, SP; ³Instituto Biológico de São Paulo 04014-002, São Paulo, SP.

flavus (1), *Trichoderma harzianum* (3), *Trichoderma asperellum* (2), *Trichoderma stromaticum* (1), *Paecilomyces lilacinus* (1) e *Pochonia chlamydosporia* (1) (Quadro 1).

Na bula dos produtos registrados é informada a concentração de propágulos do fungo (ingrediente ativo). As unidades de medida utilizadas para indicar a concentração não são padronizadas. Há produtos registrados por conídios viáveis por grama ou mililitro (11), conídios por grama ou mililitro (9), unidade formadora de colônia por grama ou mililitro (12) e não informado (2) (Agrofit, 2016). Além disto, as metodologias de análise de conformidade e controle de qualidade de produtos biológicos não são padronizadas para todos os antagonistas. Este panorama impede a análise adequada dos produtos, a comparação de resultados, dificulta a realização de testes e a emissão de laudos no processo de registro (Teixeira et al., 2010).

Considerando os problemas relacionados com as metodologias utilizadas, em 2008, foi formada uma rede de pesquisa denominada Projeto Qualibio (Desenvolvimento de metodologia analítica e amostral para avaliação de conformidade e da inocuidade de produtos comerciais formulados à base de agentes microbianos), a qual estabeleceu metodologias para avaliar a conformidade e qualidade de produtos comerciais formulados à base de agentes microbianos para o controle de doenças de plantas. O projeto foi financiado pelo edital MCT/CNPq/ MAPA/DAS n° 64/2008; com a participação da Embrapa Meio Ambiente, Embrapa Arroz e Feijão, Instituto Biológico de São Paulo, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Universidade Federal de Pelotas e Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC/CEFET).

As metodologias desenvolvidas pelo Projeto Qualibio não foram oficializadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA, mas são utilizadas por quase todas as empresas, laboratórios e instituição de pesquisa para avaliar a conformidade e qualidade de produtos comerciais formulados à base de agentes microbianos para o controle de doenças de plantas, bem como pesquisas na área.

Controle de qualidade de produtos biológicos à base de fungos

QUADRO 1 - Relação de produtos biológicos à base de micro-organismos registrados no mercado brasileiro (Agrofit, 2016)

Microrganismo	Empresa/Produto	Concentração	Formulação
<i>Aspergillus flavus</i>	Biosphere-Afla-guard	2,93 x 10 ⁵ UFC/g	Granulado
<i>Beauveria bassiana</i>	Simbiose-Beauvecontrol	2 x 10 ⁹ UFC/g	Pó-molhável
	Ballagro-Ballvéria	1 x 10 ⁹ UFC/g	Pó-molhável
	JCO-Beauveria	0,6 x 10 ⁹ UFC/g	Pó-molhável
	Biocontrol-Bouveriz	8 x 10 ⁹ UFC/g	Pó-molhável
	Biofungi-Bovebio	1,48 x 10 ⁹ UFC/g	Pó-molhável
	Novozymes-Bovemax	1,5 x 10 ⁹ conídios viáveis/mL	Concentrado emulsionável
	Koppert-Boveril Farroupilha-Granada	1 x 10 ⁸ conídios viáveis/g 1,48 x 10 ⁹ UFC/g	Pó-molhável Pó-molhável
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Ballagro Nemat	1 x 10 ¹⁰ UFC/g	Pó molhável
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	Rizoflora Biotecnologia Rizotec	-	Pó-molhável
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Biocontrol-Metarriz	2,25 x 10 ¹⁰ conídios/g	Pó-molhável
	Biocontrol-Metarriz	2,25 x 10 ¹⁰ conídios/g	Granulo
	TecniControl-Arizium	1,33 x 10 ⁹ conídios viáveis/g	Pó-molhável
	Biotech-Biometha	1,86 x 10 ⁹ conídios viáveis/g	Granulado
	Novozymes-Methamax	2,5 x 10 ⁹ conídios viáveis/mL	Concentrado emulsionável
	Ballagro-Metiê	8 x 10 ⁹ UFC/mL	Pó-molhável
	Methacontrol-Simbiose	6 x 10 ⁸ conídios viáveis/mL	Pó-molhável
	Koppert-Metarril	1,39 x 10 ⁸ conídios viáveis/mL	Pó-molhável
	Asplan-Metarplan	1,4 x 10 ⁹ conídios viáveis/mL	Granulado
	JCO-Metarhizium	5,5 x 10 ⁸ conídios/mL	Granulado
	Raizen-Metarhizen	7,48 x 10 ⁹ conídios/mL	Pó-molhável
	Raizen-Metarhizen	1,35 x 10 ⁹ conídios/mL	Granulado
	Fitoagro-Metarfito	1,44 x 10 ⁹ conídios/mL	Granulado
	BioSoja-Metamax	1,9 x 10 ⁸ conídios/mL	Suspensão concentrada
	BioFungi-Metabio	1,48 x 10 ⁹ conídios/mL	Pó-molhável
	Toyobo-Ecometa	2,0 x 10 ¹² conídios/mL	Pó-molhável
Bioenergia-Biorhizium	-	Pó-molhável	
Bioenergia-Biorhizium	-	Granulado	
<i>Trichoderma asperellum</i>	Farroupilha Quality	1,5 x 10 ⁹ UFC/g	Granulado dispersível
	Novozymes-Trichodermax	1,5 x 10 ⁹ conídios/mL	Concentrado emulsionável
<i>Trichoderma harzianum</i>	Ballagro-Ecotrich	1 x 10 ¹⁰ UFC/g	Pó-molhável
	Ballagro-Predatox	2 x 10 ⁸ UFC/mL	Suspensão concentrada
	Koppert-Trichodermil	2 x 10 ⁹ conídios viáveis/mL	Suspensão concentrada
<i>Trichoderma stromaticum</i>	Ceplac-Tricovab	2,3 x 10 ⁸ esporos/g	Pó-molhável

METODOLOGIA

No Projeto Qualibio foram desenvolvidas as metodologias de: (a) número de conídios, (b) conídios viáveis e (c) unidade formadora de colônia – UFC para

produtos formulados à base de *Trichoderma* spp. (Bettiol et al., 2016). Apesar disso, as metodologias podem ser utilizadas para avaliação de outros agentes microbianos.

METODOLOGIA 1 – NÚMERO DE CONÍDIOS

Equipamentos e vidrarias

Frasco com capacidade para 250 mL; tubos de ensaio; tampas para tubo de ensaio; estante para tubos de ensaio; autoclave; balança; agitador de tubo de ensaio; banho de ultrassom com frequência de 40 kHz; mesa agitadora; micropipeta (10 mL e 1000 µL); ponteiras esterilizadas para micropipetas (10 mL e 1000 µL); Câmara de Neubauer (ou hemacitômetro); microscópio óptico; contador manual de conídios; agitador magnético; barra magnética.

Solução

Solução salina com Tween 80 (diluyente): Ingredientes: NaCl P.A.: 9,0 g; água destilada: 1000 mL; Tween 80: 1 mL. Preparo: em frasco suspender o NaCl em 1000 mL de água destilada e acrescentar Tween 80. Misturar bem e autoclavar o diluyente a 121° C e 1 atm por 20 minutos.

Procedimentos

1. As amostras a serem testadas devem ser colocadas à temperatura ambiente por 30 a 40 minutos antes do início da análise.

2. Pesar 10 g do produto a ser testado em frasco de 250 mL e completar com 90 g do diluyente (corresponde à diluição 10^{-1}). Devem ser realizadas duas pesagens para cada amostra e uma série de diluição para cada pesagem. A segunda pesagem deve ser realizada 10 minutos após a colocação de água na primeira amostra para evitar maior tempo de hidratação.

3. Colocar o frasco com a suspensão em mesa agitadora por 60 minutos a 120 rpm

4. Colocar o frasco com a suspensão em banho de ultrassom, por 5 minutos. O nível de água do banho de ultrassom deve ultrapassar o volume da suspensão contida no frasco.

5. Misturar o conteúdo do frasco em agitador de tubo de ensaio, colocando e tirando três vezes do aparelho até ser observado o turbilhonamento da suspensão, em cada uma das passagens. Ou colocar em agitador magnético por 5 minutos.

6. Transferir 1,0 mL da suspensão contida no frasco (10^{-1}), com auxílio de micropipeta com ponteira esterilizada para o tubo de ensaio contendo 9,0 mL de diluyente (10^{-2}). Descartar a ponteira em seguida.

7. Homogeneizar o conteúdo em agitador de tubo de ensaio, colocando e

tirando três vezes do aparelho até ser observado o turbilhonamento da suspensão, em cada uma das passagens.

8. Para obter a diluição 10^{-3} repetir os itens 6 e 7 (diluição seriada), utilizando o tubo da diluição anterior (10^{-2}).

9. Misturar o conteúdo do tubo de ensaio com a suspensão apropriada em agitador de tubo de ensaio colocando e tirando três vezes. O tubo deve ser retirado quando ocorrer o turbilhonamento;

10. Retirar imediatamente uma alíquota representativa da suspensão com auxílio de uma micropipeta;

11. Colocar a suspensão na canaleta da câmara de Neubauer, já coberta com a lamínula, até o preenchimento de todo o espaço existente entre a lamínula e a câmara de Neubauer;

12. Antes de iniciar a contagem, deixar a câmara de Neubauer com a suspensão de conídios em repouso por 5 minutos, para que os conídios precipitem, facilitando a contagem e reduzindo erros;

13. Realizar a contagem de conídios ao microscópio óptico, no aumento de 250X ou 400X, nos campos 1 e 2 da câmara de Neubauer (Figura 1), nos cinco quadrados (subcompartimentos) como demarcados na Figura 2, totalizando cinco contagens por campo da câmara de Neubauer (E1, E2, E3, E4 e E5). **Observação:** Muitos conídios ficam exatamente sobre as linhas de demarcação internas dos subcompartimentos. Recomenda-se contar apenas os conídios que estiverem nas linhas da esquerda e superior do mesmo campo da observação para evitar que eles sejam contados duas vezes.

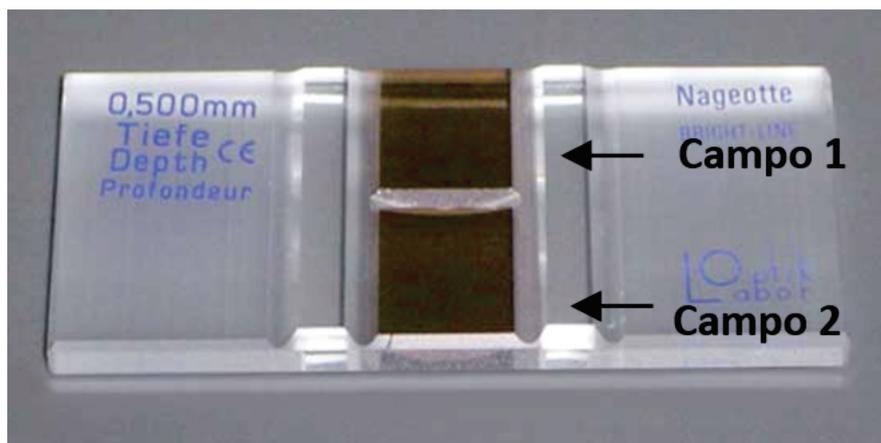


FIGURA 1 - Localização dos campos 1 e 2 na câmara de Neubauer.

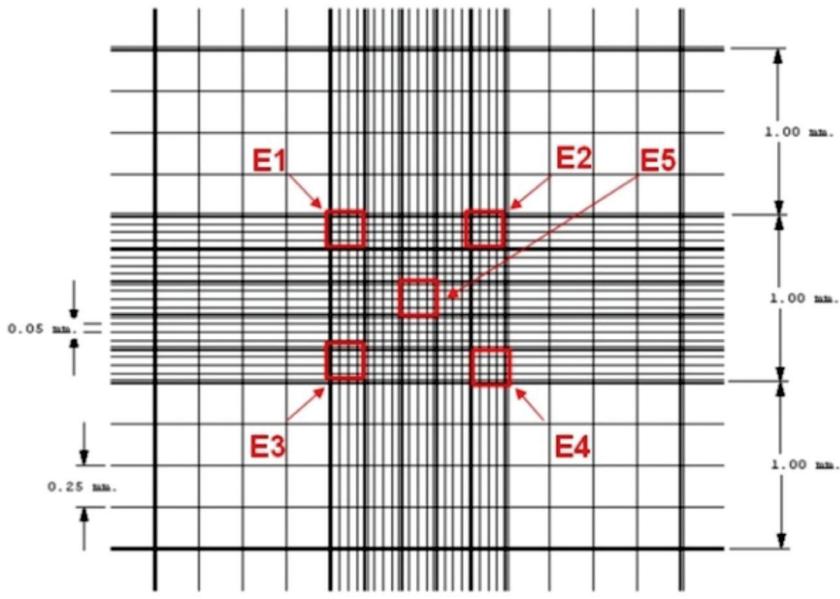


FIGURA 2 - Área dentro dos subcompartimentos vermelhos para contagem de conídios - E1, E2, E3, E4 e E5.

Cálculo do número de conídios

Para determinar o número de conídios, utilizar a fórmula: Conídios/
mL = $\{[(\text{Campo } 1 + \text{Campo } 2) / 2] \times 2,5 \times 10^8\}$, sendo que: Campo
1 = $(E1 + E2 + E3 + E4 + E5) / 5$ e Campo 2 = $(E1 + E2 + E3 + E4 + E5) / 5$.

Repetição

Devem ser feitas duas pesagens do produto, sendo que de cada pesagem deve ser realizada uma série de diluição seriada. A diluição selecionada, deve-se colocar na câmara de Neubauer para contagem (Figura 3).

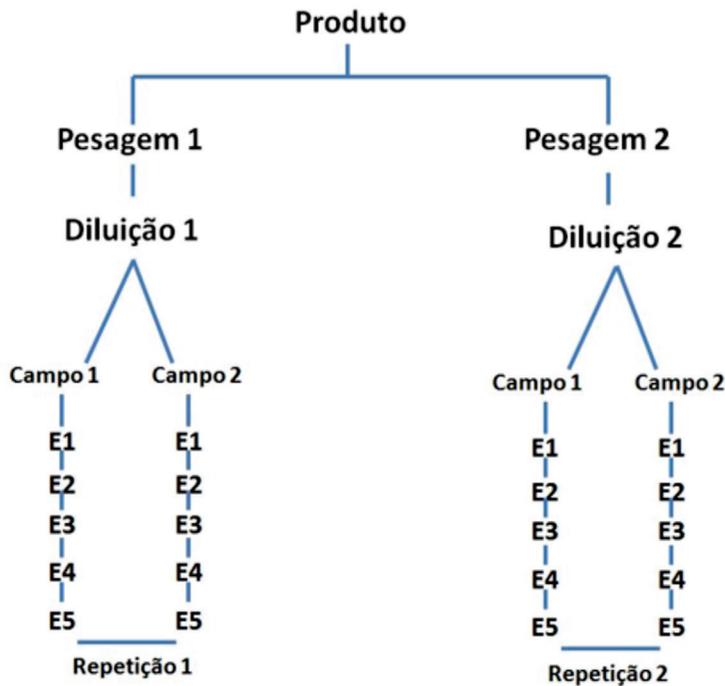


FIGURA 3 - Esquema das repetições utilizadas na metodologia para análise da qualidade – número de conídios.

METODOLOGIA 2 – CONÍDIOS VIÁVEIS

Equipamentos e vidrarias

Frasco com capacidade para 250 mL; tubos de ensaio; tampa para tubo de ensaio; estante para tubos de ensaio; autoclave; balança; agitador de tubo de ensaio; banho de ultrassom com frequência de 40 kHz; mesa agitadora para frasco; incubadora operando 25 ± 2 °C (BOD); micropipeta (10 mL, 15 μ L e 1000 μ L); ponteiros esterilizados para micropipeta (10 mL, 15 μ L e 1000 μ L); placas de Petri esterilizadas; agitador magnético; barra magnética.

Soluções

Solução salina com Tween 80 (diluyente): Ingredientes: NaCl P.A.: 9,0 g; água destilada: 1.000 mL; Tween 80: 1 mL. Preparo: em frasco suspender o NaCl em 1000 mL de água destilada e acrescentar Tween 80 (0,1%). Misturar bem e autoclavar o diluyente a 121 °C e a 1 atm por 20 minutos. **Azul de Lactofenol:** Ingredientes: fenol: 20 g; ácido láctico: 20 g; água destilada: 20 g; glicerol: 40 g; azul de metila (ou azul de algodão ou azul de Trypan): 0,1 g. Preparo: adicionar os ingredientes em um frasco e homogeneizar durante 5 minutos em agitador magnético dentro de capela de exaustão de gases.

Meio de cultura

Meio de Batata Dextrose Agar (BDA): Ingredientes: Meio de Batata Dextrose Agar comercial: recomendação do fabricante; água destilada: 1000 mL. Preparo: em frascos misturar a água destilada ao meio BDA e autoclavar a 121° C a 1 atm por 20 minutos. Verter aproximadamente 10 mL do meio por placa descartável esterilizada. Depois de solidificado o meio, as placas devem ser invertidas e incubadas a $25 \pm 2^\circ$ C por uma noite para secar e para avaliar a condição de esterilidade do meio. As placas preparadas com BDA podem ser estocadas em local escuro e sob refrigeração (2-8° C) por sete dias. Observação: todas as vidrarias e soluções devem ser esterilizadas em autoclave antes de serem utilizadas.

Procedimentos

1. As amostras a serem testadas devem ser colocadas à temperatura ambiente por 30 a 40 minutos antes do início da análise.

2. Pesar 10 g do produto a ser testado em frasco de 250 mL e completar com 90 g do diluyente (corresponde à diluição 10^{-1}). Devem ser realizadas duas pesagens para cada amostra e uma série de diluição para cada pesagem. A segunda pesagem deve ser realizada 10 minutos após a colocação de água na primeira amostra para evitar maior tempo de hidratação.

3. Colocar o frasco com a suspensão em agitador orbital por 60 minutos a 120 rpm.

4. Colocar o frasco com a suspensão em banho de ultrassom, por 5 minutos. O nível de água do banho de ultrassom deve ultrapassar o volume da suspensão contida no frasco.

5. Misturar o conteúdo do frasco em agitador de tubo de ensaio, colocando e tirando três vezes do aparelho quando observar o turbilhonamento da suspensão. Ou colocar em agitador magnético por 5 minutos.

6. Transferir 1,0 mL da suspensão contida no frasco (10^{-1}), com auxílio de micropipeta com ponteira esterilizada para o tubo de ensaio contendo 9,0 mL de

diluyente (10^{-2}). Descartar a ponteira em seguida.

7. Homogenizar o conteúdo em agitador de tubo de ensaio, colocando e tirando três vezes do aparelho até ser observado o turbilhonamento da suspensão, em cada uma das passagens.

8. Para obter a diluição 10^{-3} repetir os itens 6 e 7 (diluição seriada), utilizando o tubo da diluição anterior (10^{-2}).

9. Misturar o conteúdo do tubo de ensaio com a suspensão 10^{-3} em agitador de tubo de ensaio colocando e tirando três vezes. O tubo deve ser retirado quando ocorrer o turbilhonamento.

10. Pipetar imediatamente cinco vezes de 15 μL da diluição 10^{-3} e/ou 10^{-4} em placas de Petri com meio BDA. Repetir este passo para mais uma placa.

11. Transferir as placas em BOD a $25 \pm 2^\circ \text{C}$, no escuro.

12. Após iniciar a germinação (apresenta variação de 9 a 20 h após o plaqueamento em função do produto) em uma das placas, colocar uma gota de azul de lactofenol (8 μL) em cada ponto (local onde foi colocada a diluição apropriada) com a suspensão (cinco pontos por placa).

13. Contar os conídios viáveis (germinados e ativos não germinados – Figura 4) e não viáveis nos cinco pontos usando microscópio óptico no aumento de pelo 400x. Contar pelo menos 100 conídios por ponto. Calcular a taxa média de viabilidade utilizando a fórmula:

Viabilidade (%)=(média do número de conídios viáveis das pesagens/total de conídios) X 100

Deve ser realizado o cálculo para cada gota de cada pesagem de cada diluição, separadamente. Posteriormente, obter a média aritmética de cada pesagem.



FIGURA 4 - Observação em microscópio óptico dos conídios viáveis e não de *Trichoderma* sp.

Repetição

Devem ser feitas duas pesagens do produto (item 2), sendo que de cada pesagem deve ser realizada uma diluição seriada (itens 6 e 8). Da diluição selecionada, deve-se colocar cinco gotas por placa em duas placas diferentes (Figura 5).

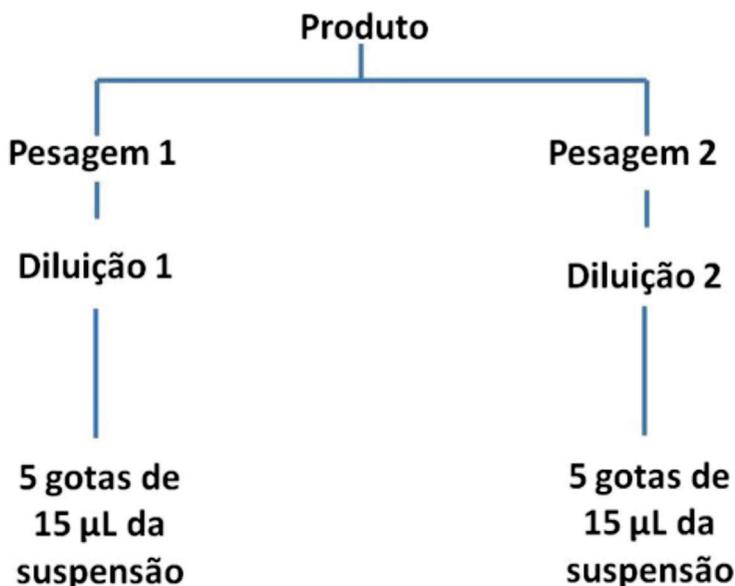


FIGURA 5 - Esquema das repetições utilizadas na metodologia para análise da qualidade – viabilidade de conídios.

METODOLOGIA 3 – UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA

Equipamentos e vidrarias

Frasco com capacidade para 250 mL; tubos de ensaio; tampa para tubo de ensaio; estante para tubos de ensaio; autoclave; balança; agitador de tubo de ensaio; banho de ultrassom com frequência de 40 kHz; mesa agitadora para frasco; incubadora operando 25 ± 2 °C (BOD); micropipeta (10 mL, 20 mL, 100 µL e 1000 µL); ponteiras estéreis para micropipeta (10 mL, 20 mL, 100 µL e 1000 µL); placas de Petri descartável esterilizada; alça de Drigalski esterilizada; agitador magnético; barra magnética; microscópio óptico; lâmina de microscopia e fita adesiva transparente.

Solução

Solução salina com Tween 80 (diluyente): Ingredientes: NaCl P.A.: 9,0 g; Água destilada: 1000mL; Tween 80: 1mL. Preparo: em frasco suspender o NaCl em 1000 mL de água destilada e acrescentar Tween 80 (0,1%). Misturar bem e autoclavar o diluyente a 121° C e 1 atm por 20 minutos.

Meio de cultura

Meio de Batata Dextrose Agar (BDA) para fungos em geral (*Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces lilacinus* e *Pochonia chlamydosporia* entre outros): Ingredientes: Meio de Batata Dextrose Agar comercial: recomendação do fabricante e água destilada: 1000 mL. Preparo: o modo de preparo do meio deve seguir a recomendação do fabricante. Em frascos misturar a água destilada ao meio BDA e autoclavar a 121° C a 1 atm por 20 minutos. Verter aproximadamente 20 mL por placa descartável esterilizada. Depois de solidificado o meio, as placas devem ser invertidas e incubadas a 25 ± 2° C por uma noite para secar e para avaliar a condição de esterilidade do meio. As placas preparadas com BDA+T podem ser estocadas em local escuro e sob refrigeração (2-8° C) por sete dias.

Meio de Batata Dextrose Agar (BDA +T) para *Trichoderma* spp. e *Clonostachys rosea* entre outros. Ingredientes: Meio de Batata Dextrose Agar comercial: recomendação do fabricante, 1 mL de Triton X-100 e água destilada: 1000 mL. Preparo: o modo de preparo do meio deve seguir a recomendação do fabricante. Em frascos misturar a água destilada e Triton X-100 (reductor de colônia) ao meio de Batata Dextrose Agar e autoclavar a 121° C a 1 atm por 20 minutos. Verter aproximadamente 20 mL por placa descartável esterilizada. Depois de solidificado o meio, as placas devem ser invertidas e incubadas a 25 ± 2° C por uma noite para secar e para avaliar a condição de esterilidade do meio. As placas preparadas com BDA+T podem ser estocadas em local escuro e sob refrigeração (2-8° C) por sete dias. Observação: todas as vidrarias e soluções devem ser esterilizadas em autoclave antes de serem utilizadas.

Procedimentos

1. Teste de microgotas:

1.1 As amostras a serem testadas devem ser colocadas à temperatura ambiente por 30 a 40 minutos antes do início da análise.

1.2 Pesar 10 g do produto a ser testado em frasco de 250 mL e completar com 90 g do diluyente (corresponde à diluição 10⁻¹). Devem ser realizadas duas pesagens para cada amostra e duas séries de diluições para cada pesagem. A segunda pesagem

deve ser realizada 10 minutos após a colocação de água na primeira amostra para evitar maior tempo de hidratação.

1.3 Colocar o frasco com a suspensão em mesa agitadora por 60 minutos a 120 rpm.

1.4 Colocar o frasco com a suspensão em banho de ultrassom, por 5 minutos. O nível de água do banho de ultrassom deve ultrapassar o volume da suspensão contida no frasco.

1.5 Misturar o conteúdo do frasco em agitador de tubo de ensaio, colocando e tirando três vezes do aparelho quando observar o turbilhonamento da suspensão. Ou colocar em agitador magnético por 5 minutos.

1.6 Transferir 1,0 mL da suspensão contida no frasco (10^{-1}), com auxílio de micropipeta com ponteira esterilizada para o tubo de ensaio contendo 9,0 mL de diluente (10^{-2}). Descartar a ponteira em seguida.

1.7 Homogenizar o conteúdo em agitador de tubo de ensaio, colocando e tirando três vezes do aparelho até ser observado o turbilhonamento da suspensão, em cada uma das passagens.

1.8 Para obter a diluição 10^{-3} repetir os itens 1.6 e 1.7 (diluição seriada), utilizando o tubo da diluição anterior (10^{-2}). Proceder assim repetidamente até alcançar a diluição apropriada (uma diluição acima da concentração mencionado pelo fabricante – Quadro 2. Para cada diluição deve-se trocar a ponteira da micropipeta.

1.9 Riscar com caneta de retroprojeter a base das placas contendo meio BDA, dividindo-as em 4 quadrantes. Em seguida, transferir com micropipeta três alíquotas de 20 μ L de cada diluição preparada para a superfície do meio de BDA de cada um dos quadrantes, conforme Figura 6.

1.10 Os tubos com as diluições devem ser guardados sobre refrigeração ($2-8^{\circ}$ C) por no máximo 48 horas para serem utilizados no teste de unidade formadora de colônia;

QUADRO 2 - Máximo de diluição seriada que deve ser realizado para obtenção da diluição apropriada.

Informação do fabricante	Diluir até
10^5	10^{-6}
10^6	10^{-7}
10^7	10^{-8}
10^8	10^{-9}
10^9	10^{-10}
10^{10}	10^{-11}
10^{11}	10^{-12}
10^{12}	10^{-13}

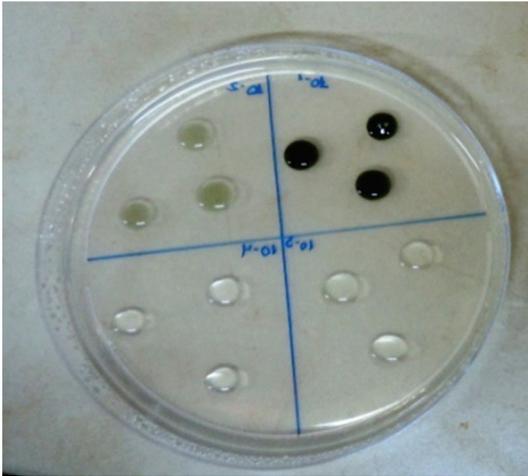


FIGURA 6 - Placa de Petri com meio BDA dividida em 4 quadrante com três alíquotas de 20 μ L de cada diluição seriada realizada.

1.11 Esperar para que os 20 μ L de cada diluição sejam absorvidos no meio de cultura e transferir as placas em BOD, por 24 a 48 horas, $25 \pm 2^\circ$ C, no escuro, antes de continuar o procedimento;

1.12 Observar em quais diluições houve o crescimento de colônias do fungo e selecionar as três últimas diluições que apresentaram o crescimento do fungo nas três gotas das duas pesagens realizadas para a realização do teste de unidade formadora de colônia.

2. Teste de unidade formadora de colônia (ufc) propriamente dito:

2.1 Retirar os tubos de cultura com as diluições seriadas da refrigeração por 30 a 40 minutos antes do início da análise.

2.2 Misturar o conteúdo dos tubos de cultura com as diluições escolhidas em agitador para tubos de ensaio colocando e tirando três vezes. O tubo deve ser retirado quando ocorrer o turbilhamento;

2.3 Transferir de cada diluição apropriada, com uma micropipeta estéril, 100 μ L para a superfície de cinco placas de Petri com meio de cultura (BDA e/ou BDA +T);

2.4 A diluição é distribuída uniformemente sobre a superfície do meio com uma alça de Drigalski esterilizada, imediatamente após a transferência. Para cada grupo de cinco placas utilizar uma alça de Drigalski.

2.5 Fazer uma placa controle antes de iniciar o item 2.3, espalhando 100 μ L da solução salina esterilizada com Tween em placa contendo o meio de cultura (BDA e/ou BDA +T) com alça de Drigalski esterilizada;

2.6 Incubar as culturas a $25 \pm 2^\circ$ C, no escuro, por 48 e/ou 72 horas.

2.7 Após a incubação contar o número de colônias crescidas e verificar se as colônias formadas são realmente do fungo presente no produto biológico, por meio da visualização da colônia na placa e das estruturas do fungo em microscópio óptico.

2.8 Para observar em microscópio óptico as estruturas do fungo, pode ser utilizada uma fita adesiva transparente colocando a parte adesiva sobre a colônia desenvolvida na placa de Petri com meio de cultura e transferir a fita para uma lâmina de microscopia, com o lado adesivo sobre a lâmina. Observar a estrutura do fungo (geralmente conidióforos e conídios) em microscópio óptico em aumento entre 200 a 500X.

Repetição

Devem ser feitas duas pesagens do produto (item 1.2), sendo que de cada pesagem deve ser realizada duas séries de diluição (item 1.6). Das três diluições selecionadas, deve-se plaquear cinco repetições por diluição (item 2.3) (Figura 8).

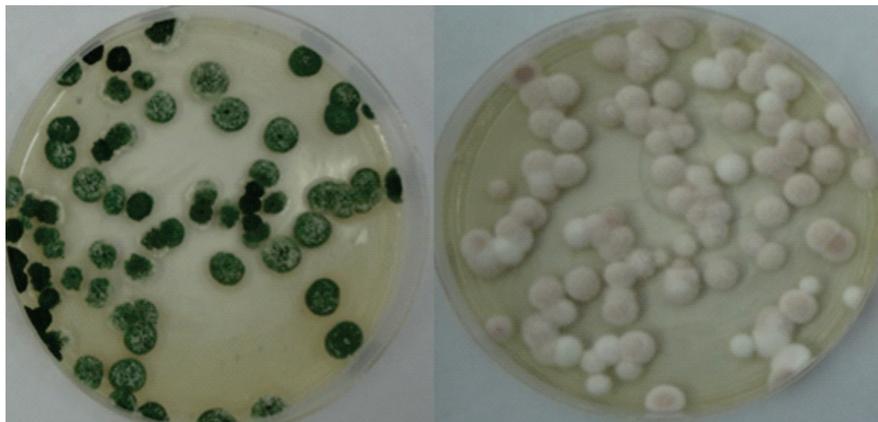


FIGURA 7 - Unidade formadora de colônia de *Trichoderma harzianum* (à direita) e *Paecilomyces lilacinus* (à esquerda).

Contagem de colônias

Fazer a contagem do número de unidades formadoras de colônias, por placa, no tempo de 72 e/ou 96 horas, segundo a fórmula: $UFC/mL = \text{número médio de colônias nas placas} \times \text{diluição escolhida da amostra} \times 10$.

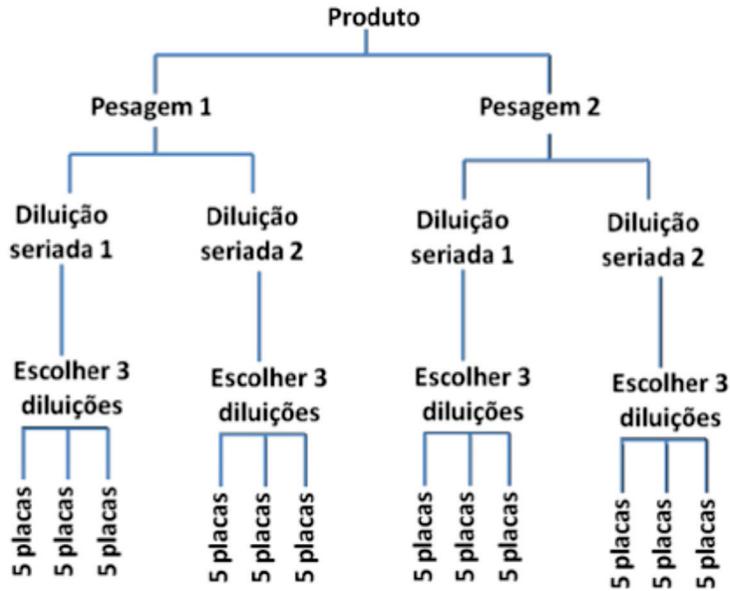


FIGURA 8 - Esquema das repetições utilizadas na metodologia para análise da qualidade – unidade formadora de colônia.

IMPORTÂNCIA DA METODOLOGIA NO PROCESSO PRODUTIVO – EXEMPLO: BALLAGRO AGRO TECNOLOGIA

A Ballagro Agro Tecnologia Ltda. é uma empresa brasileira que fabrica e comercializa produtos biológicos em todo o país. Atualmente, o portfólio da empresa é composto por **Ecotrich** (*Trichoderma harzianum* para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum*), **Nemat** (*Paecilomyces lilacinus* para o controle de *Meloidogyne incognita*), **Ballvéria** (*Beauveria bassiana* para o controle de *Bemisia tabaci*), **Metiê** (*Metarhizium anisopliae* para o controle de *Notozulia entriperiana*) e **Predatox** (*Trichoderma harzianum* para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*).

O processo produtivo destes fungos tem as seguintes etapas básicas: (a) manutenção e multiplicação da matriz, (b) produção massal em arroz, (c) beneficiamento – retirada dos conídios, (d) formulação, (e) lote - embalagem, (f) transporte – comercialização e (g) controle de qualidade (Figura 9). As metodologias desenvolvidas no Projeto Qualibio são utilizadas integralmente nas diferentes etapas da produção e departamentos da empresa (Tabela 1).



FIGURA 9. Vista aérea da planta industrial de produtos a base de fungos. (A) manutenção e multiplicação da matriz, (B) produção - massal em arroz, (C) beneficiamento – retirada dos conídios, (D) formulação, (E) lote - embalagem, (F) transporte – comercialização e (G) controle de qualidade.

Na produção massal e beneficiamento são utilizados as metodologias de contagem de conídios e viabilidade, com o objetivo de padronizar o inóculo que será adicionado no arroz e monitorar o processo, detectando possíveis falhas com rapidez.

Na etapa de formulação é utilizada a metodologia de unidade formadora de colônia. Amostras de 50 g de conídios formulados são coletadas e analisadas antes da liberação para a próxima etapa do processo (formação do lote e embalagem). A liberação só ocorre quando o formulado atinge a concentração indicada no rótulo do produto comercial (Tabela 2).

TABELA 1 - Uso das metodologias de avaliação da qualidade na produção e desenvolvimento de agentes microbianos na empresa Ballagro Agro Tecnologia Ltda.

Etapa do processo produtivo	Metodologia utilizada	Função
Manutenção e multiplicação da matriz	-	-
Produção massal em arroz	Contagem de conídios Viabilidade dos conídios	Calibrar inóculo Monitorar produção
Beneficiamento	Contagem de conídios Viabilidade dos conídios	Monitorar produção
Formulação	Unidade formadora de colônia	Avaliar a concentração do produto
Lote – embalagem	-	-
Transporte – comercialização	-	-
Controle de qualidade	Unidade formadora de colônia	Monitorar a vida de prateleira
Regulatório	Unidade formadora de colônia	Registro do produto
Pesquisa e desenvolvimento	Contagem de conídios Viabilidade dos conídios Unidade formadora de colônia	Melhorar o processo produtivo Teste de formulação Desenvolvimento de novos produtos

TABELA 2 - Relação de produtos comercializados pela Ballagro Agro Tecnologia Ltda.

Produto	Ingrediente ativo	Concentração	Validade
Ecotrich	<i>Trichoderma harzianum</i>	1,0 x 10 ¹⁰ UFC/g	11 meses
Nemat	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	7,5 x 10 ⁹ UFC/g	11 meses
Ballvéria	<i>Beauveria bassiana</i>	1,0 x 10 ⁹ UFC/g	11 meses
Metiê	<i>Metarhizium anisopliae</i>	8,0 x 10 ⁹ UFC/g	9 meses

No final do processo produtivo, amostras de cada lote são enviadas para o Laboratório de Qualidade com o objetivo de monitorar o lote e armazenar amostras para fins de fiscalização. O monitoramento é realizado mensalmente até a validade do produto, por meio da unidade formadora de colônia. Os resultados devem ser os mesmos indicados no rótulo, caso negativo, o lote é recolhido. No controle de qualidade, a empresa analisa em média 100 amostras mensais. O custo de análise por amostra é de R\$ 139,00.

Além do processo produtivo, as metodologias são utilizadas na área regulatória e de pesquisa e desenvolvimento. Atualmente, utiliza-se o teste de microgota e viabilidade de conídios para seleção de produtos para formulação; e a unidade formadora de colônia e contagem de conídios para os testes de vida de prateleira de novos produtos e para o processo de registro dos produtos nos órgãos competentes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle biológico teve um grande avanço nos últimos anos no Brasil. Houve aumento do uso no campo, aceitação pelos produtores, melhoria na qualidade dos produtos comercializados, desenvolvimento de metodologia para avaliação da qualidade dos produtos, conquista na área de registro (indicação por alvo biológico e dispensa do uso da caveira e das duas túbias cruzadas em rótulo, bula e embalagem de produtos Classe Toxicológicas III e IV), aumento do número de produtos registrados e em fase de registro, avanços na pesquisa e desenvolvimento de novos produtos, etc.

O controle de qualidade dos produtos biológicos pelas empresas colaborou com a atual situação, pois sem um controle eficiente é difícil colocar produtos de qualidade no mercado. Agora, falta oficializar e padronizar as metodologias de análise de conformidade e controle de qualidade de produtos biológicos pelos órgãos competentes. Assim, facilitará a fiscalização, o registro de produtos biológicos, análise da concentração pelos laboratórios e comparação dos resultados de pesquisa na área.

REFERÊNCIAS

AGROFIT. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 12 de junho de 2016.

Alves SB, Lopes RB (2008) Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafio. FEALQ, 14:414.

Bettiol W, Maffia LA, Castro MLMP (2014) Control biológico de enfermidades de plantas en Brasil. In: Bettiol W, Rivera MC, Mondino P, Montealegre A, Colmenárez, YC.

Controle de qualidade de produtos biológicos à base de fungos

Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe. Capítulo 3, 91-138.

Bettiol W, Morandi MAB, Pinto ZV, Paula Júnior TJ, Corrêa EB, Moura AB, Lucon CMM, Costa JCB, Bezerra JL (2012) Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. Embrapa Meio Ambiente, Documento 88, 155.

Bettiol W, Morandi MAB, Pinto ZV, Paula Júnior TJ, Moura AB, Lucon CMM, Costa JCB, Bezerra JL (2012) Avaliação da qualidade de produtos à base de *Trichoderma*: http://www.cnpma.embrapa.br/down_site/forum/2012/trichoderma/Apostila_Trichoderma_2012.pdf. Acesso em: 12 de julho de 2016.

Teixeira H, Bettiol W, Morandi MAB, Paula Júnior TJ, Pinto ZV, Lehner MS, Freitas MMQ, Rezende LC (2010) Conformidade e qualidade de produtos biológicos para o controle de doenças de plantas. In: Venzon M, Paula Júnior TJ, Pallini A. Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica. Viçosa, MG: U.R. Epamig ZM, 101-112.

