

SÔNIA CRISTINA JACOMINI DIAS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS ISOLADOS DE SOLOS DO CERRADO DA REGIÃO DE UNAÍ, MINAS GERAIS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Eliane Ferreira de Noronha

Brasília - DF

2011

D541a Dias, Sônia Cristina Jacomini

Avaliação do potencial biotecnológico de fungos isolados de solos do Cerrado da Região de Unaí, Minas Gerais. /Sônia Cristina Jacomini Dias – 2011.

81f. : il.; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Brasília, 2011.
Orientação: Eliane Ferreira Noronha

1. Fungos fitopatogênicos. 2. Feijão – Doenças e pragas. 3. Controle biológico. 4. Biotecnologia agrícola. I. Noronha, Eliane Ferreira, orient. II. Título.

A Deus, que me permitiu sonhar. Ao meu marido Marcos, que me fez acreditar no sonho, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Uma jornada, uma conquista, uma vitória; para tantos, apenas mais uma; para outros, um desafio vencido, um sonho conquistado nesta trajetória em que se é acometido de tantos momentos de tristeza, incapacidade, incertezas, cansaço, extremo cansaço, mas, que eram esquecidos com tantas pessoas ao redor, abraçando a mesma luta ou simplesmente assistindo e torcendo. E é por esse grande apoio, os meus sinceros agradecimentos:

A Deus, que por toda a minha vida sempre esteve presente, nos menores e maiores sonhos; me permitiu mais esta conquista.

A professora e orientadora Dr.^a Eliane Ferreira Noronha, por uma pequena frase no início de tudo: “eu considero que você já fez o mestrado”, que fez a diferença em desistir ou continuar.

A Jackeline, pela amizade, companheirismo, confiança, dedicação e presença em cada etapa de aprendizado.

A Raquel, por fazer parte desta caminhada.

Aos colegas do laboratório, Viviane, Isis, Priscila, que presenciaram esta batalha.

A colega Fernanda, pelo carinho, amizade e convívio, elevando sempre as preces a Deus.

Ao colega Luiz, pela amizade e pelo grande apoio na condução dos experimentos.

A Margarete e Marisia, por sua presença e contribuição.

A Francilene, menina de coração, mulher de formação, fortaleza no trabalho, sem ela seria impossível.

A amiga Elizabeth, por seu grande apoio e dedicação.

Aos amigos Silmeire e Luiz Adriano, pela amizade, pela hospedagem, pelo apoio, e por não terem me apoiado nos momentos em que quis desistir e acreditaram no meu sonho.

A todos os colegas e amigos não citados, mas não esquecidos, o meu obrigado pelo apoio.

Aos meus sogros, Lourdes e Manoel, por sua confiança em mim.

Aos irmãos Aparecida, pelas constantes contribuições e expressões de carinho, Cleusa, Carlos e Eleida, por acreditarem.

As afilhadas Alana e Aparecida, às quais dispenso muito carinho pela admiração.

Ao meu sobrinho Carlos Humberto, pela hospedagem e pela companhia.

As minhas noras Flávia e Camila, que fizeram parte desta jornada.

Aos meus filhos Danilo e Leandro, **peças fundamentais**, pelo carinho, apoio e acima de tudo por fazerem parte de toda a trajetória acadêmica da “mãe” ao longo da vida; peço aqui desculpas pelo débito de atenção e presença nesta longa jornada, mas, espero que o entusiasmo e empenho que sempre coloquei em meu trabalho possam servir de estímulo para sempre seguirem em “frente”.

A pequena Bianca, recém chegada, que veio para abrilhantar nossa vida.

Aos meus pais, Adelino e Tereza, que mesmo distantes, nunca deixaram de dedicar o seu apoio.

Especialmente ao meu marido, Marcos, **peça chave** desta conquista, por ter sofrido as ausências, impedido as quedas, suportados os desabafos, apoiado e incentivado esta e muitas outras conquistas e por que não sonhos, apenas sonhos, mas que permitiu sempre que se tornassem realidade.

Comece devagar, porque a direção é mais importante que a velocidade.

Clarice Lispector

RESUMO

Dias, Sônia Cristina Jacomini. Avaliação do Potencial Biotecnológico de Fungos Isolados de Solos do Cerrado da Região de Unaí, Minas Gerais. 2011. Mestrado (Ciências Genômicas e Biotecnologia) Universidade Católica de Brasília.

O Cerrado, segundo maior bioma brasileiro, abriga um grande número de espécies de plantas, animais e microrganismos. Apesar disto, sua biodiversidade ainda é pouco estudada e está ameaçada pelas práticas de atividades agrícolas e da pecuária. Os microrganismos presentes no solo têm despertado interesse, cada vez maior, como fonte de produtos biotecnológicos na aplicação no controle biológico contra fitopatógenos de diversas espécies de plantas, contribuindo desta forma para a diminuição do emprego de produtos químicos na agricultura. Microrganismos com atividade de biocontrole se encontram, especialmente, no solo rizosférico e rizoplano, como os fungos filamentosos que já são muito estudados como fonte de atividades antimicrobianas e na indução de resistência de plantas a fitopatógenos. A região de Unaí, Minas Gerais, é uma grande produtora de feijão (*Phaseolus vulgaris*) e enfrenta perdas na produção destes grãos em função da ocorrência de doenças fúngicas causadas pelos fungos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani*. Os fungos do gênero *Trichoderma* têm demonstrado em vários trabalhos uma eficiente ação contra diversos fitopatógenos. Espécies de *Trichoderma* com atividade antimicrobiana já foram isoladas a partir de solo rizosférico de várias culturas. Assim sendo, este trabalho objetivou isolar fungos da rizosfera de plantas de feijão em lavouras, bem como, de solo nativo do cerrado, no Município de Unaí, Minas Gerais, visando à obtenção de novos agentes de biocontrole eficientes no controle deste fitopatógeno. Os fungos obtidos a partir destas amostras foram classificados e avaliados quanto à capacidade de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos de solo, bem como de induzir resposta de defesa em feijoeiro comum. Foram testados 27 isolados, selecionados segundo seus aspectos morfológicos como *Trichoderma* sp, em testes de antagonismo (pareamento de culturas) e de inibição com metabólitos não voláteis (papel celofane), não foi observado um padrão de isolamento que apresente potencial biocontrolador em todos os testes mesmo se tratando do mesmo fitopatógeno. Para o teste antagônico contra *R. solani*, STN2AC e SRP22, foram os isolados que apresentaram valores mais significativos de inibição; contra *F. solani*, foram os isolados SCE2E e SRP22; contra *F. oxysporum*, SRP2B, STN1AC e SCE2E; e contra *S. sclerotiorum*, STN2BB, STN1AA e STN1AD. Para o teste de metabólitos não voláteis, foram SRP2B, contra *R. solani*; STN2BA e STN2A1, contra *F. solani*; STN2AB, contra *F. oxysporum* e SCE2A e SCE2C contra *S. sclerotiorum*. Quanto aos testes de alteração no desenvolvimento de feijoeiro comum, os isolados SP4BC e SRP21 apresentaram maior ação no desenvolvimento de raiz, SRP21 e STN2BA para caule e para área foliar, STN2BA. Apenas o isolado SRP2B alterou a produção da enzima de defesa β -1,3 glucanase em amostras de raiz, não sendo observadas alterações na produção de quitinases e peroxidases. Com relação à resistência aos fungicidas; “Frowncide” 500 SC e “Sumilex” 500WP utilizados no controle de *S. sclerotiorum*, os isolados SCE2C e STN2A1 apresentaram maior tolerância.

Palavras-chave: *Trichoderma* spp, *Sclerotinia sclerotiorum*, fitopatógenos, controle biológico, atividades antimicrobianas, *Phaseolus vulgaris*, rizosfera.

ABSTRACT

Evaluation of the potential of fungi isolated biotechnological soil of the Cerrado Region Unai, Minas Gerais. 2011. Genomic Sciences and Biotechnology. Catholic University of Brasilia. Distrito Federal.

The Savanna-like biome in Brazil, called Cerrado, is the second largest Brazilian biome and presents a wide large number plant's, animal's and microorganism's. Despite of this, the Cerrado's biodiversity is still poorly studied and is threatened by the practices of farming and ranching. This underexplored biodiversity of soil's microorganisms has been attracting interest as a source of biotech products especially as a source of biological control agents with antagonistic activity against fungal plant pathogens. This control strategy may contribute to the reduction of chemical fungicides used in agriculture. Antagonistic filamentous fungi are found, especially in the rhizosphere and rhizoplane, and have been widely studied as a source of antimicrobial activity and as an inducer of plant resistance to fungal pathogens. Unai is the biggest crop beans (*Phaseolus vulgaris*) producer in Minas Gerais and faces production losses due to the occurrence of fungal diseases mainly caused by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani*. The filamentous fungus of *Trichoderma* genus comprises a set of species with antagonistic activity against different phytopathogenic fungi. The present work aimed the isolation and evaluation of the antagonistic and defense elicitor activities of *Trichoderma* species isolated from Cerrado, in order to obtain novel and efficient biocontrol agents. The fungi obtained from the soil samples, 27 isolates, were classified and evaluated to its ability to inhibit the growth of pathogenic fungi as well as to induce defense response in *Phaseolus vulgaris*. The most promising antagonistic activities values were obtained for the isolates STN2AC/SRP22, SRP22/SCE2E, SRP2B/STN1AC/SCE2E and STN2BB/STN1AA/STN1AD, against *R. solani*, *F. solani*, *F. oxysporum* and *S. sclerotiorum*, respectively. The highest inhibition's values were obtained to the isolates SRP2B, STN2BA/STN2A1, STN2AB/SCE2A against *R. solani*, *F. solani*, *F. oxysporum* and *S. sclerotiorum*, respectively. Two isolates SP4BC and SRP21 presented positive effect on the root's growth of common bean plants, as well as the isolates SRP21/STN2BA and STN2BA, for stem length and leaf area, respectively. The enzymatic activity results of defense enzymes were not conclusive. The isolates SCE2C and STN2A1 presented the highest values of tolerance against the chemical fungicides SC 500 Frowncide Sumilex 500WP.

Keywords: Keywords: *Trichoderma* spp, *Sclerotinia sclerotiorum*, plant pathogens, biological control, antifungal activity, *Phaseolus vulgaris*, rhizosphere.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Sintomas do mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum* (A); escleródios e apotécios (B). Foto: Murillo Lobo Junior. 15
- Figura 2. Sintomas da podridão radicular seca, *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. Foto: Murillo Lobo Junior..... 16
- Figura 3. Sintomas causados pelo fungo *Fusarium oxysporum* na raiz do feijoeiro. Fonte: <http://www.agrolink.com.br>. 17
- Figura 4. Sintomas da podridão radicular de *Rhizoctonia solani*. Foto: Murillo Lobo Junior. 18
- Figura 5. Desenvolvimento de resistência a fungicida. Resistência qualitativa (Fig. A) e resistência quantitativa(B).<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s151783822008000200017&script=sci_arttext#fig01>. Ilustração modificada..... 30
- Figura 6. Esquema do complexo gênico nuclear de DNA ribossomal, que contém os genes das subunidades do rDNA 18S, 28S e 5.8S, além dos espaços internos transcritos (ITS1 e ITS2). As setas indicam a posição dos iniciadores (*primers*) usados nas reações de PCR. 38
- Figura 7. Pacas de meio de cultura seletivo mostrando colônias microbianas provenientes de amostras de solos de áreas cultivadas e cerrado nativo obtidas na triagem inicial. Brasília – DF. 2010. 42
- Figura 8. Placas contendo 3 dos isolados selecionados com características morfológicas semelhantes as de espécies de *Trichoderma*. Brasília – DF. 2010. 42
- Figura 9. Representação do teste de avaliação da atividade antifúngica dos isolados de *Trichoderma* utilizando o teste de pareamento de culturas. Nesta figura é mostrado o isolado STN2AA no teste contra os fungos fitopatogênicos *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*, respectivamente. Brasília – DF. 2010. 43
- Figura 10. Avaliação da inibição do crescimento do fungo *F. oxysporum* pelos 27 isolados de *Trichoderma* spp utilizando o teste de antibiose. Brasília – DF. 2010..... 46
- Figura 11. Avaliação da inibição do crescimento do fungo *R. solani* pelos 27 isolados de *Trichoderma* spp utilizando o teste de antibiose. Brasília – DF. 2010. 46
- Figura 12. Avaliação da inibição do crescimento do fungo *F. solani* pelos 27 isolados de *Trichoderma* spp utilizando o teste de antibiose. Brasília – DF. 2010. 47
- Figura 13. Avaliação da inibição do crescimento do fungo *S. sclerotiorum* pelos 27 isolados de *Trichoderma* spp utilizando o teste de antibiose. Brasília – DF. 2010..... 47
- Figura 14. Dendrograma gerado pelo método de análise UPGMA utilizando o coeficiente de *Jaccard*, a partir das 20 bandas polimórficas geradas pelo RAPD, dos 11 isolados de *Trichoderma* sp. Primers utilizados na determinação da distância genética: OPX3 e OPX7..... 49
- Figura 15. Atividade de β -1,3 glucanases de amostras de raízes e folhas de feijoeiro cultivado na presença ou ausência de isolados de *Trichoderma* spp. As plantas foram coletadas após 21 dias de cultivo (U/ml). Brasília - DF. 2010..... 51

Figura 16. Resultado do teste de sensibilidade de Sumilex 500WP representando as três doses utilizadas. As barras representam o desvio padrão entre as triplicatas – DMRCM (dose máxima recomendada), MTDDOSE (metade da dose) e DBDOSE (dobro da dose). Brasília – DF – 2010..... 52

Figura 17. Crescimento micelial de *Trichoderma* spp. em presença do fungicida Sumilex 500 WP: A,D – dose máxima recomendada; B,E – metade da dose e C,F – dobro da dose. Trata-se do mesmo isolado nas três doses (A a C - SCE2A; D a F – SRP2B). Brasília – DF – 2010..... 52

Figura 18. Resultado do teste de sensibilidade de Frowncide 500 SC representando as tres doses utilizadas. As barras representam o desvio padrão entre as triplicatas. – DMRCM (dose máxima recomendada), MTDDOSE (metade da dose) e DBDOSE (dobro da dose). Brasília – DF – 2010..... 54

Figura 19. Crescimento micelial de *Trichoderma* spp. em presença do fungicida Sumilex 500 WP: A – dose máxima recomendada; B – metade da dose e C – dobro da dose. Trata-se do mesmo isolado nas tres doses (STN2A1). Brasília – DF – 2010..... 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Crescimento e percentual de inibição do crescimento micelial de <i>R. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>S. sclerotiorum</i> e <i>F. solani</i> em teste de antagonismo dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. Brasília-DF. 2010.	45
Tabela 2. Crescimento e porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>R. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>S. sclerotiorum</i> e <i>F. solani</i> em teste de antibiose dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. Brasília-DF. 2010.	48
Tabela 3. Medidas de área foliar (cm ²), comprimento de raízes (cm) e comprimento de haste (cm) de feijoeiro comum cultivado na ausência ou presença de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. DF. 2010.....	50
Tabela 4. Diâmetro (cm ²) de colônias dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em meio de cultura contendo fungicida Sumilex 500 WP - 1,5g/L ¹ ; 0,75 g/L ² ; 3 g/L ³ . Brasília – DF. 2010.	53
Tabela 5. Diâmetro (cm ²) de colônias dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em meio de cultura contendo fungicida Frownicide 500 SC - 1,5g/L ¹ ; 0,75 g/L ² ; 3 g/L ³ . Brasília – DF. 2010.	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	O cultivo do feijoeiro comum (<i>P. vulgaris</i>)	13
1.2	Doenças do feijoeiro comum (<i>P. vulgaris</i>)	13
1.2.1	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib) de Bary	14
1.2.2	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.....	15
1.2.3	<i>Fusarium oxysporum</i>	16
1.2.4	<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn	17
1.3	Medidas de controle	18
1.3.1	Controle convencional.....	18
1.3.2	O controle biológico.....	19
1.3.3	Fungos do gênero <i>Trichoderma</i>	21
1.4	Mecanismos de ação de espécies de <i>Trichoderma</i>	24
1.4.1	O micoparasitismo.....	24
1.4.2	Antibiose	25
1.5	Indução de resposta de defesa	26
1.6	Caracterização molecular de fungos do gênero <i>Trichoderma</i>	27
1.7	Os fungicidas químicos	28
2	JUSTIFICATIVA.....	32
3	OBJETIVOS	32
2.1.	Objetivo geral.....	32
2.2.	Objetivos específicos.....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	Coleta das amostras de solo	34
4.2	Processamento das amostras de solo	34
4.3	Isolamento de fungos da rizosfera.....	35
4.3.1	Isolamento de fungos	35
4.4	Obtenção dos fungos fitopatogênicos.....	35
4.5	Extração de DNA	35
4.6	Atividade antifúngica	36
4.6.1	Avaliação da produção de metabólitos não voláteis dos isolados de <i>Trichoderma</i>	36
4.6.2	Avaliação da atividade antagônica	37
4.7	Classificação molecular dos fungos	37
4.7.1	Amplificação da região ITS	38
4.8	Sequenciamento e análise das sequências	38
4.8.1	Análise da diversidade por RAPD.....	39
4.9	Cultivo de plantas e bioensaios para estudos de interação	39
4.10	Quantificação da atividade das enzimas de defesa.....	40
4.11	Interferência dos fungicidas no crescimento de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	40
5	RESULTADOS	42
5.2	Teste de sensibilidade ao fungicida Sumilex 500WP.....	51
5.3	Teste de sensibilidade ao fungicida Frownicide 500SC.....	53
6	DISCUSSÃO.....	56
7	CONCLUSÃO	61
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 O cultivo do feijoeiro comum (*P. vulgaris*)

O cultivo de feijão (*Phaseolus vulgaris*) no Brasil é importante tanto do ponto de vista econômico como social e é uma das leguminosas alimentares mais utilizadas para o consumo humano em todo o mundo. Esta importância ocorre em função da área efetivamente cultivada, volume e valor de produção, geração de mão-de-obra, e também, pelo fato do feijão constituir a base alimentar da população brasileira, sendo utilizado diariamente como uma das fontes primárias de proteína e energia (OLIVEIRA et al., 1997; SALLAM NASHWA et al., 2008).

O feijão, de acordo com o IBGE (2008), é cultivado em todo o território nacional, porém seis estados se destacam em sua produção: Paraná, Minas Gerais, Bahia, São Paulo, Goiás e Santa Catarina, sendo os responsáveis por 72,4% desta produção. Em 2007, o Estado do Paraná se destacou como o primeiro produtor com uma produção de 766.792 t (1.405 kg ha^{-1}), seguido por Minas Gerais com 480.863 t (1.255 kg ha^{-1}). Entre os vinte maiores municípios produtores de feijão com um total de 651.993 t, destaca-se o município de Unaí (MG), produzindo o maior volume em 2007, 99.600 t, com produtividade média de 2.429 kg ha^{-1} . Segundo o IBGE (2008), a produção nacional de feijão em 2007, considerando as três safras, foi de aproximadamente 3.242.290 toneladas, com produtividade média de 847 kg ha^{-1} . No entanto, esta produção foi 4,6% inferior ao consumo anual do produto, representando, portanto um “déficit” de produção de cerca de 3.400.000 toneladas. Este “déficit” em parte pode ser atribuído a perdas de produção em função da ocorrência de doenças. A produção nacional de feijão em 2009 alcançou 3.478.775 toneladas: 1.642.946 toneladas da 1ª safra (47,2%), 1.430.040 toneladas da 2ª safra (41,1%) e 405.789 toneladas da 3ª safra (11,7%). Na comparação com o Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA) de novembro, a 1ª, 2ª e 3ª safras do produto registraram quedas de 0,5%, 1,7% e 0,3%, respectivamente.