9

Desafios para o mais amplo uso do controle biológico no Brasil

Pedro A. J. Faria Jr.

INTRODUÇÃO

O ambiente rural sempre foi organizado em torno de quatro aspectos principais, que são a função primordial de produção de alimentos, a agricultura como atividade principal, a organização social em torno de famílias com padrões de comportamento e valores muito peculiares e, por fim, uma paisagem que, no passado, refletia o equilíbrio entre os ambientes naturais e as áreas cultivadas.

O avanço da urbanização, principalmente depois da Revolução Industrial, mudou a forma como a civilização passou a se organizar; novas atividades profissionais, novas relações interpessoais e novos valores passaram a se impor, retirando do mundo rural a centralidade econômica e social. Ao contrário, este passou, gradativamente, a representar uma realidade arcaica e atrasada, e o ambiente urbano se revestiu de uma aura de sofisticação, modernidade e riqueza. Além da função primordial de abastecer os crescentes centros urbanos com alimentos e de servir de refúgio às populações urbanas em épocas de crise, o meio rural passou também a representar uma fonte de mão-de-obra barata e desqualificada para as atividades desempenhadas nas cidades. Iniciava-se, lentamente, o êxodo rural que se consolidaria 200 anos depois. Assim, se no início dos anos 1800 apenas 3% da população mundial vivia em centros urbanos, no final da década de 1940, em pleno pós II Guerra Mundial, os países desenvolvidos já tinham de 40 a 60% da população em suas áreas urbanas, embora a média mundial não chegasse a 30%, influenciada pelas baixas taxas de urbanização da Ásia e da África. No início dos anos 60, a média de população urbana já alcançava mais de 40%.

Engenheiro Agrônomo, Presidente da ABCBio – Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico, Imperatriz Leopoldina 957, sala 304, Vila Leopoldina, São Paulo SP / Brasil, 05305-011, E-mail: pedro.faria@acultivar.com.br

É certo que as demandas do mercado costumam direcionar os investimentos necessários à evolução tecnológica, e neste sentido alguns setores da economia sempre acabam beneficiados pela priorização de recursos. A civilização moderna vem presenciando uma evolução tecnológica de ritmo alucinante durante os últimos cem anos, e esta evolução constante ocorre em todas as áreas de conhecimento; mas com a urbanização crescente do mundo moderno, as demandas de consumo dos grandes centros urbanos passaram a receber muito mais atenção de empresas e investidores, pelo retorno financeiro que delas decorria.

Embora as técnicas agrícolas viessem evoluindo gradativamente, podemos afirmar que o primeiro grande marco do desenvolvimento tecnológico agrícola veio somente com o evento que ficou conhecido como Revolução Verde. Um amplo programa que combinava uso de fertilizantes químicos, defensivos, melhoramento genético de plantas, mecanização e economia de escala foi concebido inicialmente na década de 1940 para resolver problemas de produtividade no México, mas maciços investimentos capitaneados pela Fundação Rockefeller levaram o conceito para o restante do mundo à medida que grandes empresas aumentavam os investimentos em pesquisa e desenvolvimento de novos produtos. Fertilizantes e defensivos químicos passaram a ser usados de forma crescente e, de fato, os resultados obtidos foram extraordinários, com elevação das produtividades e da sanidade das lavouras.

No Brasil, a criação da EMBRAPA em abril de 1973 abriu caminho para a modernização do ambiente rural brasileiro nos moldes preconizados para uma agricultura de grande escala. De uma produção agrícola que mal alcançava os 50 milhões de toneladas de grãos por ano, em quatro décadas o país quadriplicou sua produção. Pesquisas antes focadas no desenvolvimento regional pelos institutos de pesquisa estaduais passaram a ganhar alcance nacional, e o cerrado passou a ser estudado como a principal fronteira agrícola a ser explorada. Também aqui, o uso dos defensivos e fertilizantes químicos se tornou prática obrigatória para alcançar altas produtividades, e o conceito de controle biológico não teve a atenção que merecia.

A única exceção talvez tenha sido a cultura da cana-de-açúcar. Com o crescimento da área plantada a partir da implantação do Pró-Álcool, na década de 70, os canaviais passaram a ser tratados com fungos entomopatogênicos para controle de cigarrinha-da-cana e com parasitoides da broca-da-cana para controle desta importante praga. Este programa se consolidou como o maior programa de controle biológico do mundo, tendo alcançado provavelmente mais de 3 milhões de hectares tratados.

Atualmente, com a produção nacional batendo os 200 milhões de toneladas de grãos por ano, para onde vamos? A hegemonia do controle químico puro parece estar chegando ao final. A população urbana, a mesma que nos primórdios do século XX encarava o mundo rural como o exemplo do atraso e que criou a demanda para inacreditáveis avanços tecnológicos, passou a pressionar o campo por alimentos livres de resíduos químicos e por práticas agrícolas de menor impacto ambiental.

As pragas agrícolas, após décadas de pressão de seleção pelo uso descontrolado de defensivos químicos, parecem ter atingido níveis de resistência genética intransponíveis pelo atual modelo de produção. A preservação do ambiente e das fontes de água potável exige, a cada dia mais, a adoção de práticas de manejo mais racionais. Os produtores rurais, em boa parte, alcançaram padrões empresariais e, impulsionados pelos preços de commodities agrícolas, se enriqueceram e se modernizaram. Seus filhos frequentaram universidades e voltaram para as fazendas para implantar novos conceitos de condução do agronegócio. A informática e a agricultura de precisão trouxeram a possibilidade de controles e otimização de uso de insumos nunca sonhados pelos agricultores da era da Revolução Verde.

O Controle Biológico de Pragas emerge deste cenário como a alternativa técnica viável para uma agricultura equilibrada e ambientalmente responsável, a EMBRAPA e os institutos estaduais de pesquisa, que ao longo de todos estes 40 ou 50 anos mantiveram em seus bancos de genoma os micro e macro organismos prospectados e isolados ao longo do tempo, passaram a disponibilizá-los para empresas interessadas em desenvolver formulações comerciais de defensivos biológicos. Em 2007, os pesquisadores que lideravam as pesquisas da EMBRAPA com ativos biológicos incentivaram a criação de uma associação de fabricantes que pudesse representar o setor. Nascia a ABCBio – Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico, que hoje conta com 23 empresas associadas, incluindo as grandes multinacionais do setor de defensivos químicos.

Hoje, presencia-se o uso de ativos biológicos de controle formulados de acordo com avançadas técnicas de manipulação, que fazem com que eles manifestem no campo a mesma eficiência verificada nos laboratórios. Investimentos em pesquisa e tecnologia permitem que um produto biológico bem formulado seja tão ou mais eficiente que um defensivo químico recomendado para a mesma praga alvo. O uso dos agentes biológicos de controle em sistemas de Manejo Integrado de Pragas viabilizou economicamente o cultivo de espécies que em passado recente sofreram prejuízos milionários devido à ocorrência descontrolada de pragas antes consideradas secundárias ou ao aparecimento de populações resistentes de pragas antes sensíveis aos defensivos químicos.

A adoção ampla do controle biológico parece ser apenas uma questão de tempo, mas não virá sem o esforço coordenado de sua cadeia produtiva. A seguir serão apresentados os problemas considerados críticos e que exigem imediata correção para permitir o crescimento deste mercado no Brasil.

O registro de produtos biológicos no Brasil e a pirataria

O registro de produtos para tratamento fitossanitário de culturas agrícolas é regulamentado pela Lei 7.802 / 1989 e pelo Decreto 4.074 / 2002. De acordo com estas normas, os produtos biológicos são considerados como afins dentro das regras que regulamentam o registro dos defensivos químicos. Alguns avanços específicos

para os produtos biológicos foram alcançados posteriormente, com a publicação da Instrução Normativa Conjunta nº. 3, de 2006, que definiu especificamente o que é um agente biológico de controle, e mais recentemente com o Ato número 6 / 2014, que regulamentou o registro desta classe de produtos por praga alvo, e não mais por cultura.

No entanto, o processo de registro talvez seja, atualmente, o maior dos entraves ao uso dos produtos biológicos. Além dos custos serem altos, a tramitação do processo é lenta e depende de uma avaliação colegiada envolvendo o Ministério da Agricultura, a ANVISA e o IBAMA. Com insuficiência de técnicos e falta de treinamento específico para a avaliação de biológicos, os processos frequentemente travam com pedidos de exigências sobre assuntos já devidamente esclarecidos pela pesquisa. Ainda que a legislação determine um prazo máximo de 120 dias para a manifestação do MAPA a partir da submissão do pedido de registro, este prazo nunca é cumprido. Raramente um registro é aprovado em prazo inferior a 3 anos, já que ao menos 1 ano é gasto com ensaios de eficiência agrônômica.

Esforços têm sido envidados pelos três órgãos reguladores no sentido de abreviar os prazos de registro, mas por enquanto os efeitos não foram sentidos a não ser em casos pontuais. Mas existe a firme decisão dos órgãos reguladores no sentido de ajustar os processos e priorizar de fato a análise dos pedidos de registro de biológicos, o que é encorajador. A necessidade de registro é inquestionável, para evitar uma desregulamentação do mercado que teria efeitos devastadores sobre a credibilidade dos produtos biológicos, mas já passa da hora de ser publicada uma norma específica para os produtos biológicos.

Uma alternativa poderia ter sido o registro de produtos através da COAGRE, a Coordenação de Agroecologia da Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo, que é o setor do MAPA que cuida dos assuntos de agricultura orgânica. Este sistema, criado para facilitar os estudos iniciais através da publicação pelo próprio Ministério das especificações de referência dos produtos, acabou sendo mais lento do que a via de registro convencional, novamente por falta de fiscais federais agropecuários em quantidade suficiente para dar conta da demanda que se criou.

As dificuldades criadas pelo processo de registro resultam em um quadro perverso. As empresas legalmente regularizadas deixam de comercializar seus produtos por falta de registro, ao passo que as empresas ilegais não sofrem fiscalização e comercializam livremente produtos sem registro, concorrendo de forma desleal e oferecendo com frequência produtos de baixa qualidade. Por falta de recursos humanos e materiais, o MAPA somente realiza as fiscalizações se as empresas ou produtos irregulares forem formalmente denunciados.

A oferta e comercialização de produtos biológicos ilegais, aliás, está intimamente ligada aos problemas com registro, e é outro desafio a ser vencido. Para não enfrentar a fila de registro, empresas inidôneas colocam seus produtos no mercado sob outra classificação, como fertilizante ou inoculante, por exemplo,

ou simplesmente não registram e divulgam como se se fosse registra. Quando pressionadas, estas empresas alegam que, sendo o registro demorado demais e a fiscalização insuficiente, é economicamente vantajoso iniciar a comercialização ilegalmente e conduzir em paralelo o processo de registro.

Mas quais podem ser os riscos representados por um produto não registrado? O primeiro aspecto diz respeito à qualidade. Para que um ativo biológico seja eficiente no campo tanto quanto é em laboratório, é necessária a formulação cuidadosa de um produto comercial. Formulações de má qualidade ou de baixa tecnologia prejudicam o desempenho do produto comercial, mesmo que o ativo seja biologicamente eficiente. Por isso os órgãos reguladores exigem ensaios de eficiência agrônômica conduzidos em ambientes diferentes, e os resultados destes ensaios devem passar por análise estatística. Um produto ilegal não passa por este crivo técnico e, portanto, sua eficiência no campo é questionável.

Mas esta não é a única restrição. Há a questão da pureza, tão ou mais importante do que as provas de eficiência agrônômica. As biofábricas de defensivos biológicos precisam seguir normas estritas de segurança e de assepsia para assegurar que o microrganismo vendido é realmente aquele que está contido na embalagem que chega ao consumidor final. Há, ainda, regulamentações ambientais para garantir que não haja contaminação no entorno das unidades industriais. Parece banal, mas a falta de preocupação com qualidade e segurança ambiental de algumas instalações que formulam biológicos irregularmente é alarmante. Sem nenhum cuidado com as instalações, não há como garantir que não haja contaminação das estruturas de reprodução de fungos ou bactérias com microrganismos indesejados. O resultado é que a eficiência destes produtos irregulares pode não ser a esperada, seja por baixa concentração do ativo, seja pela presença de microrganismos contaminantes que podem ser antagonicos ao microrganismo que se pretende inocular no campo.

Outra questão muito séria é a prática de reproduzir na fazenda o ativo biológico contido em um produto comercial registrado, através de kits de fermentação líquida vendidos no mercado como se fossem a solução final para redução do custo de produção. Além de não serem registrados e não terem nenhuma garantia de concentração dos ativos biológicos que os compõe, os produtos assim formulados podem representar risco ocupacional para os colaboradores envolvidos na sua fabricação, e em caso de contaminação com agentes patogênicos, acabam contaminando a lavoura que supostamente deveriam proteger e até mesmo o produto final colhido, passando a representar risco para a segurança alimentar do consumidor final.

Além das questões de assepsia e de pureza já abordadas acima, há outro aspecto, de ordem legal: trata-se da observância da Lei de Acesso ao Patrimônio Genético. Segundo esta lei, a coleta, a prospecção, o desenvolvimento de produto e a comercialização de organismos vivos e de suas partes, coletados em território nacional, deve se submeter à regulamentação específica e pagar as taxas definidas em lei. Reproduzir um microrganismo sem respeitar esta legislação, é, no mínimo, questionável.

A prática da pirataria de produtos biológicos pode levar ao descrédito da tecnologia, prejudicando o trabalho sério de pesquisa e desenvolvimento conduzido pelos fabricantes legalmente constituídos e pelos institutos de pesquisa oficial, que infringe a legislação e configura a prática de concorrência desleal, e não se pode continuar ignorando estas irregularidades, como se fossem de pouca importância. É dever do governo e das empresas do setor combater com firmeza esta prática condenável.

Pesquisa e desenvolvimento

A agricultura em ambiente tropical se caracteriza por uma enorme pressão de pragas sobre as plantas cultivadas. Para combatê-las, é necessário dispor de um verdadeiro arsenal de ferramentas dos mais variados tipos, e é o uso racional e combinado destas ferramentas que chamamos de Manejo Integrado de Pragas.

Para que o controle biológico ganhe cada vez mais espaço neste contexto de manejo, é fundamental que se tenha um maior número de ativos biológicos registrados disponíveis. O Brasil conta neste ano de 2016 com 119 produtos registrados por 63 empresas, mas apenas 20 ativos biológicos compõem esta lista, sendo 5 deles insetos ou ácaros.

É necessário, portanto, ampliar esta lista. Ativos biológicos não faltam, basta ver a lista disponível na Europa, por exemplo, ou consultar o banco de dados do CENARGEN – EMBRAPA. Por que então não se tem maior variedade de ativos biológicos no Brasil?

Parte da resposta provavelmente está nas dificuldades resultantes do processo de registro, longo e complicado do ponto de vista administrativo e que, embora seja muito mais barato do que o registro de um produto à base de um ativo químico, ainda assim pode requerer recursos relevantes cujo acesso é, às vezes, difícil para uma empresa de pequeno porte.

O primeiro passo é, sem dúvida, criar uma legislação específica para produtos biológicos com uma via de registro separado dos defensivos químicos, fato já abordado na seção anterior. Mas esse não é o único problema. Talvez seja o primeiro da lista, atrasando o desenvolvimento de todo o resto, mas há muito mais a fazer. Deve-se olhar para as estratégias das grandes empresas ligadas à proteção de plantas para entender melhor o processo de marketing, fundamental para o desenvolvimento de qualquer mercado. É preciso um profissionalismo maior no desenvolvimento de mercados, e as empresas precisam estar prontas para apresentar soluções realmente eficientes para o controle das pragas.

O discurso conservacionista, de viés ecológico, quase ideológico, sem fundamento científico sólido, não faz das pragas agrícolas organismos menos agressivos. É preciso investir pesadamente em desenvolvimento de estratégias de manejo realistas, baseadas em pesquisas científicas que possam comparar dados com rigor estatístico e apresentar indicações seguras do uso dos defensivos biológicos, sob pena de gerar descrédito em relação a esta tecnologia.

É inegável que existem pragas e doenças de plantas cujo controle através das ferramentas biológicas disponíveis é, atualmente, ineficiente. É preciso prospectar novos ativos biológicos, ou desenvolver ativos já isolados e ainda não estudados, e esse papel tem sido desempenhado pelos institutos oficiais de pesquisa e pela iniciativa privada, mas o caminho a percorrer é longo.

O Laboratório de Quarenta “Costa Lima”, situado na EMBRAPA Meio Ambiente, em Jaguariúna, São Paulo, deveria ser mais acionado para o acesso a novos micro e macro organismos visando o controle de pragas para as quais ainda não temos ferramentas biológicas adequadas. Dispondo de excelente estrutura física e humana, este laboratório introduziu entre 1991 e 2013 um total de 773 espécies de organismos vivos destinados a controle biológico e mantém em suas coleções todos os predadores e parasitoides considerados aptos para introdução no país. Os microrganismos que foram introduzidos estão depositados na Fundação de Pesquisa Tropical André Tosello, em Campinas, São Paulo, de acordo com o site da EMBRAPA.

Na tabela 1 estão detalhadas as introduções realizadas entre 1991 e 2013, e demonstra a grande diversidade de organismos disponíveis para controle de pragas agrícolas disponíveis para desenvolvimento e pesquisa.

TABELA 1 - Número de espécies introduzidas de cada grupo de organismos benéficos e outros fins, finalidades e principais culturas a que se destinaram, e estados beneficiados - Período de 1991 a 2013 (até julho).

Organismo	Nº de espécies	Finalidades e Culturas	Estados
Ácaro	29	Grãos armazenados, mandioca, maçã, hortaliças, tomateiro, palmeiras;	BA, SP, SC, MG, RS, PR, RR;
Bactéria	186	Sementes, antissoro, taxonomia, soja, palma-forrageira, cana -de-açúcar, kit de diagnóstico;	DF, PR, SP, CE, RJ;
Fungo	485	Biofertilizantes, caracterização morfológica, consumo humano, coco, enzimas, mandioca, forrageiras, doenças de plantas, sementes, metais pesados, soja, algodão, feijão, antimicrobianas, gado, taxonomia, indústria, testes de laboratório, alho e cebola;	AM, DF, SP, PR, SE, BA, RS, MG, RS, RJ;
Predador	5	Tomate, citros;	SP, BA;
Parasitóide	44	Cana de açúcar, tomate, frutas, mandioca, café, milho, florestas, citros, testes de laboratório;	AM, AP, SP, PE, BA, ES, PR, MG, MS;
Nematóide	14	Pragas de solo, florestas, testes de laboratório, caracterização morfológica, bioquímica e molecular;	SP, PR, DF;
Vírus	1	Milho;	PB;
Protozoário	1	Controle biológico do mosquito <i>Aedes aegypti</i> ;	DF;
Formiga	1	Formiga lava-pé para teste de especificidade de parasitóide;	SP;
Mosca das frutas	1	Produção massal de insetos, Biofábrica Mosamed Brasil;	PE;
Inoculantes	3	Inoculantes líquidos para milho e soja;	RS
Biofertilizantes	3	Biofertilizantes à base de bactérias;	RS
Total	773		

Estados brasileiros: AM (Amazonas), BA (Bahia), CE (Ceará), DF (Distrito Federal, Brasília), ES (Espírito Santo), MG (Minas Gerais), PB (Paraíba), PE (Pernambuco), PR (Paraná), RJ (Rio de Janeiro), MS (Mato Grosso do Sul), RS (Rio Grande do Sul), SE (Sergipe) e SP (São Paulo). **Fontes:** Coutinot et al. (2013); Giraldi et al. (2012); Sá (2010 a,b; 2006; 2005; 2003); Tambasco et al. (2004; 2001a,b; 1997); Sá et al (2000); Sá, L. A. N. de; Pessoa, M. C. P. Y., 2015; Sá et al., 2016.

A pesquisa e desenvolvimento de novas técnicas de criação e de liberação de macrorganismos também podem contribuir de forma decisiva para a adoção do controle biológico em larga escala. Pode-se tomar como o exemplo a liberação do parasitoide de ovos *Trichogramma sp.* O uso deste inseto tomou grande impulso no Brasil na década de 90, com pesquisas desenvolvidas na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, da Universidade de São Paulo, e no Centro de Pesquisa do Trópico Semi-Árido, da EMBRAPA. Na época, um projeto de controle da traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*) orientado pela Dra. Francisca Nemauro Pedrosa Hajji no município de Santa Maria da Boa Vista, em Pernambuco, e no município de Curaçá, na Bahia, envolvia o uso do parasitoide em uma área total de 1.400 hectares, e a liberação era manual, exigindo grande contingente de mão-de-obra. Seria impensável recomendar um programa do mesmo tipo em áreas maiores do que aquela, usando mão-de-obra intensiva, apesar da grande eficiência de controle demonstrada em área tão expressiva. Atualmente, o mesmo parasitoide pode ser liberado mecanicamente, em cápsulas lançadas no campo, ou ainda através de drones, pela dispersão das pupas cuja eclosão ocorre em poucas horas após a liberação. Os drones aplicam aproximadamente 150 hectares por hora, percorrendo em apenas um dia uma área que era coberta por 60 a 80 pessoas em 4 dias de trabalho.

Como resultado, hoje pode-se recomendar o uso do *Trichogramma pretiosum* em grandes áreas, com rendimento equivalente à aplicação tratorizada de defensivos líquidos. É perfeitamente possível, por exemplo, configurar um programa de Manejo Integrado de Pragas para controlar todo o complexo de lagartas da soja utilizando parasitoides de ovos, bactérias da espécie *Bacillus thuringiensis* e um único ativo químico seletivo, com mínimo ou nenhum impacto sobre a população de inimigos naturais e de abelhas, e sem desenvolver resistência nas populações das pragas.

Outros desenvolvimentos do mesmo tipo, com o objetivo de melhorar a tecnologia de liberação de predadores e parasitoides, certamente abrirão novas portas para a adoção da tecnologia. No entanto, se considerar-se a ocorrência de outras pragas, como percevejos ou mosca-branca, para continuar usando a soja como exemplo, o controle biológico sozinho não terá a mesma eficiência, e serão necessárias pesquisas adicionais e o desenvolvimento de novas soluções como o desenvolvimento de produtos baseados em outros insetos como o *Orius insidiosus* (Figura 1).

Na área do controle de doenças de plantas, tem-se também um enorme campo a explorar. Se é verdade que o controle de doenças de solo é hoje um mercado bastante explorado pelas empresas de controle biológico, tendo o *Trichoderma sp* como o ativo biológico mais utilizado, entretanto, tem-se ainda grandes lacunas a preencher no campo de controle de doenças foliares.

Considerando-se os dados disponibilizados pelo SINDIVEG referentes ao ano de 2015, nota-se que pouco mais de 30% do faturamento total do setor em 2015 se referem à venda de fungicidas, e que a cultura da soja responde por 52% das vendas

de defensivos de todas as classes. Segundo dados do Consórcio AntiFerrugem, na primeira década de sua ocorrência, a Ferrugem-Asiática-da-Soja levou ao consumo de US\$15 bilhões em fungicidas, e a busca pela produtividade de 100 sacas por hectare deverá levar a alterações na disposição espacial de plantas que favorecem ainda mais a ocorrência da doença. Esses números mostram o exemplo do potencial de mercado de fungicidas biológicos que possam entrar no sistema de manejo da Ferrugem-Asiática-da-Soja e a importância das pesquisas direcionadas para este segmento.

A importância do assunto aumenta ainda mais se lembrarmos que a ascensão da lagarta falsa-medideira da soja (*Chrysodeisis includens*) à condição de praga principal deve-se provavelmente a um desequilíbrio causado pelo uso de fungicidas para o controle das doenças foliares da soja, que causaram a queda na população de fungos entomopatogênicos (Figura 1) de ocorrência natural, como *Nomuraea rileyi* que parasita a lagarta falsa-medideira-da-soja (Figura 2). Assim, o uso de ferramentas de controle biológico de doenças foliares poderia também trazer de volta um maior equilíbrio na população de lagartas desfolhadoras e outros insetos.

Todavia, é necessário considerar que toda a pesquisa precisa de um elo de ligação com o campo. O Brasil tem hoje um enorme déficit na sua estrutura de extensão rural, o qual será discutido na próxima seção.



FIGURA 1 - Ocorrência natural do predador *Orius insidiosus* em soja sob Manejo Integrado de Pragas na região a Alta Mogiana, SP, safra 2014/2015. Apesar do potencial de uso deste inseto no combate a pragas de hábito críptico, até hoje ele não está registrado no Brasil. Foto: Pedro Faria Jr./Arquivo pessoal.



FIGURA 2 - Lagarta falsa-medideira-da-soja parasitada pelo fungo *Nomuraea rileyi*. Este entomopatógeno de ocorrência natural teve sua população bastante reduzida devido ao uso intenso de fungicidas químicos. O controle biológico de doenças de plantas pode reverter este quadro. Foto: Arquivo EMBRAPA SOJA via AGEITEC – Agência EMBRAPA de Informação Tecnológica.

As deficiências da extensão rural no Brasil

O Brasil vem sentindo há anos a falta do elo entre a estrutura de pesquisa oficial e o campo. O papel da extensão rural foi gradativamente passado para a iniciativa privada, representada pelas grandes fabricantes de insumos agrícolas. À primeira vista o resultado parece ter sido bom, visto que a produção agrícola brasileira quadruplicou nos últimos quarenta anos.

Mas uma visão mais detalhada do panorama agrícola desvenda problemas que se enraizaram profundamente na estrutura produtiva do país. Deixou de existir o elo direto que ligava a pesquisa científica ao campo. Os agrônomos extensionistas da rede oficial foram em grande parte substituídos pelos os agrônomos das revendas de defensivos. Embora detenham em geral uma grande experiência de campo, seu treinamento técnico de atualização é muito mais voltado para a ação de vendas do que para a atualização científica, e o foco do seu trabalho é o cumprimento das metas de vendas, e não a divulgação da pesquisa científica.

O profissional se torna, desta forma, o agente de uma estrutura comercial, e não um extensionista propriamente dito. Se o resultado final deste modelo em termos de

produção bruta do país mostrou evolução indiscutível ao longo das últimas quatro décadas, deve-se analisar com mais atenção os custos de produção e os problemas ambientais dele decorrentes.

Com a mesma intensidade com que tem-se visto o aumento das produtividades, cresce também a ocorrência de pragas resistentes às moléculas químicas. Episódios recentes com a *Helicoverpa armigera* (Figura 3) no oeste baiano a partir do final de 2013 escancararam a gravidade do problema. As vendas adicionais de defensivos químicos explodiram, e ainda assim os prejuízos acumulados dos produtores ultrapassaram a marca do bilhão de reais. As produtividades caíram e os custos de produção tornaram-se proibitivos.



FIGURA 3 - Larva de *Helicoverpa armigera* em lavoura de soja durante a safra 2013/2014. Foto: Pedro Faria Jr./Arquivo pessoal.

O jogo só começou a virar no momento em que a EMBRAPA e pesquisadores de universidades e institutos estaduais de pesquisa entraram em campo, divulgando o conhecimento científico e racionalizando as medidas de controle com as ferramentas disponíveis. O Manejo Integrado de Pragas, relevado em segundo plano pela extensão rural privada anos antes, voltou a ocupar lugar nas publicações especializadas e no noticiário técnico.

Dentre as ferramentas disponíveis para compor as estratégias de um Manejo Integrado de Pragas, os ativos biológicos de controle são indispensáveis para manejo de resistência de populações. Mesmo o uso de variedades de plantas transgênicas, inicialmente consideradas como a solução para o manejo das pragas, se mostrou

insuficiente quando empregado de forma isolada. Usadas sem o critério correto, as chamadas variedades *Bt* acabaram por selecionar espécies e populações resistentes aos genes *Cry* nelas introduzidos, obrigando ao controle adicional. A falta de mais ferramentas biológicas para controle de doenças foliares tornou ainda maior a pressão de lagartas desfolhadoras, devido à supressão populacional de entomopatógenos como o fungo *Nomureae rileyi*, controladores naturais destes insetos.

Pode-se dizer, na atual conjuntura econômica do Brasil, que é utopia a ideia de ter de volta ao campo os extensionistas oficiais, mas talvez possamos usar com mais intensidade as fundações de pesquisa ou até criar serviços de extensão rural ativo dentro das universidades, a exemplo do que se faz nos EUA. Basta visitar um site de universidade americana que se encontra com facilidade o acesso aos serviços de extensão. Os técnicos vão realmente para o campo e desempenham o papel de divulgar a tecnologia e interagir intensamente com os produtores rurais. Temos visto isso acontecer no Brasil em órgãos como a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e a Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), para citar dois exemplos, mas nos parece que estes programas são pontuais e pouco abrangentes, dependendo inclusive da ação individual de pesquisadores.

Capacitação técnica de agentes comerciais

O maior desafio do setor de biológicos será a adequada capacitação técnica e comercial dos agentes que o representam. Em geral os agrônomos saem da faculdade sem formação na área de controle biológico, embora em muitas delas haja cursos de pós-graduação voltados para este campo do conhecimento.

Como muitos agrônomos acessam o mercado de trabalho imediatamente após o final do curso de graduação, acabam sem ter o conhecimento necessário para usar os produtos biológicos em cultivos comerciais. E muitos destes profissionais acabam justamente como técnicos vendedores das revendas de defensivos. Os fabricantes de produtos biológicos terão que suprir esta deficiência para ter acesso ao mercado.

Isso certamente já vem sendo feito, devido ao o crescimento que tem-se observado no mercado de biológicos. Mas ainda depara-se no campo com produtores rurais que desconhecem não só o controle biológico, como também o Manejo Integrado de Pragas. Enquanto este panorama não mudar, provavelmente a adoção do controle biológico ficará restrita a nichos de mercado, como os chamados HF e outras especialidades.

Os números escancaram a desigualdade: o setor de proteção de plantas movimentou no Brasil em 2015 o total de 6,5 bilhões de dólares em inseticidas, fungicidas, acaricidas e outros, mas apenas 1 a 2%, foram gastos com produtos biológicos, isto excluindo os herbicidas.

Dados disponibilizados pelo SINDIVEG (Tabela 2) dão uma ideia clara do potencial de crescimento do mercado de defensivos biológicos pelo simples aumento do Market Share, principalmente no segmento dos inseticidas e fungicidas:

TABELA 2 - Valor da comercialização de defensivos agrícolas no Brasil entre 2011 e 2015 Fonte: Sindiveg,

Classes	Valor US\$ MM					Variação Percentual				
	2011	2012	2013	2014	2015	15/11	15/12	15/13	15/14	15/14
Total	8488	9710	11454	12249	9608	13,20	-1,05	-16,12	-21,56	-21,56
Inseticidas	2945	3607	4554	4893	3171	7,67	-12,09	-30,37	-35,19	-35,19
Herbicidas	2743	3135	3739	3903	3086	12,50	-1,56	-17,46	-20,93	-20,93
Outros	375	398	450	429	347	-7,47	-12,81	-22,89	-19,11	-19,11
Acaricidas	110	101	119	117	103	-6,36	1,98	-13,45	-11,97	-11,97
Fungicidas	2.315	2.469	2.592	2.907	2.901	25,31	17,50	11,92	-0,21	-0,21

Balço 2015 / www.sindiveg.org.br/docs/balanco-2015.pdf

A mesma pesquisa mostra que a soja, a cana, o milho e o algodão são responsáveis por 79% do valor total comercializado, sendo a soja o maior mercado, com 52% do total.

Aproveitar as oportunidades deste cenário exigirá a combinação de conhecimento técnico com programas de marketing e desenvolvimento de mercado. E o Manejo Integrado de Pragas é atualmente a única porta de entrada para o mercado dos produtos voltados à proteção de plantas. No atual estado da tecnologia de biológicos não há como, em grandes plantios comerciais, viabilizar o controle adequado de pragas e doenças sem utilizar os defensivos químicos. Mas é possível combinar o uso de microbiológicos e macrobiológicos com defensivos químicos eficientes e seletivos, criando um sistema de manejo efetivo e de custo adequado, que mantenha as infestações de pragas e doenças abaixo do nível de dano econômico e traga resultado financeiro favorável para o produtor rural.

E neste ponto outro alerta emerge dos dados apresentados no quadro acima. A queda de vendas de defensivos químicos verificada em 2015, uma redução de mais de 20% sobre o volume de 2014, deve-se, segundo o próprio SINDIVEG, ao encarecimento dos produtos em Real, à escassez de crédito aos produtores e as ilegalidades praticadas no setor. A difusão das variedades transgênicas de soja e milho também afetou negativamente as vendas de inseticidas, e o mesmo comportamento foi sentido no mercado dos biológicos.

No entanto, tem-se observado um crescimento no mercado de biológicos para controle de doenças de plantas; parte disso se deve ao uso cada vez maior do fungo *Trichoderma spp.* no controle de doenças de solo das grandes culturas, mas há outros fungos e bactérias despontando com grande potencial. É necessário continuar a investir neste segmento, cuja demanda é enorme.

Os fabricantes e agentes comerciais devem assumir conjuntamente a tarefa de divulgar e difundir o uso dos biológicos como ferramentas do MIP, fazendo chegar aos produtores rurais o resultado das pesquisas geradas nos institutos de pesquisa. É um investimento indispensável se o setor quiser consolidar e expandir sua posição no mercado.

No entanto, novamente surge a sombra da ilegalidade quando analisamos este assunto. Como competir em igualdade de condições quando se tem, de um lado, produtos registrados com regras claras e restritivas no que se refere a técnicas de propaganda e embalagem, e de outro, produtos ilegais que se utilizam de todo o arsenal de mídia livremente? Como amortizar os elevados custos de registro de um produto se um outro, similar, acessa o mercado sem este custo adicional tão importante?

O setor precisa urgentemente que as autoridades combatam com firmeza a ilegalidade e a pirataria dos produtos biológicos, sob pena de não só compactuarem com esta ilegalidade, como também de atrasarem ainda mais a consolidação do mercado dos produtos legalizados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Talvez se esteja vivenciando hoje, quase 80 anos depois dos primórdios da dita Revolução Verde, outra revolução agrícola. Pode-se pensar que os agentes desta revolução são as ferramentas da agricultura de precisão, da engenharia genética ou das técnicas de mecanização agrícola que livraram o homem das tarefas mais pesadas do trabalho no campo. Todos estes avanços são de extrema relevância e realmente contribuíram para alterar definitivamente o padrão tecnológico da agricultura. De exemplo de arcaísmo, o ambiente rural vem se transformando há anos em meio de expressão dos mais diversos avanços tecnológicos, e continua mostrando o seu potencial de criar riquezas e suprir o mundo com os produtos primários sem os quais nenhum de nós sobreviveria.

No entanto, qual seria realmente o maior agente desta nova revolução? O historiador Paul Freedman, professor de pós-graduação em Yale, ao analisar o colapso do Império Romano, ressaltou que nenhuma civilização percebe de imediato os agentes de uma grande mudança que não decorra de uma ruptura brusca e violenta. Ao contrário, as mudanças graduais são reconhecidas e totalmente compreendidas somente décadas depois, sob o olhar crítico e a análise de observadores externos e isentos.

Sob este ponto de vista, pode ser que dentro de mais 40 ou 50 anos a sociedade moderna venha a reconhecer, ao olhar para o passado, que a nossa geração implementou aquela que pode vir a ser um dos maiores marcos da agricultura moderna: uma verdadeira Revolução Biológica, que tenha resolvido de forma sustentável o problema da proteção de cultivos, permitido assim que todas as outras tecnologias aplicadas ao campo tivessem um meio de manifestação de seu potencial.

REFERÊNCIAS

Bettiol W (2009) Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. 1th Ed. FundAg, Jaguariuna. Embrapa Meio Ambiente.

Ferrão J (2000) Relações entre mundo rural e mundo urbano: evolução histórica, situação actual e pistas para o futuro. EURE (Santiago) 26:123-130.

IEAG – Instituto de Estudos do Agronegócio/ABAG. O Futuro da Soja Nacional. Impactos socioeconômicos da Ferrugem Asiática na cadeia da soja nos próximos dez anos. Sparks – Consultoria e Inteligência Competitiva. Disponível em: <http://www.abag.com.br/media/images/0-futuro-da-soja-nacional---ieag---abag.pdf>.

Open Yale courses. Disponível em: <http://oyc.yale.edu/history/hist-2>.

Parra JRP, Botelho PSM, corrêa-ferreira BS, Bento JMS. Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores, 43-70.

Desafios para o mais amplo uso do controle biológico no Brasil

Ragsdale D, Koch K, Grau C. Using foliar fungicides to manage soybean rust. Chapter 14: Secondary Effects of Fungicides. Disponível em: <http://www.oardc.ohio-state.edu/soyrust/2007edition/18-SecondaryEffectsofFungicides.pdf>.

Sá LAN, Nardo EAB, Tambasco FJ (2002) Quarentena de agentes de controle biológico. In: SINDIVEG. Balanço 2015. Setor de agroquímicos confirma queda de vendas. Disponível em: <http://www.sindiveg.org.br/docs/balanco-2015.pdf>.

Sá LAN (2015) Sistema Internacional de Intercambio de Agentes para o Controle Biológico de Pragas no Agroecossistema Amazônico. In: Simpósio de Pragas Quarentenárias na Amazônia Brasileira.

Sá LAN, Pessoa MCPY (2015) Prospecção de inimigos naturais para o controle biológico de pragas agrícolas exóticas. In: Sugayama RL, Silva ML, Silva SXB, Ribeiro LC, Rangel LEP. Defesa vegetal - fundamentos, ferramentas, políticas e perspectivas. Belo Horizonte, MG: SBDA - Sociedade Brasileira de Defesa Agropecuária, 256-274.

Sá LAN, Pessoa MCPY, Moraes GJM, Prado JSM, Prado SS, Vasconcelos RM (2016) Quarantine facilities and legal issues of the use of biocontrol agents in Brazil. Pesquisa Agropecuária Brasileira 51:502-509.

Sosa-Gomez DR. AGEITEC. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soja/arvore/CONT000g0gza9sb02wx5ok026zxpgrm81896.html#>.

UNRIC. Centro Regional de Informação das Nações Unidas. Relatório da ONU mostra população mundial cada vez mais urbanizada, mais de metade vive em zonas urbanizadas ao que se podem juntar 2,5 mil milhões em 2050. Disponível em: <http://www.unric.org/pt/actualidade/31537-relatorio-da-onu-mostra-populacao-mundial-cada-vez-mais-urbanizada-mais-de-metade-vive-em-zonas-urbanizadas-ao-que-se-podem-juntar-5-mil-milhoes-em-2050>.

10

Doutor e empreendedor: os desafios para o pós-graduado abrir sua empresa de controle biológico

Henrique M. Ferro¹
Edgar Zanotto¹
Priscilla F. Pereira²
Flávio H. V. Medeiros²

O presente capítulo foi produzido pela diretoria da Biovalens (Henrique Ferro e Edgar Zanotto) e o grupo de controle biológico de doenças de plantas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (Flávio Medeiros e Priscilla Pereira), com o intuito de apresentar os desafios e os caminhos para o empreendedorismo e para a maior empregabilidade dos egressos da pós-graduação em Agronomia com áreas de concentração em fitopatologia e entomologia do Brasil.

BREVE HISTÓRICO

A Biovalens Ltda. é uma empresa que atua na pesquisa e no desenvolvimento de soluções microbiológicas para o agronegócio brasileiro, como defensivos biológicos. A empresa foi fundada em 2014, sediada no município de Rio Verde – GO e, em 2016, foi inaugurada filial em Uberaba – MG, com o ingresso de investidores.

A empresa nasceu a partir do conhecimento e da experiência dos sócios, adquiridos durante a formação acadêmica e vivência na iniciativa privada. O interesse por controle biológico de doenças de plantas surgiu em 2005, quando da realização de iniciação científica no Departamento de Fitopatologia da

¹BioValens Biotecnologia Agrícola, Distrito Agroindustrial de Rio Verde, BR 060, Km 412, Qd. 08, Lts 1/12, Cx. Postal 204, 75901-970, Rio Verde, GO, E-mail: ferro.m.henrique@gmail.com;

²Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, 37200-000, Lavras, MG

Universidade Federal de Lavras, ocasião em que foram promovidas seleção de agentes de controle biológico e otimização de processos e, posteriormente durante a pós-graduação, o desenvolvimento de formulações de defensivos biológicos. Somado a isso, experiências na iniciativa privada e consequente conhecimento de mercado permitiram aos sócios perceber a existência de empresas que investiam na comercialização de defensivos biológicos, porém, os produtos respectivos apresentavam baixa qualidade (pureza e concentração), causando prejuízo ao agricultor-consumidor. Diante disso, teve-se a iniciativa de abrir uma empresa no segmento, a Biovalens Ltda., com o desenvolvimento de novas tecnologias relacionadas ao controle microbiológico de doenças e pragas.

Além disso, a publicação do Ato nº 15/2013 do MAPA, sobre o registro emergencial de produtos para o controle da *Helicoverpa amirgera*, e a expectativa de publicação de edital para incubar empresas de bases tecnológicas na Universidade Federal de Lavras – no qual seria dada a oportunidade para os pós-graduandos e professores colaborarem com o desenvolvimento e otimização de produtos – compuseram cenário favorável ao início do empreendimento.

Embora o contexto parecesse promissor, verificou-se atraso na publicação do edital em função do atraso nas obras do Parque Tecnológico de Lavras, e assim, a sonhada fundação e incubação da Biovalens na Universidade Federal de Lavras não se concretizou.

Foi então que mais uma oportunidade surgiu para a abertura da empresa, desta feita na cidade de Rio Verde - GO. Tratou-se de um programa de incentivo à implantação de indústrias no estado de Goiás, mediante a venda subsidiada aos interessados de terreno e infraestrutura.

Tão logo instalada e com o cadastro estadual de Fabricante de Defensivos Biológicos, a Biovalens Ltda. protocolou o pedido de registro emergencial de defensivo biológico para controle da *Helicoverpa armigera* junto ao MAPA. Infelizmente, pouco tempo depois desta de ultimada a diligência, o MAPA publicou novo Ato nº 60/2014, informando que os pleitos de registros emergenciais seriam priorizados desde que atendidas as diretrizes do Decreto nº 4.074/2002, ou seja, o MAPA passou a exigir todos os laudos necessários para o registro convencional (Laudos de Eficiência e Praticabilidade Agronômica, e Laudos dos testes toxicológicos). Desta forma, a Biovalens Ltda. decidiu protocolar pedido de registro convencional do seu defensivo biológico para controle da *Helicoverpa armigera* e demais espécies de lagartas.

Posteriormente, a Biovalens Ltda. recebeu investimentos para continuar seus trabalhos em pesquisa e desenvolvimento e registrar os seis defensivos biológicos desenvolvidos pela empresa para controle das principais pragas e doenças de importância econômica à agricultura do Brasil: inseticidas, nematicida, fungicidas e bactericida biológicos.

A Biovalens Ltda., hoje, possui dois inseticidas biológicos registrados no MAPA: Bovéria-Turbo (*Beauveria bassiana* IBCB66) e Meta-Turbo (*Metarhizium*

anisopliae IBCB425). Outros quatro defensivos biológicos encontram-se em fase de registro: Bio-Imune (*Bacillus subtilis* BV-02) para controle de doenças fúngicas e bacterianas, No-Nema (*Bacillus amyloliquefaciens* BV-03) para controle de nematóides, Tricho-Turbo (*Trichoderma asperellum* BV-10) para controle de doenças fúngicas do solo e BT-Turbo Max (*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-01) para controle de lagartas.

Os defensivos biológicos Biovalens são inovadores quanto aos processos de produção e formulação, caracterizando-se pela redução do tempo de produção, aumento da produtividade, redução da mão de obra, e consequente redução do custo de produção. Ressalta-se que algumas formulações apresentam como diferencial, em relação a formulações de produtos registrados por outras empresas, a elevada concentração de propágulos dos agentes de controle biológico e elevado *shelf life* (“vida de prateleira”).

Há outros defensivos biológicos a base de microrganismos inéditos ao mercado brasileiro que se encontram em fase de desenvolvimento, aguardando investimento para registro e lançamento.

Empreendedorismo e seus desafios

Para abrir uma empresa, o maior desafio que se apresenta ao pós-graduando é ter iniciativa para buscar conhecimentos de mercado e em gestão empresarial. O aluno não é estimulado nesse sentido durante a pós-graduação, que é focada somente na formação de pesquisadores e professores. Entretanto, para o sucesso de qualquer empresa de base tecnológica, somente o conhecimento técnico-científico não é o suficiente. Conhecimentos em Gestão Empresarial são fundamentais para o desenvolvimento do plano de negócios, o qual, por seu turno, deve ser ancorado nas seguintes áreas de conhecimento: Gestão de Pessoas, Gestão Contábil Financeira, Gestão Integrada de Custos e Orçamento, Marketing, Matemática Financeira, Finanças Corporativas, Gestão da Qualidade e Processos, Gestão de Projetos, Direito do Consumidor, Gestão de Projetos, Ética e Responsabilidade Social, Gestão Estratégica, Economia Empresarial.

Tais conhecimentos podem ser adquiridos, por exemplo, via contratação de consultoria especializada, realização de curso de MBA (*Master of Business Administration*) em Gestão Empresarial ou ainda através do ingresso de sócios com experiência na área e disponibilidade para atuar no empreendimento.

Além disso, é fundamental a contratação de pessoas qualificadas nas áreas de interesse, as quais também devem ser submetidas a treinamentos específicos, pois ainda que o contratado tenha experiência na área, é necessário realizar nivelamento de conhecimentos técnicos de acordo com os objetivos da empresa.

Outro grande desafio ao recém-empendedor é a captação de recursos financeiros para a execução do plano de negócios. Há para aqueles que não dispõem de recursos financeiros próprios, basicamente, três formas de aquisição de capital,

sendo elas por meio de financiamento bancário; de investidores-anjos e de fundos de investimentos.

Quanto ao financiamento bancário, a grande dificuldade reside em oferecer a garantia real e a contrapartida exigidas pela instituição como condição para a liberação de recursos, já que é natural que o recém-empresendedor não disponha de patrimônio suficiente para tanto.

Os Investidores-Anjos, por sua vez - que normalmente “são ex-empresendedores ou executivos que já trilharam uma carreira de sucesso, acumulando recursos suficientes para alocar uma parte (normalmente entre 5% a 10% do seu patrimônio) para investir em novas empresas, bem como aplicar sua experiência apoiando a empresa” (Anjos do Brasil) - exigem que o recém-empresendedor exponha detalhes sobre os processos de produção da tecnologia para a segurança de seu investimento, o que causa certo temor ao recém empresendedor.

De outro lado, os Fundos de Investimentos - que são um tipo de aplicação financeira que reúne recursos de um conjunto de investidores (cotistas), com o objetivo de obter lucro através da compra de cotas de empresas às quais fornece auxílio de gestão empresarial - via de regra, exigem, para sua atuação, que a empresa-alvo detenha tecnologias inovadoras capazes de proporcionar-lhes o retorno financeiro planejado.

Como em todo empreendimento, é imperioso persistir face às instabilidades econômicas e políticas que recorrentemente acometem o Brasil. Porém, é sabido que, no país, graças à sua característica eminentemente voltada à produção agrícola, mesmo em um cenário de crise econômica, a agricultura é um setor que ainda cresce, bem como a demanda por defensivos biológicos de boa qualidade e eficiência.

Aspectos da indústria de defensivos biológicos

Em relação à estruturação da indústria de defensivo biológico, geralmente não existem equipamentos específicos para a produção e formulação de microrganismos, sendo necessário realizar adaptações em equipamentos utilizados em diferentes processos de outras atividades industriais, tal como os fermentadores utilizados pela indústria farmacêutica para produção de antibióticos e probióticos. Assim, é importante a integração de áreas de conhecimento em Microbiologia Industrial, Farmácia, Engenharia de Bioprocessos, Engenharia de Alimentos e Engenharia Mecânica para a definição dos equipamentos, bem como a otimização de processos de produção e formulação em larga escala de seus agentes de controle biológico.

A Biovalens Ltda. utiliza equipamentos de diversos segmentos industriais, os quais são adaptados com objetivo de otimizar os processos de produção e formulação de seus agentes de controle biológico, tornando-os economicamente viáveis e competitivos em relação à redução dos custos de produção, principalmente pela redução de tempo dos processos de produção e formulação, e aumento do rendimento da produção dos microrganismos (esporos ou endósporos). Os

equipamentos adaptados, bem como os processos otimizados envolvidos na produção de defensivos biológicos atendem às Boas Práticas de Fabricação (BPF) para, conseqüentemente, obter produtos de alta qualidade (pureza e concentração).

A escolha da região e do local para instalar a empresa ou indústria de defensivos biológicos é um fator importante a ser considerado no planejamento estratégico do empreendimento, que envolve logística de insumos e de produtos acabados, oferta de mão de obra e prestação de serviços especializados, incentivos fiscais e acesso a clientes estratégicos, principalmente no início das atividades.

Outro relevante aspecto é a constante busca, pelas empresas, por isolados ou cepas de agentes de controle biológico, sejam bactérias, fungos e vírus com eficiência para controle de doenças e pragas de plantas. Tais microrganismos, além de eficientes à sua finalidade no campo, devem possuir processos de produção e formulação em larga escala economicamente viáveis.

Esta busca é verificada de duas principais formas, sendo elas via seleção de agentes microbiológicos promovida pela própria empresa ou através de parcerias, sobretudo com instituições públicas de pesquisa, para a transferência de cepas.

A Biovalens Ltda., em particular, possui sua própria coleção de agentes de controle biológico (fungos e bactérias) proveniente de solo rizosférico de diversas culturas, estruturas de patógenos, insetos e outros. Também possui cepas provenientes de parceria técnico-científica com o Instituto Biológico. Outras cepas estão em negociação com Universidades e Instituições de Pesquisa para a realização de sua transferência à Biovalens Ltda.

Infelizmente, as coleções de cepas de algumas Instituições de Pesquisa e Universidades não atendem às exigências da nova Lei da Biodiversidade (Lei nº 13.123/2015) e os pesquisadores responsáveis pelas coleções não possuem interesse em regularizá-las pelo receio de sofrerem sanções, tal como ocorre atualmente com a Universidade Federal de Lavras.

Não obstante, ainda há que se considerar que cada Instituição de Pesquisa deve estar a par da nova Lei da Biodiversidade, que rege sobre as regras para a transferência de cepas às empresas de controle biológico e que tem dificultado a transferência de isolados das instituições de pesquisa públicas às empresas.

Há, no entanto, exemplos de sucesso na transferência da tecnologia gerada. O Instituto Biológico possui um modelo de transferência de cepas prático e rápido, em que é celebrado um contrato técnico-científico que prevê que pesquisadores envolvidos com o desenvolvimento da tecnologia não apenas transferem a cepa mas também oferecem treinamento quanto ao bom uso da tecnologia para a qual foi desenvolvida; Já a Universidade Federal de Lavras transfere juntamente com a cepa a tecnologia de produção e/ou formulação do defensivo biológico. Entretanto, ainda não foram definidos os instrumentos jurídicos para tal finalidade.

A Biovalens Ltda. possui projeto para ampliar suas parcerias com Instituições Públicas e Privadas de Pesquisa, visando tanto à aquisição de novos agentes microbiológicos de controle de doenças e pragas, quanto ao desenvolvimento de

novos processos de produção e formulação de defensivos biológicos inovadores para a agricultura, seja com recursos próprios ou através de submissão de projetos, via editais, a órgãos de fomento à pesquisa que permitam a parceria público-privada, como FINEP, FAPEMIG, FAPEG e CNPq.

No entanto, antes de celebrar qualquer parceria técnico-científica é necessário a fixação de institutos legais a fim de proporcionar segurança jurídica aos envolvidos. A celebração de contrato, por exemplo, pode garantir a futura transferência de cepas e tecnologias desenvolvidas nas pesquisas à empresa interessada com exclusividade ou não, bem como o financiamento do projeto de pesquisa e a concessão de *royalties* à Instituição de Pesquisa.

Uma vez acordado o repasse da tecnologia, a parceria público-privada pode contribuir para a formação de recursos humanos (mestres e doutores) e para a exposição do pós-graduando ao mercado de trabalho, despertando-o para o empreendedorismo na ciência ou aumentando suas chances de empregabilidade como pesquisador também no setor privado.

Mercado de defensivos biológicos para novas empresas

No Brasil, hoje, as empresas de controle biológico tem um papel fundamental na divulgação de novas tecnologia relacionadas ao manejo de doenças e pragas de plantas. Tal se dá em função da carência de infraestrutura de órgãos públicos de extensão rural, cuja ausência é suprida pelo setor privado. Nos últimos anos, as empresas de controle biológico já consolidadas no mercado vêm realizando trabalhos nesse sentido, apresentando ao agricultor-consumidor suas tecnologias. Um exemplo clássico deste trabalho de divulgação é o consenso entre agricultores de que a alternativa biológica para o manejo do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) é o uso de *Trichoderma* spp. (principalmente *T. harzianum* e *T. asperellum*), visando a colonização de escleródios e a consequente redução na emissão de apotécios.

Entretanto, como em qualquer mercado, o mercado de defensivos biológicos está sujeito à circulação de produtos de baixa qualidade, o que compromete a eficiência e a credibilidade de toda a tecnologia. Algumas empresas no passado, comercializaram produtos de baixa qualidade e/ou recomendavam erroneamente as aplicações de agentes de controle biológico nas lavouras, gerando prejuízos aos agricultores, e consequentemente, descrédito da tecnologia. Por esta razão, muitos agricultores têm receio em adquirir a tecnologia, principalmente quando oriunda de novas empresas.

O ingresso de produtos cuja marca é desconhecida no mercado encontra resistência por parte do agricultor-consumidor, mesmo quanto àquele que faz uso de agentes de controle biológico amplamente divulgados no mercado (Ex.: *Trichoderma* spp.).

Neste cenário, empresas novas devem adotar estratégias para desenvolver o mercado, como: a) exposição da qualidade de seus produtos quanto à pureza,

concentração e formulação; b) orientação técnica de qualidade para que a eficiência do produto no campo seja garantida e; c) atendimento pós-venda com avaliação dos resultados e apresentação aos agricultores.

Em se tratando de produtos inéditos, o trabalho de divulgação adquire especial relevância, necessitando de elevados investimentos, o que dificulta a entrada de pequenas empresas de controle biológico no mercado.

Quanto às grandes empresas, geralmente, possuem elevados recursos financeiros destinados à divulgação de seus produtos, sejam eles inovadores ou pertencentes ao portfólio de produtos já estabelecidos no mercado. Outro fator facilitador são os canais de distribuição de produtos já consolidados nas principais áreas agrícolas do país, o que possibilita atingir um maior número de agricultores-consumidores.

Outro importante aspecto do mercado de defensivos biológicos no Brasil é a regionalização da utilização de determinados agentes de controle biológico de doenças devido à regionalização de seus alvos biológicos (patógenos), como os que causam doenças radiculares (fungos e nematóides). Quanto aos defensivos a base de agentes de controle biológico de pragas (Ex.: *Bacillus thuringiensis*), geralmente, não há regionalização, devido à alta capacidade de disseminação e de ataque às diversas espécies de plantas, como o caso de determinadas lagartas (Ex.: *Helicoverpa armigera*).

Também é importante destacar que, como em toda atividade econômica, verificam-se práticas de concorrência desleal no setor de defensivos biológicos, a saber:

- 1) Comercialização de produtos sem registro e sem qualquer iniciativa por parte da empresa de registrá-los como defensivos biológicos;
- 2) Comercialização de produtos recomendados na prática para controle de doenças, mas registrados como fertilizantes ou inoculantes, podendo apresentar formulação adulterada pela adição de agentes de controle microbiano de doenças (Ex.: fertilizantes) ou possuir microrganismos com mecanismos de ação voltados para o controle de doenças (Ex.: inoculantes);
- 3) Comercialização de produtos em processo de registro como defensivos biológicos.

No primeiro caso não há nenhum investimento em registro; no segundo, há um investimento muito inferior àqueles destinados ao registro como defensivos biológicos. Em ambos os casos, os produtos são comercializados com preços abaixo do praticado no mercado ou, ainda que comercializados com preços de mercado, remanesce capital para investimento no setor comercial, aumentando sua competitividade em relação às empresas idôneas, que investem no registro de seus produtos como defensivos biológicos.

É importante destacar que quando o agricultor-consumidor adquire os produtos tais como descritos nos primeiro e segundo casos, não lhe é dada nenhuma garantia legal de sua qualidade (pureza e concentração) e eficiência, podendo causar prejuízos econômicos.

No terceiro caso, a empresa realiza todos os investimentos necessários para atender às exigências dos órgãos reguladores (ANVISA, IBAMA e MAPA), como laudos de eficiência agrônômica e testes toxi-ecotoxicológicos, entretanto comercializa seus produtos durante o processo.

Para o registro de um produto como defensivo biológico o investimento, hoje, está em torno de R\$ 400.000,00, nestes incluídos contratação de consultorias, de ensaios para emissão de Laudos de Eficiência e Praticabilidade Agrônômica e de testes eco-toxicológicos, sem considerar os custos com pesquisa.

Nota-se que, nos últimos cinco anos, têm sido inauguradas empresas com maior conhecimento técnico e comprometimento com a comercialização de produtos de qualidade. Algumas empresas, no passado, preocuparam-se, de início, com o levantamento de capital em detrimento da qualidade dos produtos comercializados e de recomendações técnicas adequadas para sua finalidade. Eis que, esta prática acabou por comprometer a credibilidade dos defensivos biológicos no campo, constituindo, hoje, um desafio para as empresas idôneas introduzir a tecnologia no manejo de doenças e pragas.

Existe potencial a ser explorado, sobretudo quanto aos defensivos biológicos voltados ao controle de pragas e doenças causadores de grande prejuízo econômico para a agricultura do país.

Em Agosto deste ano, o MAPA publicou a Portaria nº 82/2016 listando as doenças e pragas de maior risco fitossanitário e importância econômica para agricultura do país: Ferrugem da Soja (*Phakopsora pachyrhizie*), Mofo Branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), *Helicoverpa armigera*, Mosca Branca (*Bemisia tabaci*), Nematóides (*Meloidogyne javanica*, *M. incognita*, *Heterodera glycines* e *Pratylenchus brachyurus*), Broca do Café (*Hypothenemus hampei*) e Bicudo do algodoeiro (*Antonomus grandis*). Tal Portaria dispõe que haverá prioridade na avaliação dos processos de registros de defensivos para o controle das doenças e pragas listadas, mas assim como para *H. armigera*, estas prioridades podem mudar a cada ano.

CONCLUSÃO

Para o sucesso do empreendimento, apenas ter conhecimento técnico-científico não é o suficiente, sendo necessário motivação, persistência, planejamento, parcerias sólidas em diversas áreas, investimento em pessoas, investimento financeiro para execução do plano de negócios.

A criação de indústria de defensivos biológicos depende de inúmeros fatores, em especial: a) investimento em infraestrutura e adaptação de equipamentos destinados

a outros setores industriais, dada a inexistência de equipamentos específicos para produção em larga escala de determinados microrganismos e sua devida formulação; b) ambiente adequado para sua instalação, que favoreça a logística de insumos e de produtos acabados, que possua oferta de mão de obra e prestação de serviços especializados e que ofereça incentivos fiscais; c) disponibilidade de cepas, podendo estas advir de coleção própria ou mediante aquisição de terceiros (Instituições de Pesquisas e Universidades); d) elevado investimento em registro de produtos; e) elevado investimento na área comercial e em *marketing*.

Ultimadas essas diligências, a comercialização dos defensivos biológicos ainda encontra desafios, tais como a resistência apresentada pelo agricultor-consumidor em adotar a tecnologia, sobretudo por razões históricas; a implementação de estratégias de desenvolvimento de mercado adequadas para cada região; a consolidação da marca no mercado, mesmo diante da concorrência, seja ela desleal ou não.

É neste cenário que a Biovalens Ltda. vem evoluindo, apresentando-se como uma empresa ainda incipiente, porém comprometida com o desenvolvimento de soluções microbiológicas sustentáveis, inovadoras e de alta eficiência, visando a sua consolidação no mercado pela excelência de seus produtos, sem descuidar de valores como ética, responsabilidade, eficiência, inovação e sustentabilidade, sobre os quais pautava sua atuação.

11

How microbiome approaches can assist the biological control of plant diseases

Gabriele Berg¹
Tomislav Cernava²
Henry Müller³

ABSTRACT

The microbiome is a crucial factor for plant growth and health. All plants are meta-organisms or so called holobionts characterized by a close symbiotic relationship with their microbiome as well as a functional interplay of all organisms. These new perspectives influence applied fields such as biocontrol of plant diseases in agriculture. The development of new tools may impact i) the detection of new bio-resources for biocontrol and plant growth promotion, ii) the optimization of fermentation and formulation processes for biologicals, iii) stabilization of the biocontrol effect under field conditions and iv) risk assessment studies for biotechnological applications. Examples are presented and discussed for the applications mentioned above, as well as an illustration of the global importance of next-generation bio-products as a sustainable alternative for agriculture.

INTRODUCTION

In 1904, more than 100 years ago, Lorenz Hiltner defined the term ‘rhizosphere’ as root-surrounding soil influenced by root exudates (Hartmann et al. 2008). In addition, he discovered the importance of microbial root inhabitants for plant growth and health. Since that time, much has been learned about microorganism and

¹Institute of Environmental Biotechnology, Graz University of Technology, 8010 Graz, Austria, E-mail: gabriele.berg@tugraz.at; ²Austrian Centre of Industrial Biotechnology (ACIB GmbH), 8010 Graz, Austria; ³BioTenzz GmbH, 8010 Graz, Austria

plant host interactions, especially in recent years by means of new next-generation sequencing (NGS) techniques, ‘omics’-technologies, and microscopic methods (Leveau 2007; Sorenson et al. 2009; Jansson et al. 2011; Berendsen et al. 2012). The rhizosphere is of central importance not only for plant nutrition, health, and quality, but also for microorganism-driven carbon sequestration, ecosystem functioning, and nutrient cycling in terrestrial ecosystems. A multitude of biotic and a-biotic factors influence the structural and functional diversity of microbial communities in the rhizosphere (rev. in Berg and Smalla 2009). For example, microorganisms’ response to root exudates and root morphology was shown to shape rhizosphere microbial communities (Smalla et al. 2001; Berg et al. 2005c, 2006, Bais et al. 2006). In addition, plant defense signaling plays a role in this process as well (Doornbos et al. 2012). Soil is the main reservoir for rhizosphere microorganisms (Hartmann et al. 2009), and many secrets and theories of microbial life in the rhizosphere were recently uncovered or confirmed due to the enormous progress in molecular and microscopic techniques. Haichar et al. (2008) used a stable isotope probing (SIP) approach to show that plant host habitat and root exudates shape the soil bacterial community structure. In another example, Lundberg et al. (2012) as well as Bulgarelli et al. (2012) revealed that only a subset of the bacterial community in the soil is present around the plant roots of *Arabidopsis thaliana*. Root exudates were identified as the major driving forces in the regulation of microbial diversity and activity, while bulk soil is considered as main source of the species richness (Chaparro et al. 2014). Noteworthy, the rhizosphere community assembly was found to be based more on functional signatures rather than on species (Mendes et al. 2014; Panke-Buisse et al. 2014). However, all these results reveal a new perspective on plants: they are meta-organisms comprised of the plants themselves and all microbial inhabitants.

Not only is the densely colonized rhizosphere important, but each plant is also home to a complex and distinctive community of microbes consisting of billions of inhabitants (Berg et al. 2016). Each plant can be divided into different micro-environments: the endorhiza (root), the phyllosphere (leaves), the spermosphere (seeds), the carposphere (fruit) etc., and we generally differentiate between the endosphere and ectosphere (Ryan et al. 2008). All these micro-environments provide specific biotic and a-biotic conditions for microbial life. However, an interesting question concerns the origin of the microbial inhabitants on plants as they seem to come from different sources. While soil is the main reservoir for rhizosphere microorganisms, a sub-set of rhizosphere inhabitants is also able to colonize the endorhiza (Berg et al. 2005b). Endophytes were long believed to originate only from the rhizosphere and soil, but molecular studies have shown that the above ground plant parts can be invaded by microbes as well (Berg et al. 2005b). New methods also revealed that seeds are colonized not only by (dormant) pathogenic bacteria, but they also harbor a beneficial seed microbiome. In addition, generative organs like pollen (Fürnkranz et al. 2012) and moss sporophytes (Bragina et al.

2012) harbor a core, beneficials-containing microbiome. Plants are in constant contact with diverse microbes blown by the wind or delivered via the water cycle, and some of them settle down and survive.

The potential of next-generation bio-products

Plant microbiome discoveries could fuel advances in sustainable agriculture (Berg 2009; Hirsch & Mauchline 2012), such as the development of microbial inoculants as biofertilizers, biocontrol, or stress protection products (Berg 2009, Berg et al. 2013). Although we recognize a strongly growing market for these bio-products, they still have their problems, e.g. short shelf-life, inconsistent effects under field conditions, and risk predictions. Therefore mainly spore-forming microorganisms are currently on the market or in the development pipeline. The real potential of the plant microbiome therefore remains completely untapped. The application of ‘omics’-technologies has allowed for an enormous progression in the development of so-called next-generation bio-products (Köberl et al. 2012). In this field, new tools may have an impact on i) the detection of new bio-resources for biocontrol and plant growth promoting agents, ii) the optimization of fermentation and formulation processes for biologicals, iii) stabilization of the biocontrol effect under field conditions and iv) risk assessment studies for biotechnological applications. Several examples are given below.

New biocontrol and plant growth promotion agents can be selected from natural environments and other unaffected ecosystems. Natural habitats, especially nature conservation areas, are characterized by a high diversity of plants. Due to the correlation of above- and below-ground variety, a high microbial diversity can be expected (van der Heijden et al. 1998). Moreover, natural habitats typically have a low number of pathogens, so the general rule of diversity versus pathogenicity would suggest a higher rate of biocontrol and plant growth promotion agents in such environments. This hypothesis could be confirmed with high proportions of potential antagonists from such habitats, e.g. associated with mosses (Opelt et al. 2007), with endemic plants from nature conservation areas (Zachow et al. 2009; 2016) or with the hemi-parasitic plant mistletoe (Berg et al. 2012). Agricultural systems, especially monocultures under intense management, often have a lower microbial diversity with the exception of suppressive soils where the microbial community responds to mono-cultivation by enhancing biocontrol and plant growth promotion bacteria against a specific pathogen (Mazolla 2002). These suppressive soils are also an excellent source of new antagonists as already shown for wheat monocultures (Weller et al. 2002) and intense sugar beet cultivation (Mendes et al. 2012). Organically managed systems contain a high proportion of indigenous beneficials in comparison to conventional agriculture (Schmid et al. 2011, Köberl et al. 2011). Lichens were utilized as more exotic bio-resource of beneficial bacteria.

These long-living symbiotic meta-organisms often adapt to extreme a-biotic conditions and harbor a high proportion of antagonists to protect themselves against fungal parasites (Cernava et al. 2015; Grube et al. 2012, 2015). Conversely, *Sphagnum* mosses are dominant components in ombrotrophic bog ecosystems and are densely colonized by plant growth promoting bacteria. In this nutrient-limited environment, bacteria help the plants survive by providing nitrogen, phosphate, minerals, and plant growth hormones (Bragina et al. 2014). An enormous potential of specific biocontrol agents was opened by the result that breeding influenced the structure and function of the microbiome (Peiffer et al. 2013; Cardinale et al. 2014). In conclusion, it is important to understand the ecological background of ecosystems and the function of the microbiome therein to select sufficient beneficials.

Risk assessments are currently one of the greatest obstacles in bio-product registration (Ehlers 2011). They are cost-intensive, time-consuming, and often inefficient without considering the specific features of bio-products. In order to resolve this issue, an intensive network between administration, industry, and research is required. However, the new tools also strongly influence this field and will hopefully lead to not only a higher registration rate, but also to prevent outbreaks by opportunistic pathogens which sometimes also harbor the required antagonistic traits (Berg et al. 2005a). Genome sequencing of biocontrol agents optimized production processes and was also utilized to identify new potential modes of action and risks factors. For example, the stress protection agent (SPA) *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405^T has great potential for applications in biotechnology and biological control due to its ability to both promote plant growth and protect roots against biotic and a-biotic stresses (Egamberdiyeva et al. 2011), yet little is known about its mode of action. Antibiotics, lytic enzymes, and osmoprotective substances were previously identified (Roder et al. 2005; Ryan et al. 2009), but now new mechanisms associated with osmotic stress were identified using a transcriptomic approach. As such, the production and excretion of glucosylglycerol (GG) were found as remarkable mechanisms for the stress protection of this *Stenotrophomonas* strain (Alavi et al. 2013). Moreover, spermidine, a plant growth regulator, was also newly identified as a protector against stress. For registration as a stress protection agent, these results are very important because they show that no potential pathogenicity factor is involved in this beneficial interaction as this species is very closely related to the opportunistic pathogen *S. maltophilia*, which is also of plant-associated origin. To detect significant differences between both species, we used comparative genomics as well as transcriptomic and physiological approaches (Alavi et al. 2013). Overall, there is a high degree of sequence similarity between the genomes of the plant and human associated *Stenotrophomonas* strains with a notable similarity in potential factors responsible for pathogenicity and antibiotic resistance. However, several virulence factors, heat shock proteins, and antibiotic resistance genes were absent in DSM14405^T but instead possess unique genes for

the synthesis of plant-protective spermidine, plant cell-wall degrading enzymes, and resistance against high salinities. Moreover, bacterial growth at 37 °C was identified as a very simple method to differentiate between the pathogenic and non-pathogenic isolates as DSM14405^T is not able to grow at this human-relevant temperature due to the missing heat shock and other unknown proteins. This is the first example for predicting the risk of beneficials using a combined approach including ‘omics’-techniques.

CONCLUSIONS

New tools based on NGS techniques have revolutionized our knowledge on the plant microbiome as well as on biocontrol of plant diseases. Next-generation bio-products with consistent effects can be developed by considering this knowledge. Moreover, these new results will also support interdisciplinary approaches such as combined biocontrol and breeding strategies.

LITERATURE CITED

- Alavi P, Starcher MR, Zachow C, Müller H, Berg G (2013) Root-microbe systems: the effect and mode of interaction of Stress Protecting Agent (SPA) *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405T. *Front Plant Sci.* 4:141.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 233–266.
- Berendsen RL, Pieterse CM, Bakker PA (2012) The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* 17:478–86.
- Berg G, Eberl L, Hartmann A (2005a) The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ. Microbiol.* 7:1673–85.
- Berg G, Krechel A, Ditz M, Sikora RA, Ulrich A, Hallmann J (2005b) Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51:215–29.
- Berg G, Zachow C, Lottmann J, Götz M, Costa R, Smalla K (2005c) Impact of plant species and site on rhizosphere-associated fungi antagonistic to *Verticillium dahliae* Kleb. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4203–4213.
- Berg G, Opelt K, Zachow C, Lottmann J, Götz M, Costa R, Smalla K (2006) The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56:250–261.
- Berg G (2009) Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84:11–18.

Berg G, Smalla K (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68:1–13.

Berg G, Hartenberger K, Liebminger S, Zachow C (2012) Antagonistic endophytes from mistletoes as bio-resource to control plant as well as clean room pathogens. *IOBC/wprs Bulletin.* 79:29–32.

Berg G, Zachow C, Müller H, Phillips J, Tilcher R (2013) Next-generation bio-products sowing the seeds of success for sustainable agriculture. *Agronomy.* 3:648-656.

Berg G, Rybakova D, Grube M, Köberl M (2016) The plant microbiome explored: implications for experimental botany. *J Exp. Botany.* 67:995-1002.

Bragina A, Berg C, Cardinale M, Shcherbakov A, Chebotar V, Berg G (2012) *Sphagnum* mosses harbour highly specific bacterial diversity during their whole lifecycle. *ISME J.* 6:802–813.

Bragina A, Oberauner-Wappis L, Halwachs B, Zachow C, Müller H, Thallinger G, Berg G (2014) The *Sphagnum* microbiome supports bog ecosystem functioning under extreme conditions. *Molecular Ecology* 23:4489-4851.

Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, Ver Loren van Themaat E, Ahmadinejad N, Assenza F et al. (2012) Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature.* 488:91–95.

Cardinale M, Grube M, Erlacher A, Quehenberger J, Berg G (2014) Bacterial networks and co-occurrence relationships in the lettuce root microbiota. *Environ Microbiol.* 239–52.

Cernava T, Müller H, Aschenbrenner IA, Grube M, Berg G (2015) Analyzing the antagonistic potential of the lichen microbiome against pathogens by bridging metagenomic with culture studies. *Front Microbiol.* 6:620.

Chaparro JM, Badri DV, Vivanco JM (2014) Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *ISME J.* 8:790-803.

Doornbos RF, Van Loon LC, Bakker PAHM (2012) Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. *Agron. Sustain.* 32:227–243.

Ehlers RU (2011) *Regulation of Biological Control Agents.* Springer.

Egamberdieva D, Kucharova Z, Davranov K, Berg G, Makarova N, Azarova T et al. (2011) Bacteria able to control foot and root rot and to promote growth of cucumber in salinated soils. *Biology and Fertility of Soils.* 47:1–9.

Fürnkranz M, Lukesch B, Müller H, Huss H, Grube M, Berg G (2012) Microbial diversity inside pumpkins: microhabitat-specific communities display a high antagonistic potential against phytopathogens. *Microb. Ecol.* 63:418–28.

Grube M, Cardinale M, Vieira de Castro Junior J, Müller H, Berg G (2009) Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbiosis. *ISME J.* 3:1105–1115.

Grube M, Cernava T, Soh J, Fuchs S, Aschenbrenner I, Lassek C, Wegener U, Riedel K, Sensen CW, Berg G (2015) Exploring a functional network of symbiotic sustain with the microbiome of lichens and comparative omics. *The ISME J.* 9:412-24.

Haichar FZ, Marol C, Berge O, Rangel-Castro JI, Prosser JI, Balesdent J et al. (2008) Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME J.* 2:1221–1230.

Hartmann A, Rothballer M, Schmid M (2008) Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil.* 312:7–14.

Hartmann A, Schmid M, Van Tuinen D, Berg G (2009) Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil.* 321:235–257.

Hirsch PR, Mauchline TH (2012) Who's who in the plant root microbiome? *Nat. Biotechnol.* 30:961–962.

Jansson JK, Neufeld JD, Moran MA, Gilbert JA (2012) Omics for understanding microbial functional dynamics. *Environ. Microbiol.* 14:1–3.

Köberl M, Ramadan EM, Roßmann B, Staver C, Fürnkranz M, Lukesch B et al. (2012) Using ecological knowledge and molecular tools to develop effective and safe biocontrol strategies. In “Pesticides in the Modern World / Book 5”.

Köberl M, Müller H, Ramadan EM, Berg G (2011) Desert farming benefits from microbial potential in arid soils and promotes diversity and plant health. *PloS ONE.* 6:24452–24452.

Leveau JHJ (2007) The magic and menace of metagenomics: prospects for the study of plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119:279–300.

Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, Yourstone S, Gehring J, Malfatti S et al. (2012) Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature.* 7409:86–90.

Mazzola M (2002) Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 81:557–564.

Mendes R, Kruijt M, De Bruijn I, Dekkers E, Van der Voort M, Schneider JHM et al. (2012) Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science.* 332: 1097–1100.

Mendes LW, Kuramae EE, Navarrete AA, van Veen JA, Tsai SM (2014) Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. *ISME J.* 8:1577–87.

Opelt K, Berg C, Berg G (2007) The bryophyte genus *Sphagnum* is a reservoir for powerful and extraordinary antagonists and potentially facultative human pathogens. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61:38–53.

Panke-Buisse K, Poole AC, Goodrich JK, Ley RE, Kao-Kniffin J (2014) Selection on soil microbiomes reveals reproducible impacts on plant function. *ISME J.* 9:980–98.

Peiffer JA, Spor A, Koren O, Jin Z, Tringe SG, Dangl JL, Buckler ES, Ley RE (2013) Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *PNAS.* 110:6548–6553.

Roder A, Hoffmann E, Hagemann M, Berg G (2005) Synthesis of the compatible solutes glucosylglycerol and trehalose by salt-stressed cells of *Stenotrophomonas* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 7:1853–1858.

Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN (2008) Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol. Lett.* 278:1–9.

Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, Taghavi S, Crossman L, Avison MB et al. (2009) The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat. Rev. Microbiol.* 7:514–525.

Schmid F, Moser G, Müller H, Berg G (2011) Functional and structural microbial diversity in organic and conventional viticulture: organic farming benefits natural biocontrol agents. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:2188–2191.

Sorensen J, Hauberg Nicolaisen M, Ron E, Simonet P (2009) Molecular tools in rhizosphere microbiology – from single-cell to whole-community analysis. *Plant Soil.* 321:483–512.

Smalla K, Wieland G, Buchner A, Zock A, Parzy J, Kaiser S et al. (2001) Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4742–4751.

Van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T et al. (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature.* 396:69–72.

Weller DM, Raaijmakers JM, McSpadden Gardener BB, Thomashow LS (2002) Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:309–348.

Zachow C, Berg C, Müller H, Meincke R, Komon-Zelazowska M, Druzhinina IS et al. (2009) Fungal diversity in the rhizosphere of endemic plant species of Tenerife (Canary Islands): relationship to vegetation zones and environmental factors. *ISME J.* 3:79–92.

Zachow C, Berg C, Monk J, Berg G (2016) Endemic plants harbour specific *Trichoderma* communities with an exceptional potential for biocontrol of phytopathogens. *J Biotechnology*, online.

12

Benefits and potential pitfalls of *Trichoderma* use for plant protection as revealed from its ecological genomics

Irina S. Druzhinina

Why to study ecological genomics of *Trichoderma*

The major ecological niche of mycotrophic fungi from the large and relatively well studied genus *Trichoderma* (Hypocreales, Ascomycota) is associated with sporocarps of other fungi and predegraded dead wood (Druzhinina et al., 2011). This conclusion is supported by comprehensive taxonomic and ecological surveys of *Trichoderma* in Central and South Europe recently performed by Walter M. Jaklitsch (2009, 2011) whose work along with contribution of other taxonomists resulted the establishment of the *Trichoderma* diversity profile consisting of more than 250 molecularly defined species (Bissett et al., 2015). Despite being mainly mycotrophic and/or secondary colonizers of wood, *Trichoderma* fungi are widely considered as plant-beneficial microorganisms because several species have high potential of environmental opportunism and therefore can establish in bulk soil and possess profound rhizosphere competence (see also Druzhinina and Kubicek, 2013 for references). These are not more than two dozen species (ca. 10-12% of the total diversity of the genus) that are cosmopolitan, highly mycoparasitic and competitive. They can be easily isolated from numerous natural and artificial habitats including living or dead fungi, wood, soil, phyllo- and rhizospheres, aquatic ecosystems, indoor specimens and, less frequently, biological tissues (as endophytes and/or pathogens of animals). Consequently, most of domesticated *Trichoderma* species belong to this active minority and are used as agents of biological control of plant pathogenic fungi (biofungicides). In rhizosphere these fungi also behave as *biofertilizers* as

¹Institute of Chemical Engineering, Research Area Biochemical Technology, Microbiology Group, TU WIEN, Gumpendorferstrasse 1a, A1060, Vienna, Austria. E-mail: irina.druzhinina@tuwien.ac.at

they stimulate plant growth and elicit a general plant defense reaction against fungal pathogens (Druzhinina et al., 2011; Galletti et al., 2015; Harman, 2011; Kotasthane et al., 2015). In the later context it is important to note that some *Trichoderma* spp. have been also isolated as endophytes – symptomless and usually beneficial associates of plants (Bae et al., 2009; Bongiorno et al., 2015; Chaverri et al., 2015; Gazis and Chaverri, 2010; Rosmana et al., 2015). Unique characteristics of opportunistic *Trichoderma* species place the entire genus in focus of the research on the development of novel biofungicides and biofertilizers for application in agriculture for plant protection and plant growth promotion, respectively.

The genus-wide phylogenetic analysis of *Trichoderma* revealed that the ability to environmental opportunism is polyphyletic as most infrageneric clades contain such species (Figure 1). Recent studies demonstrate that environmental opportunism of *Trichoderma* also includes the ability to interact with animals including humans. It is now evident that not only members of the one infrageneric group – *Trichoderma* Section *Longibrachiatum*, but nearly all most common and efficient in biocontrol *Trichoderma* species may also become opportunistic pathogens of humans (Sandoval-Denis et al., 2014) (Figure 1). Moreover, several species from the *Harzianum* clade of *Trichoderma* such as *T. aggressivum*, *T. pleuroti*, *T. pleuroticola* and several new species from the previous *T. harzianum* species complex revised by Chaverri et al. (2015) as well as members of the other groups such as *T. mienum*, *T. atroviride*, *T. longibrachiatum*, *T. asperellum* are known as causative agents of a green mold disease of mushroom farms world-wide (Hatvani et al., 2007; Komon-Zelazowska et al., 2007; Kredics et al., 2010; Kim et al., 2012). Figure 1 shows that those several most common *Trichoderma* species with high potential for environmental opportunism are also those that attract our attention as agents of biological control and, at the same time, as pathogens of humans and mushrooms. Unfortunately, adverse and beneficial impacts of *Trichoderma* on humankind are usually studied by non-overlapping scientific communities what results in introduction of such well documented human pathogens as *T. longibrachiatum* as biocontrol agents what, for example, is presented by Zhang et al (2014; 2015a), Ruocco et al. (2015). The task of the ecological genomic investigation of *Trichoderma* is the study of its evolution, genus-wide ecology and genomic structure in order to understand the biology of the fungus, to optimize and improve *Trichoderma*-based biocontrol formulations and, last not least, to give realistic estimations to the potential risks associated with this potentially aggressive microorganism.