1.2 Doenças do feijoeiro comum (*P. vulgaris*)

O feijoeiro comum é afetado por doenças de etiologias variadas, que contribuem para o seu baixo rendimento (RODRIGUES, 1999), ressaltando as causadas por patógenos que levam a podridões nas raízes e caule, e que se estabelecem no sistema vascular das plantas hospedeiras (MARINGONI, 1999). Como por exemplo, as doenças fúngicas: mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris), antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc&Magn), ferrugem (*Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger), mancha alternaria (*Alternaria* sp), oídio (*Erysiphe polygoni* DC), mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib)

De Bary), prodrisão de Rhizoctonia (*Rhizoctonia solani* Kuhn), podridão cinzenta do caule (*Macrophonia phaseolina* (Tassi) Goiadanich), mela ou murcha da teia micelial (*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk) e murcha de fusário, fusariose, (*Fusarium oxysporum* f. sp. Phaseoli; *Fusarium solani*). Segundo SALLAM NASHWA (2008) vários fungos de solo causam tombamento e murcha, sendo que os principais patógenos responsáveis por esta incidência no feijão são *R. solani* (Kühn) e *F. oxysporum*, respectivamente, podendo, sob condições favoráveis, levar a destruição de toda a cultura. Além disso, a doença murcha em feijoeiro é causada principalmente por *F. oxysporum*, em um complexo com *R. solani* e *F. solani* e em áreas severamente infestadas as perdas na produção podem atingir até 50% da cultura.

1.2.1 *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary

O fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum* (Lib) de Bary, causador da doença mofo branco, é um dos maiores problemas para a produção nacional de feijão. Sendo um dos patógenos de solo mais destrutivos em áreas de cultivo de feijão irrigadas no Brasil, tanto pela frequência de ocorrência como pela extensão das perdas causadas (CIF, Centro de Inteligência do feijão). Este fungo de solo se desenvolve bem em temperaturas amenas, entre 15 e 20°C, tendo seu desenvolvimento favorecido nos períodos de chuva, bem como, de abril a agosto, quando é realizado o plantio por irrigação no Cerrado do Brasil Central (NAPOLEÃO *et.al.*, 2005). A umidade é um agravante para a disseminação ou permanência da doença, pois favorece que os ascósporos, formados nas ascas, sejam ejetados no ar. Assim como, favorece a permanência de escleródios viáveis por até oito anos no solo (PARISI, 2006). Nesta forma, de acordo com Purdy (1979 apud ETHUR, 2005) ocorre a germinação carpogênica ou micelogênica. A germinação carpogênica é originária dos ascósporos de *S. sclerotiorum* que são produzidos no apotécio ((estruturas semelhantes a pequenos cogumelos (Figura 1 B)) que resultam da germinação de escleródios (estruturas de resistência) na superfície do solo e representam sua principal fonte de inoculo (NAPOLEÃO *et al.*, 2007). Os escleródios germinam e infectam a planta, aparecendo inicialmente, como lesões encharcadas nas folhas ou outro tecido da parte aérea da planta que tenham entrado em contato com flores infectadas. Das flores infectadas as lesões se espalham rapidamente para as hastes, ramos e vagens (Figura 1A) que ficam cobertas por um micélio branco de aspecto de algodão, que produzem os escleródios (1990 apud ETHUR, L.Z. *et al.*, 2001; OLIVEIRA, S.H.F., 2005). A doença se torna mais prejudicial à planta após a abscisão das flores infectadas, que caem sobre outras

partes da planta disseminando o fungo rapidamente pelos demais tecidos (OLIVEIRA, S.H.F., 2005). Para controlar *S. sclerotiorum*, a forma mais utilizada é o controle químico, principalmente pela aplicação do fungicida “Benomyl”, que chega a ter efetividade de 50% a 80% contra o tombamento de pré e pós-emergência no tratamento de sementes de soja e feijão, respectivamente (Illipronti Jr. & Machado, 1993 citado por Ethur 2005).



Figura 1. Sintomas do mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum* (A); escleródios e apotécios (B). Foto: Murillo Lobo Junior.

1.2.2 *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.

O fungo fitopatogênico *F. solani* (Mart.) Sacc. é um fungo de solo que apresenta variação em sua morfologia, fisiologia e patogenicidade, um grande número de hospedeiros e é encontrado em quase todas as regiões produtoras de feijão no Brasil (OLIVEIRA et al., 2002). Esta espécie é importante do ponto de vista econômico devido às perdas que acarreta ao setor agrícola, causando podridões radiculares no feijoeiro (Figura 2) e morte súbita na soja (ETHUR et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2007). Sobrevive no solo infestado na forma de clamidósporos por vários anos, e sua principal via de dispersão são os macronídios e micronídios produzidos em grande quantidade nas superfícies das plantas infectadas (BERNI et al., 2002). A podridão causada por este fungo afeta inicialmente as regiões do hipocótilo e da raiz principal das plântulas, causando lesões longitudinais, afiladas com coloração avermelhada e, posteriormente, com o avanço da doença, as lesões cobrem todo o sistema radicular da planta onde podem surgir fissuras longitudinais, podendo secar a raiz principal e a parte mais baixa do caule, limitando o crescimento da planta hospedeira e provocando o amarelecimento e queda das folhas inferiores da planta (MIRANDA et al., 2007).



Figura 2. Sintomas da podridão radicular seca, *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. Foto: Murillo Lobo Junior.

1.2.3 *Fusarium oxysporum*

O fungo fitopatogênico *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, pertencente à divisão de fungos mitospóricos (imperfeitos) (HAWSKWORTH et al., 1995), classe Hyphomycetes e ordem Tuberculariales (ALEXOPOULOS et al., 1996), é um dos agentes causadores da doença fusariose ou murcha de fusário, com ocorrência em diversas culturas de interesse econômico (ETHUR, 2007). Este apresenta variações sob o aspecto morfológico e patogênico e são comumente isolados de raízes de plantas que não apresentam sintomas da doença (GORDON & MARTYN, 1997). Como estes fungos apresentam especificidade a hospedeiros distintos, a espécie foi subdividida em *forma specialis* (f. sp.) (KURAMAE e SOUZA, 2002, HAWKSWORTH et al., 1995).

A doença murcha de fusário apresenta maior severidade quando associada à presença de nematóides, à adubação com baixa concentração de potássio e ao plantio em solos pobres e arenosos. Dependendo também de fatores ambientais favoráveis, tais como, temperatura, umidade e pH. A doença caracteriza-se pela ação do patógeno nos vasos condutores da planta (Figura 3), por meio da produção e liberação de toxinas e enzimas hidrolíticas, comprometendo o transporte de seiva (BEDENDO, 1995; JULIATTI & RUANO, 1997 apud SILVA, V. A. S. et al., 2007). O fungo fitopatogênico pode infectar as plantas em vários estágios de desenvolvimento causando amarelecimento e/ou murchas nas folhas mais velhas progredindo até os brotos, sendo que a infecção no estágio inicial de desenvolvimento pode provocar tombamento de mudas. Também pode ocorrer necrose marginal nas folhas, seguida de murcha total da planta, bem como, queda de folhas, flores e frutos e aparecimento de raízes adventícias culminando com a morte da planta hospedeira (BEDENDO, 1995). Ao desordenar

e bloquear os elementos xilêmicos, o patógeno altera o transporte de água na planta, sintoma evidenciado pelo escurecimento dos vasos do xilema (ZITTER et al., 1996). Aparecem estruturas de coloração rosada externamente à haste, quando em condições de alta umidade, em função do crescimento micelial e esporulação deste fitopatógeno (BIANCHINI et al., 1997).

Por ser um saprófita ativo e abundante no solo e matéria orgânica, o controle de *F. oxysporum*, agente causador de murcha, é complicado, porque este se desenvolve no solo, infecta o hospedeiro via sistema radicular e tem a capacidade de permanecer no solo por longos períodos mesmo na ausência de um hospedeiro (ETHUR, 2007).



Figura 3. Sintomas causados pelo fungo *Fusarium oxysporum* na raiz do feijoeiro. Fonte: <http://www.agrolink.com.br>.

1.2.4 *Rhizoctonia solani* Kühn

O gênero *Rhizoctonia* foi descrito em 1815 por Decondolle, micologista, francês o qual designou a espécie de *Rhizoctonia crocorum* (Pers.) DC., porém, *R. solani* a mais importante espécie do gênero foi descrita por Kuhn em 1858 (SNEH et al., 1991). É um fungo classificado como pertencente ao Filo Basidiomycota, classe Basidiomycetes, ordem Polyporales e família Corticiaceae (PEREIRA, 1997).

A rizoctoniose ou podridão radicular ou murcha de *Rhizoctonia* é uma das doenças radiculares mais comuns em feijoeiro comum (*P. vulgaris* L.) mundialmente registrada associada a perdas significativas em lavouras. Tombamento da cultura, cancro do talo, podridão radicular, podridão da vagem, ataque das folhas e atraso na emergência e

desenvolvimento da planta, são danos causados pelo fitopatógeno. O sistema radicular e a parte aérea da espécie são atacados pelo fungo, formando lesões que restringem o desenvolvimento das mesmas ou causam a sua morte (CARDOSO, 1990; BIANCHINI, et al., 1997; VAN BRUGGEN et al., 1986).

Os primeiros sintomas da podridão radicular induzidos por *R. solani* são caracterizados pela rápida maceração dos tecidos localizados abaixo do nível do solo, quase sempre concomitantemente à emergência dos feijoeiros. O sintoma característico (Figura 4) é o aparecimento de lesões pardo avermelhadas ou necróticas, com bordas bem delimitadas nas raízes pivotantes (NEEGAARD, 1977). Diferentes métodos têm sido utilizados para o controle de *R. solani*, sendo as práticas mais utilizadas, solarização, controle químico e biológico. Esse último método baseia-se na redução do inóculo ou da atividade patogênica, devido a presença natural de um ou mais organismos, o antagonista, tem sido desenvolvido com sucesso nos últimos anos. (BAKER and COOK, 1974).



Figura 4. Sintomas da podridão radicular de *Rhizoctonia solani*. Foto: Murillo Lobo Junior.

1.3 Medidas de controle

1.3.1 Controle convencional

As medidas de controle de fungos fitopatogênicos, mundialmente, utilizadas ainda são as práticas agrícolas tradicionais incluindo: queimadas para eliminar o excesso de resíduos pós-colheita, drenagem do solo, tratamento térmico da água, solarização, rotação de culturas e aplicação de fungicidas (MELO & AZEVEDO, 2000; SALLAM NASHWA et al., 2008). Estas medidas nem sempre são totalmente eficientes principalmente em função da elevada taxa de sobrevivência de formas resistentes dos patógenos de solo em condições ambientais

adversas, além da sua permanência em outras plantas hospedeiras, que podem funcionar como reservatórios (YANGUI, 2008).

O controle por aplicação de fungicidas apesar de eficiente é um processo oneroso, uma vez que requer repetidas aplicações, leva à seleção de patógenos resistentes e ao surgimento de pragas secundárias (PIRES et al., 2003). Além disto, os produtos químicos utilizados são tóxicos e poluentes, e desta forma impactam o meio ambiente e comprometem a saúde dos produtores agrícolas e consumidores (PUNJA & UTKHEDE, 2003). Outra desvantagem no uso de fungicidas está relacionada à sua inespecificidade, podendo eliminar microrganismos já estabelecidos no solo e benéficos às plantas, aumentando assim sua suscetibilidade aos patógenos de solo (PIRES et al., 2003). Nos últimos anos, devido à pressão imposta pelas leis de impacto ambiental, a crescente preocupação da população com o meio ambiente e saúde, bem como pela necessidade de desenvolvimento de métodos de controle mais eficientes, surgiu a demanda por novas estratégias neste controle. Isso para que o aumento na produtividade agrícola não dependa da utilização de medidas que acarretem em danos ambientais e riscos à saúde humana. (FRIGHETTO, 2000; DI PIERO, 2008)

1.3.2 O controle biológico

O controle biológico é, segundo Bettiol (1991), o controle de um microrganismo através de outro microrganismo. O controle de patógenos de solo pode ser obtido através da manipulação do ambiente e da introdução de antagonistas, tanto no solo como nos órgãos de propagação das plantas (BETTIOL, 1997). Esse controle, geralmente, não erradica os patógenos, pois sua ação depende da manipulação do equilíbrio biológico existente no solo. Segundo Lima et al. (2000) a premissa básica do controle biológico é manter a densidade populacional das espécies de pragas, associadas à agricultura, em níveis econômicos ecologicamente aceitáveis.

As recentes preocupações com o meio ambiente, saúde pública e resistência dos patógenos aos fungicidas químicos têm estimulado as tentativas em reduzir a quantidade de defensivos utilizados na agricultura, além da busca de métodos alternativos de controle das principais doenças das plantas. O controle biológico é uma destas alternativas sendo que o uso de formulados à base de microrganismos biocontroladores tem aumentado (TSENG, 2008). Este processo consiste na regulação de uma determinada população por outro organismo vivo com finalidade de manter as populações de patógenos abaixo dos níveis de danos econômicos

(BELLOTTI, 1992; PIRES et al., 2003). No entanto, o uso de biocontroladores ainda é restrito quando comparado ao de fungicidas químicos, devido ao custo e benefício que os mesmos representam em curto prazo (FRAVEL, 2005).

Estudos com microrganismos biocontroladores têm descrito também a possibilidade de sua utilização na identificação de genes envolvidos na indução de resposta de defesa e resistência em plantas hospedeiras, e desta forma, podem também contribuir para o desenvolvimento de cultivares agrícolas resistentes a doenças de diferentes origens (PUNJA & UTKHEDE, 2003; FRANCHESCHINI et al., 2001). A indução de resposta de defesa e resistência pode ser obtida pela inoculação prévia ou concomitante da semente de interesse com um indutor, como microrganismos saprofíticos ou metabólitos microbianos. Este tratamento induz o aumento na síntese de produtos de defesa vegetal como proteínas de defesa (quitinases, β -1,3-glucanases, peroxidases e proteases), fitoalexinas e compostos sinalizadores (DI PIERO, 2008). Assim como, a produção de antibióticos, e a inativação de enzimas do fungo fitopatogênico (TSENG, 2008).

Os microrganismos são encontrados em diferentes “habitats” e em função de sua intensa atividade biológica, desempenham importante papel na decomposição de matéria orgânica, na ciclagem de nutrientes e também na saúde e desenvolvimento de plantas (GOMES, 2003). Microrganismos de solo podem estabelecer uma relação complexa com algumas espécies de plantas, e esta interação pode resultar em efeitos benéficos, como por exemplo, estímulo do crescimento das plantas em função do aumento na síntese de hormônios, aumentando a taxa de fixação de N_2 ou efeitos negativos como a ocorrência de doenças (FERREIRA, 2008). Segundo Hswksworth (1995 apud BRIDGE & SPOONER, 2001) entre estes microrganismos estão os fungos, que representam um grupo extremamente diverso e estimado em 72.065 espécies, e cerca de 10^4 a 10^6 organismos por grama de solo (CAVALCANTI, 2006). Enquanto alguns fungos causam uma série de doenças em plantas, levando a perdas no setor agrícola, existem aqueles que são conhecidos pelo seu antagonismo contra patógenos de plantas (GOMES, 2003). Este fato chama a atenção para a necessidade do conhecimento da diversidade das comunidades de fungos presentes na rizosfera e entendimento do seu papel no ecossistema do solo (GOMES, 2003).

Os fungos de solo, portanto, representam uma excelente alternativa para o controle de doenças nas lavouras brasileiras (SMALLA, 2001). O biocontrole de fitopatógenos é um processo complexo e dependendo do agente controlador pode ocorrer através de mecanismos

distintos ou por uma combinação destes, como a competição por nutrientes ou espaço, a produção de antibióticos e enzimas líticas, a inativação de enzimas dos hospedeiros, parasitismo direto e indução de resposta de defesa e resistência na planta hospedeira (TSENG, 2008; GUETSKY, 2002).

Entre as centenas de organismos já identificados como agente de controle biológico de fungos fitopatogênicos, apenas alguns são comercialmente viáveis, em função de sua efetividade em condições de campo (SALLAM NASHWA et al., 2008). A rizosfera tem sido descrita como um habitat promissor para o isolamento de possíveis antagonistas, sendo que desta já foram isoladas cerca de 1200 espécies com potencial de utilização como agente de biocontrole (COOK, 1993; WATANABE, 1994 apud Bridge, 2001). Dentre os produtos comercialmente disponíveis com eficácia comprovada tem sido demonstrado que as chances de sucesso aumentam quando os potenciais agentes de biocontrole são isolados do próprio ambiente em que serão posteriormente aplicados. Hadar et al. (1984) ressaltam que os isolados de *Trichoderma* nativos são mais adaptáveis ao solo que os introduzidos. Melo (1998) relata que a incorporação de antagonistas adaptados ao micro habitat do patógeno é um aspecto relevante para muitos sistemas planta-patógeno, mas, com algumas exceções, antagonistas podem ser introduzidos em outro ambiente diferente daquele onde foi isolado, estabelecer-se e parasitar o patógeno.

1.3.3 Fungos do gênero *Trichoderma*

Fungos do gênero são os mais comuns e efetivos agentes de biocontrole de diferentes fungos fitopatogênicos de raízes e folhas (ALMEIDA et al., 2007, SHORESH e HARMAN,2008). Muitos pesquisadores têm demonstrado o potencial de *Trichoderma* spp. no controle de doenças de tombamento e murcha de plantas causado por *R. solani* e *Fusarium* spp (SALLAM NASHWA et al., 2008). Sua atividade de micoparasita e de produção de antibióticos foram demonstradas pela primeira vez por Weidling em 1932 e 1934, respectivamente (GRONDONA, 1997). Este gênero compreende um grupo de fungos filamentosos mitospóricos de solo, pertencentes à classe Hyphomycetes, que são saprófitas, anamórficos e apresentam esporulação abundante, com conídios pequenos, unicelulares e de fácil disseminação pelo ar (BRAGA et al., 2003; SAMUELS, 2006). É classificado também como um gênero imperfeito pertencente à subdivisão Deuteromycotina, ordem Moniliales e família Moniliaceae (MELO, 1991). De acordo com MELO (1991), as espécies de

Trichoderma, dentro de um mesmo grupo ou seção, apresentam características sobrepostas, o que torna complexa a sua classificação morfológica. Portanto, apesar de muito utilizada para classificação de fungos deste gênero a morfologia não é um critério seguro para definição de espécies (SIDDIQUEE, 2007).