Evolutionary neighborhood of *Trichoderma*

Along with *Trichoderma*, the order Hypocreales from the class of Sordariomycetes contains other relatively well studied mycoparasitic fungi such as *Hypomyces*, *Escovopsis* and *Clonostachys*. The whole genome sequences have been obtained for several of their species (Fravel, 2006; Gruber et al., 2011;

Karlsson et al., 2015; Kubicek et al., 2011; de Man et al., 2015; Martinez et al., 2008; Studholme et al., 2013; Xie et al., 2014). However, the order Hypocreales cannot be considered as fungicolous. Hypocrealean fungi show widely diverse trophic associations with plants, animals and other fungi and are also capable to saprotrophic growth (Sung et al., 2008). The most common animal hosts for fungi from Clavicipitaceae, Cordycipitaceae and Ophiocordycipitaceae families of the order are insects (Kobayasi 1941; Mains 1958; Sung et al., 2008). Nectriaceae and Bionectriaceae mainly feed on living plants (Sung et al., 2007). Only the family Hypocreaceae is dominated but mycotrophic genera such as *Trichoderma*, *Hypomyces* and *Escovopsis*. Despite that some nutritional preferences correlate with evolutionary structure in Hypocreales order, Sung et al., 2008 showed several shifts from feeding on one substrate to another. For example, the shift to fungicolous nutrition occurred several times during the evolution of Hypocrealean fungi.

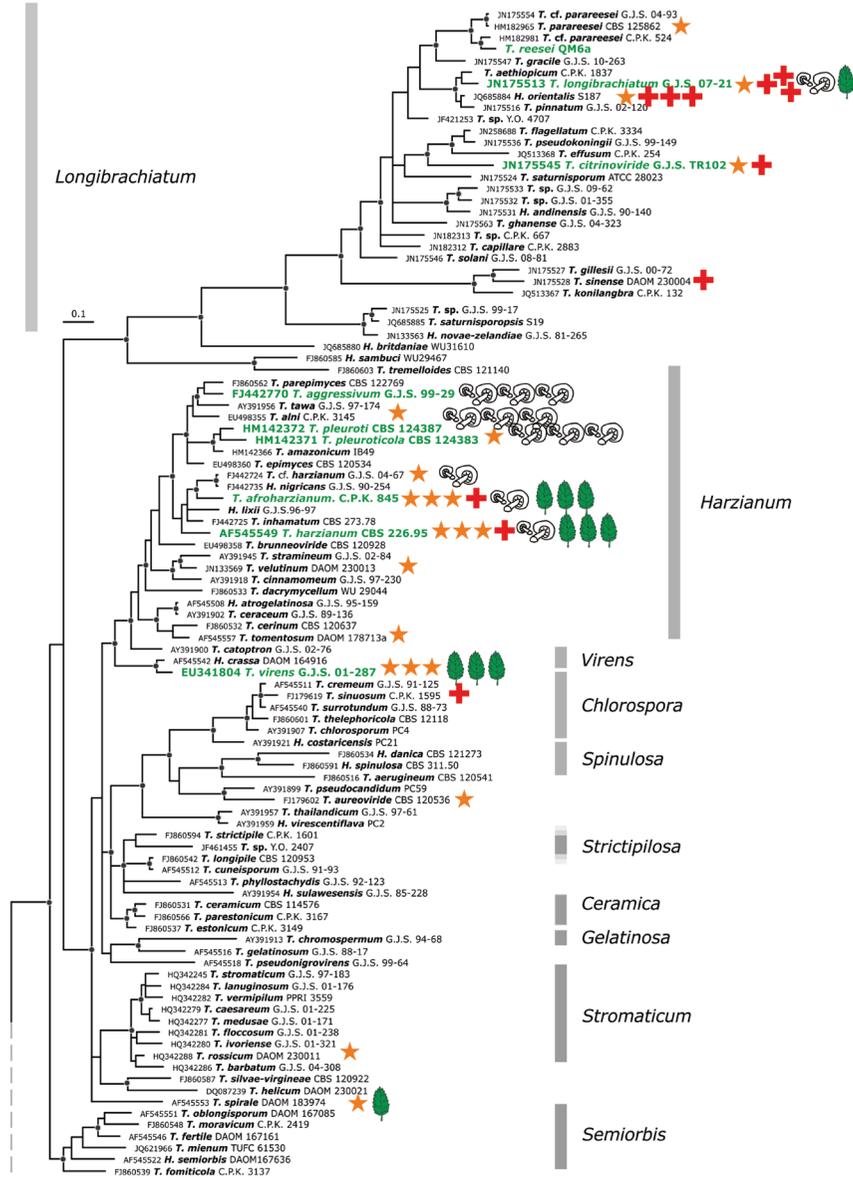


FIGURE 1 - cont.

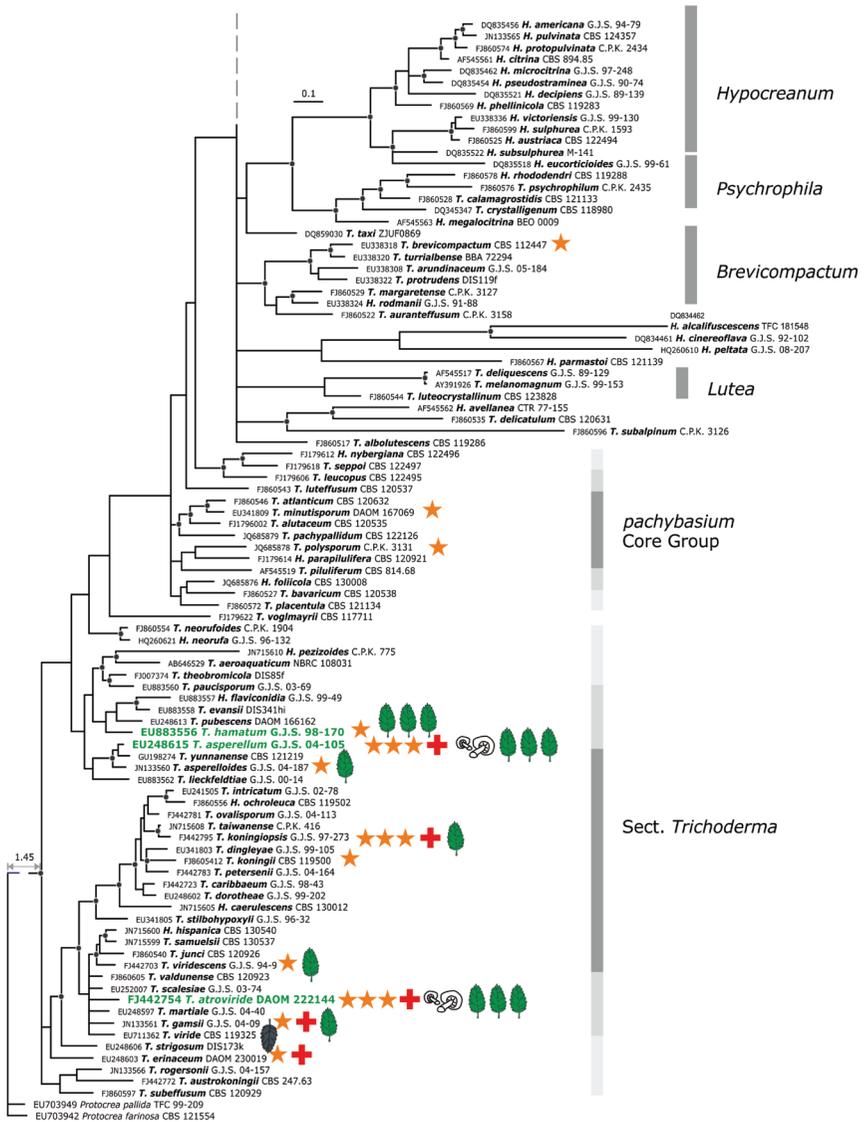


FIGURE 1 - The core diversity of the genus *Trichoderma* and the position of environmental opportunistic (yellow star) species, species that have been recorded as opportunistic pathogens of immunocompromised human (red cross), species that are most frequently used for plant protection and growth promotion (green leaf), species that have been reported as plant pathogens (brown leaf) and species that cause green mold disease on mushroom farms (mushroom). Three symbols of the same kind stress the prominent position of the species in this habitat. The Bayesian tree was inferred from the alignment of 808 nucleotides of the *rpb2*

gene for 196 sequences retrieved from NCBI GenBank by Atanasova et al., 2013a. Nodes supported with posterior probabilities above 0.94 are marked by black circles. Vertical bars correspond to infrageneric clades recognized in the genus. Note, that based on Bissett et al. (2015) there are at least 60 more species present in the genus. Green font labels species with whole genomes sequenced by August 2016.

It is likely that mycoparasitic *Clonostachys* (Bionectriaceae) that are closely related to plant-pathogenic *Fusarium* (Nectriaceae), obtained this possibility diverging from a plant-feeding host, while ancestors of *Trichoderma*, *Verticillium* and *Escovopsis* likely evolved from animal pathogens. This fact aligns well with the ability of several *Trichoderma* species. To interact with animals. It is likely that *Trichoderma* inherited genes required for such interactions however, more investigations on mechanisms are required. Our most recent data indicate that *Trichoderma* and *Escovopsis* share the most recent ancestor with carnivorous families of hypocrealean fungi (Druzhinina, Chenthamara, unpublished) what correlates well with the ability of opportunistic *Trichoderma* species to become pathogens of immunocompromised humans.

This aspect appears to be important in considering this fungus as a bioeffector for biocontrol formulations. Interestingly, in another family of hypocrealean fungi a similar nutritional shift has occurred: *Elaphocordyceps* (anamorph *Tolyposcladium*, Ophiocordycipitaceae) contains species that are mostly parasites of the ectomycorrhizal truffle genus *Elaphomyces* (Eurotiales, Ascomycota), but their next phylogenetic neighbors are all pathogens of insects. Thus, the evolutionary neighborhood of the genus *Trichoderma* includes fungi with versatile nutritional profiles.

***Trichoderma* has a diversity of genomic tools used for Mycotrophy**

As shown on Figure 1, several *Trichoderma* genomes have already been sequenced, annotated and published (Martinez et al., 2008; Kubicek et al., 2011, Studholme et al., 2013, Xie et al., 2014; Yang et al., 2015; Baroncelli et al., 2015) and at least a half of a dozen other genomes have recently been also sequenced by JGI and several laboratories focusing on *Trichoderma* including ours. The comparative phylogenomic analysis of the three *Trichoderma* species indicated that *T. atroviride* (section *Trichoderma*) most closely represents the ancestral state for the genus *Trichoderma*, while *T. reesei* (Section *Longibrachiatum*) is the most derived species among the three (Kubicek et al., 2011). The team also used Marcov cluster algorithm (MCL) analysis including 10 additional ascomycete genomes available from the DOE Joint Genome Institute (JGI) database (Eurotiomycetes, Sordariomycetes and Dothidiomycetes), to identify paralogous gene families that have become expanded either in all three *Trichoderma* species or only in the two strongly mycoparasitic and opportunistic *Trichoderma* (considering that

T. reesei is a moderate mycoparasite and it is not an environmental opportunist). They identified forty-six such families, of which 26 were expanded only in *T. virens* and *T. atroviride* (Figure 2). The ones expanded in all three *Trichoderma* spp. encoded Zn(2)Cys(6) transcription factors, solute transporters of the major facilitator superfamily, short chain alcohol dehydrogenases, S8 peptidases and proteins bearing ankyrin domains. The most expanded protein sets, however, were those that were considerably larger in *T. virens* and *T. atroviride* than *T. reesei*, and included ankyrin proteins with CCHC zinc finger domains, proteins with WD40, heteroincompatibility (HET) and NACHT domains, NAD-dependent epimerases, and sugar transporters. A recent, even more detailed analysis based on MCL clustering of orthologous genes for 44 Pezizomycotina genomes further refines these data and shows that in fact mycoparasitic and opportunistic *Trichoderma* species (*T. virens* and *T. atroviride*) have a unique genomic architecture among all Pezizomycotina.

Mycoparasitism of *Trichoderma* is probably the best studied among all fungicolous fungi (Atanasova et al., 2013b; Baek et al., 1999; Brunner et al., 2005; Druzhinina et al., 2011; Elad et al., 1980; Kotasthane et al., 2015; Kubicek et al., 2011; Studholme et al., 2013; Zhang et al., 2015). It has been documented that *Trichoderma* spp. used for biocontrol can act through a diversity of mechanisms that may be preferentially used against one or another fungal host.

The genomic properties of *Trichoderma* spp. that add to their ability for mycotrophy have been discussed in Kubicek et al. (2011), Atanasova et al. (2013b) and in several more recent reviews. Druzhinina et al. (2011) and Druzhinina and Kubicek (2013) provided detailed descriptions of *Trichoderma*'s ability to interact with living fungi as both mycoparasites and predators (necrotrophic mycoparasites) and also to their ability to saprotrophically feed on dead fungal biomass. The biotrophic interaction of *Trichoderma* with other fungi includes such steps as sensing the presence of the host and optional coiling around their hyphae; host cell wall degradation and penetration of the host hyphae, repair of damages caused by hosts and production of toxic secondary metabolites that may eventually kill the host. Chenthamara and Druzhinina (2016) reviewed all studies that functionally characterized genes involved in the interactions between *Trichoderma* and other fungi. Most of such genes are involved in signal transduction, in fungal cell wall degradation and in production of antifungal secondary metabolites. Fewer studies focused on general and specific regulator genes such as *nox1*, *noxR*, *laeA*, *vell1*, and *xyr1* and the role of proteases. The later authors specified that the absolute majority of functional genetic investigations were performed on two model species of *Trichoderma* only, i.e. *T. atroviride* and *T. virens*.

Atanasova et al. (2013b) used DNA microarrays to compare the transcriptional response of opportunistic *T. atroviride* and *T. virens* in comparison to moderately mycoparasitic and not opportunistic *T. reesei* to the presence of the mycelium of *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*). They found that the three *Trichoderma* spp. exhibited a strikingly different transcriptomic response already

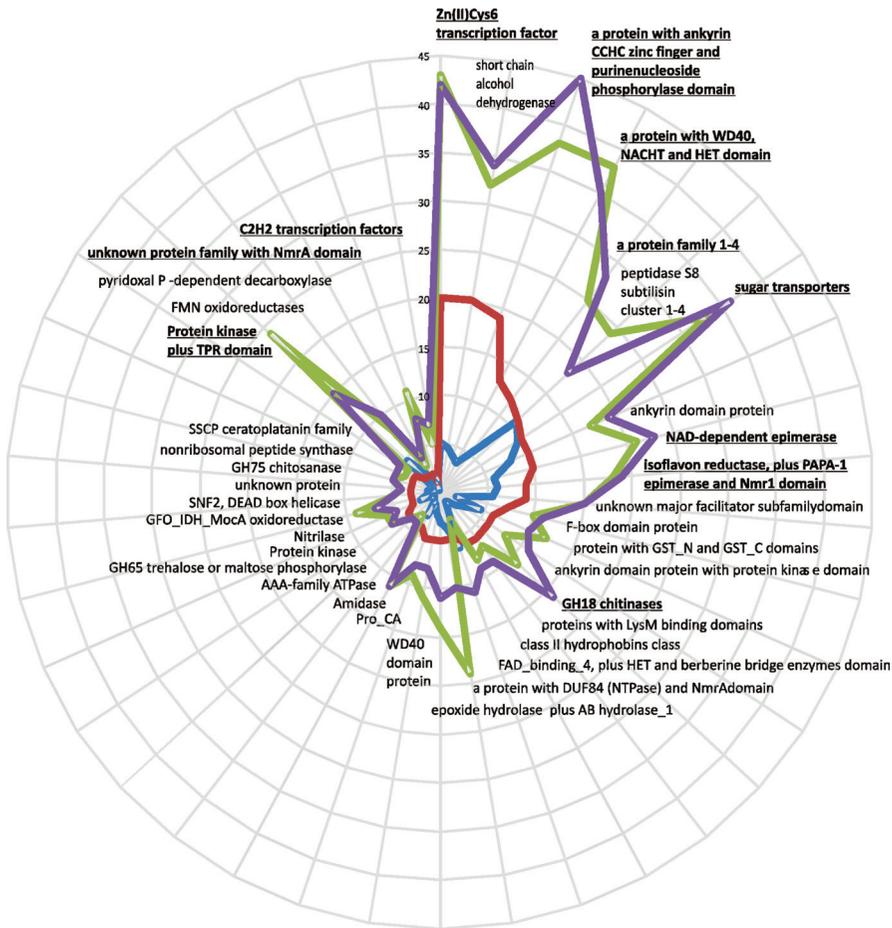


FIGURE 2 - Major paralogous gene expansions revealed by MCL analysis in genomes of *Trichoderma atroviride* (purple), *T. virens* (green) and *T. reesei* (red) in comparison with ten ecologically comparable Pezizomycotina fungi (blue) as described in Kubicek et al. (2011). Genomes of these three species and of the species sequenced later (Figure 1) are enriched with genes required for cellular pathways and signaling (protein kinases, WD40, F-box, HET, ankyrin domains), transcription factors [Zn(II)Cys6 and C2H2], fast response to nutritional opportunities (sugar transporters, ankyrin domains), mycoparasitism (CAZymes: chitinases, chitosanases, trehalose and maltose phosphorylases, LysM domain; subtilisin peptidase), secondary metabolites and stress response (ADH, epimerases, amidases, ATPases, NRPS, epoxide hydrolases, FMN oxidoreductases; GST).

before physical contact with alien hyphae. *T. atroviride* expressed an array of genes involved in production of secondary metabolites, GH16 β -glucanases, various proteases and small secreted cysteine rich proteins. *T. virens*, on the other hand, expressed mainly the genes for biosynthesis of gliotoxin, respective precursors and also glutathione, which is necessary for gliotoxin biosynthesis. In contrast, *T. reesei* increased the expression of genes encoding cellulases and hemicellulases, and of the genes involved in solute transport (Table 1). The majority of differentially regulated genes between the three species were orthologues present in all three species or in *T. atroviride* and *T. virens*, indicating that the regulation of expression of these genes is different in *Trichoderma* spp.

The genes expressed in all three fungi exhibited a nonrandom genomic distribution, indicating a possibility for their regulation via chromatin modification. The authors concluded that the initial *Trichoderma* mycotrophy proposed earlier by Kubicek et al. (2011) has differentiated into several alternative ecological strategies. In the context of their study, when *T. cucumeris* was used as an opponent for *Trichoderma*, the interactions ranged from parasitism of *T. atroviride* to predation of *T. virens* and competitive cohabitation of *T. reesei* (Figure 3). The relatively neutral or non-aggressive response of *T. reesei* is best explained by fact that this is an exclusively tropical species, which has been only rarely detected in soil; therefore, it is likely not able to recognize temperate soil-borne *T. cucumeris* as its potential host or prey (Druzhinina et al., 2010, Druzhinina and Kubicek, 2016). But is important to note here that the assumption that *T. reesei* is merely a saprotrophic fungus that is not capable to mycotrophy is contradicted by numerous studies that demonstrated the ability of this fungus to attack a variety of fungi (Druzhinina et al., 2010; Atanasova et al., 2013b, Druzhinina and Kubicek, 2016).

TABLE 1 - Differentially regulated genes of *T. atroviride* (*Ta*), *T. vires* (*Tv*) and *T. reesei* (*Tr*) in interactions with the mycelium of *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) as detected in DNA microarrays by Atanasova et al. (2013b). The total genome sizes of *Ta*, *Tv* and *Tr* are 11865, 12428 and 9143 genes, respectively, as described by Kubicek et al., 2011. Colors highlight high (red), intermediate (yellow) and low (green) values when the three species are compared. Modified from Atanasova et al. (2013b).

Genes	Total involved			upregulated			downregulated		
	<i>Ta</i>	<i>Tv</i>	<i>Tr</i>	<i>Ta</i>	<i>Tv</i>	<i>Tr</i>	<i>Ta</i>	<i>Tv</i>	<i>Tr</i>
total differentially regulated	666	303	424	187	47	155	479	256	269
unique proteins	50	21	23	9	0	5	41	21	18
unknown proteins	180	71	137	73	6	32	107	65	105
secreted proteins	178	19	93	64	3	51	114	16	42
2-oxoglutarate/Fe2+ dependent dioxygenase	3	0	0	0	0	0	3	0	0
AAA+-type ATPase	3	8	2	0	0	0	3	8	2
ABC transporter	0	2	2	0	0	0	0	2	2
Acetylcholinesterase/Butyrylcholinesterase	3	1	0	1	0	0	2	1	0
acid phosphatase	4	1	1	4	1	1	0	0	0
amino acid transporter	5	3	4	0	3	1	5	0	3
Ankyrin	4	2	0	0	0	0	4	2	0
aspartyl protease	5	1	2	4	1	0	1	0	2
bZIP	2	0	1	1	0	0	1	0	1
C2H2 transcriptional regulator	4	5	9	2	0	0	2	5	9
CE carbohydrate esterases	6	1	3	0	1	3	6	0	0
cell wall protein	3	0	3	0	0	1	3	0	2
C-type lectin	4	0	0	4	0	0	0	0	0
Cytochrome P450 CYP3/CYP5/CYP6/CYP9 subfamilies	7	9	6	3	0	3	4	9	3
Cytochrome P450 peroxidase	4	1	0	2	1	0	2	0	0
elastolytic metallopeptidase	2	1	1	1	0	1	1	1	0
FAD-containing oxidase or monooxygenase	15	2	2	6	1	0	9	1	2
ferric reductase	2	0	3	0	0	3	2	0	0
Flavonol reductase/cinnamoyl-CoA reductase	4	1	0	1	0	0	3	1	0
GCN5-related N-acetyltransferase	6	1	1	1	1	1	5	0	0
GH Cazys	47	5	34	5	5	31	42	0	3
glutathione S transferase	3	7	2	2	0	1	1	7	1
GMC oxidoreductase	4	1	1	2	0	1	2	1	0
GPCR	7	1	2	0	0	0	7	1	0
H+ oligopeptide symporter	8	1	3	2	1	1	6	0	2
haem peroxidase	4	0	0	2	0	0	2	0	0
HET protein	3	0	1	1	0	0	2	0	1
heat shock proteins	1	4	4	0	0	0	1	4	4
inorganic phosphate transporter	3	0	0	1	0	0	2	0	0
iron permease	2	0	0	0	0	0	2	0	0
isoflavon reductase	2	0	1	0	0	0	2	0	1
Lipase	9	2	3	2	0	1	7	2	2
MDR multidrug resistance protein	0	2	2	0	0	0	0	2	2
monocarboxylate transporter	3	0	0	1	0	0	2	0	0
MSF transporter	47	8	16	4	3	7	43	5	9
NADH:flavin oxidoreductase/12-oxophytodienoate reductase	4	0	1	0	0	0	4	0	1
NRPS	1	4	2	0	0	0	1	4	2
PDR proteins	3	0	2	1	0	0	2	0	2
phospholipases	4	0	1	0	0	1	4	0	0
PKS	5	1	4	1	0	1	4	1	3
PTHII-type GPCR	6	2	2	2	0	1	4	2	1
pyoverdine dioxygenase	2	0	0	1	0	0	1	0	0
Ribonuclease	2	0	1	2	0	0	0	0	1
ribosomal proteins	0	0	18	0	0	17	0	0	1
SAM-dependent methyltransferase	3	3	3	1	0	2	2	3	1
short chain dehydrogenase/reductase	8	11	6	3	1	0	5	10	6
SSCR protein	6	6	0	3	0	0	3	6	0
subtilisin-like protease	7	2	3	5	0	2	2	2	1
transcription factors, others	5	2	0	0	0	0	5	2	0
Zn2Cys6 transcriptional regulator	9	3	5	2	0	0	7	3	5

The other aspect discussed by Chenthamara and Druzhinina (2016) is that the majority of the molecular studies of mycoparasitism were based on only a limited number of opponent fungi. In most studies either *T. cucumeris*, *Athelia rolfsii* or *Botrytis cinerea* were used for confrontations with *Trichoderma*. As most *Trichoderma* species are capable of biotrophic and necrotrophic types of mycoparasitism and may also efficiently feed on dead fungal biomass the conclusions of these studies therefore demonstrated only partial reduction of either one or another mycotrophic strategy employed by the respective *Trichoderma* species in given interactions.

The study by Zhang et al. (2015b) documented a role of *nmp1* gene encoding a secreted neutral deuterolysin metalloproteinase in the predation by *T. guizhouense* [former *T. harzianum* species complex (Chaverri et al., 2015; Li et al., 2012)]

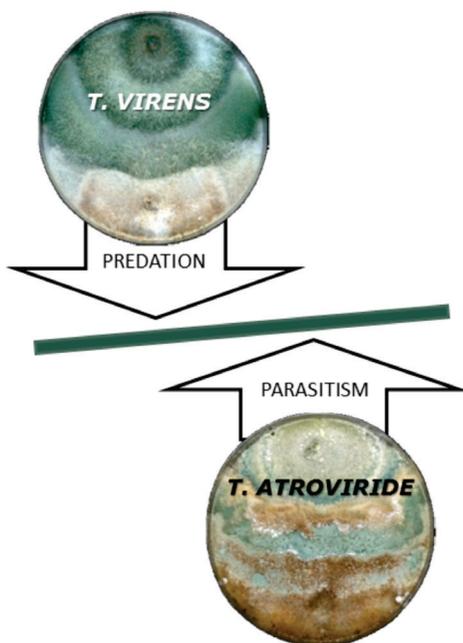


FIGURE 3 - Different strategies of *Trichoderma* (green colony) mycotrophy in interactions with *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) (brown colony). As described by Atanasova et al. (2013b) *T. virens* acts rather as a predator by rapid killing of its prey fungus prior the physical contact through the secretion of a diversity of secondary metabolites and enzymes. In contrast, *T. atroviride* behaves rather like a parasite: it does not kill but overgrows the colony of its host fungus feeding on its hyphae.

on *Fusarium oxysporum*, *A. rolfsii* and *Alternaria alternata*. However, NMP1 was also found to be involved in mycoparasitism on *B. cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* and did not have any role in the efficient attack of this fungus on *T. cucumeris* at all. The secretion of the protein was induced when the fungus was confronted with itself on dead fungal biomass as the carbon source and was not activated when *T. guizhouense* was grown on glucose or potato-dextrose agar. Besides the role of the exact protease, that is definitely only one of numerous other proteases that likely act synergistically in different *Trichoderma* species (Druzhinina et al., 2012), this study demonstrates the diversity of types of interaction that may be formed by one individual *Trichoderma* strain against a broad range of opponent fungi.

We would like to note that it is thus impossible to assign *Trichoderma* to either exclusively biotrophic mycoparasitic fungi or describe them as necrotrophic mycoparasites or saprotrophs. For this reason, Druzhinina et al. (2011) proposed the more general term mycotroph as the best ecological identifier for *Trichoderma* spp. Results of Zhang et al. (2015b) also demonstrate the need to study the role of individual genes in at least several interfungal interactions including cases of true parasitism and predation.

The use of mycotrophic opportunistic fungi in agriculture

The biological control of plant diseases, or biocontrol, is an agricultural technique that is based on the use of natural hyperparasites and/or antagonists of plant pathogenic organisms to prevent or combat disease. In a broad sense, biocontrol may also include the application of plant stimulating (micro) organisms that help plants to sustain abiotic stresses such as drought or salinity. It is very important to note that not organisms but only humans¹ are capable to do biocontrol. The success of biocontrol is best defined by its result - reduced disease index for crops, but not by the mechanism of action and the type of interactions involved. Thus, efficient bioeffectors (organisms used in biocontrol) may (i) stimulate plants to induce their resistance, (ii) compete with plant pathogens; (iii) antagonize plant pathogens by means of secondary metabolite production or (iv) directly attack such pathogens as parasites or predators. Figure 4 gives an overview of biocontrol relevant interfungal interactions as it has been reviewed in Druzhinina et al. (2011) and complemented in Chenthamara and Druzhinina (2016).

A “good” label for a bioeffector organism is conditional and may only be applied in respect of exact interactions and exact crop plant. The application of mycoparasitic and antagonistic fungi for biocontrol allows to reduce the use of chemical pesticides what is usually strongly supported by general publics and therefore respective research will likely attract more attention and funding. The Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 “Establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides” contains the respective statement: “Appropriate risk management measures shall be taken and the use of low-risk plant protection products as defined in Regulation (EC) No 1107/2009 and biological control measures shall be considered in the first place” that illustrates the future trend towards reduced use of chemical pesticides under the need to increase crop production for the growing population. However, despite the generally accepted low risk, the release of bioeffectors in the environment may also have adverse effects on human health and both agricultural and natural ecosystems. It appears to be conceivable that introduced biocontrol fungi

¹The cases of natural agriculture as that of leaf-cutting ants is not discussed here.

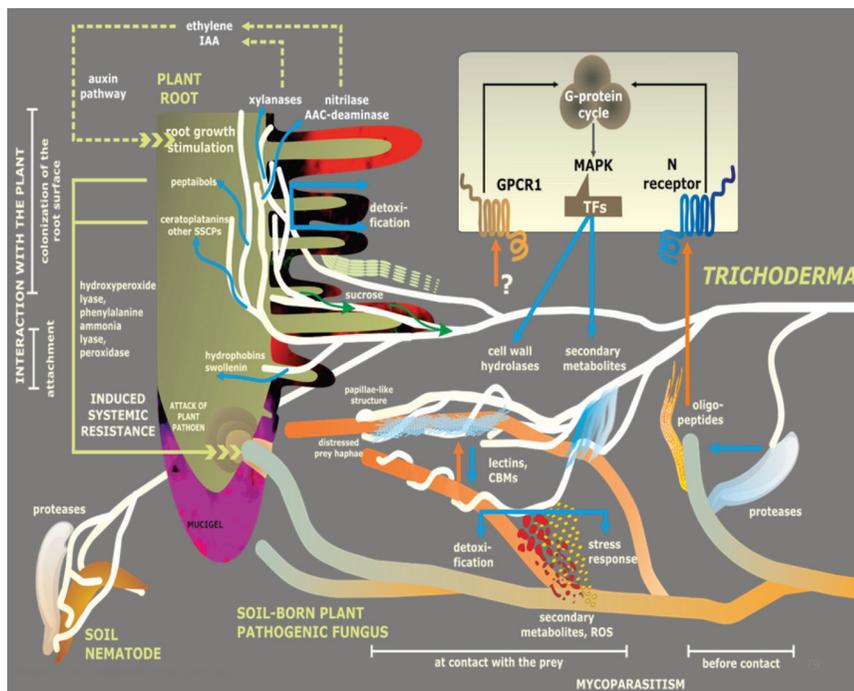


FIGURE 4 - Schematic illustration of interaction of *Trichoderma* with soil community as described in Druzhinina et al. (2011). *Trichoderma* recognizes the plant pathogenic fungus via small molecules released by it, possibly also by the involvement of its own proteases that are formed prior contact. These molecules bind to G-protein coupled receptors such as GPCR-1 or the nitrogen sensing receptors, thereby eliciting a signaling cascade comprising G-proteins, and MAP-kinase (MAPK), ultimately cumulating at an as yet unknown transcription factor (TF). This factor then enhances the already constitutive expression of genes for secondary metabolites and cell wall lytic enzymes. Once close to the prey, lectins and carbohydrate binding domains (CBMs) may add in the attachment of *Trichoderma* thereby facilitating physical attack. At the same time, the pathogen responds by forming secondary metabolites and reactive oxygen species (ROS), which elicit a stress response and detoxification in *Trichoderma*. Also in response of the presence of a plant pathogen, *Trichoderma* releases several components that trigger the positive responses in the plant : peptaibols and the cerato-platanins EPL1 have been demonstrated to evoke a systemic resistance in the plants, cumulating in the formation of hydroperoxide lyase, peroxidase and lignification (PAL); a xylanase XYN2 and an AAC deaminase have been shown to elicit the ethylene pathway of auxin formation leading to enhanced root growth; the constitutively secreted nitrilase may aid in the formation of the auxin 3-indole acetic acid (IAA). Attachment of *Trichoderma* to the plant roots has been shown to involve hydrophobins and swollenin. Finally, *Trichoderma* benefits from the plant roots itself by receiving sucrose as a carbon source enabling faster growth. The nematophagy of *Trichoderma* likely involves subtilisin-like S8 proteases and chitinases. Modified from Druzhinina et al. (2011).

such as *Trichoderma* in case of either importation or augmentation practices will increase competition pressure for naturally present plant-beneficial microorganisms including other fungi and bacteria. *Trichoderma* is usually considered as a ‘good’ and plant-beneficial fungus (*vide supra*). However, it may parasitize on arbuscular mycorrhizal fungi *Gigaspora* (Diversisporales, Glomeromycota) that are used to enhance plant nutrition and stress resistance (Lace et al., 2015), or even affect the plant as demonstrated by the colonization of broad areas of the root epidermis of *Medicago truncatula* (Fabaceae, Angiosperms, Plantae) by *T. atroviride* leading to localized death. However, reports on adverse effects of *Trichoderma* on plants are rare: *T. viride* was diagnosed as a causative agent of dieback of *Pinus nigra* (Pinales, Plantae) seedling in Italy (Li Destri Nicosia et al., 2015).

Several studies also document the adverse effect of fungal hyperparasites on fungi used to control insect pests. Our own data indicate that practically any *Trichoderma* species may attach *Beauveria bassiana* used for biological control of herbivorous insects (Druzhinina, Atanasova, unpublished) and thus the application of *Trichoderma* may counteract the positive role of *B. bassiana* on the control of the disease caused by herbivory insects.

Besides the direct impact on plants and plant-interacting microorganisms, fungi used in biocontrol may also have adverse effects on mushroom production (Castle et al., 1998; Hajek et al., 2013; Hermosa et al., 1999; Kim et al., 2012; Komon-Zelazowska et al., 2007; Kredics et al., 2010; Park et al., 2006) and animals including humans as opportunistic pathogens. Interestingly *T. longibrachiatum* that is the most frequently detected *Trichoderma* species capable to attack even immunocompetent humans (Kredics et al., 2003; Molnár-Gábor et al., 2013; Park et al., 2006; Sandoval-Denis et al., 2014) is still referred as a “good” biocontrol fungus (Ruocco et al., 2015). Moreover, the recent broad survey of clinically-relevant *Trichoderma* species that was based on the detailed DNA barcoding demonstrated that almost all most prominent plant-beneficial *Trichoderma* species such as *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. gamsii*, *T. koningiopsis* and others are capable to attack immunocompromised humans (Figure 1, Sandoval-Denis et al., 2014). Last but not least, the emerging body of scientific results on multiple and complex interactions between fungi and bacteria allow to assume the severe impact of introduced „good” but environmentally aggressive fungi on these communities, what may cause both positive and negative consequences for soil microbiome in general and consequently on plants.

Chenthamara and Druzhinina (2016) noted that up to now there are no reports published on adverse effects of *Clonostachys rosea* on humans, cultivated mushroom or biocontrol insects. As this mycotrophic hypocrealean fungus is more closely related to plant pathogenic species of the order (Nectriaceae and Bionectriaceae), it could be possible that the mycoparasitic ability derived from herbivorous ancestors may possess fewer number of possible adverse effects compared to mycoparasites that evolved from an entomopathogenic-like organisms. Thus, although the immediate

beneficial role of *Trichoderma* and other mycotrophic rhizosphere-competent fungi on plant growth and development appears to be confirmed, a detailed ecological risk assessment analysis may reveal the true balance between adverse and positive effects of these bioeffectors on humans and the entire ecosystems. With no doubts such results will not result in reduced use of *Trichoderma* for plant protection. In contrary, it will allow to design sophisticated formulations with improved activity and minimized environmental risks. The newest genome-wide mechanistic and evolutionary studies will provide sufficient background for such research.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Austrian Science Fund (FWF): project number 25613 B20 to ISD.

LITERATURE CITED

Atanasova L, Druzhinina IS, Jaklitsch WM (2013) Two Hundred *Trichoderma* Species Recognized on the Basis of Molecular Phylogeny. In book: *Trichoderma: biology and applications*, Edition: 1st, Chapter: 2, Publisher: CABI Publishing, Editors: Prasun K Mukherjee, Benjamin A Horwitz, Uma Shankar Singh, Mala Mukherjee, Monika Schmolz.

Atanasova L, Crom SL, Gruber S, Coulpier F, Seidl-Seiboth V, Kubicek CP (2013) Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. *BMC Genomics* 14(1):121.

Bae H, Sicher RC, Kim MS, Kim S-H, Strem MD, Melnick RL (2009) The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *J. Exp. Bot.* 60(11):3279–95.

Baek J-M, Howell CR, Kenerley CM (1999) The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Curr. Genet.* 35(1):41–50.

Baroncelli R, Piaggieschi G, Fiorini L (2015) Draft Whole-Genome Sequence of the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum* T6776. 3:9–10.

Bissett J, Gams W, Jaklitsch W, Samuels GJ (2015) Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA Fungus*, 2: 263–295.

Bongiorno VA, Rhoden SA, Garcia A, Polonio JC, Azevedo JL, Pereira JO (2015) Genetic diversity of endophytic fungi from *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 in organic crops. *Ann. Microbiol.* 28:1–11.

Brunner K, Zeilinger S, Ciliento R, Woo SL, Lorito M, Kubicek CP (2005) Improvement

- of the Fungal Biocontrol Agent *Trichoderma atroviride* To Enhance both Antagonism and Induction of Plant Systemic Disease Resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(7):3959–65.
- Castle A, Speranzini D, Rghei N, Alm G, Rinker D, Bissett J (1998) Morphological and Molecular Identification of *Trichoderma* Isolates on North American Mushroom Farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(1):133–7.
- Chaverri P, Branco-Rocha F, Jaklitsch WM, Gazis RO, Degenkolb T, Samuels GJ (2015) Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the reidentification of commercial biocontrol strains. *Mycologia.* 6:14–147.
- Chenthamara K, Druzhinina IS (2016) Ecological Genomics of Mycotrophic Fungi In: THE MYCOTA Volume IV - Environmental and Microbial Relationships, Edition: Third, Publisher: Springer, 215-246.
- Druzhinina IS, Komoń-Zelazowska M, Atanasova L, Seidl V, Kubicek CP (2010) Evolution and Ecophysiology of the Industrial Producer *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*) and a New Sympatric Agamospecies Related to It. *PLoS ONE.* 5(2):e9191.
- Druzhinina IS, Kubicek CP (2013) Ecological Genomics of *Trichoderma*. In: Francisrtin, editor. *Ecol. Genomics Fungi.* 89–116.
- Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, Monte E (2011) *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat. Rev. Microbiol.* 9(10):749–59.
- Druzhinina IS, Shelest E, Kubicek CP (2012) Novel traits of *Trichoderma* predicted through the analysis of its secretome. *FEMS Microbiol. Lett.* 337(1):1–9.
- Druzhinina IS, Kubicek CP (2016) Familiar Stranger: Ecological Genomics of the Model Saprotroph and Industrial Enzyme Producer *Trichoderma reesei* Breaks the Stereotypes. Chapter in *Advances in applied microbiology* 95.
- Elad Y, Chet I, Katan J, others (1980) *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology.* 70(2):119–21.
- Fravel DR (2006) Lessons learned from *Sporidesmium*, a Fungal Agent for Control of Sclerotia forming fungal pathogens. *Biol. Control Glob. Perspect. Case Stud. World.*
- Galletti S, Fornasier F, Cianchetta S, Lazzeri L (2015) Soil incorporation of brassica materials and seed treatment with *Trichoderma harzianum*: Effects on melon growth and soil microbial activity. *Ind. Crops Prod.* 30;75, Part A:73–8.
- Gazis R, Chaverri P (2010) Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. *Fungal Ecol.* 3(3):240–54.
- Gruber S, Vaaje-Kolstad G, Matarese F, López-Mondéjar R, Kubicek CP, Seidl-Seiboth V (2011) Analysis of subgroup C of fungal chitinases containing chitin-binding and LysM modules in the mycoparasite *Trichoderma atroviride*. *Glycobiology.* 21(1):122–33.
- Hajek AE, Longcore JE, Rabern Simmons D, Peters K, Humber RA (2013) Chytrid mycoparasitism of entomophthoralean azygospores. *J. Invertebr. Pathol.* 114(3):333–6.