Este gênero é representado por espécies que de acordo com CHET, 2005, são encontradas em quase todo tipo de solo agrícola, associadas à madeira em decomposição e principalmente na rizosfera (TSENG, 2008). As espécies rizocompetentes colonizam a superfície das raízes, se enrolam sobre os pelos radiculares e penetram a epiderme e o córtex das plantas hospedeiras (HARMAN, 2006). O sucesso de biocontrole destas espécies está associado à: sua alta capacidade reprodutiva, sua habilidade para sobreviver em condições desfavoráveis, sua eficiência na utilização de nutrientes, sua capacidade de modificar a rizosfera, eficiência na promoção do crescimento da planta e indução dos mecanismos de defesa, sua forte capacidade em agir contra os fungos fitopatogênicos, sua resistência a inibidores produzidos por outros microorganismos e tolerância a diferentes tipos de fungicidas (KULLNING et al, 2001; BENITEZ, 2004).

As espécies representantes do gênero *Trichoderma* interagem parasiticamente e simbioticamente com diferentes organismos como plantas e outros microorganismos (WOO, 2006; HARMAN, 2006). No processo simbiótico, eles infectam as raízes das plantas invadindo as camadas exteriores, e desta forma, induzem resistência localizada e sistêmica na planta, protegendo-a contra o ataque de fungos patogênicos (SHORESH, 2008). Como exemplo, pode-se citar o isolado T22 da espécie *T. harzianum*, que quando inoculado às raízes de tomateiro aumenta a sua resistência a doenças causadas por patógenos foliares, reduzindo em até 80% os seus sintomas (HARMAN, 2006). No parasitismo contra outros fungos, o parasita reconhece o hospedeiro e através da competição por nutrientes, pela produção de antibióticos ou pelo processo denominado de micoparasitismo inibe o crescimento do hospedeiro podendo levar até mesmo à sua eliminação (HARMAN, 2006).

Todas estas características ecológicas trazem vantagens a estas espécies na sua ação como biocontrolador, pois, as tornam hábeis a competir, colonizar e proteger importantes pontos de infecção do hospedeiro, como raízes, lesões e tecidos em senescência (HARMAN, 2000; KUBICEK et al, 2001). Como exemplo de sucesso no biocontrole de fungos fitopatogênicos pode-se citar: *Trichoderma virens* contra *Pythium ultimum* e *R. solani*, *T. harzianum* contra *Verticillium dahliae* (BENITEZ, 2004; ETHUR, 2001) e *Trichoderma spp*

contra *S. sclerotiorum*. A ação de *Trichoderma* spp. sobre *R. solani* pode ocorrer por parasitismo de hifas, escleródios e produção de antibióticos (MELLO, 1996). Além disso, Grosh et al. (2006), verificaram o parasitismo de isolados de *Trichoderma* sobre microescleródios de *R. solani* tendo como consequência a redução da severidade da doença em tubérculos de batata em condições de campo. Outra característica interessante destas espécies que as tornam interessantes como agentes de biocontrole é a capacidade de parasitar as estruturas de sobrevivência de fungos fitopatogênicos de solo (esporos, escleródios, clamidósporos) que persistem no solo por longos períodos (MELLO, 2000).

A utilização de *Trichoderma* spp. como biopesticidas e biofertilizantes representam cerca 60% do mercado biofungicida e tem proporcionado sucesso aos produtos comerciais que contêm esses antagonistas, devido ao grande volume de propágulos viáveis que podem ser produzidos rapidamente em substratos diversos a um baixo custo (HARMAN, 2000; LORITO et al, 2006; AGOSIN et al 1997, MUKHERJEE, 2010). Os formulados a base de *Trichoderma* sp. que são conservados como esporos, podem ser administrados em formulações líquidas, granular ou pó, ou podem ser armazenados por meses sem perder sua eficácia (JIN et al, 1991). Diferentes preparações de *Trichoderma* são comercializadas e utilizadas para proteger ou aumentar a produtividade de culturas de relevância econômica no Brasil e outros países. No entanto, apesar de disponíveis estes produtos biológicos nem sempre apresentam a qualidade adequada, o que colabora com as dificuldades de sua produção e aplicação em larga escala (MORANDI & BETTIOL 2009; MELO, 1996).

Com o intuito de organizar a cadeia produtiva de produtos de biocontrole no Brasil, inclusive dos formulados com *Trichoderma* spp., foi criada em 2007 a Associação Brasileira de Empresas de Controle Biológico (ABCBio), que tem atuado na defesa dos interesses do setor frente aos órgãos governamentais, na divulgação da técnica e ampliação do mercado, além de criar normas para os testes de controle de qualidade dos produtos, fornecendo desta forma segurança ao consumidor final dos mesmos (POMELLA & RIBEIRO, 2009, MORANDI & BETTIOL, 2009). Segundo Monte (2001), citado por Ozbay & Newman (2004), produtos comerciais contendo linhagens de *T. harzianum* já estão no mercado ou esperando registro, como BioFungus (Bélgica) para uso contra *Sclerotinia*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Pythium Fusarium*, *Verticillium*. - Binab-T (Suécia), a base de *T. harzianum*, para controle de doenças de raiz; RootShield (conhecido também como Bio-Trek T-22G e formulado a base de *T. harzianum*) (Estados Unidos) para uso no controle de *Pythium* spp., *R. solani*, *Fusarium* spp (PAULITZ & BELANGER, 2001) no exterior, entre outros. Segundo

Silva & Melo (2007), está à disposição, no mercado brasileiro, produtos a base de *Trichoderma* spp como Binat T®, Biotrich®, Trichonat EF® e Trichonat PM®, Trichodermil®, Trichodel® e Tricovab® e dentre estes, até o momento, apenas o produto Trichodermil® foi registrado pra o controle de *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani* na cultura do feijão; com solicitações de várias empresas sendo analisadas pelos órgãos competentes para registro (MORANDI & BETTIOL 2009). No Brasil o registro de produtos de biocontrole enfrenta dificuldades devido ao alto custo para o registro e o fato de a legislação utilizada ser a mesma para os agrotóxicos, sendo, portanto, um fator limitante para a evolução do mercado de bioprodutos no país (POMELLA & RIBEIRO, 2009). No entanto, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) já demonstrou a intenção em facilitar este processo, segundo o depoimento do coordenador-geral de Agrotóxicos do Departamento de Fiscalização de Insumos Agrícolas do Mapa (DFIA/SDA), Luís Rangel, que afirmou: “a intenção é tornar o registro dos agentes biológicos mais rápido do que o de agrotóxicos químicos”

1.4 Mecanismos de ação de espécies de *Trichoderma*

1.4.1 O micoparasitismo

O micoparasitismo é o mecanismo de biocontrole mais estudado e é descrito como o principal processo envolvido na ação antagônica de *Trichoderma* spp contra fungos fitopatogênicos (PUNJA e UTKHEDE, 2003). Através deste processo o micoparasita parasita as hifas e estruturas de reprodução de seus hospedeiros. Este mecanismo é um processo complexo e seqüencial que envolve o reconhecimento do hospedeiro e estabelecimento do contato micoparasita/hospedeiro. Uma vez estabelecido o contato o micoparasita invade a hifa hospedeira nutrindo-se do conteúdo intracelular, bem como, dos polímeros constituintes da parede celular (ALMEIDA et al., 2007). O contato micoparasita/hospedeiro é mediado por lectinas presentes na parede celular do fungo hospedeiro e esta interação desencadeia a ativação de uma cascata de transdução de sinal mediada por uma proteína G estimulatória e a enzima adenilil ciclase. O aumento intracelular do mensageiro secundário adenosina monofosfato cíclico (AMPc) leva ao rearranjo do citoesqueleto nas hifas do antagonista que enrolam sobre as hifas hospedeiras formando estruturas semelhantes a ganchos, apressórios que favorecem a sua penetração (OMERO et al., 1999; SILVA, 1997; MELO,1998).

Alguns trabalhos demonstraram que esta mesma via de sinalização leva ao aumento da expressão de genes que codificam hidrolases de parede celular fúngica, as quitinases, β -1,3-glucanases e proteases e que a ação destas enzimas facilita a penetração da hifa hospedeira, bem como são responsáveis pela maior atividade antagônica do fungo micoparasita (ELAD E KAPAT 1999; FLORES et al. 1997; POZO et al. 2004; SUÁREZ et al. 2004; VITERBO et al. 2004 e SUÁREZ et al. 2007). O papel destas enzimas no micoparasitismo é bastante estudado, estando disponíveis na literatura várias publicações referentes a sua caracterização e análises de controle de expressão (NORONHA & ULHOA, 1996; LIMA et al., 1997; NORONHA & ULHOA, 2000; OLMEDO-MONFIL et al., 2002, VITERBO et al., 2002; SANZ et al., 2005; MARCO and FELIX, 2007). Benhamou e Chet (1993) descreveram a atuação de *Trichoderma* spp. iniciando por uma desorganização na estrutura da parede celular do fitopatógeno com um subsequente desequilíbrio osmótico interno levando à retração da membrana plasmática e agregação no citoplasma. Em outro trabalho de Benhamou e Chet (1996) houve uma retração e agregação do citoplasma e quebra dos vacúolos do fitopatógeno quando se observou a interação entre *Trichoderma* spp. e *S. rofsii*.

1.4.2 Antibiose

É um processo que ocorre por interações envolvendo compostos difusíveis ou antibióticos produzidos por cepas de *Trichoderma* sp que inibem o crescimento de outros microorganismos (BENITEZ, 2004). Entre esses metabólitos estão o ácido harziânico, alamectinas, tricolin, viridina, gliovirina. Em alguns casos a produção de antibióticos correlaciona com a atividade de biocontrole, como descrito em Benitez, 2004 que cita trabalhos sobre o efeito sinérgico entre endoquitinases e o antibiótico gliotoxina de *T. harzianum* na germinação de conídios de *Botrytis cinerea* e a atuação da cepa mutante 2413, com altos níveis de enzimas extracelulares e α -pirona no controle *in vitro* de *R. solani* e *B. cinerea*. A combinação entre antibióticos e várias classes de enzimas hidrolíticas mostrou sinergismo no controle de *B. cinerea* e *F. oxysporum*, porém, este sinergismo foi reduzido quando as enzimas foram adicionadas depois dos antibióticos, indicando que a degradação da parede celular contribui para a sua ação. Para algumas espécies de *Trichoderma* na interação com *Fusarium moniliforme* e *Aspergillus flavus*, o antagonismo não requer o contato íntimo entre hifas do micoparasita e hospedeiro não sendo observado o contato ou penetração na hifa hospedeira, sugerindo importante papel de metabólitos secundários na atividade antifúngica (VERMA et al, 2007).

1.5 Indução de resposta de defesa

Algumas espécies de *Trichoderma* quando em íntima associação com plantas hospedeiras podem desencadear a resposta de defesa e, desta forma, induzir resistência na planta hospedeira a subseqüentes infecções fúngicas (DJONOVIC et al., 2006). A resposta de defesa em parte se deve à produção de proteínas denominadas proteínas-PR, sendo que destas os membros dos grupos PR-2 e PR-3 já foram identificados (GOODAY 1990; SELITRENNIKOFF, 2001). Embora estas proteínas estejam envolvidas na defesa de plantas, elas não apresentam necessariamente atividade antimicrobiana (VAN LOON, 1998). Yedidia et al. (1999), demonstraram que fungos do gênero *Trichoderma* induzem também a expressão de outras proteínas e compostos de defesa em plantas hospedeiras, como as peroxidases, compostos fenólicos e substâncias que aumentam a resistência mecânica da célula hospedeira. Desta forma, podem inibir ou restringir a invasão de tecidos vegetais pelo patógeno.

Entre as proteínas-PR já descritas, encontram-se as hidrolases β -1,3-glucanases e quitinases, que têm sido relatadas principalmente como inibidoras de crescimento fúngico (VAN LOON & VAN STRIEN, 1999). As quitinases são encontradas em níveis baixos em plantas saudáveis, porém, sua expressão é aumentada na presença de patógenos. A sua produção induz a resposta de defesa em plantas, incluindo a síntese de fitoalexinas antifúngicas (GOODAY 1990). Estas enzimas quando ao seu modo de ação podem ser classificadas em: endoquitinases (Endo-N-acetilglicosaminidase) e exoquitinases (N-acetilhexosaminidases), e atuam de forma conjunta na degradação do substrato (SHORESH, 2010; SELITRENNIKOFF, 2001). As quitinases também podem ser divididas em classes, as da classe I são básicas e contêm um domínio N-terminal rico em cisteína que provavelmente participa na ligação à quitina e um domínio C-terminal altamente conservado. A classe II inclui enzimas ácidas, secretadas no espaço extracelular que não apresentam o domínio rico em cisteína. A classe III distingue-se por apresentar atividade antibacteriana, atuando como a lisozima, e ser considerada como marcador da resposta de resistência sistêmica adquirida (SAR) (SELITRENNIKOFF, 2001).

As β -1,3-glucanases são encontradas em bactérias, fungos e plantas, e conforme seu modo de ação podem ser classificadas em: a exo- β -1,3-glucanases e endo- β -1,3-glucanases, que atuam de forma sinérgica na degradação do substrato (COHEN-KUPIEC et al. 1999; Marco & Felix 2007). Estas enzimas pertencem à família PR-2 (PR-proteínas) e são agrupadas em três classes distintas, baseando-se na suas seqüências de aminoácidos. A classe I, encontrada no vacúolo da célula vegetal, especialmente em células da epiderme das folhas inferiores e nas raízes de plantas saudáveis, já as classes II e III, incluem as proteínas ácidas

extracelulares (SELITRENNIKOFF, 2001). Segundo Vantini (2008) as PR-2 são amplamente distribuídas em plantas superiores e são induzidas durante a resposta de hipersensibilidade da planta a patógenos, que podem ter seu crescimento inibido por essas enzimas através da degradação de suas paredes celulares.

1.6 Caracterização molecular de fungos do gênero *Trichoderma*

O desenvolvimento de técnicas moleculares que possibilitam a diferenciação genética de espécies de fungos utilizando marcadores moleculares vem sendo aplicadas para os estudos na taxonomia do gênero *Trichoderma* (SIDDIQUEE, 2007). Um marcador molecular amplamente utilizado na identificação de espécies de fungos é a sequência do DNA ribossomal (rDNA). Esta sequência é encontrada no genoma de fungos de forma repetitiva constituindo um grupo de genes composto pelo rDNA 18S, o rDNA 5,8S e o rDNA 28S e duas sequências espaçadoras internas denominadas ITS1 e ITS2 que flanqueiam o gene 5,8S. As unidades de rDNA estão separadas por um espaço intergênico (IGS). No genoma de fungos haplóides, genes do rDNA nuclear são organizados em unidades repetidas em “tandem” e estão presentes em 60 a 200 cópias.

A região 18S do rDNA é altamente conservada o que a torna útil pra a comparação de organismos. A região 28S é utilizada para comparar gêneros por ser um pouco mais variável. Devido a esta alta conservação de 18S e 28S, “primers” universais foram desenhados para permitirem a amplificação destas sequências, que posteriormente podem ser comparadas para verificar proximidade entre fungos ainda não identificados (WHITE et al, 1990; HIBBETT, 1992; BERTHIER et al, 1996; FUNGARO, 2000; ABD-ELSALAM et al, 2003 e OTERO et al, 2004). Estes “primers” possibilitam a amplificação das regiões ITS1, o 5,8S e o ITS2.

Estas sequências apesar de muito utilizadas na taxonomia de fungos, não pode ser a única utilizada para espécies muito próximas, sendo necessário, portanto, o uso de outros marcadores como as sequências do fator de alongação EF-1, da quitinase (chit42), da protease (pbr1), da calmodulina, da actina, e da subunidade II da RNA polimerase (DRUZHININA et al., 2006).

Nos trabalhos de Druzhinina et al (apud SIDDIQUEE, 2007) e de Kubiceck et. al. (apud SIDDIQUEE, 2007) estas técnicas foram utilizadas na identificação de isolados de *Trichoderma*. Esta mesma técnica foi utilizada por Rosa (2003) para caracterizar molecularmente 10 isolados de *Phytophthora* sp obtidos de plantas de pimentão, utilizando os

“primers” ITS4 e ITS5. Menezes (2010) utilizou sequência do ITS1 e ITS2 para caracterização de três isolados de *Trichoderma* spp utilizados para o biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp *chrysanthemi*. Este mesmo tipo de abordagem, mas utilizando “primers” específicos foram utilizados para identificar espécies de fungos do gênero *Fusarium* isolados de mudas de algodão egípcio. Por serem específicos estes “primers” foram validados para fins de detecção molecular seletiva de espécies de *Fusarium* fitopatogênicos (ABD-ELSALAM, 2003).

1.7 Os fungicidas químicos

Os fungicidas químicos apesar de eficazes têm ocasionado problemas relacionados à aquisição de resistência e contaminações ambientais, e desta maneira alternativas devem ser buscadas, como por exemplo, a utilização de microrganismos biocontroladores. No entanto, não é possível fazer a substituição completa do tratamento químico, a estratégia mais promissora é a combinação de agentes de biocontrole e fungicidas químicos. Esta estratégia permitiria a redução das doses dos fungicidas e, conseqüentemente, diminuiria os impactos negativos sobre o ambiente e a seleção de patógenos resistentes. No caso da utilização combinada do antagonista com fungicidas químicos, o agente de biocontrole deve ser resistente ao químico para que sua ação antagônica não seja comprometida. Uma vantagem na utilização de um antagonista resistente é seu efeito mais duradouro no ambiente, quando comparado com o efeito efêmero de um fungicida (MELO, 1991).

Agentes de biocontrole com resistência a fungicidas podem ser obtidos por seleção direta de fungos com atividade antagônica mesmo quando cultivados na presença de fungicidas ou pelo desenvolvimento de linhagens transgênicas utilizando genes que conferem esta característica. Desta forma, visando o controle integrado (fungicidas químicos e agentes de biocontrole), vários estudos têm sido realizados no sentido de desenvolver novos biótipos de *Trichoderma* spp. resistentes a fungicidas mais comumente aplicados nas lavouras brasileiras (CASSIOLATO, 1995; MELO & SILVA, 1991). Ainda são poucos os trabalhos realizados a fim de detectar, em agentes de biocontrole, resistência a fungicidas, para seu uso no controle integrado de doenças (CASSIOLATO et al., 1996; SILVA, 1997). Silva (1999) ressalta a importância do uso de antagonistas com resistência a fungicidas, bem como o uso de *Trichoderma* spp com biótipos selecionados para serem utilizados em combinação com fungicidas, destacando a tolerância deste antagonista aos fungicidas captan, iprodione, etheridiazole, PCNB e thiran.

Gliocladium virens e *Trichoderma* sp têm sido estudados com biocontroladores de doenças de fungos fitopatogênicos. *G. virens* é um eficiente agente de controle da doença mofo branco causada por *Sclerotium rofsii* em feijão. No entanto, este não pode ser utilizado concomitantemente ao fungicida “Benomyl” por não ter resistência natural a este fungicida. O “benomyl” atua ligando-se à tubulina-j nas células fúngicas, impedindo a polimerização dos microtúbulos (MISCHKE, 1990). A resistência pode ser conferida por mutações nos genes de P-tubulina.

Deising (2008) mostrou que a ocorrência de resistência a fungicidas é uma das questões mais importantes na agricultura moderna e que os mecanismos que conferem esta resistência podem ser por resistência quantitativa e/ou resistência qualitativa (Figura 5A). A resistência qualitativa ocorre por mutações em genes que codificam a proteína alvo, no aminoácido ou grupo de aminoácidos necessários para a ligação ao fungicida. A aplicação constante de fungicidas pode levar ao desaparecimento do tipo selvagem do fungo e o aumento da população dos mutantes resistentes ao fungicida. A resistência quantitativa (Figura 5B) pode ser devido a vários mecanismos como a baixa concentração intracelular de fungicidas através da síntese de transportadores de efluxo que bombeiam as moléculas de fungicida para o espaço extracelular, assim como por modificações da membrana plasmática levando à redução da permeabilidade ao fungicida ou por síntese de enzimas que degradam as moléculas de fungicidas.

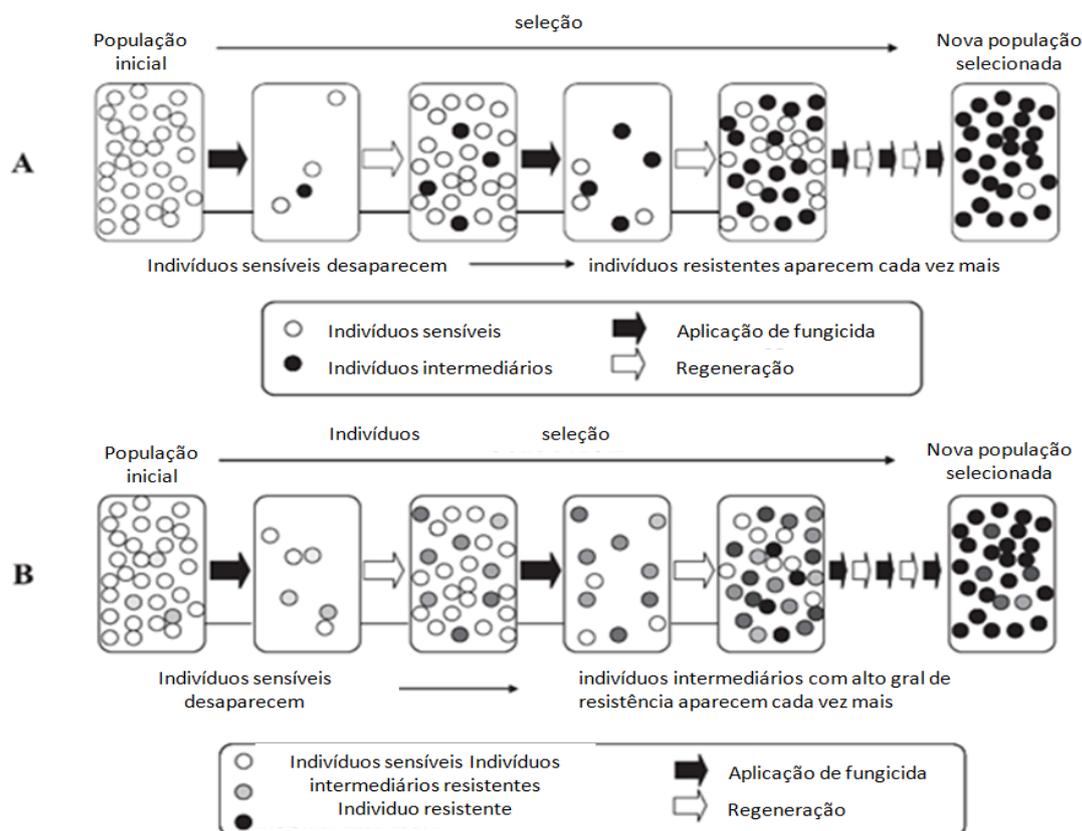


Figura 5. Desenvolvimento de resistência a fungicida. Resistência qualitativa (Fig. A) e resistência quantitativa (B). <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s1517-83822008000200017&script=sci_arttext#fig01>. Ilustração modificada.

Em fungos, os sistemas de efluxo evoluíram para conferir resistência natural contra substâncias tóxicas, como por exemplo, as fitoalexinas formadas por plantas como resposta ao ataque de patógenos. Duas famílias de transportadores de efluxo, localizados na membrana plasmática, são conhecidas por serem envolvidas na secreção de substâncias tóxicas: “ATP-Binding Cassete” (ABC, por apresentarem um módulo conservado na ligação ao ATP), e transportadores “Major Facilitator Superfamily” (MFS). O fenômeno de “Multidrug Resistance” (MDR) é baseado na existência de mecanismos de fluxo ativo mediado por proteínas transportadoras específicas. Além disso, existe um sistema de compartimentalização ativa que resulta na diminuição da concentração dessas drogas tóxicas no citossol (DEISING et al., 2008; Del Sorbo et al., 2000).

Os próprios fitopatógenos também podem ser utilizados no estudo de mecanismos de resistência a fungicidas químicos, pois a aplicação continuada destes químicos nas culturas acaba levando à seleção de patógenos resistentes. Como o observado para os, benzimidazóis, lançados no mercado como inibidores de um único sitio (fungicidas monoespecíficos) no final dos anos 1970 e meados dos anos 1990, que após dois anos de uso intensivo levou ao

desenvolvimento e seleção de formas resistentes dos fungos *Venturia inaequalis* e *Botrytis cinerea* da cultura de maçã (DEISING et al., 2008).

Silva (1999) destaca ainda outros mecanismos dessa resistência como modificação no sítio de ação, resultando em menor afinidade com o fungicida; desvio do sítio bloqueado por uma operação alternativa, redução da absorção ou acúmulo de fungicida e que dentre esses mecanismos os fungos filamentosos podem adquirir resistência aos benzimidazóis pela alteração estrutural da β -tubulina, componente do heterodímero tubulina dos microtúbulos, pois os benzimidazóis agem diretamente sobre eles.

Silva et al. (1999) testaram *Trichoderma* sp. quanto a sensibilidade aos fungicidas benomil e iprodione e mostraram que os dois fungicidas adicionados em meio de cultura, apresentaram efeito negativo sobre o crescimento micelial dos isolados de *T. harzianum* e *T. viride*. Medeiros et al. (2006) avaliaram os efeitos do composto sintético Tiazolidina-2,4-diona no desenvolvimento “in vitro” de um isolado de *Trichoderma* sp, mostrando que os dois podem ser aplicados concomitantemente no controle de *Monosporascus cannonballus* pois, nenhuma das concentrações utilizadas alterou o desenvolvimento micelial de *Trichoderma* sp. ELAD et al. (1995) com a utilização de diversas estratégias de aplicações entre fungicidas e *T. harzianum*, no controle do mofo-cinzento causado por *Botrytis cinerea* em tomateiro, observaram que quando se aplicava *T. harzianum* T39 isoladamente, a doença era reduzida em 31% a 82%, porém, em metade dos casos, a redução não era significativa quando comparada com o resultado alcançado por fungicidas químicos, mas concluíram que aplicações alternadas dos produtos químicos reduzidos pela metade e biológicos foram mais eficientes no controle da doença do que aplicações sucessivas de um único tratamento.

A indução de resistência a fungicidas em *Trichoderma* spp. e a conseqüente seleção de biótipos estáveis para serem utilizados em combinação com fungicidas é uma opção para se obter um esquema de controle efetivo que envolve pesquisas biológicas e químicas no controle integrado de um ou mais fitopatógenos. Conídios e micélio de isolados resistentes podem ser utilizados em conjunto com fungicidas para tratamento de sementes, pulverizações foliares ou aplicações no solo (PAPAVIZAS, 1985).

Neste trabalho, os fungicidas Frowncide 500 SC (Fluazinam) e Sumilex (Procimidona), aplicados em lavoura de feijoeiro para o controle do fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum*, foram adicionados ao meio de cultura utilizado no cultivo dos isolados de *Trichoderma* obtidos de amostras de solos do Cerrado e de lavouras da Região de Unaí, Minas Gerais. Como alguns destes isolados foram obtidos de amostras de solo que passaram

por aplicações anuais destes fungicidas, com aproximadamente vinte e seis anos para amostras da fazenda Palmeiras (SP) e nove anos para amostras da fazenda Terra Nova (STN), este experimento foi realizado visando avaliar se estes isolados apresentam resistência a estes fungicidas e, portanto, podem ser utilizados em processos de controle integrado ou como fonte de genes para o desenvolvimento de biótipos mais ativos contra os fitopatógenos e resistentes aos fungicidas.

2 JUSTIFICATIVA

Considerando o potencial de aplicação biotecnológica de microrganismos de solo do Cerrado ainda pouco explorado, assim como, o problema presente na região de Unaí e Bonfinópolis, Minas Gerais, com os fungos fitopatógenos *S. sclerotiorum*, *F. solani*, *F. oxysporum* e *R. solani*. É nosso interesse neste trabalho, isolar microrganismos da rizosfera do feijoeiro e do solo de cerrado nativo desta região, com o intuito de encontrar novos agentes de biocontrole contra estes patógenos ou indutores de defesa em plantas hospedeiras. Podendo, desta forma, contribuir para o desenvolvimento de novos produtos comerciais com alto potencial biotecnológico. No futuro, o controle biológico de fungos ou bactérias fitopatogênicos será de grande importância para uma agricultura mais sustentável.

3 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é isolar fungos potenciais agentes de biocontrole com ação contra *S. sclerotiorum*, *F. solani*, *F. oxysporum* e *R. solani* de amostras de solo rizosférico de lavoura de feijão e de solo de Cerrado coletadas na Fazenda Palmeiras em Unaí e na Fazenda Terra Nova, Bonfinópolis, Minas Gerais. Os fungos isolados serão avaliados quanto à inibição do crescimento dos principais fitopatógenos desta cultura e identificados utilizando técnicas morfológicas e moleculares. Além disto, será avaliada a resposta de feijoeiro (*P. vulgaris*) à presença do agente de biocontrole com maior atividade inibitória.

2.2. Objetivos específicos

- Isolar fungos da rizosfera de feijoeiro em área de cultura e de solo de Cerrado da região de Unaí-MG;
- Avaliar a atividade inibitória dos fungos isolados contra os fungos fitopatogênicos *F. oxysporum*, *F. solani*, *S. sclerotiorum* e *R. solani*;

- Identificar por técnicas morfológicas e moleculares os fungos que apresentarem maior atividade antifúngica;
- Avaliar a resposta de *P. vulgaris* na presença do agente de biocontrole de maior atividade inibitória, determinando tamanho da raiz principal, área foliar e tamanho da planta;
- Quantificar a atividade de enzimas relacionadas à defesa (β -1,3-glucanases) e a produção de compostos fenólicos, de feijoeiro na presença do agente de biocontrole com maior atividade inibitória.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das amostras de solo

As amostras de solo para isolamento dos fungos foram obtidas na Fazenda Palmeiras e Desbarrancado, localizada na região de Unaí, Minas Gerais, (S-16°29'761" W-047°13'924" – Elevação 988m) e na fazenda Terra Nova (S16°25'475" W-045°25'606" – Elevação 931m), localizada na região de Bonfinópolis, Minas Gerais com uma distância de cerca de 180 Km entre elas. O solo da região é caracterizado como latossolo vermelho argiloso. Na primeira fazenda as coletas foram realizadas em uma área com 26 anos de cultivo, que possui maior incidência de doenças fúngicas. Na segunda fazenda a coleta foi realizada em uma área com nove anos de cultivo e ainda menos infestada que a primeira.

Em ambas as regiões foram selecionados dois diferentes pontos para coleta: um em cultura de feijão e um em Cerrado nativo. Na cultura de feijão foram realizadas amostragens de solo na rizosfera do feijoeiro e a 10 cm desta. Para o Cerrado foi selecionada uma área de mata fechada, provida de serapilheira. O procedimento da coleta foi seguido de acordo com Mello e Azevedo (1998) que consistiu em delimitar uma área ao redor das plantas e abaixo do estrato herbáceo (cerrado) e de forma asséptica, remover o solo aderido as raízes a uma distância de, aproximadamente 1 cm da raiz, e transferir cuidadosamente para um recipiente estéril. Foram coletadas nove amostras na primeira área, sendo quatro do cerrado nativo (duas de serapilheira), e as restantes coletadas aleatoriamente na lavoura de feijão, designadas por SP (solo palmeiras), SRP (serapilheira) e SCE (solo cerrado) e três amostras da segunda área designadas por STN (solo terra nova).

4.2 Processamento das amostras de solo

O preparo das amostras de solo para o isolamento dos fungos foi realizado conforme procedimento descrito por Mello e Azevedo, 1998. Após a coleta, o solo foi peneirado (10g) e transferido para frascos cônicos autoclavados. A estes foram adicionados 90 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0, em seguida os frascos foram submetidos a agitação de 140rpm por 60 minutos. Posteriormente, as amostras foram agitadas vigorosamente em vortex (Phoenix, AP56) por 30 a 60 segundos. Duas alíquotas de cada uma das amostras foram transferidas para dois microtubos e armazenadas a -80°C em glicerol a 20% (v/v). Em seguida estas alíquotas foram diluídas (diluições de 10 a 1000 vezes). Estas amostras foram em seguida plaqueadas em meio Czapeck visando o isolamento dos fungos.

4.3 Isolamento de fungos da rizosfera

4.3.1 Isolamento de fungos

Para o cultivo e isolamento de fungos, da rizosfera e do solo do Cerrado, foi utilizado o meio de cultura Czapeck-ágar (Mello e Azevedo, 2000) (g.L^{-1} : 30g de sacarose, 2g de NaNO_3 , 1g de K_2HPO_4 , 0,5g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5g de KCl, 0,01g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e ágar 2% (m/v) contendo o antibiótico tetraciclina na concentração final de 0,5% (m/v). Das amostras resultantes da última diluição, 250 μL e 500 μL foram transferidos para placas de Petri contendo o meio de cultura, em triplicata, seguindo todas as condições assépticas. As placas foram incubadas a 28°C e após 7 dias, as colônias emergentes de fungos foram utilizadas para novo inóculo em meio Czapeck, utilizando palitos estéreis para a transferência de placas. Este procedimento foi repetido até a obtenção de culturas puras dos fungos provenientes das amostras de solo.

4.4 Obtenção dos fungos fitopatogênicos

Os fungos fitopatogênicos isolados de feijoeiros doentes foram obtidos das coleções de fungos do Laboratório de Enzimologia das Universidades Federal de Brasília (UnB) e Universidade Federal de Goiás (UFG). Assim como, do centro de pesquisa em Arroz e Feijão da Embrapa, gentilmente cedidas pelo Dr. Murilo Lobo Júnior.

4.5 Extração de DNA

Os fungos que apresentaram características morfológicas semelhantes à de espécies de *Trichoderma* (micélio de cor esverdeada) num total de 27 isolados foram cultivados em meio de cultura líquida para obtenção de massa micelial. Uma alíquota da suspensão de esporos (1×10^7 esporos/mL) recuperada de culturas em meio de cultura BDA (100g de batata, 10g de glicose, 20g de ágar) dos isolados de interesse foi inoculada em 50 mL de meio de cultura TLE (g. L^{-1} : 3g de glicose, 0,3g de uréia, 1g de bactotripton, 2g de KH_2PO_4 , 0,3g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,4g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3g de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 1mL de elementos traços) suplementado com 0,5% (m/v) de glicose. Após 48 horas de cultivo a 28°C e 120 rpm, as culturas foram filtradas e os micélios lavados com água destilada até retirar completamente o

meio de cultura, em seguida transferidos para microtubos esterilizados e utilizados na extração de DNA conforme método descrito por Silva, 2008.

Para tanto, a massa micelial resultante em torno de 0,5 g foi congelada com nitrogênio líquido e macerada até a sua completa pulverização, ressuspensa em 700µl de tampão de extração (2,0% (m/v) de CTAB, 2,0g; 1,4M de NaCl, 8,12g; 20mM de EDTA, 4ml de um estoque a 0,5M; 100mM de Tris-HCl pH 8,0, 10ml de um estoque a 1M) contendo 0,2% (v/v) de β-mercaptoetanol, homogeneizada e incubada a 65°C por 1 hora. Esta mistura foi gentilmente agitada a cada 20 minutos. Em seguida os microtubos foram retirados do banho maria e a estes foram acrescentados 600 µl da solução clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram agitados manualmente, por inversão por 5 minutos, até a homogeneização da amostra e centrifugados a 15000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e a estes foram adicionados 400µl de isopropanol gelado. Os tubos foram agitados gentilmente por inversão e centrifugados a 10000 rpm por 5 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com 1ml de etanol 70% gelado e 1ml de etanol absoluto (100%). O DNA precipitado foi, então, ressuspensa em 100 µl de tampão TE (10mM de Tris-HCl pH8,0, 10ml de uma solução estoque a 1M; 1mM de EDTA, 2ml de uma solução estoque a 0,5M e água q.s.p.) contendo 10 µl/ml de RNase e incubado a 37°C por 2 horas. O DNA extraído foi em seguida analisado em gel de agarose a 1% (m/v) para verificar a qualidade da preparação e realizar a sua quantificação.

4.6 Atividade antifúngica

Para a análise da atividade antifúngica foram utilizados os fungos inicialmente identificados como espécies de *Trichoderma* baseando-se em suas características morfológicas (micélio esverdeado).

4.6.1 Avaliação da produção de metabólitos não voláteis dos isolados de *Trichoderma*

Para avaliar a atividade de inibição do crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos *R. solani*, *F. oxysporum*, *F. solani* e *S. sclerotiorum* foi utilizado o procedimento descrito por Gibbs (1967) , citado por Mariano (1993). Discos de cultura de diâmetro de 0,8 cm de culturas dos isolados de *Trichoderma* em meio sólido BDA, foram recortadas destas e inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA recoberto com uma lâmina de papel celofane. Após 48 horas de crescimento a 28° C, o papel celofane

contendo o micélio de *Trichoderma* foi retirado e amostras de diâmetro de 0,8 cm contendo o micélio dos fungos fitopatogênicos foram inoculadas neste meio. Como controles foram utilizados as culturas dos fungos fitopatogênicos cultivados sem o crescimento prévio dos isolados de *Trichoderma*. As culturas foram incubadas a 28° C por 96 horas. Após este tempo foram medidos os diâmetros de crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos, utilizando-se o programa ImageJ. Este experimento foi realizado em triplicata para cada um dos isolados, e os valores de crescimento foram utilizados na determinação da taxa de inibição, calculada de acordo com a seguinte equação: $(\text{crescimento da colônia controle} - \text{crescimento da colônia do fitopatógeno}) / \text{crescimento do controle} \times 100$. Estes dados foram analisados quanto à variância e as médias dos diâmetros médios das colônias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade utilizando-se o programa ASSISTAT 7,5 beta 2010 (<http://www.assistat.com>).