Harman GE (2011) Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytol.* 189(3):647–9.

Hatvani L, Antal Z, Manczinger L, Szekeres A, Druzhinina IS, Kubicek CP, Nagy A, Nagy E, Vágvölgyi C, Kredics L (2007) Green Mold Diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* spp. Are Caused by Related but Phylogenetically Different *Trichoderma* Species. *Phytopathology* 2007 97(4):532-537.

Hermosa MR, Grondona I, Monte E (1999) Isolation of *Trichoderma harzianum* Th2 from Commercial Mushroom Compost in Spain. *Plant Dis.* 83(6):591–591.

Jaklitsch WM. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. *Stud. Mycol.* 2009;63:1–91.

Jaklitsch WM (2011) European species of *Hypocrea* part II: species with hyaline ascospores. *Fungal Divers.* 48(1):1–250.

Karlsson M, Durling MB, Choi J, Kosawang C, Lackner G, Tzelepis GD (2015) Insights on the evolution of mycoparasitism from the genome of *Clonostachys rosea*. *Genome Biol. Evol.* 7(2):465–80.

Kim CS, Shirouzu T, Nakagiri A, Sotome K, Nagasawa E, Maekawa N (2012) *Trichoderma mienum* sp. nov., isolated from mushroom farms in Japan. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 102(4):629–41.

Kobayasi Y (1941) The genus *Cordyceps* and its allies. *Bull Natl Sci Mus Tokyo.* 2–13.

Komon-Zelazowska M, Bissett J, Zafari D, Hatvani L, Manczinger L, Woo S (2007) Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause green mold disease in oyster mushroom farms worldwide. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(22):7415–26.

Kotasthane A, Agrawal T, Kushwah R, Rahatkar OV (2015) In-vitro antagonism of *Trichoderma* spp. against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* and their response towards growth of cucumber, bottle gourd and bitter melon. *Eur. J. Plant Pathol.* 141(3):523–43.

Kredics L, Antal Z, Dóczi I, Manczinger L, Kevei F, Nagy E (2003) Clinical importance of the genus *Trichoderma*. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 50(2):105–17.

Kredics L, Garcia Jimenez L, Naeimi S, Czifra D, Urbán P, Manczinger L (2010) A challenge to mushroom growers: the green mould disease of cultivated champignons. *Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.* 295–305.

Lace B, Genre A, Woo S, Faccio A, Lorito M, Bonfante P (2015) Gate crashing arbuscular mycorrhizas: *in vivo* imaging shows the extensive colonization of both symbionts by *Trichoderma atroviride*: *Trichoderma* mycoparasitic potential on AM partners. *Environ. Microbiol. Rep.* 7(1):64–77.

Li Destri Nicosia MG, Mosca S, Mercurio R, Schena L (2015) Dieback of *Pinus nigra* Seedlings Caused by a Strain of *Trichoderma viride*. *Plant Dis.* 99(1):44–9.

- Li Q-R, Tan P, Jiang Y-L, Hyde KD, Mckenzie EHC, Bahkali AH (2012) A novel *Trichoderma* species isolated from soil in Guizhou, *T. guizhouense*. *Mycol. Prog.* 12(2):167–72.
- Mains EB (1958) North American Entomogenous Species of *Cordyceps*. *Mycologia* 50(2):169.
- Man TJB, Stajich JE, Kubicek CP, Teiling C, Chenthamara K, Atanasova L (2015) The small genome of the fungus *Escovopsis weberi*, a specialized disease agent of ant agriculture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113(13):3567-72.
- Martinez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo M, Arvas M, Baker SE (2008) Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat. Biotechnol.* 26(5):553–60.
- Molnár-Gábor E, Dóczy I, Hatvani L, Vágvölgyi C, Kredics L (2013) Isolated sinusitis sphenoidalis caused by *Trichoderma longibrachiatum* in an immunocompetent patient with headache. *J. Med. Microbiol.* 62(8):1249–52.
- Park MS, Bae KS, Yu SH (2006) Two New Species of *Trichoderma* Associated with Green Mold of Oyster Mushroom Cultivation in Korea. *Mycobiology.* 34(3):111.
- Rosmana A, Samuels GJ, Ismaiel A, Ibrahim ES, Chaverri P, Herawati Y (2015) *Trichoderma asperellum*: A Dominant Endophyte Species in Cacao Grown in Sulawesi with Potential for Controlling Vascular Streak Dieback Disease. *Trop. Plant Pathol*40(1):19–25.
- Ruocco M, Lanzuise S, Lombardi N, Woo SL, Vinale F, Marra R (2015) Multiple roles and effects of a novel *Trichoderma hydrophobin*. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI.* 28(2):167–79.
- Sandoval-Denis M, Sutton DA, Cano-Lira JF, Gené J, Fothergill AW, Wiederhold NP (2014) Phylogeny of the Clinically Relevant Species of the Emerging Fungus *Trichoderma* and Their Antifungal Susceptibilities. *J. Clin. Microbiol.* 52(6):2112–25.
- Studholme DJ, Harris B, Le Cocq K, Winsbury R, Perera V, Ryder L (2013) Investigating the beneficial traits of *Trichoderma hamatum* GD12 for sustainable agriculture-insights from genomics. *Front. Plant Sci.* 4:258.
- Sung G-H, Hywel-Jones NL, Sung J-M, Luangsa-ard JJ, Shrestha B, Spatafora JW (2007) Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Stud. Mycol.* 57:5–59.
- Sung G-H, Poinar GO, Spatafora JW (2008) The oldest fossil evidence of animal parasitism by fungi supports a Cretaceous diversification of fungal–arthropod symbioses. *Mol. Phylogenet. Evol.* 49(2):495–502.
- Xie B-B, Qin Q-L, Shi M, Chen L-L, Shu Y-L, Luo Y (2014) Comparative Genomics Provide Insights into Evolution of *Trichoderma* Nutrition Style. *Genome Biol. Evol.* 6(2):379–90.
- Yang D, Pomraning K, Kopchinskiy A, Karimi Aghcheh R, Atanasova L, Chenthamara K, Baker SE, Zhang R, Shen Q, Freitag M, Kubicek CP, Druzhinina IS (2015) Genome

Sequence and Annotation of *Trichoderma parareesei*, the Ancestor of the Cellulase Producer *Trichoderma reesei*. *Genome Announcements*, 3(4):00885-15.

Zhang S, Gan Y, Xu B (2014) Efficacy of *Trichoderma longibrachiatum* in the control of *Heterodera avenae*. *BioControl*, 59 (3):319–331.

Zhang S, Gan Y, Xu B. Biocontrol potential of a native species of *Trichoderma longibrachiatum* against *Meloidogyne incognita* 2015a, 94: 21–29.

Zhang J, Bayram Akcapinar G, Atanasova L, Rahimi MJ, Przylucka A, Yang D, et al., The neutral metallopeptidase NMP1 of *Trichoderma guizhouense* is required for mycotrophy and self-defence. *Environ. Microbiol.* 2015b d oi:10.1111/1462-2920.12966.

RESUMOS



REVISORES

Acleide Maria Santos Cardoso
André Costa da Silva
Adriano Jorge Nunes dos Santos
Ana Cristina Andrade Monteiro
Carolina da Silva Siqueira
Dalila Sêni de Jesus
Daniel Henrique Ribeiro
Eduardo Souza Freire
Felipe Augusto Moretti Ferreira Pinto
Flávio Henrique Vasconcelos Medeiros
Gizeli de Souza Santos
Jader Braga Maia
Jonas Alberto Rios
Julio Carlos Pereira
Leônidas Leoni Belan
Luís Claudio Paterno Silveira
Manoel Batista da Silva Júnior
Mirella Figueiró de Almeida
Poliana Patrícia Lima
Priscilla de Fátima Pereira
Rafaela Araújo Guimarães
Roberto Lanna Filho
Samuel Julio Martins
Sarah da Silva Costa
Stéfanny Araújo Martins
Silvino Intra Moreira
Wagner Bettiol
Willian César Terra

SUMÁRIO

Action of volatile organic compounds produced by endophytic fungi on the growth of <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	187
Ação antibacteriana <i>in vitro</i> de fungos endofíticos produtores de compostos voláteis contra <i>Ralstonia solanacearum</i>	188
Análise ultraestrutural e avaliação da emergência de plântulas de soja inoculadas com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Trichoderma harzianum</i>	189
Atividade antagonica de rizobactérias nativas de solos do oeste do Paraná no controle de <i>Botrytis cinerea</i>	190
Atividade antagonica de rizobactérias nativas de solos do oeste do Paraná no controle de <i>Rhizoctonia solani</i>	191
Atividade antagonica de rizobactérias nativas de solos do oeste do Paraná no controle de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	192
Atividade antifúngica de fungos endofíticos do gênero <i>Sarocladium</i>	193
Avaliação da inibição <i>in vitro</i> de <i>Pseudocercospora griseola</i> pela atividade de fungos endofíticos	194
Avaliação da inibição <i>in vitro</i> de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> pela atividade de fungos endofíticos	195
Avaliação da qualidade de lotes do biofungicida Tricovab®	196
<i>Bacillus subtilis</i> na supressão da brusone foliar em arroz	197
Bactérias como agentes de controle de <i>Phytophthora nicotianae</i>	198
Biocontrole de <i>Aspergillus carbonarius</i> e <i>Aspergillus ochraceus</i> por meio de compostos voláteis produzidos por leveduras	199
Biocontrole de <i>Lasioidiplodia theobromae</i> da videira com uso de <i>Trichoderma harzianum</i>	200

Biocontrole <i>in vitro</i> de <i>Pyricularia oryzae</i> por isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	201
Capacidade predatória de <i>Ceraeochrysa cubana</i> e <i>Chrysoperla externa</i> alimentadas com o afídeo da roseira <i>Rhodobium porosum</i>	202
Caracterização de leveduras isoladas da filosfera do cacauzeiro quanto à produção de toxinas <i>killer</i>	203
Compatibilidade entre produtos à base de <i>Trichoderma</i> spp. e fungicidas	204
Compostos orgânicos voláteis do fungo <i>Muscodor</i> sp. sobre <i>Meloidogyne incognita</i>	205
Contribuição de resíduos orgânicos nas propriedades do solo e sobrevivência de <i>Stenocarpella</i> em colmos de milho	206
Controle biológico de <i>Fusarium</i> em sementes de pínus	207
Control biológico de hongos fitopatógenos de semillas de sésamo (<i>Sesamum indicum</i> L.) con bacterias antagónicas	208
Controle alternativo de doenças pós-colheita em mamão Formosa ‘Tainung 01’	209
Controle biológico da mancha preta dos citros por <i>Bacillus subtilis</i> . Uma alternativa para a citricultura orgânica	210
Controle de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> em cana-de-açúcar por meio da utilização de produtos formulados à base de <i>Bacillus</i> spp.	211
Diferentes épocas de aplicação de <i>Clonostachys rosea</i> e acibenzolar-S-metil no controle do mofo cinzento do tomateiro	212
Efeito do nematicida QRD 7017 (<i>Paecilomyces lilacinus</i> cepa 251- 200g/L) no controle do nematoide das galhas (<i>M. incognita</i>) na cultura da Cenoura (<i>Daucus carota</i>)	213
Efeito do <i>Trichoderma asperellum</i> e <i>harzianum</i> no crescimento micelial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> do mamoeiro	214

Efeito dos fungos endofíticos <i>Neofusicoccum parvum</i> e <i>Schizophyllum commune</i> no controle da <i>Cercospora beticola</i>	215
Eficácia de TRICHOMAX (<i>Trichoderma viride</i>) en el control preventivo de <i>Phytophthora cinnamomi</i> (causante de pudrición radicular) en plantones de palto var. Zutano en condiciones de vivero. La Libertad. Perú	216
Eficiência de <i>Bacillus subtilis</i> e extrato de cravo-da-índia controle de <i>Botrytis cinerea</i> em cachos da cv. Chardonnay	217
Eficiência de biofungicidas no controle biológico de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> na cultura da soja na região dos Chapadões	218
Eficiência de produtos comerciais à base de <i>Trichoderma</i> spp. no controle da podridão branca da haste da soja	219
Filtrado do fungo <i>Curvalaria eragrostidis</i> no manejo de <i>Meloidogyne javanica</i>	220
Filtrado do fungo <i>Lappodochium lageniforme</i> no manejo de nematoides de galhas	221
Fontes alternativas de sacarose na esporulação de <i>Trichoderma stromaticum</i>	222
Formulações de <i>Penicillium citrinum</i> para o controle da podridão vermelha do sisal	223
Fungos endofíticos do gênero <i>Paraconiothyrium</i> no parasitismo e viabilidade de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	224
Fungos simbiontes à plantas com possível efeito antagônico a <i>Alternaria solani</i>	225
Indução de faseolina em feijoeiro com produtos alternativos	226
Influência de espécies de <i>Trichoderma</i> sobre o crescimento micelial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> do abacateiro	227
Inibição da germinação de conídios de <i>Alternaria alternata</i> patótipo tangerina por biofertilizante	228

Inibição do crescimento micelial de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> com uso de <i>Bacillus subtilis</i>	229
Inibição <i>in vitro</i> do crescimento micelial de <i>Colletotrichum musae</i> por espécies de <i>Trichoderma</i>	230
Inoculación de NEMAKONTROL (<i>P. lilacinum</i>) para el control de <i>Meloidogyne</i> sp. en <i>Capsicum annuum</i> - Pimiento morrón var. Aristotele. Virú. La Libertad. Perú	231
Leveduras no controle de fungos associados a podridões na semente de pimenta de cheiro e estímulo ao crescimento de plântulas	232
Manejo de <i>Meloidogyne javanica</i> por filtrado do fungo <i>Dictyochaeta obeispora</i>	233
Manejo de nematoides de galhas com filtrado do fungo <i>Curvalaria inaequalis</i>	234
Perfil dos egressos da disciplina de graduação de controle biológico de doenças de plantas	235
Potencial antagonico de las bacterias benéficas <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> contra <i>Alternaria solani</i> Sorauer causante del tizón temprano del tomate	236
Potencial de inibição do crescimento <i>in vitro</i> de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> por fungos endofíticos produtores de voláteis	237
Potencial do uso da pulverização de rizobactérias no controle do mofo branco em soja	238
Potencial migratório de leveduras em ramos de cacauero infectados com <i>Moniliophthora perniciosa</i>	239
Produção de protease por isolados de <i>Cladosporium</i> spp. durante o antagonismo aos principais patógenos fúngicos do arroz	240
Promoção de crescimento em tomateiros mediada por <i>Clonostachys rosea</i>	241
Rhizobacterial volatiles in the control of anthracnose in common bean	242

Seleção de isolados de <i>Trichoderma</i> sp. para o biocontrole de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em condições favoráveis ao mofo branco do feijoeiro comum ...	243
Seleção de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. antagonistas a <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	244
Serifel (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa MB1600) no controle de <i>Cryptosporiopsis perennans</i> em pré-colheita de maçã	245
Serifel (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MB1600) no biocontrole de <i>Botrytis cinerea</i> em frutos de uva	246
Supresión de la eclosión <i>in vitro</i> de <i>Meloidogyne javanica</i> en presencia de <i>Paecilomyces</i> y óleos esenciales	247
Supressão de brusone foliar por diferentes isolados de <i>Trichoderma asperellum</i>	248
The role of microbial volatiles in plant protection	249
The specificity of <i>Trichoderma</i> in the biological control of <i>Guignardia citricarpa</i> : clarification of molecular interactions	250
Uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas no controle de nematoides na cultura do algodoeiro	251
Uso de espécies de <i>Trichoderma</i> na inibição do crescimento micelial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	252
Uso de <i>Trichoderma harzianum</i> como estratégia para redução de impactos causados pelo pé preto na implantação de vinhedos	253
Viabilidade de formulações de <i>Penicillium citrinum</i> armazenadas em diferentes temperaturas	254



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Action of volatile organic compounds produced by endophytic fungi on the growth of *Xanthomonas vesicatoria*

M. C. P. Monteiro¹, I. A. F. M. Santos¹, P. S. O. Nunes¹, O. L. Pereira², P. G. Cardoso¹

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia - Setor de Microbiologia, Lavras-MG, Brasil, CEP 37200-000; ²Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Viçosa-MG, Brasil, CEP 36570-000. E-mail: mkmonteir@gmail.com

Bacterial leafspot is caused by the bacterium *Xanthomonas vesicatoria* in tomato (*Lycopersicon esculentum*) and infection results in a decreased yield at harvest. The endophytic fungi have received considerable attention due to their ability to produce many compounds including alkaloids, terpenoids, amino acids and phyto-hormones. In addition, volatile organic compounds produced by endophytes may inhibit or reduce the growth of various pathogenic microorganisms presenting potential for biotechnological applications, mainly related to the control of microorganisms causing plant diseases. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial effect of volatile organic compounds produced by 12 endophytic fungi on the growth of *X. vesicatoria*. In bipartite Petri dishes, the endophytic fungi were grown on PDA medium for 7 days at 25°C. After this period, it was added 50µL of bacterial suspension *X. vesicatoria*, corresponding to 10⁸ UFC/mL on the other side of the Petri dish containing the culture medium 523. The plates were sealed with parafilm and incubated at 25°C for 72 h. The isolates *Muscodor yucatanensis* (HZM64), *M. vitigenus* (HZM10), *M. coffeanum* (COAD1842 e COAD 1900) e *Simplicillium* sp. (C18 e C12) completely inhibited pathogen growth. Moreover, the compounds produced exhibited bactericidal action, since no bacterial growth was observed after 72 h without contact with the fungi. The isolates of *Muscodor* and *Simplicillium* stands out as potential candidates as biocontrol agents constituting an alternative to replace chemical fungicides. Studies of characterizing the bioactive metabolites of the potent fungal strains from *C. arabica* and their use as biocontrolling agents are in progress.

Acknowledgment: FAPEMIG, CNPq, CAPES.

Keywords: Volatile compounds, Biological control, Endophytic fungi, *Muscodor* spp., *Simplicillium* sp.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Ação antibacteriana *in vitro* de fungos endofíticos produtores de compostos voláteis contra *Ralstonia solanacearum*

I. A. F. M. Santos¹, P. S. de O. Nunes¹, M. C. P. Monteiro¹, P. G. Cardoso¹

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia, Lavras-MG, Brasil, CEP 37200-000. E-mail: italo.ferrer@hotmail.com

A murcha-bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) é a doença mais importante do tomateiro em regiões com predomínio de altas temperaturas e umidades, e considerada de difícil controle. Essa doença tem ganhado importância em cultivos protegidos sujeitos a plantios sucessivos. O controle químico não é efetivo nem economicamente viável. Portanto, o biocontrole utilizando microrganismos produtores de substâncias bioativas pode ser uma alternativa. O objetivo desse trabalho foi avaliar a ação antibacteriana *in vitro* de 12 fungos endofíticos produtores de compostos orgânicos voláteis (COVs) contra *R. solanacearum*, raça 3. Em placas bipartidas, com quatro repetições, cada fungo foi cultivado em uma das partes da placa contendo o meio de cultura BDA e todos incubados a 25°C em BOD. Após sete dias, foi adicionada, na outra parte, contendo o meio MB₁, 100µL de suspensão bacteriana ajustada para uma DO_(λ=600nm) de 0,1, correspondendo a 1x10⁸ UFC.mL⁻¹, e incubadas por 72 horas. Após exposição aos voláteis e mais 72 horas sem exposição, quando não houve crescimento do fitopatógeno, o efeito foi considerado bactericida. A menor formação de colônias em comparação ao controle, sem o fungo, foi considerada inibição parcial. O fungo *Muscodor coffeanum* (COAD 1900) apresentou efeito bactericida, enquanto que os fungos *M. coffeanum* (COAD 1842), *Simplicillium* sp. (HZM41) e *M. vitigenus* (C12, HZM10 e HZM39) inibiram parcialmente. O efeito antibacteriano dos COVs de alguns fungos demonstra o potencial desses microrganismos, como agentes de biocontrole no manejo da murcha-bacteriana do tomateiro.

Agradecimentos: FAPEMIG, CAPES, CNPq.

Palavras-chave: *Lycopersicon esculentum*, Murcha-bacteriana, Controle biológico, COVs, Endófito.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Análise ultraestrutural e avaliação da emergência de plântulas de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* e *Trichoderma harzianum*

A. L. Silveira¹, F. S. França¹, M. G. O. Soares¹, S. I. Moreira¹, L. S. Lopes¹, E. Alves¹

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Lavras-MG, Brasil, CEP 37200-000. E-mail: amandaagronomia@gmail.com

A susceptibilidade da soja ao mofo-branco (*S. sclerotiorum*) tem reduzido a produtividade da cultura. Métodos de controle biológico como o uso de *Trichoderma* spp. têm sido uma alternativa ao controle químico, visto que promovem menor impacto ambiental e mostram-se efetivas no controle da doença favorecendo o desenvolvimento vegetativo da cultura. Objetivou-se com este estudo avaliar os efeitos de *Trichoderma harzianum* sobre a emergência de sementes de soja inoculadas com *S. sclerotiorum*, além de verificar a interação entre os fungos e a soja, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). O teste de emergência foi conduzido em bandejas com areia esterilizada, em câmara de crescimento vegetal, com temperatura de 25 °C, durante 8 dias. Em seguida foram seccionados os órgãos vegetativos das plântulas emergidas para análise do potencial de *T. harzianum* em parasitar e inibir *S. sclerotiorum* por meio de MEV. *Sclerotinia sclerotiorum* colonizou e deteriorou todas as sementes de soja. *Trichoderma harzianum* mostra-se efetivo em colonizar o sistema radicular da soja, porém não contribui para a emergência quando comparado com a testemunha. A análise ultraestrutural permitiu evidenciar o micoparasitismo de *T. harzianum* a *S. sclerotiorum*, porém o controle do mofo-branco não foi tão efetivo.

Palavras-chave: Controle biológico, *Glycine max*, Mofo branco.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Atividade antagonista de rizobactérias nativas de solos do oeste do Paraná no controle de *Botrytis cinerea*

G. de S. Lambert¹, A. J. Scherer¹, S. Holz², G. Andrade Filho³, V. Carré-Missio², L. Grange²

¹Universidade Federal do Paraná, Departamento de Biociências, Palotina, Brasil;

²Universidade Federal do Paraná, Departamento de Ciências Agronômicas, Palotina, Brasil, CEP 80060-000; ³Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Microbiologia, Londrina, Brasil, CEP 86057-970. E-mail:

lucianagranger@gmail.com, sabrinaholz16@gmail.com

Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) podem atuar de forma direta promovendo crescimento vegetal ou indireta agindo no controle de patógenos. *Botrytis cinerea* é um fungo fitopatogênico que pode causar danos em diversas culturas. Dentre as principais bactérias consideradas em estudos de biocontrole, destacam-se as *Pseudomonas* spp. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar estirpes nativas de *Pseudomonas* como candidatas ao biocontrole do mofo cinzento. As estirpes de *Pseudomonas* foram obtidas a partir de uma coleção de culturas composta por bactérias nativas da região oeste do Paraná. Os testes antagonísticos foram realizados utilizando a técnica de cultura pareada, através da deposição de um disco do patógeno em placas de Petri e, a repicagem por estria foi realizada para as bactérias-candidatas. De um total de 157 estirpes componentes da coleção de cultura de *Pseudomonas* sp., 45 foram agrupadas por tipagem morfológica e, destas, 11 isolados foram identificados por meio específico e submetidos ao teste antagonístico com 4 repetições em delineamento inteiramente casualizado. As placas foram mantidas em BOD a uma temperatura de 25°C com fotoperíodo de 12/12 horas. Através dos valores obtidos para as medidas de inibição de halo, foi possível identificar que a estirpe 56 apresentou uma eficiência de cerca de 25% no controle do crescimento do *B. cinerea*, enquanto que, as estirpes 102 e 121 inibiram o crescimento do fungo estudado em até 50% em relação a testemunha.

Palavras-chave: Antagonismo, Rizobactérias, Mofo cinza.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Atividade antagonista de rizobactérias nativas de solos do oeste do Paraná no controle de *Rhizoctonia solani*

G. de S. Lambert¹, A. J. Scherer¹, M. P. Gonçalves², G. Andrade Filho³, V. Carré-Missio², L. Grange²

¹Universidade Federal do Paraná, Departamento de Biociências, Palotina-PR, Brasil; ²Universidade Federal do Paraná, Departamento de Ciências Agronômicas, Palotina-PR, Brasil, CEP 80060-000; ³Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Microbiologia, Londrina-PR, Brasil, CEP 86057-970. E-mail: lucianagranger@gmail.com, manoel.penachio@gmail.com

Diversos estudos vêm sendo realizados sobre a importância da utilização de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) no biocontrole de doenças em culturas e também em pós-colheita. Substâncias produzidas por estas rizobactérias como sideróforos, antibióticos, enzimas e outras moléculas, possuem efeitos de controle sobre danos causados por fitopatógenos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar estirpes nativas de *Pseudomonas* como candidatas ao biocontrole da podridão radicular de rizoctonia. As estirpes de *Pseudomonas* foram obtidas a partir de uma coleção de culturas da UFPR setor Palotina composta por bactérias nativas da região oeste do Paraná. O teste antagonista foi realizado utilizando a técnica de cultura pareada, através da deposição de um disco do patógeno na extremidade das placas de Petri contendo meio de cultura e, no extremo oposto deposição por estrias das bactérias candidatas. De um total de 157 estirpes componentes da coleção de cultura de *Pseudomonas* sp., 45 foram agrupadas por tipagem morfológica e, destas, 11 isolados foram identificados por meio específico e submetidos ao antagonismo. Através dos valores obtidos para as medidas de inibição de halo, foi possível apontar que a estirpe 56 apresentou uma eficiência média no controle do *R. solani*, enquanto que, as estirpes 102 e 121 apresentaram desempenho satisfatório contra o fungo estudado, inibindo o crescimento do mesmo em até 50%.

Palavras-chave: Antagonismo, Rizobactérias, *Rhizoctonia solani*.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Atividade antagonista de rizobactérias nativas de solos do oeste do Paraná no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*

G. de S. Lambert¹, A. J. Scherer¹, F. G. Moreira², G. Andrade Filho³, V. Carré-Missio², L. Grange²

¹Universidade Federal do Paraná, Departamento de Biociências, Palotina, Brasil;

²Universidade Federal do Paraná, Departamento de Ciências Agronômicas, Palotina, Brasil CEP 80060-000; ³Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Microbiologia, Londrina, Brasil, CEP 86057-970. E-mail:

lucianagrang@gmail.com, fernandowesse@gmail.com

Os sistemas de produção agrícola têm utilizado principalmente a bactéria *Pseudomonas* spp. como rizobactérias, devido, principalmente, à diversidade nutricional, de habitat e ao grande potencial de colonização de raízes desse gênero. Dentre as *Pseudomonas* spp. fluorescentes, as principais envolvidas no sistema de decomposição de matéria orgânica e formação de solo fértil são as *P. fluorescens* e *P. putida*. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar estirpes nativas de *Pseudomonas* spp. como potenciais candidatas ao biocontrole do mofo branco. As estirpes de *Pseudomonas* foram obtidas a partir da coleção de um banco de culturas da UFPR setor Palotina composta por bactérias nativas da região oeste do Paraná. O teste antagonista foi realizado através da técnica de cultura pareada, com deposição de 1 disco do patógeno na extremidade das placas de Petri contendo meio de cultura e, no extremo oposto deposição por estrias das bactérias candidatas. A partir de um trabalho anterior, de um total de 157 estirpes componentes da coleção de cultura de *Pseudomonas* spp., 45 foram agrupadas por tipagem morfológica e, destas, 11 isolados foram identificados por meio específico e submetidos ao antagonismo. Com os valores obtidos nas medições de inibição de halo, foi possível apontar que a estirpe 102 e 121 apresentaram uma eficiência de 30% no controle do *S. sclerotiorum*, enquanto que, a estirpe 56 apresentou desempenho de 10% em relação ao patógeno testemunha.

Agradecimentos: Laboratório de ecologia microbiana – UEL.

Palavras-chave: Antagonismo, Rizobactérias, *Sclerotinia sclerotiorum*.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Atividade antifúngica de fungos endofíticos do gênero *Sarocladium*

R. M. Anjos¹, D. S. Gama¹, N. C. Maia¹, P. G. Cardoso¹

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia, Lavras-MG, Brasil, CEP 37200-000. E-mail: rafaelamerlo@yahoo.com.br

Fungos endofíticos habitam o interior de tecidos vegetais durante todo ou parte do seu ciclo de vida, sem causar danos visíveis ao hospedeiro. A presença destes fungos endófitos em gramíneas forrageiras está associada a benefícios para estas plantas, como, um maior número de colmos e matéria seca, maior tolerância às condições extremas do ambiente, resistência a microrganismos fitopatogênicos, insetos e nematóides. O gênero *Sarocladium* possui muitas espécies importantes como, por exemplo, *S. oryzae*, *S. kiliense*, *S. strictum* e *S. zaeae*. *S. oryzae* é a espécie tipo do gênero, é um importante patógeno da podridão da bainha do arroz e produz metabólitos secundários antimicrobianos, tais como, Ácido Helvólico e Cerulenina. Este estudo teve por objetivo avaliar a atividade antifúngica de fungos endofíticos do gênero *Sarocladium* isolados das gramíneas *Brachiaria* e *Panicum* contra os fungos fitopatogênicos: *Bipolaria maydes*, *Sclerotinia minor* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Fragmentos do micélio dos fungos endofíticos foram colocados em um dos lados das placas de Petri contendo meio BDA e, após sete dias de crescimento a 25°C, foi colocado do lado oposto da placa um fragmento de micélio do fungo fitopatogênico. Os endofíticos que inibiram o crescimento dos fitopatógenos foram transferidos para placas subdivididas para verificar se a inibição ocorreu devido a produção de compostos voláteis. Quatro fungos do gênero *Sarocladium* inibiram o fungo *B. maydes*, treze inibiram *S. minor* e oito inibiram *S. sclerotiorum*, pela síntese de algum composto no meio de cultivo. Os isolados estão sendo identificados morfológicamente e molecularmente em relação à espécie e alguns se mostram interessantes como candidatos ao controle biológico.

Agradecimentos: FAPEMIG, CNPq, CAPES.

Palavras-chave: Fungos endofíticos, *Sarocladium*, Atividade antifúngica.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Avaliação da inibição *in vitro* de *Pseudocercospora griseola* pela atividade de fungos endofíticos

L. B. W. Gomes¹, A. N. Ferreira¹, C. A. A. Hayashibara¹, S. Finamor¹, P. G. Cardoso¹, E. A. Souza¹

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia, Lavras-MG, Brasil, CEP 37200-000. E-mail: alexnavesf@gmail.com

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma das culturas de maior importância econômica do Brasil. A mancha angular, causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola*, pode causar grandes prejuízos aos produtores. O uso de cultivares resistentes está entre as medidas de controle desse fitopatógeno, além do uso de fungicidas e do controle biológico. A utilização de fungos endofíticos como inibidores do crescimento de fitopatógenos, devido a produção de compostos orgânicos voláteis, tem sido relatado como um método de controle biológico. O objetivo desse trabalho foi avaliar a inibição de *P. griseola in vitro*, por fungos endofíticos. Foram utilizados 12 isolados de fungos endofíticos, sendo nove isolados do gênero *Muscodor* (C17, UBSX, Z26, C20, HZM39, HZM10, HZM41, HZM60, HZM64), dois do gênero *Simplicillium* (C18 e C12) e um do gênero *Acremonium* (C19). Fragmentos miceliais dos fungos endofíticos foram colocados em placas de Petri contendo meio BDA juntamente com o isolado de *P. griseola* da raça 63-63. As placas foram mantidas a 25°C, em BOD, com fotoperíodo de 12 horas. A reação do isolado de *P. griseola* foi avaliada após o crescimento da testemunha. A ausência de crescimento de *P. griseola* indicou a inibição do patógeno pelos fungos endofíticos. Os isolados Z26, HZM64, UBSX, HZM41, C20, C17, C18 e o C12 inibiram totalmente o crescimento micelial da raça 63-63 de *P. griseola*. Os fungos endofíticos apresentaram resultados promissores no controle biológico de *P. griseola in vitro*, no entanto são necessários outros estudos para verificar seu potencial *in vivo*.

Agradecimentos: CAPES, FAPEMIG, CNPq.

Palavras-chave: Controle biológico, *Phaseolus vulgaris*, Mancha angular.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Avaliação da inibição *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum* pela atividade de fungos endofíticos

A. N. Ferreira¹, L. B. W. Gomes¹, C. A. A. Hayashibara¹, S. Finamor¹, P. G. Cardoso¹, E. A. Souza¹

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia, Lavras-MG, Brasil, CEP 37200-000. E-mail: alexnavesf@gmail.com

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma das culturas de maior importância econômica do Brasil. O mofo branco interfere na produção da cultura do feijoeiro podendo causar grandes prejuízos aos produtores, principalmente em lavouras irrigadas. Uma alternativa para a redução desta doença pode ser a utilização de controle biológico com fungos endofíticos que produzem compostos orgânicos voláteis, os quais podem inibir o desenvolvimento da doença. O objetivo desse trabalho foi avaliar a inibição de *S. sclerotiorum in vitro*, por fungos endofíticos. Foram utilizados 12 isolados de fungos endofíticos, sendo nove isolados do gênero *Muscodor* (C17, UBSX, Z26, C20, HZM39, HZM10, HZM41, HZM60, HZM64), dois do gênero *Simplicillium* (C18 e C12) e um do gênero *Acremonium* (C19). Fragmentos miceliais dos fungos endofíticos foram colocados em placas de Petri contendo meio BDA juntamente com os fragmentos dos isolados UFLA 15, UFLA 23, UFLA 24 e UFLA 44 de *S. sclerotiorum*. As placas foram mantidas à temperatura de 25°C na incubadora (B.O.D) com fotoperíodo de 12 horas. Após cinco dias, o diâmetro da colônia dos isolados de *S. sclerotiorum* foram medidas e assim, determinada a porcentagem de inibição do crescimento desses isolados confrontados com os endofíticos em relação ao crescimento das testemunhas. Os endofíticos que promoveram porcentagem de inibição no crescimento de *S. sclerotiorum* com média acima de 60% foram selecionados, sendo apenas três isolados endofíticos. O isolado Z26 inibiu o crescimento dos isolados UFLA 15; UFLA 24 e UFLA 44. Os isolados C19 e C12 inibiram o crescimento dos isolados UFLA 15 e UFLA 24, respectivamente. Nenhum dos fungos endofíticos inibiu o crescimento do UFLA 23. Os fungos endofíticos apresentaram resultados promissores no controle biológico do fitopatógeno *S. sclerotiorum in vitro*, no entanto, são necessários outros estudos para verificar seu potencial *in vivo*.

Agradecimentos: CAPES, FAPEMIG, CNPq.

Palavras-chave: Mofo branco, Controle biológico.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Avaliação da qualidade de lotes do biofungicida Tricovab®

G. R. Niella¹, A. Z. de M. Costa¹, J. J. C. Miranda², M. de Oliveira¹

¹CEPLAC/CEPEC/Seção de Fitopatologia, Itabuna-BA, Brasil; ²FTC - Faculdade de Tecnologia e Ciências de Itabuna, Itabuna-BA, Brasil, CEP 45600-081. E-mail: niella@uesc.br

Espécies do gênero *Trichoderma* são efetivas como agentes de controle biológico. Um isolado de *Trichoderma* descoberto em 1987 foi classificado como uma nova espécie, *Trichoderma stromaticum*. Este fungo é usado como princípio ativo do biofungicida Tricovab® utilizado no controle da vassoura de bruxa do cacauzeiro. Esta pesquisa foi realizada na Ceplac/BA, com objetivo de avaliar a qualidade de 41 lotes de Tricovab® produzidos em 2014/15. A amostragem foi realizada em 100 g de arroz em 10 diferentes pontos na secagem de cada lote (100 kg), constituindo uma amostra composta de 1 Kg. Desta, retirou-se 30 g e adicionou-se 60 mL de água destilada estéril, agitando-se por 2 minutos a 60 rpm, com 2 repetições por lote. Com esta suspensão, foram avaliadas a concentração, a porcentagem de germinação dos esporos do fungo e sua capacidade de colonização de ramos infectados com *Moniliophthora perniciosa*. A concentração mínima de esporo garantida pelo fabricante é de $2,3 \times 10^8$ esporos/g. Para avaliar a germinação foi utilizada uma suspensão de 2 a 4×10^6 esporos/mL e aprovados os lotes que tiveram germinação igual ou superior a 70%. A capacidade de colonização do fungo é um teste decisivo e foi realizada cortando três fragmentos de ramos infectados com *M. perniciosa* com aproximadamente 5 cm de comprimento que foram superficialmente desinfestados com hipoclorito a 1%. Após, os ramos foram imersos durante 2 minutos na suspensão de esporos, em seguida foram colocados em câmara úmida e incubado a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 24 horas, durante 10 dias. Todos os lotes apresentaram concentração superior à mínima garantida. Dos 41 lotes avaliados, 8 foram reprovados com uma porcentagem de germinação abaixo de 70%. A capacidade de colonização aprovou 33 lotes.

Agradecimentos: CEPLAC, FAPESB, CNPq.

Palavras-chave: Biofungicida, Controle biológico, *Moniliophthora perniciosa*, Vassoura-de-bruxa, Concentração, Germinação de esporos.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



***Bacillus subtilis* na supressão da brusone foliar em arroz**

L. S. D'Ávila¹, J. Símaro², M. C. C. Fillipi³

¹Universidade de Brasília, Departamento de Fitopatologia, Brasília-DF, Brasil;

²Bayer S.A., Marketing Cerrados, Brasil; ³Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás-GO, Brasil, CEP 75375-000. E-mail: silveiraleilane@gmail.com

A brusone, causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae*, é a principal doença do arroz, para seu controle utiliza-se principalmente agrotóxicos, na busca por outros métodos, o controle biológico, tem se mostrado promissor no manejo integrado da brusone. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito direto de Serenade® (*Bacillus subtilis*) no crescimento micelial, germinação de esporos de *M. oryzae* e na severidade da doença em plantas de arroz. Placas de petri contendo meio BDA suplementado com Serenade®, nas doses de 0; 1; 2; 2,5; 5 e 10 ppm receberam um disco de micélio do fungo e foram incubadas em BOD a 25 °C após 7 dias o crescimento relativo foi mensurado. No teste de germinação realizou-se a mistura de 30 µl de suspensão de conídios ($1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$) de *M. oryzae* contendo Serenade® para atingir concentrações finais de 0; 1; 2; 2,5; 5 e 10,0 µg mL⁻¹, as suspensões foram plaqueadas em superfície hidrofóbica e incubadas à 28°C e após 24h a germinação relativa calculada. Em casa de vegetação, plantas de arroz com 20 dias foram pulverizadas com Serenade® na dose (2L.ha⁻¹) e após 24 horas as plantas foram inoculadas com uma suspensão de conídios (3×10^5). Após 9 dias foi quantificada a severidade da doença. O crescimento micelial de *M. oryzae* foi inibido em 100% em todas as doses testadas. Os conídios não germinaram nas doses de 2, 5; 5 e 10 ppm, sendo que na dose 1 e 2 ppm houve uma germinação relativa de 18,54 e 11,83%, respectivamente. A severidade da brusone foliar foi reduzida em 88% no tratamento com Serenade®. O produto Serenade® foi eficiente no controle da brusone foliar em arroz, indicando seu potencial de uso no manejo da doença.

Palavras-chave: *Pyricularia oryzae*, Controle biológico.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Bactérias como agentes de controle de *Phytophthora nicotianae*

V. Giassi^{1,2}, C. Kiritani², K. C Kupper^{1,3}, W. L. F. Costa^{1,2,3}

¹Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós-graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural, Araras-SP, Brasil, CEP 13607-339; ²Centro de Pesquisa Mokiti Okada, Ipeúna-SP, Brasil, CEP 13537-000; ³Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC, Cordeirópolis-SP, Brasil, CEP 13490-970. E-mail: wesley.costa@cpmo.org.br

As interações entre micro-organismos e plantas têm grande influência sobre a sanidade e a nutrição das mesmas. Neste contexto, o uso de rizobactérias promotoras de crescimento pode melhorar o desenvolvimento das plantas, por meio de uma ampla variedade de mecanismos. O trabalho teve como objetivo avaliar bactérias como agentes de controle biológico de *Phytophthora nicotianae* na cultura de Citrus através da microbiolização. Ao todo foram avaliados 30 isolados bacterianos, sendo 11 *Bacillus* spp., 11 actinobactérias e 8 bactérias lácticas. Inicialmente, foram realizados ensaios com brotos de alfafa para selecionar os isolados bacterianos mais promissores para o biocontrole e, posteriormente, os melhores isolados foram inoculados em plantas de tangerina Sunki (*Citrus sunki* Hort. ex Tan) e limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) pelos métodos de microbiolização das sementes e microbiolização do substrato, avaliando-se o número de plantas sobreviventes 90 dias após a semeadura e inoculação. As médias foram comparadas por teste de Tukey a 5% de probabilidade. No bioensaio realizado com brotos de alfafa os isolados de bactéria lácticas BL06, BL12, BL14 e BL16 apresentaram 100% de inibição no número de esporângios. Os isolados BL06 e BL12 apresentaram controle acima de 80% para ambos porta-enxertos, independentemente de seu meio de microbiolização, apresentando potencial para serem utilizados como agentes de biocontrole da doença.