4.6.2 Avaliação da atividade antagônica

A verificação “*in vitro*” da atividade antagônica dos isolados de *Trichoderma* contra os fungos fitopatogênicos foi realizada em placas de Petri, através de testes de pareamento de culturas que consistiu no confronto direto do antagonista e dos fungos fitopatogênicos (MARIANO, 1993). Para tanto, foram inoculados discos de culturas dos fungos (0,8 cm de diâmetro) em meio de cultura BDA, cada placa de Petri recebeu dois discos, em lados opostos da placa, com uma distância de 3 centímetros entre eles, sendo um do isolado de *Trichoderma* a ser avaliado e outro do fitopatógeno. Para o controle procedeu-se da mesma forma, porém utilizando-se um disco contendo apenas meio de cultura BDA no lugar do fitopatógeno. As culturas foram incubadas a 28°C e após 96 horas, a atividade antagônica dos isolados foi avaliada pela determinação da área de crescimento dos isolados de *Trichoderma* e dos fungos fitopatogênicos, utilizando-se o programa ImageJ. O percentual de inibição foi calculado de acordo com a seguinte equação: $\text{porcentagem de inibição} = [(\text{crescimento do controle} - \text{crescimento do tratamento}) / \text{crescimento do controle}] \times 100$, conforme descrito por MENTEN et al. (1976). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 3 repetições. Na análise estatística dos resultados obtidos, empregou-se o Teste de Tukey a 5% de probabilidade com limite de confiança de 95%, utilizando-se o programa ASSISTAT 7.5 beta 2010, Silva (2006).

4.7 Classificação molecular dos fungos

4.7.1 Amplificação da região ITS

A identificação molecular dos fungos foi realizada com base na sequência ITS1 e ITS2 e do rDNA 5,8S. O DNA extraído para cada um dos fungos foi utilizado como molde em uma reação de amplificação contendo os oligonucleotídeos SR6R: 5' – AAGTAGAAGTCGTAACAAGG– 3', para a amplificação da região ITS1 e LR1: 5' – GGTTGGTTTCTTTTCCT– 3' para amplificação da região ITS2. Esta foi realizada no volume final de 15 µl contendo 1,5µl do tampão da Taq polimerase (Invitrogen®); 0,45µl de MgCl (50mM); 0,6µl de dNTP (2,5mM); 0,75µl de BSA (10x); 0,6µl do primer SR6R (10mM); 0,6µl do primer LR1 (10mM); 0,15µl Taq polimerase (1U/50µl); 2µl DNA (5ng/µl); 8,35µl H2O miliQ para completar o volume final da reação. Seguindo o seguinte protocolo de amplificação: 94°C por 1 min para desnaturação inicial seguidos por 40 ciclos de: 92°C por 1 min para desnaturação; 50°C por 1 min e 40 seg para anelamento; 72°C por 1 min e 40 seg de extensão; 72°C por 7 min de extensão final. A reação de amplificação foi analisada em gel de agarose a 1%, as amostras que apresentaram o fragmento de amplificação de 600pb foram precipitadas e sequenciadas.

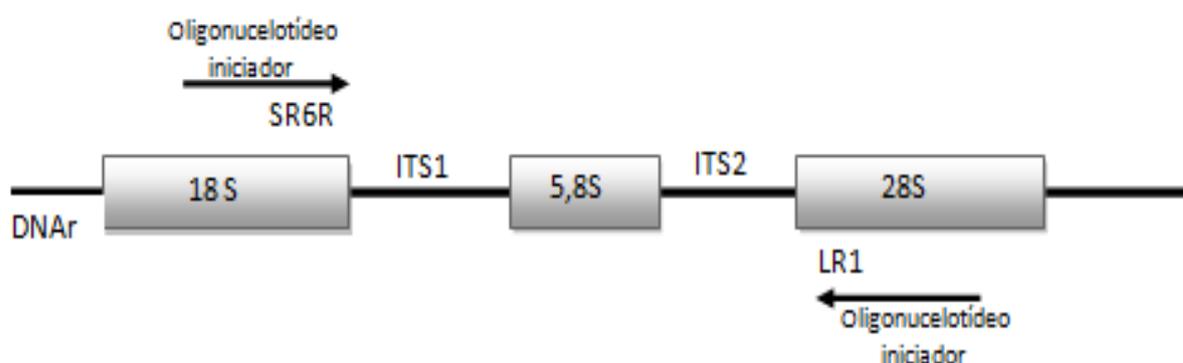


Figura 6. Esquema do complexo gênico nuclear de DNA ribossomal, que contém os genes das subunidades do rDNA 18S, 28S e 5.8S, além dos espaços internos transcritos (ITS1 e ITS2). As setas indicam a posição dos iniciadores (*primers*) usados nas reações de PCR.

4.8 Sequenciamento e análise das sequências

O sequenciamento das amostras foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília utilizando o seqüenciador MegaBace 1000 DNA Analysis System e o kit DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit (MegaBACE™), da GE Healthcare Lifescience, seguindo protocolo padrão da plataforma de sequenciamento. As seqüências com qualidade foram comparadas na busca por identidades com seqüências de DNA depositadas em bancos de dados utilizando-se o programa TrichoBLAST (<http://www.isth.info/>) e o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.8.1 Análise da diversidade por RAPD

A análise de diversidade dos isolados selecionados foi realizada utilizando os “primers”: OPX7 (5'-GAGCGAGGCT) e o OPX3 (5' TGGCGCAGTG 3'), seguindo o protocolo descrito por Williams et al. (1990). Para a reação foram utilizados: 2,5 µL de tampão *Taq* polimerase; 7,5 mM de MgCl₂ (solução estoque 10mM); 2,5µL de dNTPs (solução estoque 2,5 mM); 2,5µL de “primer” (solução estoque 2,5mM); 3µL de DNA genômico a 5ng e; 0,2µL de 1U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®) em um volume final de 25µL. A reação de amplificação foi realizada conforme a descrição a seguir: 92°C por 5 minutos, seguido de 39 ciclos a 92°C por 40 segundos, 40°C por 1 minuto e 30 segundos, 72°C por 2 minutos, e um ciclo a 72°C por 5 min., utilizando o o termociclador (Bio Cycler). Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose a 1,5% (m/v). A análise do padrão de bandas para cada uma das reações foi realizada utilizando o programa MVSP (Multi-Variate Statistical Package).

4.9 Cultivo de plantas e bioensaios para estudos de interação

Sementes de feijão comum (*P. vulgaris*), cultivar pérola, foram esterilizadas de acordo com Marra et al., 2006 (1min em solução de hipoclorito 1% e lavadas com água estéril), e em seguida, germinadas em solo estéril a temperatura ambiente, em casa de vegetação adequadas para crescimento de plantas. Inicialmente, foram dois grupos de plantas, (i) plantas obtidas a partir de sementes não tratadas com os isolados obtidos após as análises anteriormente citadas e (ii) plantas obtidas a partir de sementes tratadas com 1×10^7 esporos. mL⁻¹ dos isolados utilizados, em tratamentos independentes. Foram cultivadas 15 plantas para cada tratamento.

Após 21 dias de crescimento plantas correspondentes a cada um dos tratamentos foram coletadas, as folhas e raízes destas plantas foram utilizadas para a determinação da área foliar, tamanho da raiz e tamanho da planta e imediatamente foram reunidas formando amostras compostas (Folhas de 15 plantas e raízes de 15 plantas submetidas ao mesmo tratamento), congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C, até sua utilização. Estas amostras compostas foram utilizadas na quantificação de atividades enzimas de defesa. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância através do Teste de Tukey no nível de significância de 5% de probabilidade.

4.10 Quantificação da atividade das enzimas de defesa

As amostras compostas de folhas e raízes de feijoeiro (5g) foram maceradas com nitrogênio líquido até sua completa pulverização. Este material foi ressuspenso em tampão adequado conforme procedimento descrito em Segarra et al. (2007) e Djonovic et al. (2006). Para a determinação da concentração de proteínas totais e quantificação da atividade enzimática, 5 gramas do macerado de raízes e folhas foram homogeneizados em 3 mL de água destilada contendo 1mM de PMSF. A suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante dialisado e posteriormente utilizado como fonte de proteínas. A concentração de proteínas foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando BSA como padrão. A atividade quitinolítica foi determinada, baseada na quantificação colorimétrica de *p*-nitrofenol liberado a partir do substrato sintético *p*-nitrofenil- β -D-*N,N*9-diacetilquitobiose, como descrito por Yedidia e colaboradores, 1999. Para tanto, 250 μ L do extrato das amostras foi incubado com 10 μ L de uma solução estoque do substrato sintético (2 mg. mL⁻¹) e 250 μ L de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5.0 por 2 horas em banho-maria a 37°C. A reação foi interrompida com 0,5 mL de carbonato de sódio 0,2M, e a absorbância determinada a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de PNP por minuto de reação por grama de tecido.

Para os testes “in vitro” de cultivo na presença de fungicidas foram utilizados os seguintes químicos aplicados em cultura de feijoeiro:

4.11 Interferência dos fungicidas no crescimento de isolados de *Trichoderma* spp.

O efeito de fungicidas sobre os 27 isolados de *Trichoderma* spp. foi avaliado pelo crescimento dos isolados na presença dos fungicidas seguindo o protocolo modificado de Caldari Junior (1998). A adição dos dois fungicidas foi feita no meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) depois de autoclavado, de modo que a concentração final foi estabelecida considerando o volume de meio utilizado. Foram utilizados três tratamentos com três repetições, sendo três concentrações para cada fungicida, uma com a dose máxima recomendada pelo fabricante, outra com a metade da mesma dose e a terceira com o dobro desta dose, mais o controle correspondendo ao cultivo apenas com o *Trichoderma* spp.. Discos de BDA contendo colônias dos isolados de *Trichoderma* foram inoculadas no centro da placa onde foi vertido o meio BDA contendo o fungicida. As placas foram mantidas a

28°C durante sete dias quando foi feita a avaliação do crescimento medindo-se a área ocupada pelas colônias. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ($P < 0,05$) para comparação das médias.

Nome comercial	Frowncide 500 SC
Nome químico	3-chloro-N-(3-chloro-5-trifluoromethyl-2-pyridyl)- α,α,α – trifluoro-2,6-dinitro-p-toluidine
Composição	FLUAZINAM.....500 g/L (50% m/v) Outros Ingredientes.....755 g/L (75,5% m/v)
Classe	Fungicida – Acaricida de contato do grupo químico fenilpiridinilamina
Formulação	Suspensão concentrada
Concentração	500g de fluazinam/L
Classe toxicológica	II – altamente tóxico
Dose recomendada	1,0 a 1,5 L/ 1000 a 1500L
Registro no ministério da agricultura	7695

Caracterização do produto Frowncide 500 SC - www.seab.pr.gov.br/.../FROWNCIDE_500_SC.pdf

Nome comercial	Sumilex 500 WP
Nome químico	[N-(3,5-dichlorophenil)-1,2- dimethylcyclopropane-1,2-dicarboximide
Composição	Procymidone 500 g/kg
Classe	Fungicida
Formulação	Pó molhável
Concentração	500 g/kg
Classe toxicológica	II – altamente tóxico
Dose recomendada	1,0 a 1,5 kg/ há
Registro no ministério da agricultura	4094

Caracterização do produto Sumilex 500WP

www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/.../SUMILEX_500_PM.pdf

5 RESULTADOS

Isolamento

Foram obtidas a partir das amostras de solos das áreas de cultivo e cerrado preservado, colônias de fungos e actinobactérias com morfologias distintas (Figura 7). Os isolados com características de crescimento e morfológicas semelhantes a fungos do gênero *Trichoderma*, totalizando 27 prováveis isolados deste gênero, foram coletadas destas culturas e transferidas para novas placas até a obtenção de colônias puras (Figura 8).



Figura 7. Pacas de meio de cultura seletivo mostrando colônias microbianas provenientes de amostras de solos de áreas cultivadas e cerrado nativo obtidas na triagem inicial. Brasília – DF. 2010.



Figura 8. Placas contendo 3 dos isolados selecionados com características morfológicas semelhantes as de espécies de *Trichoderma*. Brasília – DF. 2010.

Atividade antifúngica

Avaliação da atividade antagônica

A atividade antagônica dos isolados de *Trichoderma* foi avaliada através do método de pareamento de culturas (Figura 9) contra os fungos fitopatogênicos *R. solani*, *F. oxysporum*,

S. sclerotiorum e *F. solani*. As áreas de crescimento do fungo micoparasita e inibição dos crescimentos dos fitopatógenos foram medidas 7 dias após o inóculo dos fungos.

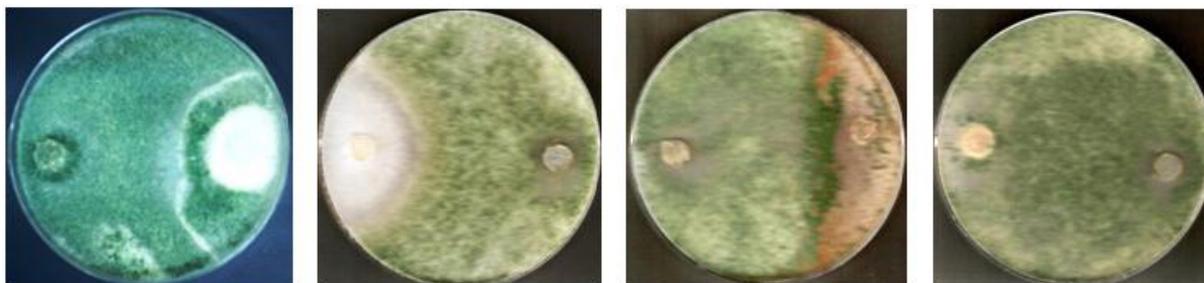


Figura 9. Representação do teste de avaliação da atividade antifúngica dos isolados de *Trichoderma* utilizando o teste de pareamento de culturas. Nesta figura é mostrado o isolado STN2AA no teste contra os fungos fitopatogênicos *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*, respectivamente. Brasília – DF. 2010.

Nos testes de pareamento de culturas (atividade antagônica) foi observado, pelo apresentado na tabela 1 uma variação de 38% a 98 %, na porcentagem de inibição do crescimento micelial de *R. solani*. Pelos dados desta tabela, verificou-se que os isolados que mais se destacaram com relação ao percentual de inibição, com valores estatisticamente significativos, foram STN2AC (98,42%), SRP22 (87,52%), este não diferindo apenas de SP4BA (75,21%) e SRP2G (67,69%). Ao se comparar todos os isolados testados com o controle, verificou-se alteração na taxa de crescimento do fungo hospedeiro *R. solani* na presença de todos os isolados.

Com relação ao fungo fitopatogênico *F. solani*, neste teste, as taxas de inibição variaram de 62,9% (SRP2-1) a valores em torno de 84% para os isolados SCE2E, SRP22, STN1AA e STN2A2, que apresentaram valores de inibição significativamente diferentes e superiores ($p < 0,05$) aos obtidos para o controle e SP4BA, SRP2-1, STN1AC, STN1AD, STN2A1, STN2BA e STN2BB (Tabela 1).

O fitopatógeno *F.oxysporum*, apresentou no teste de pareamento de culturas, o menor percentual de inibição foi detectado para o isolado STN2BA (69%), para os demais foram detectados percentuais em torno de 80% sem diferença estatisticamente significativa entre eles, mas, com diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle (Tabela 1).

Para o fitopatógeno *S.sclerotiorum*, o menor valor de percentual de inibição foi detectado para o isolado SRP2A (55%) e os valores mais significativos de 88%, 87%, 86% e 85%, para STN2BB, STN1AA/STN1AD, SP4BC/STN2BA e SRP22/STN2A2, respectivamente. Não foram detectadas diferenças significativas entre os valores de inibição

destes isolados, no entanto, todos apresentaram diferença significativa na taxa de inibição do fungo hospedeiro ($p < 0,05$), quando comparados ao controle (Tabela 1).

Tabela 1. Crescimento e percentual de inibição do crescimento micelial de *R. solani*, *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum* e *F. solani* em teste de antagonismo dos isolados de *Trichoderma* spp. Brasília-DF. 2010.

Isolados	Crescimento micelial (cm ²)				Inibição do crescimento micelial (%)			
	<i>R. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>F. solani</i>	<i>R. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>F. solani</i>
Controle	55,246 a	34,647 a	5,326 a	42,35200 a				
SCE2A	21,210 bcd	6,137 cde	1,585 bcdefg	8,431 de	61,607	82,29	70,24	80,09
SCE2B	15,832 defghi	5,932 cde	1,560 cdefgh	8,696 de	71,343	82,88	70,22	79,47
SCE2C	20,629 bcde	7,755 bcde	1,640 bcde	8,671 de	62,659	77,62	69,20	79,53
SCE2E	14,075 fghi	5,563 de	1,506 cdefghij	6,710 e	74,524	83,94	71,72	84,16
SCE22	17,849 cdefgh	6,333 cde	1,529 cdefghi	9,917 cde	67,692	81,72	71,30	76,58
SP4BA	11,830 ij	7,658 bcde	0,811 ghim	10,494 cd	78,587	77,90	84,78	75,22
SP4BC	13,696 ghi	8,160 bcde	0,716 m	9,906 cde	75,209	76,45	86,56	76,61
SRP2A	23,468 bc	8,728 bcd	2,382 b	9,685 cde	40,430	74,81	55,28	77,13
SRP2B	24,361 b	4,701 e	1,817 bc	7,870 de	55,904	86,43	65,89	81,42
SRP2D	23,157 bc	5,998 cde	1,504 cdefghij	7,770 de	58,083	82,69	71,76	81,65
SRP2E	16,389 defghi	7,634 bcde	0,833 fghim	8,427 de	70,334	77,97	84,35	80,10
SRP2F	20,811 bcde	8,082 bcde	1,444 cdefghil	9,799 cde	62,331	76,67	72,89	76,86
SRP2G	12,410 hij	7,367 bcde	0,858 efghim	7,451 de	77,536	78,74	83,90	82,41
SRP2I	21,297 bcd	7,390 bcde	1,628 bcdef	9,056 de	61,450	78,67	69,43	78,62
SRP2-1	19,747 bcdef	5,975 cde	1,502 cdefghij	15,683 b	66,130	82,76	71,80	62,97
SRP22	6,893 j	8,073 bcde	0,774 him	6,781 e	87,524	76,70	85,47	83,99
STN1AA	11,473 ij	7,399 bcde	0,693 m	6,556 e	79,233	78,65	86,99	84,52
STN1AB	16,400 defghi	7,824 bcde	1,701 bcd	7,211 de	70,314	77,42	68,07	82,97
STN1AC	15,196 efghi	5,090 de	1,965 bc	10,537 cd	72,495	85,31	63,11	75,12
STN1AD	16,397 defghi	7,667 bcde	0,704 m	10,333 cd	38,85	77,87	86,78	75,60
STN2A1	20,294 bcde	5,731 de	1,501 cdefghij	10,562 cd	63,266	83,46	71,82	75,06
STN2A2	17,902 cdefgh	7,273 bcde	0,790 ghim	6,618 e	67,595	79,01	85,16	84,37
STN2AA	15,234 efghi	9,675 bc	0,903 defghim	9,458 de	72,426	72,08	83,05	77,67
STN2AB	19,135 bcdefg	5,978 cde	1,208 cdefghim	8,178 de	65,363	82,75	77,33	80,69
STN2AC	0,875 l	9,758 bc	0,775 him	9,811 cde	98,416	71,84	85,44	76,83
STN2BA	12,067 hij	10,667 b	0,723 im	13,000 bc	67,190	69,21	86,43	69,30
STN2BB	12,567 hij	8,667 bcd	0,627 m	14,667 b	65,990	74,99	88,23	65,37
CV%	10,407	14,616	18,128	10,135				

Médias de tres repetições.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

5.1.1.1 Avaliação da produção de metabólitos não voláteis

Os valores dos percentuais de inibição do crescimento de *F. oxysporum* pelos isolados de *Trichoderma* spp. variaram de valores de 0,09% (SCE2C e SCE22) a 91,57% (STN2AB) (Tabela 2). O isolado STN2AB e o grupo composto por SP4BC/SCE2E/SP4BA/STN2AA/STN2BA apresentaram as maiores taxas de inibição, 91,57% e 30,67%, respectivamente (Figura 12 e Tabela 2).

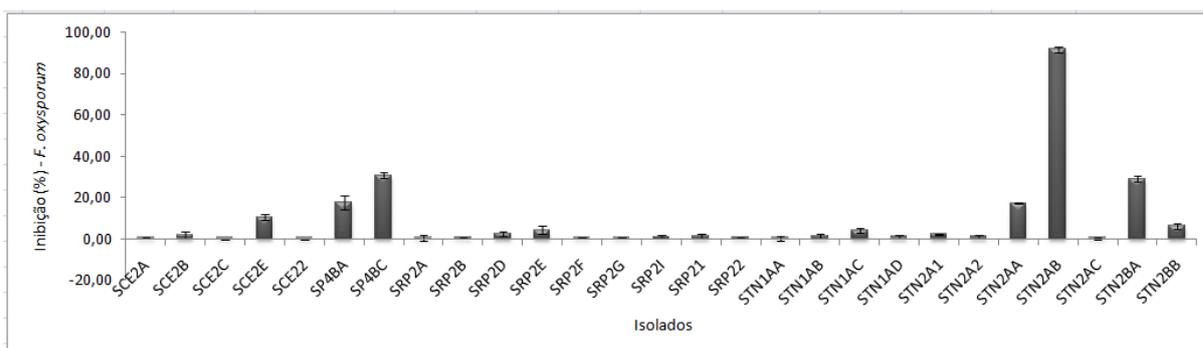


Figura 10. Avaliação da inibição do crescimento do fungo *F. oxysporum* pelos 27 isolados de *Trichoderma* spp utilizando o teste de antibiose. Brasília – DF. 2010.

Os valores dos percentuais de inibição do crescimento de *R. solani* pelos isolados de *Trichoderma* spp. variaram de valores de 0,14% (SRP2F) a 92,37% (SRP2B) (Figura 11 e Tabela 2). Os isolados SRP2B, STN2AC e STN2BA apresentaram as maiores taxas de inibição 92,37%, 33,68% e 43,42% sendo que, o valor de inibição de STN2AC não apresentou diferença estatisticamente significativa dos obtidos pelo isolado STN2AB.

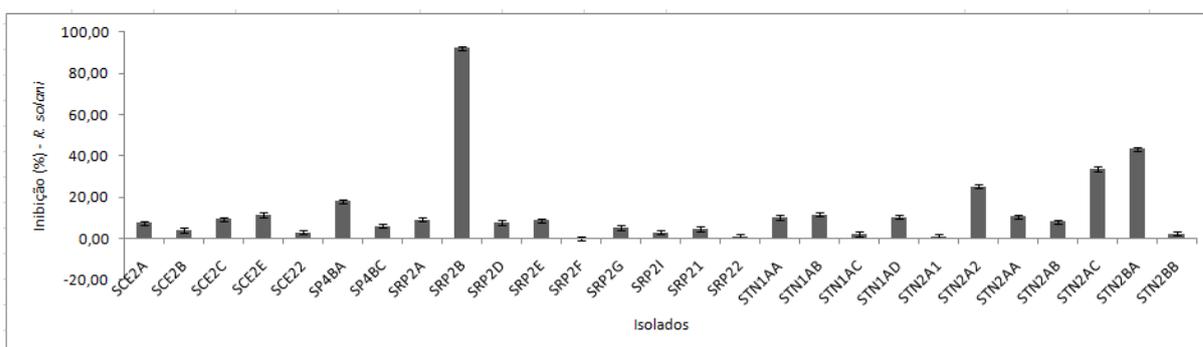


Figura 11. Avaliação da inibição do crescimento do fungo *R. solani* pelos 27 isolados de *Trichoderma* spp utilizando o teste de antibiose. Brasília – DF. 2010.

Os valores dos percentuais de inibição do crescimento de *F. solani* pelos isolados de *Trichoderma* spp variaram de valores de 2,30% (STN2A2) a 95,51% (STN2BA) (Figura 12 e Tabela 2). Os isolados STN2BA, STN2A1, SRP2E, SRP2G, STN2BB e SP4BC apresentaram as maiores taxas de inibição 95,51%, 69,92%, 64,15%, 58,96%, 58,28% e 45,71% sendo que,

o valor de inibição de STN2BB apresentou diferença estatisticamente significativa dos obtidos apenas pelos isolados SRP2E e STN2BA.

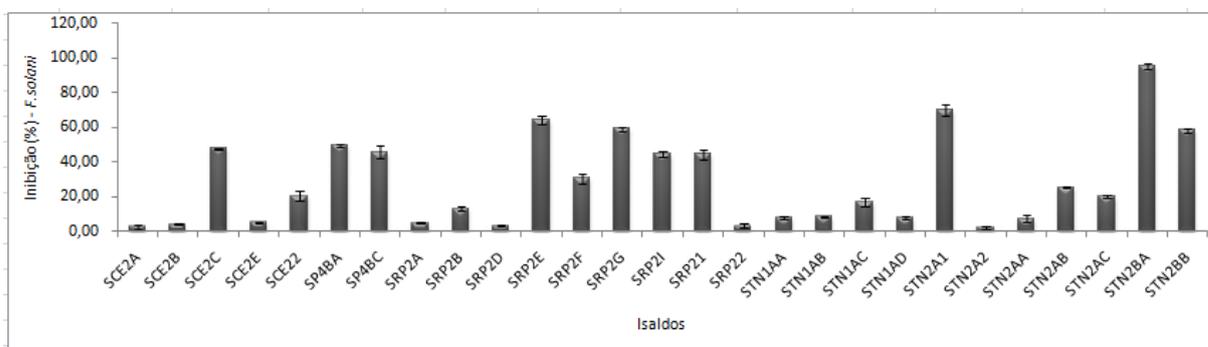


Figura 12. Avaliação da inibição do crescimento do fungo *F. solani* pelos 27 isolados de *Trichoderma* spp utilizando o teste de antibiose. Brasília – DF. 2010.

Os valores dos percentuais de inibição do crescimento de *S. sclerotiorum* pelos isolados de *Trichoderma* spp. variaram de valores de 12,72% (SRP2E) a 85,12% (SRP2F) (Figura 13 e Tabela 2). Os isolados SCE2A, SCE2C, SCE2E, SCE22 e SRP2F apresentaram as maiores taxas de inibição 84,99%, 80,03%, 84,38%, 84,89% e 85,12%, com valores de inibição estatisticamente diferentes do obtido pelo controle.

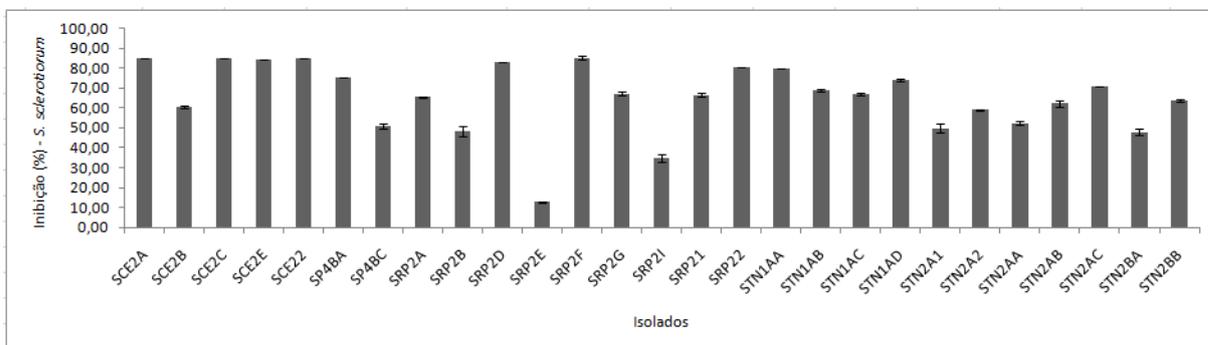


Figura 13. Avaliação da inibição do crescimento do fungo *S. sclerotiorum* pelos 27 isolados de *Trichoderma* spp utilizando o teste de antibiose. Brasília – DF. 2010.

Tabela 2. Crescimento e porcentagem de inibição do crescimento micelial de *R. solani*, *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum* e *F. solani* em teste de antibiose dos isolados de *Trichoderma* spp. Brasília-DF. 2010.

Isolados	Crescimento micelial (cm ²)				Inibição (%)			
	<i>R.solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	F. solani	<i>R.solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	F. solani
Controle	13,742 a	25,302 a	5,772 a	50,220 a				
SCE2A	12,708 ab	25,187 a	0,867 b	48,927 a	7,53	0,46	84,99	2,57
SCE2B	13,188 a	24,841 a	2,277 ab	48,330 a	4,03	1,82	60,56	3,76
SCE2C	12,435 ab	25,280 a	0,864 b	26,365 efg	9,51	0,09	80,03	47,50
SCE2E	12,169 ab	22,667 abc	0,901 b	47,624 a	11,45	10,42	84,38	5,17
SCE22	13,321 a	25,280 a	0,872 b	39,982 abcde	3,07	0,09	84,89	20,39
SP4BA	11,260 ab	20,820 abc	1,420 ab	25,340 efg	18,06	17,72	75,40	49,54
SP4BC	12,908 ab	17,541 c	2,840 ab	27,263 defg	6,07	30,67	50,80	45,71
SRP2A	12,487 ab	25,140 a	1,997 ab	47,792 a	9,14	0,64	65,40	4,83
SRP2B	1,049 c	25,120 a	2,995 ab	43,717 abcde	92,37	0,72	48,11	12,95
SRP2D	12,682 ab	24,651 a	2,202 ab	48,635 a	7,71	2,57	61,85	3,16
SRP2E	12,533 ab	24,229 ab	5,038 ab	18,004 gh	8,80	4,24	12,72	64,15
SRP2F	13,722 a	25,160 a	0,859 b	35,009 abcdefg	0,14	0,56	85,12	30,29
SRP2G	13,015 a	25,147 a	1,903 ab	20,610 fgh	5,29	0,61	67,03	58,96
SRP2I	13,321 a	25,035 a	3,768 ab	27,836 cdefg	3,06	1,06	34,71	44,57
SRP21	13,102 a	24,959 a	1,940 ab	28,443 bcdefg	4,66	1,36	66,39	44,51
SRP22	13,572 a	25,077 a	3,477 ab	48,771 a	1,24	0,89	39,79	3,00
STN1AA	12,339 ab	25,226 a	2,738 ab	48,166 a	10,20	0,3	52,53	7,75
STN1AB	12,143 ab	24,950 a	1,786 ab	46,232 abcd	11,64	1,39	69,06	8,37
STN1AC	13,438 a	24,299 ab	1,915 ab	43,451 abcde	2,21	3,96	66,82	16,93
STN1AD	12,303 ab	25,017 a	1,499 ab	48,279 a	10,47	1,13	74,04	7,66
STN2A1	13,595 a	24,713 a	2,907 ab	33,066 abcdefg	1,07	2,33	49,64	69,92
STN2A2	10,269 ab	25,000 a	2,371 ab	49,119 a	25,27	1,19	58,92	2,30
STN2AA	12,264 ab	20,913 ab	2,751 ab	47,025 ab	10,76	17,35	52,34	7,31
STN2AB	12,606 ab	2,133 d	2,184 ab	37,997 abcdef	8,27	91,57	62,16	25,13
STN2AC	9,114 ab	25,224 a	1,688 ab	46,601 abc	33,68	0,31	70,76	20,1
STN2BA	7,775 b	17,937 bc	3,005 ab	2,250 h	43,42	29,11	47,94	95,51
STN2BB	13,427 a	23,717 abc	2,096 ab	38,209 abcdef	2,29	6,26	63,69	58,28
CV%	13,508	8,906	62,435	15,657				

Médias de tres repetições.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

Sequenciamento e análise das sequências

O sequenciamento foi realizado com todas as amostras, porém, foram utilizados apenas os isolados que apresentaram um número em torno de 500 bases nitrogenadas para efetuar o “Blast”. Dos que puderam ser sequenciados, SRP2F e STN2A1, STN1AA, SRP2E, SRP21, STN1AB, SRP2G, STN1AD, STN1AC e SCE2B e SCE2G; confirmaram a hipótese inicial de serem fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma*.

Análise da diversidade por RAPD

Na figura 15 é mostrado o dendrograma da análise de diversidade por “RAPD” utilizando os “primers” randômicos (OPX7 5'-GAGCGAGGCT e OPX3 5' TGGCGCAGTG 3'), utilizando o método UPGMA e o coeficiente de *Jaccard* do programa MVSP. Esta análise foi realizada para os isolados que apresentaram valores mais significativos de inibição dos crescimentos dos fungos fitopatogênicos *S.sclerotiorum*, *F. solani*, *F. oxysporum* e *R. solani*. Os isolados foram separados em dois ramos principais, um representado apenas pelo isolado STN2AB e outro que agrupa os demais isolados (10). Este ramo apresenta uma subdivisão sendo observados subgrupos, com uma variação de similaridade de 44% a 100%. A maior similaridade genética encontrada foi entre SP4BC e SCE2C, com 100%. A segunda maior similaridade foi encontrada entre STN2AC com o grupo SP4BC e SCE2C com 88%. Vale ressaltar que nesta análise o isolado STN2AB não apresentou nenhuma similaridade com os demais isolados (Figura 16).

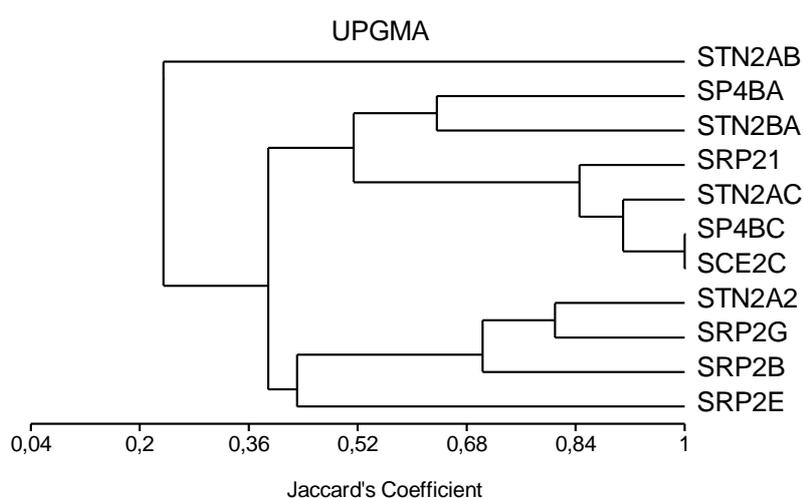


Figura 14. Dendrograma gerado pelo método de análise UPGMA utilizando o coeficiente de *Jaccard*, a partir das 20 bandas polimórficas geradas pelo RAPD, dos 11 isolados de *Trichoderma* sp. Primers utilizados na determinação da distância genética: OPX3 e OPX7.

Cultivo de plantas e bioensaios para estudos de interação

Na tabela 3 são apresentados os resultados da avaliação de alterações no padrão de crescimento de feijoeiro comum quando cultivados na presença dos isolados de *Trichoderma* spp. Observa-se que as plantas cultivadas na presença dos isolados: SP4BC, SRP21, SRP2G e STN2A2 apresentaram aumento no tamanho da raiz. Sendo que este mesmo resultado foi observado para os isolados SRP21 e STN2BA com relação ao tamanho da haste e para os isolados SP4BC, STN2AB, STN2AC STN2BA com relação às áreas foliares. Os valores de comprimento do caule, raiz, e áreas foliares para os cultivos na presença dos isolados de *Trichoderma* diferiram significativamente dos obtidos para as plantas controle, ainda que entre si não apresentem diferença significativa.

Tabela 3. Medidas de área foliar (cm²), comprimento de raízes (cm) e comprimento de haste (cm) de feijoeiro comum cultivado na ausência ou presença de isolados de *Trichoderma* spp. DF. 2010.

Isolados	Raiz (cm)	Caule (cm)	Folha (cm ²)
Controle	14,40 b	11,60 c	5,47 b
SCE2C	16,10 ab	13,40 bc	7,85 ab
SP4BA	16,87 ab	15,47 ab	8,75 a
SP4BC	19,07 a	16,13 ab	9,43 a
SRP21	19,47 a	17,07 ab	8,84 a
SRP2B	15,53 ab	13,53 bc	6,72 ab
SRP2E	14,00 b	14,17 abc	6,72 ab
SRP2G	19,63 a	15,73 ab	6,85 ab
STN2A2	19,33 a	15,60 ab	8,39 ab
STN2AB	15,30 ab	15,53 ab	9,06 a
STN2AC	18,23 ab	15,87 ab	9,02 a
STN2BA	15,03 ab	17,67 a	9,04 a
CV%	15,76	8,34	13,42

Médias de cinco repetições.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

Quantificação da atividade da enzima de enzimas de defesa

Para avaliar alterações na resposta de defesa das plantas cultivadas na presença dos isolados de *Trichoderma* amostras de raízes e folhas foram utilizadas como fonte de proteínas em ensaios enzimáticos para quantificação da atividade de quitinases, β -1,3 glucanases e peroxidases. Apenas as plantas cultivadas na presença do isolado SRP2B apresentaram atividade de β -1,3 glucanase superiores aos obtidos para as plantas cultivadas na ausência dos isolados. Além disto, esta alteração foi observada apenas para amostras de raiz, (Figura 15)

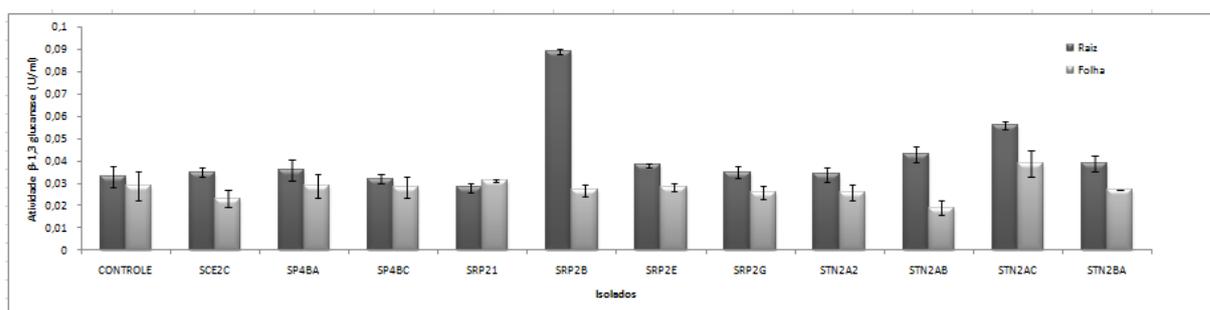


Figura 15. Atividade de β -1,3 glucanases de amostras de raízes e folhas de feijoeiro cultivado na presença ou ausência de isolados de *Trichoderma* spp. As plantas foram coletadas após 21 dias de cultivo (U/ml). Brasília - DF. 2010.