Agradecimentos: Centro de Pesquisa Mokiti Okada, Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC.

Palavras-chave: *Bacillus* spp., Actinobactérias, Bactérias lácticas, *Phytophthora nicotianae*.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Biocontrole de *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus* por meio de compostos voláteis produzidos por leveduras

M. L. Souza¹, L. L. Pimenta¹, L. R. Batista², C. F. Silva¹

¹Universidade Federal de Lavras, Setor Microbiologia Agrícola, Departamento de Biologia, Lavras, Brasil; ²Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciências dos Alimentos, Lavras, Brasil, CEP 37200-000. E-mail: linomariana@yahoo.com.br

O biocontrole é um método alternativo que visa à redução do uso de agrotóxicos em frutos. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar 18 isolados de leveduras, pertencentes aos gêneros *Debaromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* e *Saccharomyces* quanto à capacidade de produzir compostos voláteis e sua influência no crescimento micelial e produção de esporos dos isolados *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus*. Em placas de poliestireno bipartidas, contendo ágar extrato de malte, foram co-cultivados leveduras e fungos. Em um dos lados foi espalhado com swab 50 μ L da suspensão de leveduras (10^8 células/mL) e no outro, 5 μ L da suspensão de esporos (10^6 esporos/mL). O controle consistiu na inoculação apenas do fungo. As placas foram incubadas a 25°C por 7 dias e, posteriormente realizou-se a medição do crescimento colonial dos fungos com o auxílio de um paquímetro. *Saccharomyces* sp. inibiu 65% o crescimento colonial de *A. carbonarius* e 80% de *A. ochraceus*. *Pichia* sp. reduziu 70% do crescimento de *A. ochraceus* e 67% de *A. carbonarius*. A produção de esporos de *A. carbonarius* também foi fortemente inibida quando comparado com o controle. Essas leveduras produzem compostos voláteis capazes de interferir no desenvolvimento destes fungos.

Agradecimentos: FAPEMIG, CNPq, CAPES.

Palavras-chave: Controle biológico, Antagonismo, *Pichia* spp., Fungos toxigênicos.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Biocontrole de *Lasiodiplodia theobromae* da videira com uso de *Trichoderma harzianum*

C. Rusin¹, M. Carli¹, R. V. Botelho¹, C. M. D. R. Faria¹, M. A. K. Almança²

¹Universidade Estadual do Centro Oeste, Departamento de Agronomia, Guarapuava-PR, Brasil; CEP 85040-170; ²Instituto Federal do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, Brasil, CEP 95700-000. E-mail: carine.rusin@gmail.com

Diversos fungos são associados ao declínio ou morte da videira, dentre eles *Lasiodiplodia theobromae* é facilmente encontrado em plantas sintomáticas. Os agentes biológicos podem atuar de forma positiva no controle do patógeno. Assim, o objetivo do trabalho foi testar a ação do agente biológico *Trichoderma harzianum* no controle *in vitro* de *L. theobromae*. A avaliação de potencial de controle foi realizada através do método de culturas pareadas, no laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Centro Oeste. Foram utilizados dois isolados de *L. theobromae*, CMM-384 e CMM-307, oriundos de Petrolina, PE Um disco micelial do patógeno de 5mm de diâmetro foi inserido em um ponto da placa e em outro ponto equidistante inseriu-se 1mg de produto comercial à base de *T. harzianum* (1×10^{10} UFC/g p.c.). Placas contendo somente o patógeno foram utilizadas como controle. As placas foram mantidas em câmara de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 12 h. O experimento foi totalmente casualizado com cinco repetições. Após 36 h foi avaliado o crescimento micelial do patógeno e calculada a zona de inibição. A presença de *T. harzianum* foi significativa no controle micelial de *L. theobromae* inibindo em 34,9% e 66,2% o crescimento micelial dos isolados CMM-384 e CMM-307, respectivamente. Conclui-se que independentemente dos isolados responderem de forma diferente ao biocontrole, o *T. harzianum* possui eficácia na inibição do crescimento micelial do patógeno.

Agradecimentos: CAPES, BALAGRO.

Palavras-chave: Pareamento, Doenças de tronco, Botryosphaeriaceae.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Biocontrole *in vitro* de *Pyricularia oryzae* por isolados de *Trichoderma* spp.

L. S. Lopes¹, A. L. Silveira¹, M. G. O. Soares¹, A. V. Barros¹, S. I. Moreira¹, E. Alves¹

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Lavras-MG, Brasil, CEP 37200-000. E-mail: biolucassilveira@gmail.com

A brusone, causada por *P. oryzae* é a principal doença da cultura do arroz e promove prejuízos na produtividade e na qualidade dos grãos. O controle biológico com *Trichoderma* spp. tem sido utilizado como alternativa para o controle de patógenos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência inibitória de isolados de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *P. oryzae*. Foram utilizados dois isolados de *Trichoderma* e um isolado *P. oryzae*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram: T1- *T. harzianum*, T2- *T. asperellum*, T3- *P. oryzae*, T4- *P. oryzae* X *T. harzianum*, T5- *P. oryzae* X *T. asperellum*. Para a realização do teste de pareamento de culturas, discos de micélio de *P. oryzae* e *Trichoderma* foram pareados em placas de Petri com BDA, além de placas com *P. oryzae*, como controle e para comparação, placas com isolado de *T. harzianum* e *T. asperellum*. As placas foram mantidas em BOD à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Foram medidos os diâmetros ortogonais das colônias por sete dias. Com os dados obtidos calculou-se o IVCM (índice de velocidade de crescimento micelial) e a % I (porcentagem de inibição). Foi realizada análise de variância dos dados e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott. Houve diferença estatística para IVCM e os isolados testados, sendo que o isolado de *T. harzianum* foi o mais eficiente com média de 0,57 mm de IVCM e 95,41% de % I, seguido do *T. asperellum* com 5,13 mm de IVCM e de 58,82% de % I, demonstrando que as espécies de *Trichoderma* podem ser utilizadas como uma alternativa de controle de *P. oryzae* na cultura do arroz.

Palavras-chave: Controle biológico, Antagonismo, Inibição.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Capacidade predatória de *Ceraeochrysa cubana* e *Chrysoperla externa* alimentadas com o afídeo da roseira *Rhodobium porosum*

L. L. Pereira¹, L. A. G. Tamashiro¹, M. P. Rodrigues, L. P. S. Pereira¹, B. Souza¹,
C. F. Carvalho¹

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Entomologia, Lavras-MG, Brasil, CEP 37200-000. E-mail: laulopes28@gmail.com

O cultivo de plantas ornamentais enfrenta desafios que, em grande parte, estão relacionados com o controle de pragas. Em roseiras, *Rhodobium porosum* (Hemiptera: Aphididae) está entre os afídeos de maior importância para a cultura, sendo presa para os crisopídeos *Ceraeochrysa cubana* e *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae). Esses predadores compõem o rol de espécies afidófagas que podem ser utilizadas no controle desse inseto-praga. Porém, ainda são necessários estudos que busquem o conhecimento sobre sua capacidade predatória. Dessa forma, objetivou-se neste trabalho verificar o consumo de larvas de *C. cubana* e *C. externa* frente ao pulgão *R. porosum*, buscando-se averiguar a possibilidade de utilizar esses predadores para o controle do afídeo em roseiras. Foram utilizados folíolos de roseira dispostos em placa de Petri e infestados com ninfas de primeiro instar do afídeo, onde foi liberada uma larva de cada espécie de crisopídeo recém-eclodida. Avaliou-se o número de ninfas consumidas a cada 24h, ao longo de todo o desenvolvimento larval do predador, repondo-se, diariamente, o número inicial de presas conforme o instar do crisopídeo. Foram realizadas dez repetições por predador, para análise foi utilizado GLMM. Houve diferença no consumo de *R. porosum* em função dos instares dos predadores, constatando-se um aumento na predação ao longo do desenvolvimento larval, com o maior número de presas consumidas no terceiro estágio. Durante o primeiro, segundo e terceiro instares de *C. cubana* foram consumidas cerca de 56, 222 e 1012 ninfas, respectivamente. Para *C. externa*, o total de ninfas predadas foi próximo a 72, 290 e 2135, nos respectivos instares do crisopídeo. Verifica-se que ambos os predadores possuem potencial para utilização como agentes de controle desse afídeo em cultivos comerciais de rosas frente ao número de ninfas predadas. Novos estudos devem ser conduzidos visando conhecer as interações entre esses inimigos naturais quando utilizados conjuntamente.

Agradecimentos: CAPES, CNPq.

Palavras-chave: Controle biológico, Capacidade de predação, Crisopídeo, Pulgão, Cultivo de rosa.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Caracterização de leveduras isoladas da flosfera do cacaueteiro quanto à produção de toxinas *killer*

R. V. Niella¹, A. A. P. Neto², E. D. M. N. Luz²

¹Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, Brasil; ²Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira, Ilhéus-BA, Brasil, CEP 45662-000. E-mail: raquelniella@hotmail.com

Leveduras com atividade *killer* são capazes de produzir toxinas proteicas, inibindo o desenvolvimento de outra levedura, sendo imunes a si mesmas. Dessa forma, experimentos foram conduzidos na CEPLAC, para identificação do caráter *killer* em 60 isolados de leveduras autóctones do filoplano do cacaueteiro. Esses isolados foram selecionados quanto à habilidade de sintetizar compostos inibidores do crescimento e da esporulação do fungo *Moniliophthora perniciosa*. Em co-cultivo com nove isolados de leveduras *killer* da UEFS (K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K8, K9), que foram as leveduras padrão, ajustadas à concentração de 5×10^5 ufc/mL e distribuídas em placas de Petri com meio YEPD, semeando sob esta camada, as 60 leveduras em teste. Incubadas em B.O.D. à 25°C por 72 horas e observadas diariamente para a presença do fenótipo *killer* (K+) que se caracterizava pela formação de uma zona clara em volta das colônias das leveduras. O delineamento foi inteiramente casualizado, com três repetições e a testemunha. Dentre os nove isolados utilizados como padrão de sensibilidade *killer*, os mais representativos quanto à sensibilidade às 60 leveduras avaliadas foram os isolados K3 com 45,5%, K5 com 41,6%, e K2 com 40% de sensibilidade aos 60 isolados. Apenas 11 isolados (18,3%) não produziram halo de inibição quando cultivados as *killer* sensíveis (001, 007, 014, 030, 047, 068, 080, 085, 090, 122 e 187). Conclui-se que a manifestação desse fenótipo pode proporcionar vantagem através da inibição do crescimento de linhagens sensíveis indesejáveis minimizando as chances de contaminação externa.

Agradecimentos: CEPLAC, FABESP.

Palavras-chave: Toxinas Killer, Potencial biocontrolador, *Theobroma cacao*.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Compatibilidade entre produtos à base de *Trichoderma* spp. e fungicidas

A. A. Rezende, T. P. Morais, F. C. Juliatti

Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Agrárias, Uberlândia-MG, Brasil, CEP 38400-902. E-mail: juliatti@ufu.br

Diversos micro-organismos apresentam potencial antagônico a fitopatógenos. Dentre os biocontroladores, isolados selvagens e melhorados de *Trichoderma* spp. vêm sendo utilizados no controle biológico do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*). A adoção de uma tecnologia na cultura da soja e feijoeiro, no entanto, não implica na substituição de práticas rotineiras, como a utilização de defensivos. Assim, objetivou-se avaliar a compatibilidade entre fungicidas e produtos comerciais à base de *Trichoderma* spp. em ensaios conduzidos *in vitro* e após tratamento químico de sementes de soja. Isolados de *Trichoderma* spp. provenientes de quatro produtos biológicos foram inoculados em meio de cultura BDA contendo diferentes concentrações de fungicidas (0,1; 1; 10; 100 e 1000ppm). O nível de seletividade foi determinado baseando-se no índice de velocidade de crescimento das colônias (IVC), variando de ausente a muito boa (0 a 75-100% de IVC). Sementes de soja (cv. NK7074RR) foram previamente tratadas com os fungicidas (nas doses recomendadas pelos fabricantes) e homogeneizadas com suspensões dos bioprodutos. Coletaram-se amostras em três tempos de contato dos produtos nas sementes (0, 3 e 16 horas) para a avaliação da compatibilidade por plaqueamento. Os fungicidas Fluzinam e Procimidona apresentaram seletividade regular (25-50% de IVC) aos bioprodutos Quality (*T. asperellum*) e Trichodermil (*T. harzianum*) mesmo em altas concentrações (100 e 1000ppm). Após o tratamento das sementes, maiores porcentagens de germinação de *Trichoderma* foram obtidas com os fungicidas Tiofanato metílico e Procimidona para Quality e Trichodermil, independente de contato com os fungicidas nas sementes. Com estes resultados abre-se a perspectiva da associação dos agentes de biocontrole com fungicidas em sementes de soja.

Agradecimentos: CAPES.

Palavras-chave: Tratamento de sementes, Controle biológico, *Glycine max*.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Compostos orgânicos voláteis do fungo *Muscodor* sp. sobre *Meloidogyne incognita*

D. G. T. Galvão¹, Í. A. F. M. Santos¹, F. J. Silva², E. S. Freire², P. G. Cardoso¹

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia, Lavras-MG, Brasil;

²Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Lavras-MG, Brasil, CEP 37200-000. E-mail: dericatavares@gmail.com

Dentre os metabólitos secundários sintetizados por fungos destacam-se os compostos orgânicos voláteis (COVs). Diversas pesquisas indicam grande potencial desses compostos no controle de fitopatógenos. O nematóide *Meloidogyne incognita* é um patógeno de plantas que causa perdas em diversas culturas de interesse econômico. Objetivou-se avaliar o efeito dos COVs do fungo endofítico *Muscodor* sp. sobre *M. incognita*. O fungo foi cultivado em meio YES em placas de Petri bipartida durante 3, 6, 9 e 12 dias de crescimento a 25 °C. Após cada período foram adicionados juvenis de *M. incognita* de segundo estágio (J2) e incubados por 72h a 25 °C. Em seguida os J2 foram recolhidos e colocados em mudas de tomateiro. Aos 45 dias avaliou-se a reprodutibilidade do nematóide. Foi encontrado um número de ovos por grama de raiz de 61 e 43,9 para 12 e 9 dias, respectivamente. Não foram observados ovos para 6 e 3 dias de crescimento. Os resultados mostram que a incubação do fungo *Muscodor* sp. por 6 dias foi mais eficiente na produção de COVs tóxicos ao *M. incognita*. Experimentos estão sendo realizados visando confirmar os resultados obtidos.

Agradecimentos: CNPq, CAPES, FAPEMIG.

Palavras-chave: Metabólitos secundários, Fungo endofítico, Nematóide das galhas.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Contribuição de resíduos orgânicos nas propriedades do solo e sobrevivência de *Stenocarpella* em colmos de milho

M. R. Faria¹, R. A. Guimarães¹, P. F. Pereira¹, F. A. M. F. Pinto¹, W. Bettio², F. H. V. Medeiros¹

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia e Ciências do solo, Lavras-MG, Brasil, CEP 37200-000; ²Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, Brasil, CEP 13820-000. E-mail: mirianrabelofaria@yahoo.com.br

Sistema de plantio direto de milho associado ao monocultivo pode contribuir para o aumento da sobrevivência de patógenos na palhada da cultura no campo, o que ocasiona elevação da incidência de doenças como as causadas por fungos do gênero *Stenocarpella*. Uma estratégia para reduzir o tempo de sobrevivência destes agentes patogênicos é através da aplicação de microrganismos e matéria orgânica no solo. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da aplicação de resíduos orgânicos no solo e sobre a sobrevivência de *Stenocarpella* em caules de milho em Lavras e Sete Lagoas. Os caules de milho infestado com o patógeno foram mantidos no campo por três meses após a aplicação de resíduos orgânicos [cama de frango (CF), esterco de suínos (ES), hidrolisado de peixe (HP), lodo de esgoto (LE)] e ureia. Colmos com o patógeno, mas sem adição de resíduos foram mantidos na superfície ou incorporados ao solo representando os controles negativo e positivo. Foram feitas avaliações da atividade microbiana indireta [β -glicosidase e Hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA)], análise química do solo e dinâmica da população do patógeno através de qPCR. Em Lavras e Sete Lagoas o teor de cálcio aumentou quando CF foi aplicada no solo e em Sete Lagoas, ES também elevou o teor de Ca no solo. CF contribuiu para aumento no teor de N e C total do solo, em Sete Lagoas e Lavras. O aumento da atividade β -glicosidase ocorreu para HP, LE, CF e ureia em Lavras e em Sete Lagoas somente HP e ureia. Ocorreu aumento da hidrólise da FDA em Lavras para CF, ureia, e os controles negativo e positivo. Em Sete Lagoas, a hidrólise FDA aumentou no solo com CF, HP, ES e ureia. Os tratamentos com colmo na superfície e colmos enterrados nos dois locais apresentaram a maior redução do patógeno, seguido por LE em Lavras e, HP e LE em Sete Lagoas. Hidrolisado de peixe e lodo de esgoto são promissores na indução de supressividade, pois elevaram a atividade enzimática do solo e reduziram a quantidade de patógeno.

Palavras-chave: *Zea mays*, Resteva, *Stenocarpella maydis*, *Stenocarpella macrospora*.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Controle biológico de *Fusarium* em sementes de pínus

A. L. M. do Carmo¹, A. F. dos Santos², J. A. T. Sousa³

¹Universidade Federal do Paraná, Pós-graduação em Agronomia, Curitiba-PR, Brasil, CEP 80035-050; ²Embrapa Florestas, Colombo-PR, Brasil, CEP 83411-000; ³União Latino-americana de Tecnologia, Engenharia Florestal, Jaguariaíva-PR, Brasil, CEP 84200-000. E-mail: alvaro.santos@embrapa.br

O controle biológico tem sido uma alternativa para o controle de doenças de plantas; no entanto, há falta de trabalhos na área florestal. Este trabalho teve o objetivo de avaliar a eficiência de quatro isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium graminearum* e *Fusarium* sp. em sementes de pínus. Sementes de *Pinus taeda* e *P. elliottii*, desinfestadas, foram inoculadas por meio do contato com a cultura de *Fusarium* spp. em batata-dextrose-água, por 48 horas. Após, as sementes foram imersas em suspensão de *Trichoderma* spp. na concentração de 10⁸ conídios/mL, por 30 minutos. As sementes de *P. taeda* foram inoculadas com *F. graminearum* e *P. elliottii* com *Fusarium* sp. A testemunha consistiu em sementes inoculadas apenas com *Fusarium* spp. Foram avaliados quatro isolados de *Trichoderma* spp. As sementes foram semeadas em tubetes contendo substrato comercial e mantidas em casa de vegetação. A avaliação consistiu na quantificação da emergência de plântulas (EP) e mudas sintomáticas (MS), diâmetro de coleto (DC), altura (A), comprimento de raízes (CR), peso fresco de parte aérea (PFA) e radicular (PFR), peso seco de parte aérea (PSA) e raízes (PSR), a relação A/DC e DC/A e índice de qualidade de Dickson (IQD). O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento. O ensaio foi realizado duas vezes. Os isolados de *Trichoderma* spp. não diferiram estatisticamente da testemunha para EP e MS. Houve diferença estatística para parâmetros de crescimento. Em *P. taeda* o isolado TPtecNE4 aumentou o DC e em *P. elliottii*, o isolado TPPNE8, aumentou o DC, PFR, A/DC e DC/A.

Palavras-chave: Espécie florestal, Biocontrole, Promoção do crescimento.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Control biológico de hongos fitopatógenos de semillas de sésamo (*Sesamum indicum* L.) con bacterias antagonicas

D. Echeverría¹, C. Grabowski¹

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Agrarias - Área de Protección Vegetal – Fitopatología, San Lorenzo, Paraguay. E-mail: cgrabowski@agr.una.py

El sésamo Paraguay exportado cuenta con la declaración orgánica exigido por países importadores debido la detección de residuos de productos fitosanitarios utilizados para la producción por lo que tratamientos fitosanitarios no pueden ser realizados de manera informal y sin asesoramiento técnico. Así, con el objetivo de evaluar el potencial de control biológico de patógenos transmitidos por semillas de sésamo con las bacterias benéficas *Bacillus* sp., *Pseudomonas fluorescens* y *Streptomyces* sp. se verificó el antagonismo ejercido por la producción de compuestos antimicrobianos hidrosolubles y volátiles sobre el crecimiento de los patógenos en condiciones *in vitro* utilizando los métodos de placa pareada y cultivo pareado. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar (DCA). Los resultados indican que *Bacillus* sp., *P. fluorescens* y *Streptomyces* sp., poseen un efecto antagonico sobre los hongos *Alternaria sesami* y *Cercospora sesami*, por el efecto de los compuestos volátiles inespecificos; y por compuestos antimicrobianos producidos en el medio por *Bacillus* sp., y *Streptomyces* sp. fueron capaces de inhibir el crecimiento micelial de *F. oxysporum* f.sp. *sesami*, *A. sesami*, y *C. sesami*. En condiciones controladas las bacterias benéficas no redujeron significativa la incidencia de *M. phaseolina*. *Streptomyces* sp., redujo significativamente la incidencia en un 60,2% y agresividad en 36,3% del hongo *F. oxysporum* f.sp. *sesami* con relación al testigo absoluto, mientras que las cepas bacterianas de *Bacillus* sp. y *P. fluorescens* redujeron la incidencia en 69,2% y 76,5 respectivamente.

Palabras-clave: Bacterias antagonicas, *Sesamum indicum*, Patógenos de semillas.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Controle alternativo de doenças pós-colheita em mamão Formosa ‘Tainung 01’

A. M. M. Dantas¹, S. R. C. Nascimento², B. L. S. Cruz³, M. M. Q. Ambrósio²,
F. H. A. Silva²

¹Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Viçosa, Brasil, CEP 36570-000; ²Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró-RN, Brasil, CEP 59625-900; ³Universidade Federal Rural de Pernambuco-Recife, Brasil, CEP 50670-901. E-mail: andrea.dantas@ufv.br

A ocorrência de doenças pós-colheita em mamão (*Carica papaya* L.) é um dos principais fatores limitantes a comercialização desta frutífera no mundo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de produtos alternativos no controle *in vitro* de fungos fitopatogênicos e na doença pós-colheita do mamão Formosa ‘Tainung 01’. O experimento *in vitro* foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco fungos (*Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia theobromae* e *Rhizopus* sp.) x cinco tratamentos (óleo essencial de cravo-da-Índia, *Trichoderma harzianum*, fosfito de cobre, fungicida Imazalil e testemunha) e cinco repetições. No experimento *in vivo*, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos (óleo essencial de cravo-da-Índia, *T. harzianum*, fosfito de cobre, Imazalil e testemunha) x cinco tempos de armazenamento (zero, 7, 14, 21 e 28 dias, acrescido de 2 dias de shelf life para cada tempo a 25 ± 2 °C), com cinco repetições e três frutos por repetição. Os frutos foram armazenados em refrigeração a 10 ± 2 °C e 90 ± 5% UR. As avaliações foram quanto à inibição do crescimento micelial, para o experimento *in vitro*, e no *in vivo* avaliou-se a ocorrência de doenças pós-colheita. O óleo essencial de cravo-da-Índia e *T. harzianum* foram tão eficientes quanto o Imazalil na inibição do crescimento micelial de *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp. e *Rhizopus* sp. Até 21 dias de armazenamento, os tratamentos com cravo-da-Índia, *T. harzianum* e Imazalil foram iguais quanto ao controle de patógenos. Os demais tratamentos não foram eficientes.

Agradecimentos: CAPES, UFERSA, AGRÍCOLA FAMOSA, FAPEMIG.

Palavras-chave: *Carica papaya* L., Cravo-da-Índia, Fosfito de cobre, *Trichoderma harzianum*.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Controle biológico da Mancha Preta dos Citros por *Bacillus subtilis*: uma alternativa para a citricultura orgânica

W. L. F. Costa^{1,2}, K. C. Kupper², R. C. Botelho¹, S. K. Homma¹, A. C. da Silva²,
V. Giassi¹

¹Centro de Pesquisa Mokiti Okada, Ipeúna-SP, Brasil, CEP 13537-000; ²Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC, Cordeiropolis-SP, Brasil, CEP 13490-970.
E-mail: wesley.costa@cpmo.org.br

A Mancha Preta dos Citros (MPC), causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kieley (*Phyllosticta citricarpa* (McAlp.) van der A.A.), é uma das principais doenças dos citros. Mesmo no cultivo convencional o leque restrito de produtos para o controle da doença é preocupante uma vez que pode selecionar estirpes resistentes do patógeno. Na agricultura orgânica é ainda mais complicado, sendo os produtos à base de cobre a única alternativa para o controle. O uso de agentes de biocontrole pode ser uma alternativa interessante para o manejo da doença e, entre os organismos mais estudados encontram-se as bactérias do gênero *Bacillus* spp. Este trabalho teve por objetivo avaliar um isolado de *B. subtilis* no controle da MPC em pomar de citros orgânico. O Ensaio foi realizado em um pomar comercial no município de Mogi-Guaçu/SP durante a safra 2014/2015. Foram avaliadas duas áreas de laranja doce (variedade Westin). Na área convencional foram realizadas duas pulverizações de óxido cuproso e duas de óxido cuproso mais piraclostrobin (estrobirulina), enquanto que, na área de pomar orgânico foram realizadas cinco aplicações com a bactéria (10^8 células. mL⁻¹). A severidade da doença foi avaliada uma semana antes da colheita, utilizando uma escala diagramática que confere notas de severidade de acordo com o nível de sintomas nos frutos, determinando-se o índice de doença (ID). Para o tratamento convencional o ID foi de 0,58 e, no tratamento biológico foi de 2,62. Em áreas sem aplicação de produtos, o índice de doença foi de 4,0. O isolado apresentou um controle interessante embora ainda não podendo ser equiparado ao manejo convencional.

Agradecimentos: Centro de Pesquisa Mokiti Okada, Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC.

Palavras-chave: *Citrus* spp., *Phyllosticta citricarpa*, Índice de doença.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Controle de *Thielaviopsis paradoxa* em cana-de-açúcar por meio da utilização de produtos formulados à base de *Bacillus* spp.

F. Brandi¹, T. C. Ferreira², D. P. Silva³, W. Bettiol⁴

¹Bayer S.A, Divisão de Crop Science, Paulínia-SP, Brasil, CEP 01525-000; ²UNESP/FCA, Botucatu-SP, CEP 18610-307; ³FHO/UNIARARS, Araras-SP, Brasil, CEP 13607-339; ⁴Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, Brasil, CEP 13820-000. E-mail: ferreira_uepb@hotmail.com

O fungo *Thielaviopsis paradoxa* é um habitante natural dos solos e importante patógeno da cana-de-açúcar e de outras culturas agrícolas. São poucos os estudos com *Bacillus* spp. visando ao seu controle. O objetivo deste trabalho foi avaliar a efetividade de produtos formulados à base de *Bacillus* spp. contra *T. paradoxa* em cana-de-açúcar. Para isto foram plantados, em bandejas previamente preenchidas com solo infestado com *T. paradoxa*, microtoletes da variedade RB867515 tratados com os seguintes produtos e dosagens separadamente: *B. pumilus* QST 2808 (BP) e *B. subtilis* QST 713 (BS) – 5, 10 e 20 mL/Litro de calda; BP + BS – 5 mL/L; Azoxistrobina (Estrobilurina) + Ciproconazol (Triazol) [fungicida químico] - 1,25 mL/L; BP e BS combinados com o tratamento com fungicida químico - 5 e 1,25 mL/L, respectivamente. Esses tratamentos foram comparados com testemunha absoluta e testemunha com solo infestado com o patógeno. As bandejas foram acondicionadas em ambiente climatizado por 63 dias e avaliados os parâmetros fitotécnicos (índice de emergência, altura das plantas, peso úmido e seco do sistema radicular, foliar e total) e determinada a incidência. As misturas entre os produtos não foram efetivas e *B. subtilis* QST 713, nas dosagens de 10 e 20 mL/Litro de calda, obtiveram resultados mais promissores (maior fitomassa) do que os demais tratamentos no controle de *T. paradoxa* e na promoção de crescimento em cana-de-açúcar.

Agradecimentos: Bayer S.A, Embrapa Meio Ambiente.

Palavras-chave: Controle biológico, *Bacillus subtilis*, *Thielaviopsis paradoxa*, *Saccharum officinarum*.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Diferentes épocas e sítios de aplicação de *Clonostachys rosea* e acibenzolar-S-metil no controle do mofo cinzento do tomateiro

A. V. Borges¹, F. C. Borel¹, R. M. Saraiva¹, L. A. Maffia¹

¹Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Viçosa-MG, Brasil, CEP 36570-000. E-mail: alefevborges@gmail.com

Clonostachys rosea pode controlar patógenos em diferentes culturas, inclusive *Botrytis cinerea*, agente causal do mofo cinzento em tomateiro. Objetivou-se avaliar o efeito da aplicação de *C. rosea* (10^6 conídios.mL⁻¹) e acibenzolar-S-metil (ASM) (0,05 g.L⁻¹) no controle de *B. cinerea* em hastes de tomateiros em diferentes épocas e sítios de aplicação. Aplicaram-se os tratamentos 6, 4, 2 e 1 dia(s) antes ou imediatamente sobre um ferimento de desfolha artificial no qual, em seguida, inoculou-se o patógeno com 30 µL de suspensão contendo 10^5 conídios.mL⁻¹. A aplicação foi feita no local de inoculação, na parte aérea distante do local de inoculação (aspersão) ou no solo (50 mL.vaso⁻¹). As plantas foram mantidas a 22 °C, fotoperíodo de 12 h e avaliou-se diariamente, até o oitavo dia, o comprimento das lesões causadas na haste. Com estes valores, estimaram-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e a taxa de expansão da lesão. Não houve redução significativa da intensidade da doença independentemente do local e época de aplicação de ASM, nem quando se aplicou *C. rosea* distante do ferimento. O antagonista foi eficiente quando aplicado no local de inoculação do patógeno, principalmente aos 6 e 4 dias antes ou sobre o ferimento no caule. Em vista dos resultados, há necessidade da presença do antagonista colonizando os tecidos antes da chegada do patógeno para controle do mofo cinzento. Portanto, *C. rosea* tem potencial no controle do mofo cinzento em tomateiros quando aplicado sobre os possíveis sítios de infecção pelo patógeno.

Agradecimentos: FAPEMIG, CNPq.

Palavras-chave: Mofo cinzento, Manejo integrado, Controle biológico.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Efeito do nematicida QRD 7017 (*Paecilomyces lilacinus* cepa 251- 200g/L) no controle do nematoide-das-galhas (*Meloidogyne incognita*) na cultura da cenoura (*Daucus carota*)

S. R. Souza¹, V. F. Pereira², F. O. Asselta³

^{1,2}Pesquisadoras da Agroteste Pesquisa e Desenvolvimento, Lavras-MG, Brasil, CEP 37200-000; ³BAYER, Paulínia- SP, Brasil, CEP 13148-914. E-mail: vanessa@agroteste.com

A cenoura é uma hortaliça pertencente ao grupo das raízes tuberosas e cultivada em larga escala no Brasil. Os nematoides de galhas atacam as raízes dessa cultura ocasionando redução de produtividade, deformações e interferência no comprimento das raízes. Desta forma torna-se necessária a avaliação de produtos que atuem no controle desses patógenos com menor impacto ambiental. O objetivo do experimento foi avaliar o efeito do nematicida QRD 7017 (*Paecilomyces lilacinus*, cepa 251), no controle do *M. incognita* na cultura da cenoura, e na produtividade, aplicado em diferentes doses e intervalos. O experimento foi realizado no município de Campos Gerais, MG. Os tratamentos avaliados foram: testemunha, QRD 7017 (0,75 L.ha⁻¹) em aplicações A (na semeadura), AC (na semeadura e 6 semanas após a semeadura) e ABCD (na semeadura; 2 semanas após a semeadura; 6 semanas após a semeadura e 10 semanas após a semeadura); QRD 7017 (1,5 L.ha⁻¹) em aplicação A e AC; e padrão Nemat (0,6 Kg.ha⁻¹) em aplicação AC. O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados, com 7 tratamentos e 4 repetições. Foram realizadas avaliações de severidade de ataque às raízes, número de ovos e juvenis/g de raiz, peso fresco de raiz, juvenis/100 cm³ de solo e produção. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). O nematicida QRD-7017 aplicado na dose de 0,75 L.ha⁻¹ e nos intervalos AC e ABCD, foi significativamente semelhante ao Nemat e superior a testemunha, no controle das galhas (*M. incognita*) na cultura da cenoura (*Daucus carota*). Esses tratamentos apresentaram praticabilidade agrônômica além de incrementar a produção, podendo ser indicado para o uso no manejo integrado de fitonematóides na cultura.

Palavras-chave: Controle biológico, *Meloidogyne incognita*, Hortaliças.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Efeito do *Trichoderma asperellum* e *T. harzianum* no crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* do mamoeiro

M. G. O. Soares¹, A. L. Silveira¹, L. S. Lopes¹, A. V. Barros¹, F. S. França¹, E. Alves¹

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Lavras-MG, Brasil, CEP 37200-000. E-mail: gilmarasoaes2009@hotmail.com

O mamoeiro é uma frutífera de grande importância econômica. A antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* é a principal doença de pós-colheita. *Trichoderma* spp. são utilizados como antagonistas de diversos fitopatógenos, e constituem uma alternativa biológica no controle de doenças pós-colheita. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de *T. asperellum* e *T. harzianum* na inibição do crescimento micelial de *C. gloeosporioides*. O ensaio foi conduzido em DIC com cinco tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram: T1- *T. harzianum*, T2- *T. asperellum*, T3- *C. gloeosporioides*, T4- *C. gloeosporioides* x *T. harzianum* e T5- *C. gloeosporioides*. x *T. asperellum*. Discos de micélio de 5 mm de diâmetro dos isolados de *Trichoderma* spp. e *C. gloeosporioides* foram pareados em extremos de placas de Petri contendo meio BDA. Para os tratamentos controles, discos de micélio dos fungos estudados foram inseridos no centro das placas para fins comparativos. As placas foram incubadas em BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 h. O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado através de medições diárias do diâmetro das colônias. Os dados foram submetidos à ANOVA, e as médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott. Houve diferença significativa entre o IVCM e os isolados testados. *T. harzianum* apresentou maior eficiência na inibição do crescimento micelial com média de 6,92 mm e percentual de inibição 54,09%, seguido do *T. asperellum* com média de 9,20 mm e 39,03% de percentual de inibição. As espécies de *Trichoderma* testadas possuem potencial de inibição de *C. gloeosporioides in vitro*, e possível controle biológico em condições de campo.

Palavras-chave: *Carica papaya*, Antagonismo.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Efeito dos fungos endofíticos *Neofusicoccum parvum* e *Schizophyllum commune* no controle da *Cercospora beticola*

F. J. Telaxka¹, F. A. Salinas¹, C. M. D. R. Faria¹, A. J. Maia¹, J. Vanessa¹, E. Pittner¹

¹Universidade Estadual do Centro Oeste do Paraná, Guarapuava-PR, Brasil, CEP 85040-170. E-mail: fabio1910@live.com

Microrganismos endofíticos vivem no interior das folhas de plantas sem ocasionar problemas há seus hospedeiros, embora possam ser confundidos com fitopatógenos. Estudos evidenciam também seu envolvimento na produção de compostos que conferem resistência nas plantas à fitopatógenos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antagonístico de *Neofusicoccum parvum* e *Schizophyllum commune* sobre *Cercospora beticola*. Para tanto, foi utilizado placas de Petri contendo o meio batata-dextrose-ágar (BDA), cobertas assepticamente com um disco de papel celofane, esterilizado em autoclave a 120 °C, durante 30 minutos. Um disco de 12 mm de diâmetro, contendo micélio e esporos dos possíveis fungos antagonistas, crescidos em meio BDA por cinco dias foi colocado no centro das placas, sobre o papel celofane. As placas foram incubadas em câmara climatizada a 22 °C por 48 horas (h) (até o micélio atingir um crescimento de dois terços da placa), quando o papel celofane foi retirado juntamente com a colônia do fungo antagonista. Discos de micélio de *C. beticola* foram retirados do meio BDA e transferidos para o centro das placas de Petri contendo os metabólitos não voláteis dos possíveis antagonistas. As placas foram incubadas a 22 °C, com fotoperíodo de 12 h. Após quatro dias de incubação foi avaliado o desenvolvimento micelial. Observou-se que não houve diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância, sendo a média de 3,76 cm, 3,56 cm e 3,5 cm para a testemunha, *S. commune* e *N. parvum*, respectivamente. Portanto, os fungos endofíticos não são antagonísticos à *C. beticola*.

Agradecimentos: UNICENTRO, CAPES.

Palavras-chave: Antagonismo, Simbiose, Controle biológico.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Eficacia de TRICHOMAX (*Trichoderma viride*) en el control preventivo de *Phytophthora cinnamomi* (causante de pudrición radicular) en plántones de palto var. Zutano en condiciones de vivero. La Libertad, Perú

B. León, M. Alcántara, G. Santillán, D. Moreno, R. Castro, K. Barrionuevo
SOLAGRO S.A.C. E-mail: solagrosac@gmail.com

El palto ha aumentado considerablemente su importancia en la última década. En el Perú, se reportan 24.000 hectáreas sembradas, exclusivamente la variedad Hass injertado sobre zutano. La tristeza del aguacatero o pudrición radicular causada por *Phytophthora cinnamomi*, es reconocida como la enfermedad más destructiva e importante de este cultivo. Como una alternativa al control químico de enfermedades, se han realizado intensas investigaciones, identificado hongos del género *Trichoderma* con efecto de supresión sobre *P. cinnamomi*. El presente estudio se planteó como objetivo evaluar cuatro dosis (5, 10, 20 y 30 g/planta) de producto Trichomax (*Trichoderma viride*) en el control preventivo de *P. cinnamomi* en plántones de Palto en condiciones de vivero. Como resultados, al evaluar la intensidad de daño, de las plantas inoculadas con este producto, no se observan diferencias significativas entre las diferentes dosis, sin embargo si de éstas con respecto al Testigo, es decir se pudo proteger la raíz del ataque del patógeno. Con respecto a la evaluación de medidas de peso fresco y seco de follaje, peso fresco y seco de raíz, altura de follaje, diámetro del tallo y longitud de raíces se obtuvo que la dosis de 20g/planta presentó las mayores medidas biométricas con respecto al Testigo. Al proteger las raíces con TRICHOMAX (*Trichoderma viride*.) de este patógeno de pudrición radicular, obtenemos como resultado una planta vigorosa.

Agradecimientos: Empresa BEGGIE – Perú.

Palabras-clave: Palto, Hass, *Trichoderma*, *P. cinnamomi*, Medidas biométricas.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Eficiência de *Bacillus subtilis* e extrato de cravo-da-índia no controle de *Botrytis cinerea* em cachos da cv. Chardonnay

M. R. Oliveira¹, J. C. Tonello¹, C. V. Chieli¹, M. A. K. Almança¹

¹Instituto Federal do Rio Grande do Sul, Campus Bento Gonçalves-RS, Brasil, CEP 95700-000. E-mail: maikersaa@gmail.com

O objetivo deste trabalho foi testar a eficiência de *B. subtilis* e o extrato aquoso de cravo-da-índia no controle do mofo cinzento, causado por *B. cinerea* em condições de campo. O ensaio foi realizado em um parreiral (cv. Chardonnay/porta-enxerto P1103) localizado no município de Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul. Os tratamentos utilizados foram: T1 - Cravo-da-índia, dose de 1% em água e volume de calda de 200L/ha; T2 - *B. subtilis*, dose de 0,5/100L de água e volume de calda de 200L/ha; T3 - cravo-da-índia (1% em água) e *B. subtilis* (0,5L/100 L de água) e volume de calda de 200L/ha; T4 - Controle positivo, fungicida Iprodiona (Rovral®), dose de 100g/100L de água e volume de calda de 300L/ha; T5 – Controle negativo, sem aplicação de fungicidas. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com 3 blocos e 9 repetições (plantas). Em cada planta foram avaliados 5 cachos, quanto a incidência e severidade de podridão cinzenta pela escala diagramática. As aplicações foram realizadas a partir do estágio fenológico com 50% das caliptras abertas, ervilha, na fase de fechamento de cacho e a mudança de cor com um pulverizador eletrônico Pulvimat PE 18 de pressão uniforme na altura dos cachos. As avaliações iniciaram na fase fenológica de pegamento de cachos, fechamento do cacho, mudança de cor e dia da colheita. Os tratamentos T1, T2, T3 e T4, observou-se o maior índice de severidade 15,6% e incidência 28,8% na testemunha (T5). Os tratamentos T1, T2, T3 e T4 não diferiram entre si, demonstrando igual eficiência entre o controle biológico e químico.

Agradecimentos: FAPERGS, Vinícola Pizzato.

Palavras-chave: Controle alternativo, Mofo cinzento, Viticultura.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Eficiência de biofungicidas no controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* na cultura da soja na Região dos Chapadões

R. D. J. Pereira¹, E. P. Borges¹, A. R. Dias¹, G. C. Lima¹, J. E. Paschoal¹, A. C. Cervigni¹

¹Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária de Chapadão, Departamento de Fitopatologia, Chapadão do Sul-MS, Brasil, CEP 79560-000. E-mail: romulo-jb@hotmail.com

O mofo branco é uma doença importante na cultura da soja e pode provocar reduções de produtividade de até 70%. Os biofungicidas podem apresentar uma solução eficiente para o manejo sustentável deste patógeno. O objetivo do trabalho foi avaliar a eficácia de diferentes biofungicidas no controle biológico do mofo branco na cultura da soja na região de Chapadão do Sul-MS. O experimento foi instalado no dia 29/10/2015, utilizando a variedade P98Y30 RR. Os tratamentos foram: testemunha absoluta, Trichodermil, StimuControl S, Quality, Predatox, Ecotrich, Sonata, Serenade e Trichodermax. As aplicações de biofungicidas foram realizadas nos estádios V3 e V6 da cultura, ainda uma aplicação do fungicida Frownicide em R1 para todos os tratamentos. O delineamento experimental de blocos casualidades com 4 repetições, parcelas de 21,6 m². Antecedendo a primeira aplicação, foi distribuído ao centro das parcelas e abaixo da palhada, dois sacos de rede contendo 100 escleródios cada, que foram retirados 10 dias após a pulverização no estádio R1, em seguida foram encaminhados para laboratório, para determinar a percentagem de germinação carpogênica em escleródios, número de escleródios podres e escleródios com *Trichoderma*. A campo, foi avaliado a incidência e severidade da doença em plantas de soja, e a produtividade. Os dados foram transformados em $(x+k)^{1/2}$ com $k = 0,5$, médias comparadas através do teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os tratamentos com biofungicidas comparados com a testemunha nenhum apresentou diferença estatística no que diz respeito a percentagem de germinação carpogênica, número de escleródios podres e escleródios com *Trichoderma*. Não foi constatada a incidência e severidade na cultura da soja, devido a condições climáticas desfavoráveis ao desenvolvimento do patógeno, acredita-se, que pelo mesmo motivo não foi constatada diferença para as análises realizadas em laboratório, consequentemente não houve diferença para a produtividade de soja. Portanto, apesar de que neste trabalho a eficiência de controle de biofungicidas não foi observada sugere-se a realização de novos trabalhos a campo e laboratório para complementação deste resultado.

Agradecimentos: Fundação Chapadão.

Palavras-chave: Controle biológico, Mofo branco, *Glycine max*.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Eficiência de produtos comerciais à base de *Trichoderma* spp. no controle do mofo branco na cultura da soja

A. A. Rezende, T. P. Morais, F. C. Juliatti

Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Agrárias, Uberlândia-MG, Brasil, CEP 38400-902. E-mail: juliatti@ufu.br

O manejo eficiente do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), pode ser obtido através do controle biológico com *Trichoderma* spp. Avaliaram-se os produtos à base de *Trichoderma* spp. disponíveis no mercado (Quality, Trichodermil e Trichodermax) foram testados. Previamente, verificou-se a qualidade dos bioprodutos mediante quatro critérios: contaminação por bactérias, concentração por contagem e em placa e viabilidade (% germinação) dos conídios. A capacidade antagonista dos isolados de *Trichoderma* spp. contra o patógeno foi realizada segundo metodologia adaptada de cultura pareada. Para tanto, utilizou-se o isolado de *S. sclerotiorum* proveniente de Jataí-GO, identificado como muito agressivo. Em ensaio de campo em blocos casualizados com quatro repetições avaliou-se a incidência (%), severidade (%), índice de doença (ID), reposição de escleródios (g) e produtividade (Kg.ha⁻¹) para os produtos biológicos no controle do mofo (cultivar BRS Valiosa RR – considerada suscetível) foi comparada a fungicidas Fluazinam (duas pulverizações a partir de R1) e Tiofanato metílico (3 pulverizações a partir de R1). Todos os isolados analisados mostraram-se antagonistas à *S. sclerotiorum*, colonizando o patógeno por penetração e/ou estrangulamento de suas hifas. Na eficiência do controle da doença destacaram Quality e Trichodermil, que apresentaram eficiência semelhante aos fungicidas Fluazinam e Tiofanato metílico na redução da incidência, severidade da doença e manutenção da produtividade da soja.

Agradecimentos: CAPES.

Palavras-chave: *Sclerotinia sclerotiorum*, Controle biológico, Antagonismo.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Filtrado do fungo *Curvularia eragrostidis* no manejo de *Meloidogyne javanica*

L. V. Obici¹, T. Menegassi¹, C. M. D. R. Faria¹, C. D. Leite², D. Bortuli¹, L. M. A. Costa³

¹Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava-PR, Brasil, CEP 85040-170; ²Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco, Pato Branco-PR, Brasil, CEP 85503-390; ³Faculdade Campo Real, Guarapuava-PR, Brasil. E-mail: lucianaobici@hotmail.com

Os nematoides das galhas causam prejuízos a diferentes culturas. Várias pesquisas demonstram o potencial de produção de metabólitos secundários fúngicos que controlam esses nematoides. Objetivou-se avaliar o efeito do filtrado de *Curvularia eragrostidis* no manejo de nematoides de galhas de tomateiro. Os tratamentos constituíram de testemunha (água), tratamento padrão avermectina, tratamento padrão biológico (*Purpureocillium lilacenum*) e filtrado fúngico. No ensaio *in vitro*, adicionou-se em tubos de ensaio 50 ovos de *Meloidogyne javanica* e os tratamentos. Após 15 dias a 25°C no escuro, foi avaliado o percentual de J2 eclodidos. Mudanças de tomateiro foram transplantadas em vasos (2,5 L) com solo e areia estéril. Foram inoculados 3.000 ovos em orifícios próximo ao colo das plantas, e aplicou-se 20 mL do filtrado por repetição, para os tratamentos padrão avermectina e biológico utilizou-se a recomendação do fabricante. O tratamento com o filtrado foi repetido três vezes e após 60 dias avaliou-se a altura de parte aérea, a massa da parte aérea fresca e seca, a massa fresca do sistema radicular, número de ovos e de galhas. O tratamento com filtrado foi superior à testemunha e ao padrão biológico na variável J2 eclodidos, sendo inferior ao padrão avermectina. O delineamento experimental utilizado foi o DIC no ensaio *in vitro* e DBC no ensaio *in vivo*, ambos com 8 repetições, a comparação das médias foi feita pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Não houve diferença significativa no desenvolvimento vegetativo do tomateiro com os tratamentos. O filtrado fúngico, padrão biológico e padrão avermectina reduziram em 53,7%, 60,6% e 95,9% o número de ovos, respectivamente. Os tratamentos afetaram a formação de galhas do nematoide em relação à testemunha.

Palavras-chave: Controle biológico, Galhas, Sapróbios.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Filtrado do fungo *Lappodochium lageniforme* no manejo de nematoides de galhas

L. V. Obici¹, J. C. Miri¹, C. M. D. R. Faria¹, C. D. Leite², V. P. Oliveira³, L. M. A. Costa³

¹Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava-PR, Brasil; ²Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco, Pato Branco-PR, Brasil, CEP 85503-390; ³Faculdade Campo Real, Guarapuava-PR, Brasil, CEP 85040-170. E-mail: carolinemiri@hotmail.com

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é parasitado pelos nematoides de galhas, do gênero *Meloidogyne*, o que afeta a produtividade dos frutos. Nos filtrados de origem fúngica podem haver metabólitos tóxicos aos nematoides. Assim objetivou-se avaliar o efeito de filtrados de *Lappodochium lageniforme* sobre a eclosão, infectividade e reprodução de *Meloidogyne javanica*. Os tratamentos constituíram de controle negativo (água), controle positivo (avermectina), tratamento padrão biológico (*Purpureocillium lilacenum*) e o filtrado fúngico. No experimento *in vitro*, adicionaram-se em tubos de ensaio 50 ovos de *M. javanica* e os tratamentos e após 15 dias a 25°C no escuro, avaliou-se o percentual de J₂ eclodidos. Transplantou-se mudas de tomateiro em vasos (2,5 L) com solo e areia estéril (2:1), e infestou-se o substrato com 3.000 ovos em orifícios próximo ao colo das plantas, e aplicou-se 20 mL do filtrado por repetição, para os tratamentos padrão avermectina e biológico utilizou-se a recomendação do fabricante. O tratamento com o filtrado foi realizado a cada 15 dias e após 60 dias avaliou-se a altura de parte aérea, a massa da parte aérea fresca e seca, a massa fresca do sistema radicular, número de ovos e de galhas. O delineamento experimental utilizado foi o DIC no ensaio *in vitro* e DBC no ensaio *in vivo*, ambos com 8 repetições, a comparação das médias foi feita pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. O tratamento com o filtrado foi superior ao controle negativo e padrão biológico na variável J₂ eclodidos, sendo inferior ao padrão avermectina. Não houve diferença significativa no desenvolvimento vegetativo do tomateiro entre os tratamentos. O filtrado fúngico, padrão biológico e padrão avermectina reduziram em 62,8%, 56,2% e 98,9% a formação de galhas, respectivamente. Os tratamentos afetaram a produção de ovos do nematoide em relação à testemunha.

Palavras-chave: Sapróbio, *Meloidogyne javanica*, Tomateiro.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Fontes alternativas de sacarose na esporulação de *Trichoderma stromaticum*

G. R. Niella¹, M. P. dos Santos¹, A. Z. de M. Costa¹, M. de Oliveira¹, J. J. C. Miranda², L. C. dos Santos³

¹CEPLAC/CEPEC/Seção de Fitopatologia, Itabuna-BA, Brasil; ²FTC – Faculdade de Tecnologia e Ciências de Itabuna, Itabuna-BA, Brasil, CEP 45600-081; ³UESC/DCAA, Campus Soane, Ilhéus-BA, Brasil, CEP 45662-000. E-mail: niella@uesc.br

A produção massal do biofungicida Tricovab[®] depende diretamente da qualidade e da quantidade do inóculo de *Trichoderma stromaticum* produzido. Os esporos obtidos *in vitro* são utilizados no biocontrole da vassoura de bruxa do cacaueteiro no sul da Bahia. O meio de cultura utilizado na multiplicação e esporulação das matrizes para a produção do Tricovab[®] é à base de Batata, Caldo de Cana e Ágar (BCCA). O caldo de cana, devido a sua variação na concentração de sacarose, constitui-se entrave na produção. Esta pesquisa teve como objetivo estudar fontes alternativas de sacarose para substituição do caldo de cana. Consta na literatura que o caldo de cana tem em média 13% de sacarose. Foram avaliados sacarose PA, açúcar mascavo, açúcar cristalino, melaço de cana e o BCCA como testemunha. As soluções de cada tratamento foram calculadas para conterem 13% de sacarose. O preparo de cada meio seguiu a mesma metodologia do BCCA, substituindo apenas o caldo de cana por fontes alternativas de sacarose. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 18 repetições e houve diferença estatística entre os tratamentos. Os resultados demonstraram que o meio contendo caldo de cana foi o que obteve maior produção de esporos, com $2,3 \times 10^7$ esporos/mL. O açúcar mascavo foi o tratamento que mais se aproximou do tratamento a base de caldo de cana, com $1,5 \times 10^7$ esporos/mL. Nenhuma das fontes alternativas de sacarose testadas produziu mais esporos que a testemunha (BCCA). Os resultados sugerem que além da sacarose, o caldo de cana pode conter outros componentes essenciais à máxima esporulação.

Agradecimentos: CEPLAC, FAPESB, CNPq.

Palavras-chave: Tricovab[®], Produção Massal, Cana de Açúcar, Açúcar Mascavo.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Formulações de *Penicillium citrinum* para o controle da podridão vermelha do sisal

J. de S. Lima¹, L. O. Barbosa², R. B. Mendes¹, I. L. de S. Alves³, P. F. S. Tavares³,
C. A. T. Gava⁴

¹Instituto Federal do Sertão Pernambucano, Petrolina-PE; ²UFRB, Cruz das Almas-BA, Brasil, CEP 44380-000; ³UPE, Petrolina-PE, Brasil; ⁴Embrapa Semiárido, Petrolina-PE, Brasil, CEP 56302-970. E-mail: jessyka_llima@hotmail.com

A podridão vermelha do sisal (PVS) é uma grave doença que afeta a produção de sisal no Brasil. Sendo que até o momento, não existe um método eficaz para o controle da doença. Neste contexto, o controle biológico com o uso de agentes microbianos vem sendo estudado e tem se mostrado uma alternativa promissora. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de formulações à base de *Penicillium citrinum* (Pc) no controle da PVS. Para obtenção das formulações, os conídios de Pc foram extraídos de grãos de arroz utilizando-se um extrator, Mycoharvester MH5b. Foram elaboradas três formulações com os conídios de Pc extraídos: misturados em bagaço de cana-de-açúcar, em caulim, e em óleo emulsionável. Utilizou-se também uma formulação com arroz usado como substrato de cultivo do fungo. A avaliação da eficiência das formulações no controle da PVS foi monitorada em casa de vegetação, durante 12 meses, nos intervalos de 24 horas, 30, 120, 180 e 360 dias pós elaboração e armazenamento. Observou-se que a eficiência de controle das formulações somente foi reduzida (>20%) após 120 dias de armazenamento, porém a formulação de bagaço de cana manteve a eficiência elevada no controle da doença (>60%). Aos 365 dias, observou-se que as formulações de Pc não reduziram de forma significativa a incidência, porém a severidade da doença se manteve reduzida em todos os tratamentos. Estes resultados indicam que o bagaço de cana possui potencial para preparação de formulação do fungo *P. citrinum* para o manejo da PVS, demonstrando potencial para uso no controle da doença.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*, *Agave sisalana*, Controle biológico.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Fungos endofíticos do gênero *Paraconiothyrium* no parasitismo e viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*

N. M. Alves¹, C. P. Ferreira¹, F. H. V. Medeiros², P. G. Cardoso¹

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia - Setor Microbiologia Agrícola, Lavras-MG, Brasil; ²Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Lavras-MG, Brasil, CEP 37200-000. E-mail: natathyw@gmail.com

O gênero *Paraconiothyrium* (*Ascomycota*) acomoda fungos presentes no solo, e podem ser encontrados como endofíticos em algumas espécies de plantas. Algumas espécies deste gênero são conhecidas como agentes de controle biológico, biorremediadoras e produtoras de metabólitos com capacidade antimicrobiana. Fungos deste gênero foram isolados como endofíticos de gramíneas forrageiras. O objetivo deste trabalho foi avaliar o parasitismo e a viabilidade de escleródios de *S. sclerotiorum* por fungos endofíticos do gênero *Paraconiothyrium*. Os escleródios foram mergulhados em suspensão de micélio dos 16 fungos, previamente crescidos em meio batata-dextrose-ágar (BDA) à 20°C durante 10 dias, e posteriormente distribuídos em placas de Petri, em triplicata. Quatro escleródios foram organizados por placa, sobre substrato de papel de germinação, umedecido com água destilada estéril, para indução da germinação miceliogênica do fitopatógeno e possível parasitismo pelo endofítico. O teste de viabilidade desses escleródios foi conduzido em meio ágar-bromofenol (NEON), onde as placas foram colocadas em BOD à temperatura de 20°C por 10 dias. As avaliações foram feitas, diariamente, para detectar ao redor dos escleródios a formação de halos amarelo-avermelhados, como indicativo de sua viabilidade. Dos 16 fungos, do gênero *Paraconiothyrium*, avaliados, 13 parasitaram escleródios de *S. sclerotiorum* e quatro fungos tiveram efeito positivo na viabilidade dos escleródios, ou seja, além de parasitar, conseguiram matar esses escleródios. Fungos endofíticos do gênero *Paraconiothyrium* apresentaram potencial no controle biológico de *S. sclerotiorum*.

Agradecimentos: CAPES, CNPq, FAPEMIG.

Palavras-chave: Controle biológico, Endófitos, Fungicida, Fungistático.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Fungos simbiotes à plantas com possível efeito antagônico a *Alternaria solani*

F. A. Salinas¹, J. Vanessa¹, F. J. Telaxka¹, C. M. D. R. Faria¹, A. J. Maia¹, E. Pittner¹

¹Universidade Estadual Centro-Oeste de Paraná, Departamento de Agronomia, Guarapuava-PR, Brasil, CEP 85040-170. E-mail: felipesalinasvasquez@gmail.com

Microorganismos endofíticos, geralmente fungos e bactérias, vivem em simbiose no interior das plantas sem causar aparentemente, danos a seus hospedeiros. Este experimento teve como objetivo avaliar o possível efeito antagônico dos fungos endofíticos *Neofusicoccum parvum* e *Schizophyllum commune* sobre *A. solani* isolado de tomateiro. Foram utilizadas placas de Petri contendo meio BDA, cobertas com um disco de papel celofane, esterilizado em autoclave a 120 °C, durante 30 min, com tamanho suficiente para cobrir toda a placa e ainda sobrar 0,5 cm nas laterais. Um disco de meio BDA, de 12 mm de diâmetro, contendo micélio e esporos dos possíveis fungos antagonistas, crescidos em meio BDA por cinco dias foram colocados no centro das placas, sobre o papel celofane. As placas foram incubadas em câmara climatizada a 22 °C por 48 h (até o micélio atingir um crescimento de dois terços da placa), quando o papel celofane foi retirado juntamente com a colônia do fungo antagonista. Disco de micélio de *A. solani* foram retirados do meio BDA e foram transferidos para o centro das placas de Petri contendo os metabólitos não voláteis dos possíveis antagonistas. As placas foram incubadas a 22 °C, com fotoperíodo de 12 h, a testemunha foi BDA sem a presença de antagonistas. Após quatro dias de incubação, avaliou-se o crescimento das colônias medindo-se os lados diametralmente opostos. Constatou-se que não ocorreu efeito inibitório dos fungos endofíticos sobre *A. solani* após o sétimo dia de incubação, não havendo diferença significativa entre os tratamentos ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Agradecimentos: UNICENTRO, CAPES.

Palavras-chave: Biocontrole, *Neofusicoccum parvum*, *Schizophyllum commune*.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Indução de produção de faseolina em feijoeiro por produtos alternativos

F. J. Telaxka¹, F. A. Salinas¹, C. M. D. R. Faria¹, A. J. Maia¹

¹Universidade Estadual do Centro Oeste do Paraná, Guarapuava-PR, Brasil, CEP 85040-170. E-mail: fabio1910@live.com

A indução de resistência é resultado da interação de uma planta com um adequado agente indutor. A síntese de fitoalexinas está entre os fatores de resistência mais eficientes desta tática de manejo, por ocasionar reação de hipersensibilidade (RH). Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de óleos essenciais na indução de fitoalexinas em hipocótilos de feijoeiro. Sementes de feijão da variedade IPR - Tuiuiu foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos. Após, foram lavadas em água destilada estéril, semeadas em areia esterilizada por autoclavagem (120 °C por uma hora a 1atm) e mantidas no escuro a 24°C durante nove dias. Após nove dias, segmentos de hipocótilos estiolados com 5cm foram destacados das plântulas, lavados em água estéril e mantidos sobre papel absorvente por 30 minutos. Quatro segmentos de hipocótilo foram colocados em cada placa de Petri contendo papel germitest umedecido com água destilada estéril. Os tratamentos testados foram óleo essencial de copaíba, óleo essencial de eucalipto, Agromoss® e Fox®, sendo estes pulverizados sobre os hipocótilos (aproximadamente 2 mL). Este ensaio teve como testemunhas água destilada e Tween 20® à 0,5%. O teor de faseolina foi mensurado indiretamente através do espectrofotômetro à 280nm. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste SNK no Software Sisvar. Os óleos essenciais de eucalipto, de copaíba e o produto Agromoss® se diferiram estatisticamente dos outros tratamentos. Em relação a testemunha água, proporcionaram aumento na síntese de faseolina em 73%, 71% e 64%, respectivamente, demonstrando potencial alternativa no manejo de doenças em plantas com base na indução de resistência.

Agradecimentos: UNICENTRO, CAPES.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*, Fitoalexina, Óleos essenciais.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Influência de espécies de *Trichoderma* sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* do abacateiro

G. A. C Vargas¹, I. P. Barros¹, M. G. O. Soares¹, A. L. Silveira¹, L. S. Lopes¹, E. Alves¹

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Lavras-MG, Brasil, CEP 37200-000. E-mail: gabriel-btl@hotmail.com

O abacate possui grande importância na produção brasileira, sendo o país, um dos maiores produtores mundiais. Dentre os fatores que limitam o aumento da sua exportação, encontra-se a antracnose. Esta doença é causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, que está presente em todos os países produtores da cultura. Visando a redução do uso de agrotóxicos no controle de doenças, o fungo *Trichoderma* tem sido uma alternativa como agente de biocontrole. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de espécies de *Trichoderma* sobre o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*. Para isso, duas espécies de *Trichoderma* foram utilizadas, além de um isolado de *C. gloeosporioides*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram: T1- *T. harzianum*, T2- *T. asperellum*, T3- *C. gloeosporioides*, T4- *C. gloeosporioides* X *T. harzianum*, T5- *C. gloeosporioides* X *T. asperellum*. Para a realização do teste de pareamento, discos de micélio de *C. gloeosporioides* e *Trichoderma* foram posicionados nos extremos de placas de Petri com meio de cultivo BDA. Como controle e comparação utilizou-se placas com isolados *C. gloeosporioides*, *T. harzianum* e *T. asperellum*. As placas foram mantidas em BOD à temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Foram medidos os diâmetros transversais e longitudinais das colônias por sete dias e com os dados obtidos foram calculados o IVC (índice de velocidade de crescimento micelial) e % I (porcentagem de inibição). Foi realizada análise de variância dos dados e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott. Houve diferença estatística para IVC e os isolados testados, sendo o isolado de *T. harzianum* o mais eficiente na inibição do crescimento micelial com média de 8,75 mm e % I de 63,17%, seguido do *T. asperellum* com 14,08 mm e % I de 40,70%, demonstrando que as espécies de *Trichoderma* podem ser utilizadas como uma alternativa de controle de *C. gloeosporioides* em abacate.

Palavras-chave: Biocontrole, *Persea americana*, Antracnose.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Inibição da germinação de conídios de *Alternaria alternata* patótipo tangerina por biofertilizante

S. A. F. Alves¹, E. B. Corrêa¹, M. C. Bezerra¹, A. M. da Silva Filho¹, A. Q. Moura¹

¹Universidade Estadual da Paraíba, Departamento de Agroecologia e Agropecuária, Lagoa Seca-PB, Brasil, CEP 58117-000. E-mail: elida.uepb@gmail.com

A mancha-marrom-de-alternaria é uma das principais doenças da tangerina. Diagnosticada em 2009 na Paraíba, a doença vem causando grande prejuízo econômico aos agricultores. O desenvolvimento de métodos alternativos de controle da doença é essencial para promover o cultivo orgânico da tangerina. De acordo com o exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar a inibição de conídios de *A. alternata* patótipo tangerina utilizando-se biofertilizante. O biofertilizante anaeróbico utilizado foi produzido com esterco verde bovino (40 kg), leite cru (8L), rapadura (8kg), pó-de-rocha (5 kg), cinza (0,5 kg), rama de batata doce (2 kg), folhas de gliricídia (2kg), folhas de mandioca (2kg), tiririca (2kg) e palma forrageira (2 kg), em tambor (200L) por 30 dias. Suspensões de biofertilizante nas concentrações finais de 0, 20, 25, 30, 35 e 40% foram adicionadas às placas de Elisa; e os conídios (concentração final de $1,05 \times 10^5$ conídios/mL) foram expostos aos tratamentos por 1h. Cada poço da placa de Elisa foi preenchido com 200 μ L, sendo 100 μ L de suspensão de biofertilizante e 100 μ L de suspensão contendo os conídios. Após a exposição, as suspensões foram depositadas nos poços das placas de Kline contendo meio ágar-água, sendo acondicionadas em temperatura ambiente; os esporos foram avaliados quanto à germinação após 24h. Decréscimo no número de esporos germinados foi verificado após a exposição dos conídios às concentrações crescentes de biofertilizante ($y = -1,8x + 76,528$, $R^2 = 0,90^{**}$), sendo que a dose de 40% foi a mais efetiva, inibindo a germinação de esporos em 93,5%. Conclui-se que o biofertilizante testado tem potencialidade para ser utilizado no controle da mancha-marrom-de-alternaria em tangerina.

Agradecimentos: UEPB, PIBIC.

Palavras-chave: Mancha-de-alternaria, *Citrus reticulata*, Controle biológico.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Inibição do crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* com uso de *Bacillus subtilis*

M. Carli¹, C. Rusin¹, R. V. Botelho¹, C. M. D. R. Faria¹, M. A. K. Almança²

¹Universidade Estadual do Centro Oeste, Departamento de Agronomia, Guarapuava-PR, Brasil, CEP 85040-170; ²Instituto Federal do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves-RS, Brasil, CEP 95700-206. E-mail: decarlimayara@gmail.com

O fitopatógeno *Lasiodiplodia theobromae* infecta inúmeras culturas, dentre elas a videira, causando o declínio ou morte dos vinhedos. A infecção ocorre por ferimentos de poda ou enxertia, o que faz necessário a proteção das plantas. Os agentes biológicos podem limitar a entrada dos patógenos nas plantas, evitando a infecção. O objetivo do trabalho foi testar a ação do agente biológico comercial *Bacillus subtilis* no controle *in vitro* de *L. theobromae*. A avaliação de potencial de controle foi realizada por meio do método de culturas pareadas, no laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Centro Oeste. Foram utilizados dois isolados de *L. theobromae*, CMM-384 e CMM-307, oriundos de Petrolina-PE. Um disco micelial do patógeno de 5 mm de diâmetro foi inserido no centro da placa e em dois pontos equidistante inseriu-se uma estria com 100 µL de produto comercial a base de *B. subtilis* (1×10^9 UFC/g). Placas contendo somente o patógeno foram utilizadas como controle. As placas foram mantidas em câmara de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 12 h. O experimento foi realizado em delineamento totalmente causalizado com 5 repetições, sendo cada placa uma repetição. Após 36 h foi mensurado o crescimento micelial do fitopatógeno e calculada a zona de inibição de *L. theobromae*. A presença de *B. subtilis* foi significativa no controle do crescimento micelial de *L. theobromae* inibindo em 70,93% o crescimento micelial do isolado CMM-384 e 87,06% para o isolado CMM-307. Conclui-se que *B. subtilis* possui eficácia na inibição do crescimento micelial de *L. theobromae*.

Agradecimentos: CAPES.

Palavras-chave: Pareamento, Viticultura, Botryosphaeriaceae.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Inibição *in vitro* do crescimento micelial de *Colletotrichum musae* por espécies de *Trichoderma*

L. S. Lopes¹, M. G. O. Soares¹, A. L. Silveira¹, I. P. Barros¹, G. A. C. Vargas¹, E. Alves¹

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Lavras-MG, Brasil, CEP 37200-000. E-mail: biolucassilveira@gmail.com

A produção de bananas é prejudicada por problemas fitossanitários como a antracnose, causada pelo fungo *C. musae*. O uso de *Trichoderma spp.* no controle biológico tem sido uma alternativa no manejo das doenças. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a inibição *in vitro* do crescimento micelial de *C. musae* utilizando espécies de *Trichoderma spp.*. Foram utilizadas duas espécies de *Trichoderma*, e um isolado de *C. Musae*. O delineamento experimental foi em DIC, com cinco tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram: T1- *T. harzianum*, T2- *T. asperellum*, T3- *C. musae*, T4- *C. musae* X *T. harzianum*, T5- *C. musae* X *T. asperellum*. Para o teste de pareamento, um disco de micélio de *C. musae* e outro de *Trichoderma* foram depositados em placas de Petri com BDA. Como controle e para comparação utilizou-se placas com isolados de *C. musae*, *T. harzianum* e *T. asperellum*. As placas foram mantidas em BOD em temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Durante sete dias, foram medidos os diâmetros ortogonais das colônias. As variáveis analisadas, o IVCM (índice de velocidade de crescimento micelial) e a % I (porcentagem de inibição) foram calculadas. Foi realizada ANAVA dos dados e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ano nível de 5% de significância. Houve diferença estatística para IVCM. O isolado *T. harzianum* foi o mais eficiente na inibição do crescimento micelial com média de 13,13 mm de IVCM e 50,34% de I %, seguido do *T. asperellum* com 19,93 mm de IVCM e 24,61% de % I em relação ao controle (apenas com *C. musae*). Dessa forma, espécies de *Trichoderma* podem ser utilizadas como alternativa de controle de *C. musae*.

Palavras-chave: Biocontrole, *Musa* sp., Antracnose.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Inoculación de NEMAKONTROL (*P. lilacinum*) para el control de *Meloidogyne* sp. en *Capsicum annuum*- Pimiento morrón var. Aristotele. Virú. La Libertad. Perú

B. León¹, N. Lujan², W. Salvatierra¹, M. Alcántara¹, R. Castro¹, K. Barrionuevo¹
¹Solagro S.A.C; ²DANPER. E-mail: solagrosac@gmail.com

El cultivo de capsicum en el Perú presenta actualmente gran desarrollo en la zona norte, pero se enfrenta también a plagas y enfermedades de difícil control como nematodos, Pudriciones radiculares y manchas foliares. Como parte del manejo integrado de nematodos en campo, se planteó el uso del producto Nemacontrol (*P. lilacinum*), hongo nematófago para el control eficiente de *Meloidogyne* sp. en el cultivo de capsicum. Además se evaluó el impacto medioambiental y económico del uso del producto para el control de nematodos, comparado con otras medidas convencionales de control. Para realizar éste trabajo se realizó inoculaciones de *P.lilacinum* y materia orgánica antes de la siembra en una dosis de 30 Kg/ha, y se utilizó como Testigo, plantas tratadas con el tratamiento químico convencional (Oxamilo), el cual se aplicó dos días después de la siembra a dosis de 10L/ha. Al realizar las evaluaciones de las raíces a los 74 y 125 días de aplicación se observa mayor proporción de raíces adventicias con respecto al Testigo, además no presentaron síntomas de enanismo y clorosis en el tratamiento con NEMAKONTROL demostrándose el efecto nematófago de *P. lilacinus* en el control de *Meloidogyne* sp. en el cultivo de capsicum. Al medir el impacto medioambiental, no genera residuos químicos por ser un organismo vivo. En el impacto económico tenemos: en el tratamiento NEMAKONTROL costo \$ 221.69/ha y un ingreso bruto de \$74 497.66/ha, el testigo un costo \$150/ha y ingreso bruto de \$71 138.06/ha; lo que hace que adicionando \$71.69/ha más hay un rendimiento \$ 3 359.60/ha a favor del tratamiento de NEMAKONTROL.

Agradecimientos: Empresa Danper.

Palabras-clave: Nemacontrol, *P. lilacinum*, *Meloidogyne*.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Leveduras no controle de fungos associados a podridões na semente de pimenta de cheiro e estímulo ao crescimento de plântulas

C. S. Conceição¹, E. R. Alexandre¹, A. P. Melo¹, E. B. Souza², R. L. R. Mariano¹, S. M. A. Oliveira¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Dep. de Agronomia/ Fitossanidade, Recife-PE, Brasil, CEP 52171-900; ²UFRPE, Dep. de Biologia/ Microbiologia, Recife-PE, Brasil. E-mail: anaedualc@hotmail.com

Fungos associados às sementes podem causar podridões, comprometendo o desenvolvimento das plântulas de *Capsicum* spp. Leveduras têm sido utilizadas no controle biológico, pois colonizam o substrato e competem com outros micro-organismos. O objetivo deste trabalho foi investigar a redução da incidência de fungos associados a podridões da semente de pimenta de cheiro (*C. chinense*) e o estímulo ao crescimento de plântulas, utilizando as leveduras *Pichia anomala* (CC-2) e *Rhodotorula aurantiaca* (LMA1). As sementes foram imersas em suspensão das leveduras, na concentração de $1,5 \times 10^7$ cel.mL⁻¹, durante 20 minutos. Para cada tratamento, 400 sementes foram dispostas em papel de filtro umedecido com água destilada esterilizada depositados em caixas tipo gerbox e avaliadas aos 20 dias quanto à incidência de fungos totais na semente (IFT). Em seguida, a plântulas foram transplantadas para bandejas de 200 células, determinando-se após sete dias o tamanho das plântulas (TP). Os fungos detectados causando podridão nas sementes foram *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp. e *Fusarium* sp. O tratamento com LMA1 reduziu o IFT em 33,75% e aumentou o TP em 68,23%. Em conclusão, a levedura LMA1 foi eficiente no controle dos fungos associados a podridões de pimenta de cheiro, agindo ainda como promotora de crescimento das plantas.

Agradecimentos: CAPES, CNPq.

Palavras-chave: *Pichia anomala*, *Rhodotorula aurantiaca*, Pimenta de cheiro, Biocontrole.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Manejo de *Meloidogyne javanica* por filtrado do fungo *Dictyochaeta obeispora*

L. V. Obici¹, T. Menegassi¹, C. M. D. R. Faria¹, C. D. Leite², C. F. Verza³, D. Bortuli¹

¹Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava-PR, Brasil, CEP 85040-170; ²Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco-PR, Brasil, CEP 85503-390; ³Faculdade Campo Real, Guarapuava-PR, Brasil. E-mail: lucianaobici@hotmail.com

O nematoide *Meloidogyne javanica* causa prejuízo a cultura do tomateiro, tanto o desenvolvimento da planta quanto a produção de frutos. Estudos mostram potencial de filtrados fúngicos no controle de fitonematoides. Objetivou-se avaliar o efeito do filtrados de *Dictyochaeta obeispora* no manejo de nematoides de galhas de tomateiro. Os tratamentos constituíram de testemunha, tratamento padrão avermectina, tratamento padrão biológico (*Purpureocillium lilacenum*) e filtrado fúngico. No experimento *in vitro*, os tratamentos foram adicionados em tubos de ensaio e aplicados 50 ovos de *M. javanica* em cada tudo. Após 15 dias a 25°C no escuro, avaliou-se o percentual de J2 eclodido. Mudanças de tomateiro foram transplantadas em vasos (2,5 L) com solo e areia estéril, onde foram inoculados 3.000 ovos em orifícios próximo ao colo das plantas, e aplicados 20 mL do filtrado por repetição. Para os tratamentos padrão avermectina e biológico usou-se a recomendação do fabricante. O tratamento com o filtrado foi repetido três vezes e após 60 dias foram avaliados a altura de parte aérea, a massa da parte aérea fresca e seca, a massa fresca do sistema radicular, número de ovos e de galhas. O delineamento experimental utilizado foi o DIC no ensaio *in vitro* e DBC no ensaio *in vivo*, ambos com 8 repetições, a comparação das médias foi feita pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. O tratamento com filtrado reduziu mais a eclosão de J2 do que a testemunha e padrão biológico e menos que o padrão avermectina. Não houve diferença significativa no desenvolvimento vegetativo do tomateiro entre os tratamentos. O filtrado fúngico, padrão biológico e padrão avermectina reduziram em 63,6%, 55,9% e 96,8% o número de galhas, respectivamente. Os tratamentos afetaram a produção de ovos do nematoide em relação à testemunha.

Palavras-chave: Controle, Galhas, Sapróbios.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Manejo de nematoides de galhas com filtrado do fungo *Curvularia inaequalis*

L. V. Obici¹, J. C. Miri¹, C. M. D. R. Faria¹, C. D. Leite², V. P. Oliveira³, L. M. A. Costa³

¹Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava-PR, Brasil; ²Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco, Pato Branco-PR, Brasil, CEP 85503-390; ³Faculdade Campo Real, Guarapuava-PR, Brasil, CEP 85040-170. E-mail: carolinemiri@hotmail.com

O ataque de nematoides das galhas em tomateiro afeta a produtividade das plantas. Sabe-se que alguns filtrados de origem fúngica pode haver metabólitos tóxicos à nematoides. Objetivou-se avaliar o efeito do filtrados de *Curvularia inaequalis* no manejo de nematoides de galhas de tomateiro. Os tratamentos constituíram de testemunha (água), tratamento padrão avermectina, tratamento padrão biológico (*Paecilomyces lilacinus*) e filtrado fúngico. No experimento *in vitro*, adicionou-se em tubos de ensaio 50 ovos de *Meloidogyne javanica* e os tratamentos e após 15 dias a 25°C no escuro, avaliou-se o percentual de J₂ eclodido. Nos testes *in vivo*, transplantou-se mudas de tomateiro em vasos (2,5 L) com solo e areia estéril (2:1), e infestou-se o substrato com 3.000 ovos em orifícios próximo ao colo das plantas. Em seguida aplicou-se 20 mL do filtrado. Para os tratamentos padrão avermectina e biológico utilizou-se a recomendação do fabricante. O tratamento com o filtrado foi realizado a cada 15 dias e após 60 dias foram avaliadas a altura de parte aérea, a massa da parte aérea fresca e seca, a massa fresca do sistema radicular, número de ovos e de galhas. O delineamento experimental utilizado foi o DIC no ensaio *in vitro* e DBC no ensaio *in vivo*, ambos com 8 repetições, a comparação das médias foi feita pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. O tratamento com filtrado foi superior a testemunha e padrão biológico na variável J₂ eclodidos, sendo inferior ao padrão avermectina. Não houve diferença significativa no desenvolvimento vegetativo do tomateiro com os tratamentos. O filtrado fúngico, padrão biológico e padrão avermectina reduziram em 90,9%, 60,9% e 97,3% a reprodutibilidade de *M. javanica*, respectivamente. Os tratamentos afetaram a formação de galhas nas raízes em relação à testemunha.

Palavras-chave: Metabólito secundário, *Meloidogyne javanica*, Tomateiro.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Perfil dos egressos da disciplina de graduação de controle biológico de doenças de plantas

P. F. Pereira¹, M. R. Faria¹, F. H. V. Medeiros¹

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Lavras-MG, Brasil, CEP 37200-000. E-mail: priscilla.pereira@outlook.com

O controle biológico é uma estratégia para o manejo de doenças de plantas que tem crescido nos últimos anos e, para atender a demanda de treinamento de técnicos foi criada a disciplina de graduação específica na área, mas ainda não se sabe o quanto esta disciplina tem sido útil na atuação profissional de agrônomos, biólogos e engenheiros florestais que cursaram a disciplina. Neste contexto, objetivou-se investigar o perfil dos egressos que cursaram a disciplina de controle biológico de doenças de plantas, na Universidade Federal de Lavras, no período de 2011 a 2016. Foram entrevistados 76 egressos pela aplicação de um questionário sobre a formação e atuação profissional. O critério de inclusão para o questionário (amostra) foi o aceite ao convite para o preenchimento desse. A amostra foi composta por 20 egressos que corresponde a 26,32% do número total de entrevistados. A coleta de dados ocorreu no período de junho a agosto de 2016. O estudo caracterizou-se como transversal, com uma abordagem qualitativa, e para análise foi utilizada estatística descritiva (frequência relativa e absoluta). Os resultados indicaram que os estudantes que optaram por esta disciplina durante a graduação, 84,21% foram discentes do curso de agronomia, 11,84% cursavam ciências biológicas e 3,95% engenharia florestal. Do total de egressos, 42,1% ainda não concluíram a graduação, 25% optaram por uma pós-graduação e 32,9% ingressaram no mercado de trabalho. Sendo que, 7,89% desses ex-alunos atuam diretamente no biocontrole de doenças de plantas. Quanto à importância da disciplina na atuação profissional do egresso, 70% relataram a relevância do conteúdo para a profissão. A disciplina de controle biológico de doenças de plantas é optativa e ainda é pequeno o número de alunos que a cursou, mas percebe-se que a maior procura é por parte de alunos de agronomia e que o conhecimento adquirido tem sido útil para a atuação profissional da maioria daqueles formados que estão no mercado de trabalho.