5.2 Teste de sensibilidade ao fungicida Sumilex 500WP

No teste de sensibilidade dos 27 isolados de *Trichoderma* spp na presença do fungicida Sumilex 500WP (Figura 16), observou-se que SRP2B, apresentou crescimento estatisticamente diferente da maioria dos isolados para a concentração de fungicida recomendada para utilização em lavouras, e igual ao da condição controle, e, portanto foi o isolado que demonstrou maior tolerância ao fungicida nesta concentração. Porém este resultado não foi confirmado quando utilizado o dobro da dose recomendada de fungicida, neste caso os isolados SCE2C e SCE2A apresentaram taxas mais significativas de crescimento, 43cm^2 e 42cm^2 , respectivamente, abaixo dos valores obtidos para o controle. Porém, mesmo apresentando inibição no crescimento os isolados cresceram na presença do fungicida com uma taxa de crescimento variando de $13,35$ a $53,35\text{ cm}^2$, para cada uma das concentrações testadas (Tabela 4).

Apesar de apresentar crescimento correspondente ao do controle na presença do fungicida, não foi observado para o isolado SRP2B esporulação abundante como detectada para o controle. Indicando que o metabolismo do isolado foi alterado pela presença do fungicida. É necessário, portanto avaliar se a presença do fungicida afeta a sua sobrevivência e a sua atividade antagônica. (Figura 17).

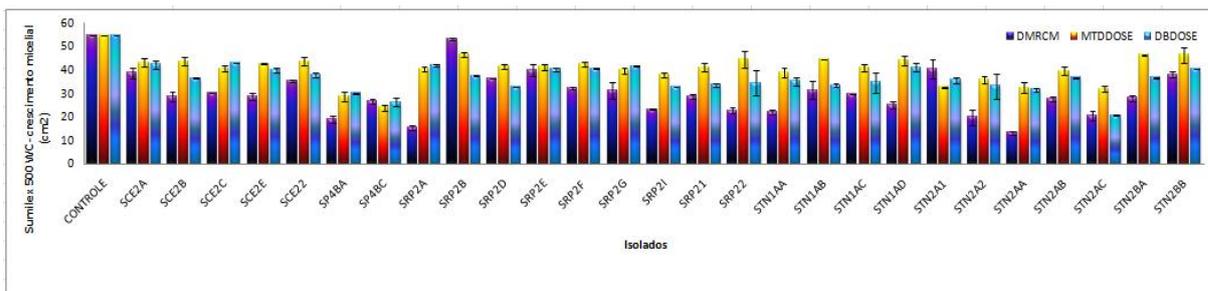


Figura 16. Resultado do teste de sensibilidade de Sumilex 500WP representando as três doses utilizadas. As barras representam o desvio padrão entre as triplicatas – DMRCM (dose máxima recomendada), MTDDOSE (metade da dose) e DBDOSE (dobro da dose). Brasília – DF – 2010.

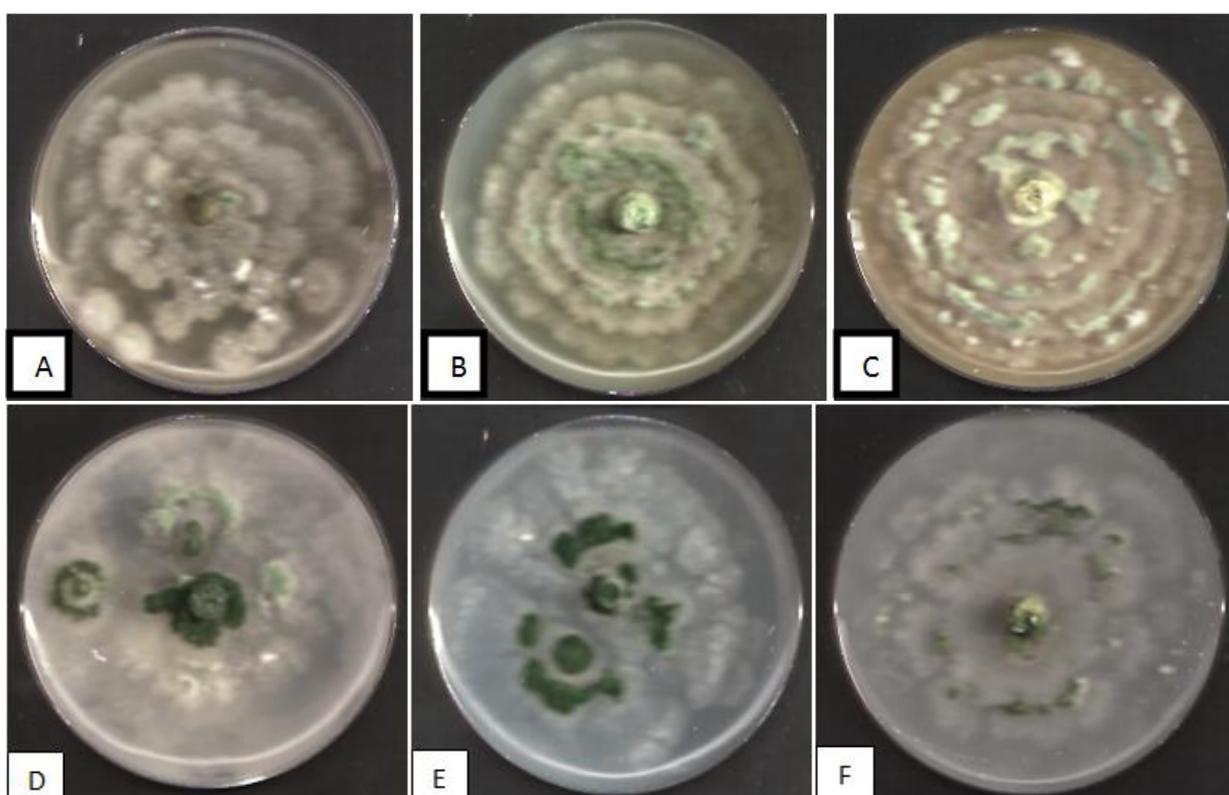


Figura 17. Crescimento micelial de *Trichoderma* spp. em presença do fungicida Sumilex 500 WP: A,D – dose máxima recomendada; B,E – metade da dose e C,F – dobro da dose. Trata-se do mesmo isolado nas três doses (A a C - SCE2A; D a F – SRP2B). Brasília – DF – 2010.

Tabela 4. Diâmetro (cm²) de colônias dos isolados de *Trichoderma* spp. em meio de cultura contendo fungicida Sumilex 500 WP - 1,5g/L¹; 0,75 g/L²; 3 g/L³. Brasília – DF. 2010.

Isolados	Dose/ fungicida/ Sumilex		
	Máxima recomendada	Metade	Dobro
Controle	55,092 a	55,092 a	55,092 a
SCE2A	38,899 bcd	43,179 bcd	42,393 ab
SCE2B	28,908 cdefghi	43,749 bcd	36,717 bc
SCE2C	30,212 cdefgh	40,801 bcdef	43,104 ab
SCE2E	28,847 cdefghi	42,724 bcd	39,981 abc
SCE22	35,402 cdef	43,866 bcd	38,022 bc
SP4BA	19,167 ghi	28,985 hi	30,134 bcd
SP4BC	26,689 cdefghi	24,015 i	26,404 cd
SRP2A	15,479 hi	40,528 bcdefg	42,223 ab
SRP2B	53,352 ab	46,689 ab	37,720 bc
SRP2D	36,497 cde	41,638 bcd	32,932 bcd
SRP2E	40,038 abc	41,366 bcd	40,355 abc
SRP2F	32,578 cdefg	42,674 bcd	40,708 abc
SRP2G	31,546 cdefg	39,863 bcdefg	41,787 abc
SRP2I	23,368 defghi	38,074 cdefg	33,003 bcd
SRP21	28,839 cdefghi	41,248 bcde	33,772 bcd
SRP22	22,829 efghi	44,639 bcd	34,598 bcd
STN1AA	22,396 efghi	39,131 bcdefg	35,268 bcd
STN1AB	31,593 cdefg	44,531 bcd	33,509 bcd
STN1AC	29,733 cdefgh	41,168 bcde	34,748 bcd
STN1AD	25,085 cdefghi	44,167 bcd	41,113 abc
STN2A1	40,638 abc	32,765 efgh	351887 bcd
STN2A2	19,925 fghi	36,201 defgh	33,245 bcd
STN2AA	13,347 i	32,557 fghi	31,648 bcd
STN2AB	27,667 cdefghi	39,754 bcdefg	36,859 bc
STN2AC	20,471 fghi	32,129 ghi	20,826 d
STN2BA	28,088 cdefghi	46,506 bc	36,763 bc
STN2BB	38,065 bcde	46,566 abc	40,573 abc
CV%	16,634	6,632	13,360

Médias de tres repetições.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

5.3 Teste de sensibilidade ao fungicida Frowncide 500SC

Nos testes de sensibilidade dos 27 isolados de *Trichoderma* spp ao fungicida “Frowncide” 500 SC, observa-se que a maioria dos isolados tem maior crescimento micelial quando submetidos ao dobro da dose recomendada do fungicida, principalmente STN2A1 que apresenta um crescimento bem superior ao da dose inicial como mostrado na figura 5, o que pode ser atribuído a uma resposta do próprio fungo quando submetido a este tipo de estresse. Na tabela 5 observa-se que todos diferem estatisticamente do controle, porém entre os isolados há pouca diferença significativa. Diferenças significativas de crescimento também foram observadas na comparação entre os dois fungicidas testados (Figuras 16 e 18) sendo

que a taxa de crescimento dos isolados na presença de “Frownicide” foi inferior às taxas observadas para o fungicida “Sumilex”. Esta resposta diferencial pode estar relacionada ao mecanismo de ação de cada um destes fungicidas e características da forma de aplicação, o primeiro é utilizado no tratamento de semente e o segundo de atuação curativa, aplicado durante o ataque do fitopatógeno.

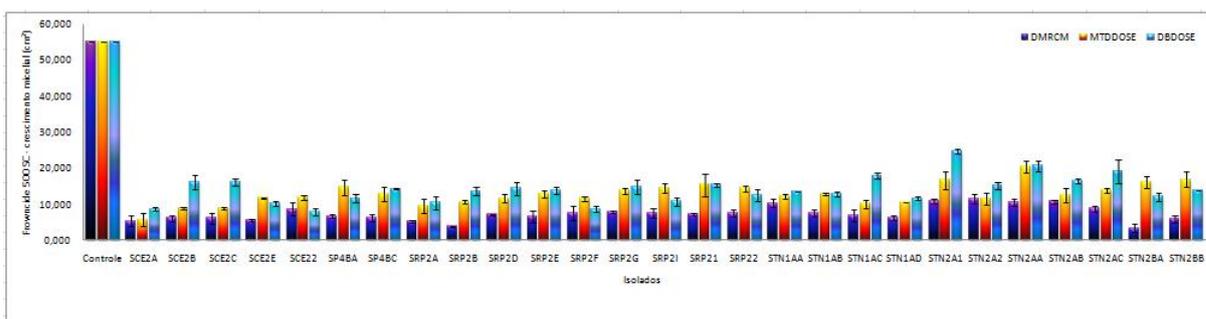


Figura 18. Resultado do teste de sensibilidade de Frownicide 500 SC representando as tres doses utilizadas. As barras representam o desvio padrão entre as triplicatas. – DMRCM (dose máxima recomendada), MTDDOSE (metade da dose) e DBDOSE (dobro da dose). Brasília – DF – 2010.

A figura 19 mostra o comportamento do crescimento micelial dos isolados podendo-se observar a redução significativa do crescimento do isolado. Assim como a produção de pigmento de coloração amarelada produzido em resposta ao estresse.

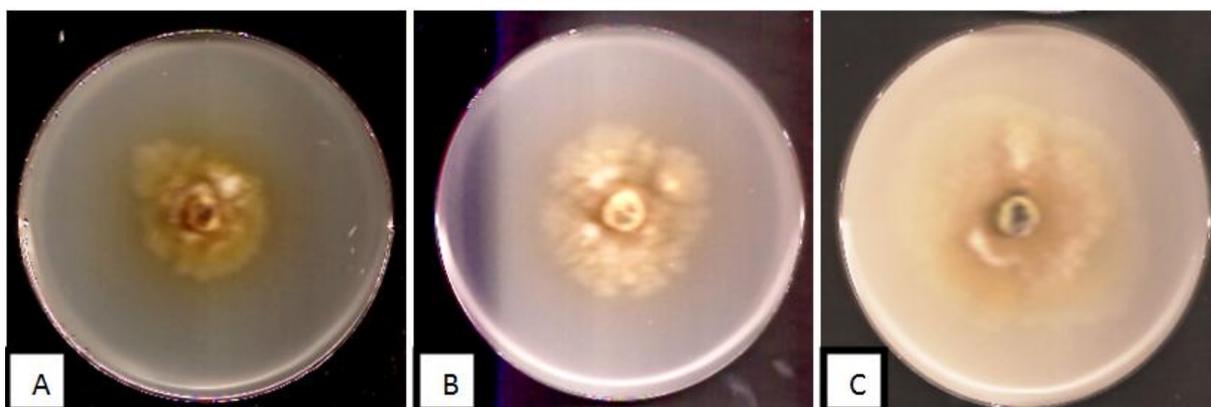


Figura 19. Crescimento micelial de *Trichoderma* spp. em presença do fungicida Sumilex 500 WP: A – dose máxima recomendada; B – metade da dose e C – dobro da dose. Trata-se do mesmo isolado nas tres doses (STN2A1). Brasília – DF – 2010.

Tabela 5. Diâmetro (cm²) de colônias dos isolados de *Trichoderma* spp. em meio de cultura contendo fungicida Frownicide 500 SC - 1,5g/L¹; 0,75 g/L²; 3 g/L³. Brasília – DF. 2010.

	Dosagem/Fungicida/Frownicide		
	Máxima Recomendada ¹	Metade ²	Dobro ³
CONTROLE	55,092 a	55,092 a	55,092 a
SCE2A	8,329 bcd	7,453 c	8,679 ef
SCE2B	6,198 bcd	8,932 c	16,041 bcdef
SCE2C	6,133 bcd	9,778 c	10,253 def
SCE2E	5,587 bcd	11,728 bc	9,612 ef
SCE22	8,660 bcd	11,801 bc	7,803 f
SP4BA	6,686 bcd	14,766 bc	11,581 cdef
SP4BC	6,291 bcd	12,908 bc	14,243 cdef
SRP2A	5,236 cd	9,629 c	10,492 def
SRP2B	3,804 d	10,654 bc	13,685 cdef
SRP2D	7,101 bcd	11,677 bc	14,460 cdef
SRP2E	6,677 bcd	12,842 bc	13,965 cdef
SCE2G	7,509 bcd	11,619 bc	8,665 ef
SRP2G	7,961 bcd	13,697 bc	14,822 cdef
SRP2I	7,600 bcd	14,604 bc	10,838 def
SRP21	7,135 bcd	15,351 bc	15,353 cdef
SRP22	7,575 bcd	14,431 bc	12,488 cdef
STN1AA	10,387 bc	12,265 bc	13,528 cdef
STN1AB	7,552 bcd	12,916 bc	12,798 cdef
STN1AC	6,971 bcd	10,169 c	17,580 bcde
STN1AD	6,151 bcd	10,496 bc	11,640 cdef
STN2A1	10,909 bc	16,698 bc	24,793 b
STN2A2	11,460 b	11,525 bc	15,208 cdef
STN2AA	10,561 bc	20,456 b	20,706 bc
STN2AB	10,753 bc	12,547 bc	16,492 bcdef
STN2AC	8,792 bcd	13,839 bc	19,234 bcd
STN2BA	3,399 d	16,262 bc	12,074 cdef
STN2BB	5,992 bcd	16,936 bc	13,948 cdef
CV%	21,0042	22,0276	19,3158

Médias de tres repetições.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

6 DISCUSSÃO

Comparando-se os percentuais de inibição obtidos para os isolados de *Trichoderma* spp. nos testes de pareamento de culturas observou-se comportamentos diferenciados com relação aos valores de inibição e fungo fitopatogênico hospedeiro. Estas atividades variaram entre as maiores taxas de 98,42% para *R. solani* (tabela 1) e de 86,43% para *F. oxysporum* (tabela 1), 88,23% para *S. sclerotiorum* (tabela 1) e de 84,37% para *F. solani* (tabela 1). Além disto, os maiores valores de inibição não foram obtidos para o mesmo isolado, demonstrando uma maior especificidade entre micoparasita e hospedeiro. Estes resultados indicam que pelo menos para os fungos isolados nesta amostragem não é possível obter um agente de biocontrole efetivo contra fungos fitopatogênicos de solo. BELL et al., 1982, observaram este mesmo tipo de comportamento avaliando a inibição dos fungos *R. solani* e *S. rolfsii* por *T. harzianum*, isolados de solos de Tifon, Geórgia, USA, sendo observados resultados de maior eficiência de inibição do crescimento contra *R. solani* em comparação com a inibição obtida contra *S. rolfsii*. No presente trabalho os resultados obtidos nos testes de inibição dos isolados de *Trichoderma* contra os fungos fitopatogênicos também apresentaram variação, pois nem sempre um determinado isolado conseguiu inibir todos os fitopatógenos testados, indicando que existência de especificidade entre o antagonista e o fitopatógeno, podendo haver o envolvimento de vários genes, além de outros fatores genéticos que interagem com o ambiente, ressaltando que a probabilidade de se encontrar um antagonista biológico específico que tenha ampla adaptabilidade é remota.

Segundo Linhares *et.al.*(1995) os microrganismos biocontroladores podem ser categorizados em eficientes, moderadamente eficientes ou ineficientes com base no valor de percentual de inibição. Os eficientes são aqueles que inibem de 80 a 100 % do crescimento do patógeno, moderadamente eficientes são aqueles que controlam com taxas entre 51 a 79% e os ineficientes aqueles que inibem menos de 50% do crescimento do patógeno.