Palavras-chave: Biocontrole, Ex-Alunos, Atuação Profissional.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Potencial antagonístico de las bacterias benéficas *Bacillus amyloliquefaciens* y *Pseudomonas fluorescens* contra *Alternaria solani* Sorauer causante del tizón temprano del tomate

J. Rojas¹, C. Grabowski¹

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Agrarias - Área de Protección Vegetal – Fitopatología San Lorenzo, Paraguay. E-mail: cgrabowski@agr.una.py

En búsqueda de medidas que garanticen la sostenibilidad de la producción agrícola, minimicen los costos para el manejo integrado del tizón temprano, el control biológico constituye una alternativa para reducir la demanda de productos químicos y el riesgo de sus residuos. Así, la acción antagonística de bacterias como *Bacillus amyloliquefaciens* (Ba), y *Pseudomonas fluorescens* (Pf) que han demostrado capacidad de inhibir el crecimiento de varios patógenos e con propiedades de excretar metabolitos y/o compuestos volátiles que permiten competir con patógenos y actuar en nichos ecológicos donde los productos fitosanitarios no son eficientes, reduciendo la presión selección sobre los patógenos. Con el objetivo de evaluar las bacterias benéficas Ba y Pf seleccionadas en otras investigaciones como agentes potenciales de control biológico del tizón temprano, se verifico el antagonismo ejercido por la producción de compuestos antimicrobianos hidrosolubles y volátiles en el medio de cultivo sobre el crecimiento de As en condiciones *in vitro* por los métodos del cultivo pareado y el pareado de placas. Los resultados indican que existe un efecto antagonístico sobre el crecimiento de As por las bacterias Ba y Pf inhibiendo en 4,7 y 1,4 % su crecimiento micelial y reduciendo su crecimiento en 21,6 y 9,7 % respectivamente por la liberación de compuestos volátiles. Los resultados son promisoros y experimentos en condiciones de invernaderos están siendo conducidos para confirmar el potencial antagonístico observado contra As.

Palabras-clave: Bacterias benéficas, Control biológico, *Alternaria solani*.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Potencial de inibição do crescimento *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* por fungos endofíticos produtores de voláteis

I. A. F. M. Santos¹, P. S. de O. Nunes¹, M. C. P. Monteiro¹, P. G. Cardoso¹

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia, Lavras-MG, Brasil, CEP 37200-000. E-mail: italo.ferrer@hotmail.com

Ocorrendo em regiões de temperatura amena e alta umidade, a pinta-bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), é uma das principais bacterioses do tomateiro. Dentre outros fatores, a rápida multiplicação e disseminação desse patógeno em condições favoráveis, além da baixa eficácia do controle químico, dificulta o manejo dessa doença. Uma alternativa para o manejo é o biocontrole utilizando agentes produtores de substâncias bioativas. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de inibição *in vitro* do crescimento de *P. syringae* pv. *tomato* por atividade de 12 fungos endofíticos produtores de compostos orgânicos voláteis (COVs). Em placas bipartidas, com quatro repetições, cada fungo foi cultivado em uma das partes da placa contendo o meio BDA, e incubados a 25°C em BOD. Após sete dias, foi adicionada, na outra parte da placa contendo o meio MB₁, 100µL de suspensão bacteriana ajustada para uma DO_(λ=600nm) de 0,1, correspondendo a 1x10⁸ UFC.ml⁻¹, e incubadas por 72 horas. Após o período de exposição aos voláteis, em comparação ao controle, sem o fungo, a menor formação de colônias do fitopatógeno foi considerada inibição parcial. Nove fungos inibiram parcialmente o crescimento de *P. syringae*: *Muscodor coffeanum* (COAD 1900 e 1842), *M. vitigenus* (C12, HZM10 e HZM39), *M. yucatanensis* (HZM64), *Acremonium* sp. (C19) e *Simplicillium* sp. (C18 e HZM41). COVs produzidos por alguns dos fungos reduziram o crescimento do fitopatógeno, demonstrando potencial de utilização desses microrganismos como agentes de biocontrole no manejo da *P. syringae* pv. *tomato*.

Agradecimentos: FAPEMIG, CAPES, CNPq.

Palavras-chave: *Lycopersicon esculentum*, Pinta-bacteriana, Controle biológico, COVs, Endófito.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Potencial do uso da pulverização de rizobactérias no controle do mofo branco em soja

L. M. M. Duré¹, L. R. Rocha², D. R. Pedrinho², B. O. Corrêa²

¹Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - Campus de Chapadão do Sul, Mato Grosso do Sul, Brasil, CEP 79560-000; ²Universidade Uniderp Agrárias - Campus Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, CEP 79035-470. E-mail: laisidure@gmail.com

O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial de uso de duas bactérias isoladas de solo sob cultivo de cana-de-açúcar, no biocontrole do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em folhas destacadas de soja das cultivares Codetec 217, Codetec 208 e Codetec 266. Para tanto, sementes das cultivares Codetec 217, Codetec 208 e Codetec 266 foram semeadas em vasos com capacidade para 5 L com solo. Após 40 dias foram coletados os trifólios de cada uma das cultivares e levados ao laboratório de Fitopatologia, para o tratamento com as bactérias Fit-03 e Fit-04 (*Pseudomonas fluorescens*) para então adicionar um disco de micélio do fungo *S. sclerotiorum*, com cinco dias de crescimento. As mesmas foram depositadas em bandejas plásticas, contendo papel germitest umedecido e acondicionadas em sacos plásticos transparentes e incubadas em BOD a 25°C. Como testemunhas foram utilizadas folhas pulverizadas apenas com solução salina (NaCl 0,85%). As avaliações foram diárias observando os primeiros sintomas de necrose, para tanto foi utilizado paquímetro digital, medindo a lesão tanto horizontalmente como verticalmente, na face abaxial dos folíolos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. A bactéria Fit-04 destacou-se por reduzir em 67,3% as lesões necróticas provocadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas destacadas de soja para cultivar Codetec 217, enquanto a bactéria Fit-03 controlou 50,2% as lesões para cultivar Codetec 266. Entretanto, para a cultivar Codetec 208 não foi observado controle do patógeno com nenhuma das bactérias. De acordo com os resultados, concluiu-se que as bactérias Fit-03 e Fit-04 são capazes de controlar o mofo branco em diferentes cultivares de soja.

Palavras-chave: Microbiolização, Antagonismo, Controle Biológico, *Pseudomonas fluorescens*, *Sclerotinia sclerotiorum*.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Potencial migratório de leveduras em ramos de cacaueteiro infectados com *Moniliophthora perniciosa*

R. V. Niella¹, A. A. P. Neto², E. D. M. N. Luz²

¹Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, Brasil; ²Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira, Ilhéus-BA, Brasil, CEP 45662-000. E-mail: raquelniella@hotmail.com

As leveduras agem por competição e possuem potencial migratório nos tecidos colonizados. Seis isolados de leveduras 014, 050, 162, 169, 207 e 210 considerados biocontroladores do fungo *Moniliophthora perniciosa* foram testados quanto à sua capacidade migratória em ramos de vassoura de bruxa. O experimento foi conduzido com fragmentos de 10 cm de vassouras secas autoclavados e afixadas no meio de erlenmeyers com SDA, onde haviam sido transferidos 100 microlitros da suspensão de células de cada uma das leveduras a serem testadas na concentração de 5×10^5 ufc/mL. Após a incubação à 26°C por 10 dias, os fragmentos foram retirados e cortados as porções que ficaram em contato com o meio e as leveduras, sendo o restante dividido em três porções, parte basal, mediana e apical junto com 9mL de ADE (água destilada esterilizada). As suspensões foram espalhadas em placas e incubadas por 48h, quando a contagem de colônias foi realizada. O delineamento foi inteiramente casualizado, seis tratamentos com três repetições. Após a transformação logarítmica, os dados foram analisados e as médias de ufc/segmento comparadas entre pelo Tuckey (5%). Houve colonização por todas as leveduras até o segmento apical. O isolado 050 apresentou as menores médias para as três porções dos segmentos em relação aos demais (122 - 613 ufc/segmento). Destacaram-se os isolados 162, 169 e 207 com médias entre as mais altas para todas as porções (1667 - 2492 ufc/segmento), e, o isolado 14, que apresentou médias mais baixas nas porções basal e intermediária e entre as mais altas para a apical (2829,75 ufc/segmento). Conclui-se que as seis leveduras migram nas vassouras secas o que é excelente para o controle biológico da doença.

Agradecimentos: CEPLAC, FABESP.

Palavras-chave: Controle biológico, Vassoura-de-bruxa, *Theobroma cacao*.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Produção de protease por isolados de *Cladosporium* spp. durante o antagonismo aos principais patógenos fúngicos do arroz

A. A. Chaibub¹, T. P. de Sousa², L. G. Araújo², M. C. C. Filippi³

¹Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brasil, CEP 70910-900; ²Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, Brasil, CEP 74690-900; ³Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás-GO, Brasil, CEP 75375-000. E-mail: thatyane_@hotmail.com

O arroz é afetado por doenças fúngicas que podem causar perdas na produtividade de até 100% da cultura. O controle é realizado através da aplicação de fungicidas, muitas vezes abusiva, colocando em risco o meio ambiente. *Cladosporium* spp. já foi relatado como agente de controle biológico para diversas pragas e doenças. O objetivo do trabalho foi quantificar a atividade de protease durante a interação entre *Cladosporium* spp. e patógenos fúngicos do arroz (*Cochliobolus miyabeanus*; *Monographella albescens*; *Magnaporthe oryzae*; *Sarocladium oryzae* e *Thanatephorus cucumeris*). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições e vinte tratamentos que consistiram no cultivo dos cinco patógenos com quatro isolados de *Cladosporium* spp. A detecção da atividade de protease foi realizada a partir do cultivo de suspensões de *Cladosporium* spp. a 10^6 con.mL⁻¹ em 25 mL de meio mínimo suplementado com parede dos patógenos (0,5%) e o controle consistiu no cultivo dos isolados de *Cladosporium* spp. na ausência da parede dos patógenos. Foram realizadas coletas após a incubação (24 a 96 horas) e a atividade determinada utilizando azocaseína como substrato e quantificada em espectrofotômetro a 450 nm. Os dados do antagonismo foram subtraídos do controle (produção de protease por *Cladosporium* spp. sem patógenos) e realizada análise de variância com médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Observou-se que todos os isolados testados responderam à presença da parede dos patógenos, a partir das 24 horas, os isolados de *Cladosporium* spp. secretaram protease na presença da parede dos patógenos testados. O antagonismo envolve a degradação da parede celular do patógeno por enzimas líticas produzidas por bioagentes e os isolados de *Cladosporium* spp. mostraram-se potenciais para estudos e utilização em plantas de arroz.

Palavras-chave: Controle biológico, Enzimas líticas, Antagonismo.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Promoção de crescimento em tomateiros mediada por *Clonostachys rosea*

F. C. Borel¹, A. V. Borges¹, R. M. Saraiva¹, L. A. Maffia¹

¹Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Viçosa-MG, Brasil, CEP 36570-000. E-mail: borelfilipe@gmail.com

Dentre os microrganismos com potencial para uso na agricultura, destaca-se *Clonostachys rosea*, que é antagonista a vários fitopatógenos e, em plantas, pode induzir resistência e promover o crescimento. Objetivou-se avaliar a promoção de crescimento em tomateiros mediada por *C. rosea*, em experimentos conduzidos em casa de vegetação. Compararam-se seis tratamentos: 1 a 4) aplicação individual de quatro isolados de *C. rosea* (10^6 conídios.mL⁻¹), 5) mistura destes isolados (10^6 conídios.mL⁻¹) e 6) água destilada. Imergiram-se sementes de tomate em cada tratamento por 1 h, semearam-se duas sementes/vaso e, imediatamente após, aplicaram-se 20 mL de suspensão de *C. rosea* por vaso, nos tratamentos respectivos. Diariamente, avaliou-se a emergência de plantas. Ao final do experimento, após 35 dias, avaliaram-se: altura, peso das plantas, número de folhas, peso de raízes frescas e secas, peso de parte aérea fresca e seca, bem como a frequência de colonização de *C. rosea* em raízes, hastes e folhas nos terços inferior, médio e superior das plantas. Com a aplicação de *C. rosea*, ocorreram aumentos do tempo de emergência de plantas, da emergência total, bem com da altura e peso das raízes e da parte aérea. A colonização do antagonista predominou no terço inferior das plantas, e ocorreu em mais que 80% dos segmentos de raízes, entre 30 a 70% em segmentos de hastes e menos que 1 % de folhas. Conclui-se que *C. rosea* tem o potencial de promover o crescimento de plantas de tomateiros e sobreviver nos tecidos, especialmente raízes.

Agradecimentos: FAPEMIG, CNPq.

Palavras-chave: Biocontrole, Mecanismo de ação, Manejo integrado, *Solanum lycopersicum*.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Rhizobacterial volatiles in the control of anthracnose in common bean

S. J. Martins¹, M. P. Pedroso², M. G. Cunha³, M. R. Rocha³, A. F. Faria¹, F. H. V. Medeiros¹

¹Universidade Federal de Lavras, Department of Plant Pathology, Lavras-MG, Brazil, CEP 37200-000; ²Universidade Federal de Lavras, Department of Chemistry, Lavras-MG, Brazil; ³Federal University of Goiás, Campus Samambaia, Rodovia GO-462 km 0, Goiânia-GO, Brazil, CEP 74690-900. E-mail: flaviomedeiros@dfp.ufla.br

Microbial volatile organic compounds (mVOCs) have been shown recently toxic to phytopathogens, but information about their effect *in vivo* is scarce. We aimed to evaluate the effect of *Bacillus amyloлицefaciens* ALB629 and UFLA285 mVOCs on anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) control in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). An *in vitro* test in bipartite Petri dish was set up and spore numbers and the pathogen mycelial growth were assessed in the presence of mVOCs. Additionally, mVOCs were tested *in vivo* to check their effect against anthracnose. ALB629 reduced spore numbers (31%), while UFLA285 and ALB629 inhibited mycelial growth by 16 and 18%, respectively. Both bacterial volatiles controlled anthracnose *in vivo* (79–85%). The volatiles from bacteria were identified as 3-hydroxy-2-butanone, 3-methylbutanoic acid, and 2-methylbutanoic acid. Rhizobacteria volatiles may represent a new tool for disease management.

Aknowledgements: CNPq, FAPEMIG.

Keywords: PGPR, *Phaseolus vulgaris*, Biocontrol, *Colletotrichum*, Acetoin.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Seleção de isolados de *Trichoderma* sp. para o biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* em condições favoráveis ao mofo branco do feijoeiro comum

L. D. Freitas¹, E. T. Barbosa², M. Lobo Junior²

¹Uni-Anhanguera, Goiânia-GO, Brasil, CEP 74423-165; ²Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás-GO, Brasil, CEP 75375-000. E-mail: leticiafreitas.eng@gmail.com

O feijoeiro comum é atacado por diversos patógenos, entre eles o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, agente etiológico do mofo branco. Sabe-se que o controle químico tem baixa eficiência sobre estruturas de resistência do patógeno (escleródios), devido ao sítio de sobrevivência (solo) e ao fechamento do dossel a partir do florescimento, que dificulta a proteção das plantas. O fungo *Trichoderma* sp. tem sido utilizado no biocontrole de *S. sclerotiorum*. No entanto, há dúvidas sobre a adaptação de isolados em regiões com temperaturas amenas, favoráveis à doença. Portanto, o objetivo do trabalho foi selecionar isolados de *Trichoderma* promissores no parasitismo de escleródios sob condições de temperatura em torno de 20°C. Vinte e sete isolados de *Trichoderma* sp. foram multiplicados em grãos de arroz autoclavado, e mantidos por sete dias a 20°C. Posteriormente foi preparada para cada tratamento (isolado), suspensão ajustada em 1×10^9 conídios mL⁻¹. Os tratamentos foram aspergidos sobre escleródios dispostos sobre 150g de solo, em caixas gerbox, com três repetições por tratamento. A umidade do solo foi mantida em 100% da capacidade de campo, e a temperatura, a 20°C±2. A avaliação do parasitismo ocorreu 30 dias após inoculação por inspeção visual. A viabilidade dos escleródios foi verificada aos 60 dias após tratamento, sobre discos de cenoura. Os isolados TR770 e TR832 apresentaram parasitismo acima de 80%, enquanto que os demais isolados obtiveram médias variando de 0 a 58%. Com relação à viabilidade de escleródios, o isolado TR770 apresentou o melhor resultado, com redução para 20%, comparado aos outros que variaram de 33 a 100% de viabilidade. Concluiu-se que a maioria dos isolados não foram eficientes quanto ao parasitismo e degradação de escleródios de *S. sclerotiorum*, porém, dois isolados se destacaram como promissores para testes futuros.

Agradecimentos: CNPq, FAPEMIG.

Palavras-chave: Controle biológico, *Phaseolus vulgaris*, Parasitismo, Escleródios.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum*

I. R. F. Fagundes¹, G. P. Cavalcante¹, R. A. S. Brito¹, A.G. Encarnação¹, L. A. Maffia¹

¹Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Viçosa-MG, Brasil, CEP 36570-000. E-mail: alexander.giovane@yahoo.com.br

Considerando a importância do mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, para o feijoeiro no Brasil, a necessidade de alternativas de manejo da doença e a carência de estudos de biocontrole da doença no país, delineou-se este trabalho. Objetivou-se obter isolados de *Trichoderma* spp. de lavouras de feijão e soja de Minas Gerais e avaliar o potencial antagonista desses isolados a *S. sclerotiorum*. Obtiveram-se 48 isolados: 30 da rizosfera, 11 epifíticos, quatro endofíticos e três de restos culturais. Com base no sequenciamento das regiões ITS, *TEF1-α* e *RPB2*, incluíram-se os isolados em oito espécies: 29 como *T. harzianum*; cinco como *T. koningiopsis*; quatro como *T. hamatum*; quatro como *T. atroviride*; dois como *T. asperelloides*; dois como *T. longibrachiatum*; um como *T. asperellum* e um como *T. neokonigii*. Avaliaram-se os isolados por meio de vários ensaios. Oito isolados cresceram mais eficiente e rapidamente em meio de cultura. Quanto ao antagonismo a *S. sclerotiorum*, em testes de pareamento de culturas, oito isolados inibiram em 100% o crescimento do patógeno. Quanto ao potencial de micoparasitismo, 24 isolados foram eficientes em parasitar escleródios no solo, com 79 a 99% de eficiência. Testou-se, também, a inibição da germinação de escleródios em ágar-água: 31 isolados inibiram de 78 a 100% a germinação miceliogênica e sete inibiram em mais de 85% a germinação carpogênica. Um isolado de *T. harzianum* foi o mais eficiente em reduzir a sobrevivência, a germinação miceliogênica, bem como a carpogênica de escleródios, e tem potencial no biocontrole de *S. sclerotiorum*.

Agradecimentos: FAPEMIG, CNPq.

Palavras-chave: Mofo branco, Manejo, Biocontrole.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Serifel (*Bacillus amyloliquefaciens* cepa MB1600) no controle de *Cryptosporiopsis perennans* em pré-colheita de maçã

M. O. Manosso¹, F. C. Romano², R. B. Rodrigues³, M. Ikeda⁴, E. A. Teixeira⁵, R. Damiani⁶

¹Pesquisador de Desenvolvimento de Produtos BASF; ²Gerente de Projetos Biológicos BASF, BASF S.A., São Paulo-SP, Brasil, CEP 04794-000; ³Gerente de Desenvolvimento de Produtos BASF; ⁴Pesquisador Expert Global BASF; ⁵Assistente de Pesquisa BASF; ⁶Estagiária BASF. E-mail: miguel.manosso@basf.com

A podridão olho de boi causada por *Cryptosporiopsis perennans* é uma das principais doenças de maçã em pós-colheita no Brasil, o controle da doença tem como base a aplicação de fungicidas, principalmente na fase final de maturação dos frutos. Este trabalho teve como objetivo avaliar o controle dessa doença com aplicações de Serifel, biofungicida a base de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa MB1600. Foram realizadas 2 aplicações (7 e 1 dia antes da colheita) de Serifel nas doses 0,25; 0,5; 0,75 e 1 kg.ha⁻¹ e do padrão Serenade 2L.ha⁻¹. Houve efeito significativo das doses do biofungicida Serifel na AACPS e AACPI da podridão olho de boi. Os dados apresentaram melhor adequação ao modelo quadrático de regressão, sendo a dose de 1 Kg.ha⁻¹ a de maior redução tanto da AACPS, quanto da AACPI. No teste de Dunnett verificou-se que o biofungicida Serifel aplicado na dose de 1Kg.ha⁻¹ diferiu significativamente do biofungicida comercial testado e apresentou menores AACPS e AACPI que este. O biofungicida Serifel apresenta eficácia no controle da podridão olho de boi em maçã quando aplicado na dose de 1 Kg.ha⁻¹.

Palavras-chave: Podridão olho de boi, Biofungicida, Maçã.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Serifel (*Bacillus amyloliquefaciens* MB1600) no biocontrole de *Botrytis cinerea* em frutos de uva

M. O. Manosso¹, F. C. Romano², R. B. Rodrigues³, M. Ikeda⁴, E. A. Teixeira⁵,
R. Damiani⁶

¹Pesquisador de Desenvolvimento de Produtos BASF; ²Gerente de Projetos Biológicos BASF, BASF S.A., São Paulo-SP, Brasil, CEP 04794-000; ³Gerente de Desenvolvimento de Produtos BASF; ⁴Pesquisador Expert Global BASF; ⁵Assistente de Pesquisa BASF; ⁶Estagiária BASF. E-mail: miguel.manosso@basf.com

O fungo *Botrytis cinerea*, causador da doença podridão cinzenta da uva, é capaz de atacar quase todos os órgãos da planta, mas são ataques aos cachos, durante a maturação que assumem maior gravidade. Agentes de controle biológico ajudam a reduzir os danos causados por doenças, com isso o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência de Serifel, biofungicida a base de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa MB1600 no controle da podridão cinzenta da uva, var. Trebiano. Foram avaliados os fungicidas biológicos, Serifel, nas doses 0,25; 0,5; 1 e 2 kg/ha e Serenade (*Bacillus subtilis*) 2L/ha, em 6 aplicações consecutivas (A,B,C,D,E e F), além desses, foram avaliados tratamentos utilizando as mesmas doses dos anteriores sendo que as 2 primeiras aplicações (A e B) foram substituídas por Collis (Boscalid+kresoxim-methyl) no programa de aplicação de Serifel e Mythos (Pyrimethanil) no programa de aplicação de Serenade. As aplicações foram realizadas no cultivo nos estádios: 66, 71, 81, 85 BBCH, pré-colheita e colheita. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). A dose de 0,5 kg/ha de Serifel diferiu estatisticamente da dose de 0,25 kg/ha do mesmo produto no controle da doença, porém não diferiu das doses superiores (1 e 2 kg/ha). Serifel a 0,5 kg/ha foi suficiente para exercer controle estatisticamente superior a Serenade 2 L/ha, até mesmo aos 7 dias após a colheita. A menor incidência da doença foi obtida pelos tratamentos com Collis seguido de Serifel, nas doses 0,5; 1; e 2 kg/ha, que também apresentaram menor severidade, porém não diferiram estatisticamente das mesmas doses apenas de Serifel, no estádio 85, e de Mhytos + Serenade após 7 dias da última aplicação.

Palavras-chave: Podridão cinzenta da uva, Controle, Fungicidas biológicos.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Supresión de la eclosión *in-vitro* de *Meloidogyne javanica* en presencia de *Paecilomyces* y óleos esenciales

F. A. Salinas¹, C. M. D. R. Faria¹, F. J. Telaxka¹, C. D. Leite¹, A. J. Maia¹, V. A. Jardimetti²

¹Universidade Estadual Centro-Oeste de Paraná, Departamento de Agronomia, Guarapuava-PR, Brasil, CEP 85040-170; ²Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, Brasil, CEP 87020-900. E-mail: felipesalinasvasquez@gmail.com

Los nematodos causan una de las enfermedades más dañinas, que disminuye el rendimiento en 30 a 50%, en el mundo se estima que US\$ 100 billones de pérdidas son generadas por estos. Los nematodos de agalla poseen una amplia gama de hospederos, donde originan células gigantes (hipertrofia) interfiriendo en la absorción de agua y nutrientes. Este estudio tuvo por objetivo evaluar la supresión en la eclosión de *M. javanica* de los diferentes tratamientos. Los tratamientos fueron: T0=agua, T1=Tween, T2= Oleo esencial de *Eucaliptus* sp., T3= Oleo esencial de *Origanum vulgare*, T4= Oleo esencial de *Piper nigrum*, T5= Oleo esencial de *Copaifera officinalis*, T6= *Paecilomyces*, T7= compuesto orgánico (linaza+vinagre de vino orgánico, 1:1) y T8= Vertimec, los oleos esenciales fueron utilizados al 0,5%, utilizando como coadyuvante Tween (1:1). La supresión fue evaluada por la determinación del porcentaje de eclosión de huevos de *M. javanica* despues de 14 días de incubación en oscuridad a 25 °C. Se utilizó un diseño completamente aleatorio, los datos obtenidos fueron analizados en el programa estadístico Sisvar, realizando Anova y teste de significancia de Tukey. Los resultados obtenidos presentaron diferencias estadísticas, separando los tratamientos en cuatro grupos, siendo el óleo esencial de *Eucalyptus* sp, *Paecilomyces* y compuesto orgánico herramientas promisorias para el biocontrol o control alternativo de nematodos, llegando a suprimir la eclosión de huevos de *M. javanica* hasta un 99,75%, 99,8% y 100% respectivamente.

Agradecimientos: CAPES, UNICENTRO.

Palabras-clave: Supresión, Eclosión, Biocontrol, Control alternativo.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Supressão de brusone foliar por diferentes isolados de *Trichoderma asperellum*

T. P. de Sousa¹, R. L. Arruda¹, A. A. Chaibub², G. B. da Silva³, M. C. C. Filippi⁴

¹Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, Brasil, CEP 74690-900;

²Universidade de Brasília, Brasília-DF, CEP 70910-900; ³Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém-PA, Brasil, CEP 66077-830; ⁴Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás-GO, Brasil, CEP 75375-000. E-mail: thatyane_@hotmail.com

A brusone é a principal doença do arroz, causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae*, ocorre em todas as regiões produtoras. O uso de *Trichoderma* spp. tem sido procurado como método alternativo do controle de doenças. O objetivo deste trabalho foi quantificar a supressão de brusone foliar em casa de vegetação com aplicação da suspensão de conídios e filtrado, de quatro isolados de *T. asperellum* (Ufra.T06, Ufra.T09, Ufra.12, Ufra.52). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições e 9 tratamentos: A–Ufra.T06x *M. oryzae*; B–Ufra.T09x *M. oryzae*; C–Ufra.T12x *M. oryzae*; D–Ufra.T52x *M. oryzae*; E–Ufra.T06 Filtradox *M. oryzae*; F–Ufra.T09 Filtradox *M. oryzae*; G–Ufra.T12 Filtradox *M. oryzae*; H–Ufra.T52 Filtradox *M. oryzae*; I–*M. oryzae*. Plantas de arroz no estágio vegetativo foram pulverizadas com suspensão de conídios do isolado de *M. oryzae* (3×10^5), com as suspensões de conídios ou filtrado dos isolados de *T. asperellum* (10^8), após 24 horas realizou-se coleta de folhas para análise de Microscopia eletrônica de Varredura (MEV). Todos os tratamentos, suprimiram a brusone foliar, dentre estes o tratamento D apresentou menor severidade da doença (1,92%). No MEV observou-se alterações morfológicas em *M. oryzae*, como murchamento do conídio, tubo germinativo e apressório e adesão dos conídios de *T. asperellum* à *M. oryzae*. Conclui-se que tanto a aplicação da suspensão de conídios quanto o filtrado das culturas de todos os isolados de *T. asperellum*, atuam no biocontrole de *M. oryzae*, interferindo no ciclo infeccioso, suprimindo a severidade de brusone foliar.

Palavras-chave: Biocontrole, Brusone, Antagonismo.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



The role of microbial volatiles in plant protection

T. Cernava^{1,2}, S. Liebming³, G. Berg²

¹ACIB GmbH, Petersgasse 14, 8010 Graz, Austria; ²Institute of Environmental Biotechnology, Graz University of Technology, Petersgasse 12, 8010 Graz, Austria; ³Roombiotic GmbH, Petersgasse 12, 8010 Graz, Austria. E-mail: tomislav.cernava@tugraz.at, gabriele.berg@tugraz.at

The indigenous microbiota of plant hosts fulfills a central role in terms of protection against biotic stresses. A variety of microorganisms produce highly efficient metabolites to block pathogen attacks and thus maintain plant health under unfavorable conditions. The utilization of volatile organic compounds (VOCs) is a powerful strategy to overcome distance boundaries. Bioactive VOCs are employed by beneficial microorganisms to establish and maintain a 'protective shield' around the host. It was demonstrated that distinct plant-associated bacteria, e.g. the genera of *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, and *Paenibacillus*, are major contributors to the recruitment of volatile and highly active antimicrobial substances. Identified diazines from the *Bacillus* and *Paenibacillus* clusters drastically reduced the viability of the pathogenic fungi *Botrytis cinerea*, *Verticillium dahliae*, and *Candida albicans*. Moreover, analogous diazine derivatives were demonstrated to inhibit the growth of various human pathogenic bacteria including *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Staphylococcus aureus* when applied in low concentrations. We also demonstrated that various volatiles can be employed as long-distance messengers and play a central role in inter-species interactions. In the environmental context we found that VOCs-driven effects highly depend on i) the availability of nutrients, ii) the development stage of the microorganism, and iii) strain-specific interactions, e.g. synergistic effects of compatible microorganisms. The overall findings provide strong evidence for the importance of microbial VOCs in the maintenance of host wellbeing and additionally increase the repertoire for upcoming biotechnological applications.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



The specificity of *Trichoderma* in the biological control of *Guignardia citricarpa*: clarification of molecular interactions

F. B. Lima¹, C. Félix², A. Alves², P. Domingues², R. T. S. Ribeiro¹, A. C. Esteves²

¹University of Caxias do Sul, Department of Biotechnology, Caxias do Sul-RS, Brazil, ²University of Aveiro, CESAM, Department of Biology, 3810-193 Aveiro, Portugal. E-mail: nandalima85@gmail.com

Biological control agents (BCA) have received great recognition, and their use can complement or even replace the use of agrochemicals. However, there are few studies of the citrus black spot biological control. This disease is caused by the fungus *Guignardia citricarpa*, leading to a significant decrease of citrus production and to an intensive use of chemicals for its control. The purpose of this study was to identify extracellular proteins secreted by *Trichoderma atroviride* T17 and *T. harzianum* T1A, which have proven to be effective for the control of *G. citricarpa*. The bidimensional electrophoresis (2D) allowed obtaining the secreted protein profiles of *Trichoderma* species grown in glucose media (control) and in medium containing deactivated mycelium of *G. citricarpa* Gc3. Proteins were identified by LC-MS/MS showing that both strains secrete different proteins. *Trichoderma harzianum* secreted proteins related to mycoparasitism processes, to antagonism and induction of systemic resistance of plant even in control medium and in contact with the pathogen only the expression of proteins related to the metabolism is decreased. *Trichoderma atroviride* showed higher expression of proteins related to biocontrol pathogen in the presence of pathogen mycelium, when compared to the control medium. Identified proteins that have prominent importance are: α -mannosidase, chitinase, mutanase, glycosidase, endochitinase and, some families of glycoside hydrolases. The results are pioneer in unravelling the *Trichoderma* interaction with *G. citricarpa*. This study allowed identifying proteins responsible for the degradation of the pathogen's cell wall that help in the mycoparasitism processes of *Trichoderma*, and others that are considered important in the induction of systemic resistance of plant and biological control. Thus, the results confirm the potential of these organisms as BCA of *G. citricarpa*, allowing understanding the antagonism mechanisms.

Acknowledgements: CESAM, CAPES.

Keywords: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride*, Secretome, Citrus black spot, Biological control.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas no controle de nematoides na cultura do algodoeiro

M. F. Silva¹, A. S. Ferreira¹

¹Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Agrárias, Uberlândia-MG, Brasil, CEP 38408-100. E-mail: marcelafreitass@hotmail.com

O objetivo deste trabalho foi avaliar o controle de *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus brachyurus* na cultura do algodoeiro inoculada com bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP). O ensaio foi conduzido na casa de vegetação da Universidade Federal de Uberlândia. Algodoeiros foram cultivados em vasos de polipropileno de 1,5 litros, contendo solo e areia na proporção de 1:2 (v:v) e, após 15 dias da germinação, o solo foi infestado com ou 5000 ovos de *M. incognita* ou 100 juvenis de *P. brachyurus*, combinados com 5 mL dos isolados bacterianos 710, Rec 14b ou BR11001, quantificados em espectrofotômetro à 600 nm e densidade ótica (0,400). Como testemunha, plantas foram inoculadas apenas com os nematoides. Utilizou-se cinco repetições por tratamento e uma planta por vaso. Depois de 30, 45, 60 e 75 dias de aplicação das bactérias e dos nematoides no solo, avaliou-se a população de nematoide nas raízes e determinou-se o fator de reprodução (FR) dos nematoides. Os isolados Rec 14b e BR11001 aumentaram significativamente a população de *M. incognita* no sistema radicular aos 75 dias, sendo justificado por serem bactérias promotoras de crescimento de plantas, aumentando o sistema radicular e conseqüentemente o número de entradas para o nematoide. No ensaio com *P. brachyurus*, todos os tratamentos aumentaram o FR nos tempos avaliados, sendo que apenas aos 30 dias, o FR no tratamento com o isolado 710 foi igual a zero. Os resultados mostraram que os isolados de BPCP podem afetar o nematoide, mas o controle depende do isolado de bactéria e do nematoide.

Agradecimentos: CNPq.

Palavras-chave: Bactérias endofíticas, *Meloidogyne incognita*, *Pratylenchus brachyurus*.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Uso de espécies de *Trichoderma* na inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*

I. P. Barros¹, G. A. C Vargas¹, A. L. Silveira¹, L. S. Lopes¹, M. G. O. Soares¹, E. Alves¹

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Lavras-MG, Brasil, CEP 37200-000. E-mail: isabelapiresbarros@yahoo.com.br

O Brasil é um dos maiores produtores de manga do mundo, porém, problemas fitossanitários, dificultam sua produção. A antracnose causada pelo fungo *C. gloeosporioides* é a doença de maior importância. Fungos do gênero *Trichoderma* são utilizados no controle biológico, reduzindo a incidência de doenças. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antagonista de *Trichoderma* spp. sobre o fungo *C. gloeosporioides* da cultura da mangueira. Foram utilizados dois isolados de *Trichoderma* e um isolado de *C. gloeosporioides*. O delineamento experimental foi em DIC, com cinco tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram: T1- *T. harzianum*, T2- *T. asperellum*, T3- *C. gloeosporioides*, T4- *C. gloeosporioides* X *T. harzianum*, T5- *C. gloeosporioides* X *T. asperellum*. Para o teste de pareamento, discos de micélio de *C. gloeosporioides* e *Trichoderma* foram pareados em placas de Petri. Como controle e para comparação utilizou-se placas com isolados de *C. gloeosporioides*, *T. harzianum* e *T. asperellum*. As placas foram mantidas em BOD à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Os diâmetros transversais e longitudinais das colônias foram medidos por sete dias. Foram calculados o IVC (índice de velocidade de crescimento micelial) e a %I (porcentagem de inibição). Foi realizada ANOVA dos dados e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Houve diferença estatística entre o IVC e os isolados testados, sendo *T. harzianum* o mais eficiente, com média de 5,28 mm e %I de 70,48%, seguido do *T. asperellum* com 7,62 mm e %I de 57,44%, demonstrando que as espécies de *Trichoderma* podem ser utilizadas como controle de *C. gloeosporioides* em mangueira.

Palavras-chave: Antagonismo, Biocontrole, Antracnose.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Uso de *Trichoderma harzianum* como estratégia para redução de impactos causados pelo pé preto na implantação de vinhedos

J. C. Tonello¹, M. R. Oliveira¹, S. Lerin², D. S. Grohs³, M. A. K. Almança¹

¹IFRS Campus Bento Gonçalves, Lab. de Fitopatologia, Bento Gonçalves-RS, Brasil; ²UFPEL, Dep. de Fruticultura de Clima Temperado, Pelotas-RS, Brasil, CEP 96010-610; ³Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves-RS, Brasil, CEP 95700-000. E-mail: julio.c.tonello@gmail.com

O objetivo deste trabalho foi validar uma tecnologia de aplicação de *Trichoderma harzianum* como estratégia para proteção de mudas e redução dos impactos causados por fungos associados a doença pé preto. O experimento foi realizado em Pinto Bandeira, RS, numa área de replantio de videira com histórico positivo da doença. No ensaio a campo, *T. harzianum* (Ecotrich® WP) foi aplicado no momento do plantio das mudas, nas doses de 0, 2,5, 5 e 10 g/L, nos portaenxertos IAC 572 e SO4. As raízes dos portaenxertos ficaram imersas antes do plantio por 1 h nas suspensões. O delineamento experimental foi blocos casualizados (4 tratamentos, 5 blocos, 4 plantas por tratamento em cada bloco). A partir da brotação as mudas receberam uma aplicação via rega de 300ml de uma solução de 1g/L de *T. harzianum* a cada mês, por 4 meses, exceto para as testemunhas. A avaliação foi realizada 10 meses após o plantio com o arranquio e reisolamento dos fungos. Em cada planta foram isolados 10 fragmentos de raízes em placas de Petri. Para a avaliação, as colônias foram identificadas morfológicamente. Observou-se que o SO4 teve o menor índice de plantas colonizadas por *T. harzianum* (52%) e o maior por fungos associados ao pé preto (92%). Na soma dos portaenxertos a testemunha teve 42% de plantas colonizadas por *T. harzianum* e 100% por fungos associados ao pé preto. Para o IAC 572 observou um aumento do reisolamento de *T. harzianum* com o aumento da dose no plantio.

Agradecimentos: CNPq, Ballagro Agro Tecnologia, Embrapa Uva e Vinho.

Palavras-chave: Controle biológico, Portaenxerto, Fungos.



XII Reunião Brasileira de Controle
Biológico de Doenças de Plantas

XVI Simpósio de Manejo de
Doenças de Plantas

Integrando técnicas para entregar resultados



Viabilidade de formulações de *Penicillium citrinum* armazenadas em diferentes temperaturas

J. de S. Lima¹, I. L. de S. Alves², R. B. Mendes¹, P. F. S. Tavares², N. C. Duarte²,
C. A. T. Gava³

¹Instituto Federal do Sertão Pernambucano, Petrolina-PE, Brasil; ²UPE, Petrolina-PE, Brasil; ³Embrapa Semiárido, Petrolina-PE, Brasil, CEP 56302-970. E-mail: jessyka_llima@hotmail.com

A cultura do sisal, importante para região semiárida da Bahia, é afetada pela podridão vermelha causada pelo fungo *Aspergillus niger*. Uma alternativa promissora para o manejo desta doença é o controle biológico utilizando *Penicillium citrinum*. No entanto, um dos fatores limitantes a utilização de um agente microbiano é a dificuldade na manutenção da viabilidade dos conídios por longos períodos. Este estudo teve por objetivo avaliar a preservação da viabilidade de formulações à base de *P. citrinum* (Pc) armazenadas em temperaturas ambiente (28 °C) e sob refrigeração (4 °C), durante 12 meses. Para a produção de conídios de Pc foi selecionado o arroz como substrato sólido. Os conídios foram separados dos grãos de arroz com auxílio de um extrator, Mycoharvester MH5b. Foram elaboradas quatro formulações utilizando arroz, bagaço de cana-de-açúcar, caulim ou óleo vegetal emulsionável. As formulações foram ajustadas para 10⁹ conídios g ou mL⁻¹. A avaliação da viabilidade ocorreu mensalmente durante 12 meses, pela contagem de UFCs em meio BDA, sendo utilizadas 4 repetições. As médias dos tratamentos foram comparadas, obtendo-se curvas de sobrevivência dos conídios puros de Pc formulados. A viabilidade de Pc em arroz se manteve elevada sob 4 °C, com a germinação de conídios 1,7 x 10⁹ UFC mL⁻¹ até o final 12 meses. Para as demais formulações a germinação permaneceu constante até 9 meses (10⁹ UFC mL⁻¹) e, após este período, ocorreu uma redução. Quando armazenadas a 28 °C houve uma redução expressiva da viabilidade dos conídios para todas as formulações a partir do 7^o mês de armazenamento. Estes resultados demonstraram que as formulações de Pc mantidas em 4°C permaneceram viáveis por mais tempo do que aquelas mantidas em 28 °C ao longo de 12 meses.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*, *Agave sisalana*.