Neste trabalho, ficam inseridos na categoria de eficientes, os isolados SRP22 e STN2AC, contra o fungo fitopatogênico *R. solani*; SCE2A, SCE2B, SCE2E, SCE22, SRP2B, SRP2D, SRP21, STN1AC, STN2A1 e STN2AB, contra o fungo fitopatogênico *F. oxysporum*; SP4BA, SP4BC, SRP2E, SRP2G, SRP22, STN1AA, STN1AD, STN2A2, STN2AA, STN2AC, STN2BA e STN2BB, contra o fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum* e SCE2A, SCE2E, SRP2B, SRP2D, SRP2E, SRP2G, SRP22, STN1AA, STN1AB, STN2A2 e STN2AB, contra o fungo fitopatogênico *F. solani* (Tabela 1). Vale ressaltar ainda, que neste trabalho, ficaram inseridos na categoria ineficientes apenas SRP2A e STN1AD, contra *R.*

solani. O que pode ser observado também, é que o isolado SRP22, foi o que se apresentou mais efetivo, pois, foi eficiente para tres, dentre os quatro fitopatógenos testados. Desta forma, é possível concluir que todos os isolados tiveram ação inibitória sobre os fitopatógenos testados, estando de acordo com o trabalho de Lisboa et al. (2007) que também obtiveram de solos de lavoura, neste caso de tomate, 36 isolados de fungos filamentosos, dos quais, 24 foram classificados como *Trichoderma harzianum* e 12 como *Gliocladium viride*. Sendo que todos os isolados de *Trichoderma* e *Gliocladium* apresentaram ação inibitória “*in vitro*” sobre o fungo fitopatogênico *B. cinerea*. Segundo BELL et al., 1992, o antagonismo “*in vitro*” é utilizado apenas para a seleção massal de candidatos a agentes de biocontrole, pois nem todos aqueles que apresentam efeitos inibitórios “*in vitro*” exercem com efetividade o antagonismo “*in vivo*”. Desta forma, a validação destes isolados como potenciais agentes de biocontrole depende ainda da avaliação de sua capacidade de reduzir sintomas de doenças fúngicas em uma determinada cultura de interesse, no caso deste trabalho, feijoeiro comum.

A atividade inibitória dos isolados de *Trichoderma* também foi avaliada pelo teste de inibição sem o contato direto entre micoparasita e hospedeiro, utilizando a técnica do papel celofane. Neste teste, foi observada uma diferença significativa dos percentuais de inibição obtidos para cada um dos isolados contra os fitopatógenos testados. Como para o teste de pareamento de culturas, não foi observado um isolado que seja promissor no biocontrole de todos os fitopatógenos, o que dificulta a seleção de um isolado em potencial que tenha atividade inibitória de amplo espectro. Esta resposta diferencial pode estar relacionada com a produção e secreção de metabólitos não voláteis pelos isolados de *Trichoderma* spp. Benitez et al. (2004) já descreveram que a maioria das cepas de *Trichoderma* spp. produzem metabólitos tóxicos voláteis e não voláteis que apresentaram atividade inibitória contra fungos fitopatogênicos. Dentre estes metabólitos, destacam-se: o ácido harziânico, e os antibióticos viridina, almeticina, suzucacilina, dermadina e gliotoxina. Os primeiros trabalhos científicos demonstrando a produção de antibióticos por *Trichoderma* spp. foram realizados por Weidling (1964) que conseguiu identificar os antibióticos gliotoxina e viridina. Ethur et al (2005) obtiveram 73 isolados de *Trichoderma* spp de horta e estufa de pepineiro, dos quais apenas os 8 melhores foram selecionados pelo mesmo teste do papel celofane, com um índice de 95,4% a 97,8% de inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* e conseguiram confirmar a eficácia destes na técnica de confrontação direta com o mesmo fitopatógeno. Em 2001, Ethur et al, obtiveram a mesma eficácia de isolados de *Trichoderma* com relação ao fitopatógeno *S. sclerotiorum* na técnica do papel celofane (85% a 94 % de inibição). Kuçuk

e Kivanç (2003) testaram diferentes isolados de *Trichoderma harzianum* contra fungos fitopatogênicos e obtiveram como maior valor de inibição, 88% contra *R. solani*.

De acordo com MELO (1998) a atividade inibitória de *Trichoderma* se dá através da associação ou não dos mecanismos de parasitismo, antibiose e competição. Os resultados deste trabalho sugerem que a atividade antagônica dos isolados envolve mecanismos de micoparasitismo e antibiose. Ao se analisar os dois testes conjuntamente, observa-se que o teste de antibiose abrange um número bem menor de isolados eficientes em comparação ao teste de antagonismo, inserindo nesta categoria, SRP2B, contra o fitopatógeno *R. solani*; STN2AB, contra o fitopatógeno *F. oxysporum*; SCE2A, SCE2C, SCE2E, SCE22 e SRP2F, contra o fitopatógeno *S. sclerotiorum* e STN2BA, contra o fitopatógeno *F. solani*.

Na tentativa de estabelecer uma correlação entre proximidade genética e atividade antifúngica e eliminar duplicidade destes isolados, foi realizada uma análise de diversidade por RAPD utilizando o DNA cromossomal dos isolados que apresentaram maior atividade antagônica. Para Bezerra (2003) o uso de marcadores RAPD tem permitido o estudo da diversidade inter e intraespecífica, caracterização de raças fisiológicas e a classificação detalhada de isolados de fungos. Em seu trabalho este autor observou que a variabilidade genética intraespecífica em isolados de *T. stromaticum* e *Hypocrea stromatica* possui valores de distância mais baixos do que quando são analisados isolados de espécies diferentes como observado neste mesmo trabalho entre os dois isolados citados, com valores inferiores destes comparados com *Fusarium* sp. Já Goes (2002) enfatizou a eficiência da técnica de RAPD demonstrando o polimorfismo de DNA com alta variabilidade genética intraespecífica entre isolados de *Trichoderma*, embora a similaridade entre isolados da mesma espécie tenham apresentado baixa similaridade. Ranganath (2002) utilizou cinco primers para a análise de RAPD e mostrou em seu trabalho, uma grande variabilidade intra e interespecífica. No presente trabalho, os dois isolados com maior proximidade de similaridade (SP4BC e SCE2C) apresentaram também, resposta semelhante nos dois testes de inibição dos fungos fitopatogênicos testados, exceto para os fungos fitopatogênicos *F. oxysporum* (teste de antagonismo) e *S. sclerotiorum* (teste de antagonismo e antibiose). O isolado STN2AB, apesar de representar um grupo totalmente isolado dos demais, apresentou um padrão de inibição dos fitopatógenos semelhante a vários outros isolados. Ainda no presente trabalho, apesar de ter sido utilizado um pequeno número de primers (apenas dois), que dificulta a eliminação de duplicidade, ficou claro a existência de variabilidade intra e inter específica no sequenciamento, que comprovou a hipótese inicialmente proposta, de se estar trabalhando com fungos antagonistas do gênero *Trichoderma* e os classificar com sendo praticamente

todos da mesma espécie, porém, se faz necessário o aprofundamento dos estudos do DNA para a comprovação de espécie.

A alteração no padrão de crescimento de plantas em função da associação com fungos do gênero *Trichoderma* já foi demonstrado para diferentes espécies, faltando ainda informação quanto à associação com feijoeiro comum. Harman (2000) observou aumento na taxa de crescimento de raízes e produtividade em plantas de soja, milho e pimentão, respectivamente, quando cultivadas na presença de *T. harzianum* (T-22). Filho (2008) utilizou vários isolados de *Trichoderma* para avaliar a promoção de crescimento de plantas de eucalipto e observou que para matéria seca, plantas tratadas com *T. harzianum* apresentaram valores significativamente superiores a plantas cultivadas na presença de outras espécies de *Trichoderma*. Como sugerido por Harman (2000) estas alterações podem ocorrer em função do deslocamento e controle da microbiota patogênica associada às raízes das plantas hospedeiras, pois os fungos do gênero *Trichoderma* colonizam a raiz e os pelos radiculares e liberam metabólitos com ação antifúngica ou que atuam diretamente sobre as plantas. Os processos de germinação, emergência e desenvolvimento de plantas podem ser influenciados por isolados de *Trichoderma* spp. (MELO, 1996). No presente trabalho, os resultados obtidos no cultivo das plantas mostraram maior desenvolvimento destas na presença de fungos do gênero *Trichoderma* para a maioria dos isolados testados, corroborando com os trabalhos dos autores citados.

Com relação à avaliação da produção de enzimas de defesa em feijoeiro comum cultivados na presença dos isolados de *Trichoderma*. Não foram observadas diferenças significativas na produção de enzimas de defesa por feijoeiro comum cultivado na ausência ou presença dos isolados de *Trichoderma*. Apenas o isolado SRP2B, apresentou resultado significativo de aumento da atividade de β -1,3-glucanases em raízes de feijoeiro. Este aumento não foi observado para as amostras de folhas, indicando que pelo menos para este primeiro experimento não foi observada resposta sistêmica da planta hospedeira. Kuhn e Pascholati (2010) avaliaram a indução de resposta de defesa em feijoeiro comum pelo tratamento com o indutor biótico *Bacillus cereus* e um químico ASM, observando que para o indutor biótico não houve aumento significativo na atividade de β -1,3 glucanase e quitinase como o detectado para ASM. Este mesmo tipo de análise foi realizada por Cavalcanti (2003) utilizando o indutor químico MCp (suspensão de quitosana proveniente de *Crinipellis pernicioso*) e o indutor biótico *Xanthomonas campestris* em plantas de tomate. Neste caso, aumento significativo da atividade de β -1,3 glucanases foi observado nas folhas na primeira hora após a pulverização com os indutores (químico e biótico), não detectada após 3 e 12 dias.

No presente trabalho os experimentos de quantificação de atividade de enzimas de defesa foram realizados para plantas cultivadas por 21 dias, quando é possível verificar os sintomas de doenças fúngicas, e, portanto provavelmente perderam-se dados de atividade nos dias anteriores quando comparados com os trabalhos citados onde se observaram produção de enzimas de defesa precocemente.

A preocupação com doenças que atacam o feijoeiro comum (*P. vulgaris*) e a utilização de produtos químicos que são tóxicos e impactam o ambiente e ainda comprometem a saúde dos produtores agrícolas e consumidores representaram as forças motivadoras principais para o desenvolvimento deste trabalho.

No Brasil, diversos produtos biológicos estão disponíveis para utilização no biocontrole, mas a sua qualidade nem sempre é adequada, o que colabora com as dificuldades de sua adoção em maior escala (Morandi & Bettiol 2009). Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que os isolados testados possuem potencial para o biocontrole de *R. solani*, *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum* e *F. solani*, e podem nortear trabalhos futuros que tenham por objetivo verificar a eficiência dos mesmos no controle destes patógenos como formulados biológicos. Os resultados apontam também para a necessidade de estudos sobre doses dos isolados que sejam eficientes para o controle deste fitopatógenos, sem prejudicar o desenvolvimento das plantas.

A resistência induzida é expressa tanto de forma local como sistêmica em resposta a patógenos. Na verdade, as proteínas de defesa são identificadas por seu simples acúmulo em plantas submetidas a uma situação de patogênese (VAN LOON, 1997). Entretanto, estudos recentes têm mostrado que a super expressão de genes de quitinases e glucanases em plantas, tem aumentado a resistência dessas plantas a patógenos (VAN LOON et al., 2006). Se faz necessário a realização de novos ensaios enzimáticos, quantificando essas proteínas em diferentes estágios de desenvolvimento das plantas, pois, Cavalcanti (2003), utilizando um outro indutor biótico (*Xanthomonas campestris*), observou atividade de β -1,3 glucanase na primeira hora após a pulverização com o indutor.

Com relação aos fungicidas testados para se observar a resposta dos isolados de *Trichoderma* submetendo os mesmos à máxima exposição destes ao produto. De acordo com Moino Jr & Alves (1999) estudos “in vitro” com fungicidas leva à máxima exposição dos microorganismos ao produto, situação que não ocorre em campo, pois vários são os fatores associados a essa exposição. Logo, quando constatada a inocuidade do produto em laboratório espera-se que este efeito seja menor em condições de campo. Desta forma, a alta toxicidade de um produto em laboratório não implica em sua elevada toxicidade em campo.

Quando submetidos à presença do fungicida Sumilex 500 WP, cujo princípio ativo é a substância procimidone, os 27 isolados testados tiveram aproximadamente o mesmo comportamento de desenvolvimento micelial (Figura 17) com formações crostosas e anéis concêntricos com formação de micélio de cor verde claro. Moity (1982) mostrou as mesmas mudanças nas características morfológicas em isolados de *Trichoderma* spp. cultivados na presença do “iprodione”. Nas três concentrações do fungicida houve crescimento micelial de *Trichoderma* spp. mostrando que o fungicida não inibiu totalmente o desenvolvimento do antagonista, porém foram observadas alterações no padrão de esporulação. Desta forma, é necessário avaliar se estas alterações não afetam a atividade antifúngica dos isolados micoparasitas “in vitro”, assim como em experimentos de campo para a avaliação à toxicidade dos fungicidas químicos.

No presente trabalho, portanto, todos os isolados apresentaram tolerância à presença do fungicida “sumilex”, destacando-se o isolado SRP2B e maior sensibilidade a “frownicide”, porém, não foram completamente inibidos pelo fungicida. Os isolados mais tolerantes aos fungicidas foram: STN2A2, STN2A1, STN2AA, STN2AB e STN1AA na dose recomendada do produto e STN2A1 para o dobro da dose. Todos estes isolados foram obtidos de amostras de solos que sofrem aplicação destes fungicidas anualmente há cerca de 26 anos. O interesse em estudar a resistência de isolados de *Trichoderma* spp. a fungicidas está na utilização deste antagonista no controle integrado de fitopatógenos. Conídios e micélio de isolados resistentes podem ser usados em conjunto com fungicidas para tratamento de sementes, pulverizações foliares ou aplicações no solo (PAPAVIZAS, 1985).

7 CONCLUSÃO

Dos 27 isolados de *Trichoderma*, apenas os isolados SRP2A e STN1AD não foram categorizados como eficientes agentes de biocontrole, os demais, 25 no total, foram categorizados como eficientes e moderadamente eficientes no controle do crescimento dos fungos fitopatogênicos testados e ainda que SRP22 foi eficiente contra tres dos quatro fitopatógenos testados (*R. solani*, *F. oxysporum* e *S. sclerotiorum*). Para o teste de antibiose o número de isolados categorizados como eficientes foi menor, e não houve correlação com os dados de confronto. Os isolados categorizados como eficientes foram SRP2B, contra *R. solani*; STN2AB, contra *F. oxysporum*; SCE2A, SCE2C, SCE2E, SCE22 e SRP2F, contra o fitopatógeno *S. sclerotiorum* e STN2BA, contra o fitopatógeno *F. solani*. Demonstrando, o

potencial de utilização destes isolados em testes de campo para verificação de sua atividade no controle de doenças fúngicas, principalmente contra fungos de solo.

Não foram obtidos resultados contundentes quanto à ação destes isolados como indutores de resposta de defesa em feijoeiro comum, sendo observado aumento apenas da atividade de β -1,3-glucanase para amostras de raízes provenientes de plantas cultivadas na presença do isolado SRP2B. Enfatizando a necessidade da aplicação de cinética enzimática para comprovar ou refutar a hipótese de a planta expressar estas enzimas em fases diferentes do ciclo de vida, bem como, da aplicação do antagonista, não somente no tratamento de sementes.

Todos os isolados de *Trichoderma* apresentaram algum grau de tolerância aos fungicidas “Sumilex” e “Frowncide”, porém, esta foi menor para o segundo fungicida. O isolado mais tolerante ao “Sumilex” 500 WP foi SRP2B e ao “Frowncide” 500 SC foi STN2A1. Considerando-se que “Sumilex” 500 WP é um produto para tratamento de sementes, e os isolados mostraram desenvolvimento na sua presença, pode-se concluir que ambos podem se utilizados concomitantemente para este tipo de tratamento. Para ambos os tratamentos é necessário avaliar em condições de campo se os micoparasitas mantêm a atividade antifúngica e sua viabilidade.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há grande interesse na diminuição da utilização de produtos químicos nas lavouras para diminuir os resíduos no solo. O controle biológico é uma alternativa, visando o manejo integrado das doenças fúngicas do feijoeiro comum, o que reduz a incidência das doenças, mas não elimina completamente o fitopatógeno.

O sucesso do controle biológico depende de vários fatores tais como condições ambientais, adaptação do agente biocontrolador, eficácia sobre o fitopatógeno o que leva a se fundamentar na seleção acertada do agente de biocontrole associado às condições do local onde há incidência da doença e ainda atentar para o fato de que nem sempre os resultados obtidos em testes *in vitro* são observados nas condições de campo onde serão utilizados (MELO, 1998; BETTIOL, 1997).

Genes que codificam enzimas que degradam parede celular, especialmente quitinases têm sido utilizados para modificar a resistência de plantas a fungos fitopatogênicos (COLLINGE et al, 1993). Para Lorito et al, 1998, enzimas produzidas pro *Trichoderma*

harzianum tem maior poder antifúngico do que enzimas quitinolíticas e glucanólíticas extraídas de outra fonte qualquer. Vários trabalhos mostraram eficiência na utilização de genes de enzimas quitinolíticas de *Trichoderma* que foram expressas em plantas transgênicas de tabaco, batata e maçã, melhorando a resistência da planta aos fungos fitopatogênicos (LORITO et al, 1998).

São duas as vertentes passíveis de serem exploradas: i) Formulações a base de esporos de fungos do gênero *Trichoderma*, ii) a exploração de genes das enzimas hidrolíticas da parede celular de fungos fitopatogênicos. A primeira destaca a necessidade de testes em condições de campo para comprovar resultados obtidos em testes “*in vitro*” reforçando a importância do controle biológico. A segunda direciona para a exploração biotecnológica dos genes de enzimas quitinolíticas, pois, manipulações genéticas de plantas com enzimas líticas de fungos antagonistas pode ser uma poderosa ferramenta para o aumento da resistência de plantas a fungos fitopatogênicos.

Hatvani (2005) considera que há necessidade de se encontrar cepas de *Trichoderma* que reúnam potencial biocontrolador e tolerância a fungicidas químicos, o que seria um pré-requisito para sua aplicação no manejo integrado de pragas que combina estratégia química e meios biológicos de controle. Ainda segundo este autor, a mutagenese clássica e a fusão de protoplastos tem se mostrado ferramentas apropriadas para a melhoria das cepas de *Trichoderma*. O sucesso na busca e obtenção de mutantes que acumulem a capacidade de induzir resposta de defesa na planta, tolerância a fungicidas e outros produtos químicos utilizados no controle de doenças nas lavouras, mais a reação contra o próprio fitopatógeno seria de grande importância, de acordo com as necessidades agrícolas e redução do uso de produtos químicos na natureza.

No entanto como não há uma correlação nos resultados de atividade antagonista de isolados com potencial biocontrolador e sua tolerância a fungicidas o desenvolvimento de linhagens com atividade antifúngica e resistência a fungicidas tem sido considerada uma interessante estratégia para o controle integrado de fitopatógenos. Levando a outro ponto de interesse, que são os genes de tolerância a fungicidas. Alguns isolados poderão ser utilizados como fonte destes genes com potencial de aplicação na transformação de fungos com alto potencial biocontrolador, mas com baixa tolerância aos fungicidas. Inglis (1999) trabalhou com os fungos entomopatogênicos *Paecilomyces fumoroseus* e *Paecilomyces lilacinus*, utilizados em programas de controle biológico, para a utilização simultânea destes com o fungicida benomil. Ele transformou estas linhagens de fungos utilizando uma construção

contendo o gene da proteína β -tubulina de um mutante de *Neurospora crassa* resistente a benomil.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ELSALAM, Kamel A.; ALY, Ibrahim N.; ABDEL-SATAR, Mohamed A.; KHALIL, Mohamed S. and VERREET, Joseph A.. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. **African Journal of Biotechnology**, Vol. 2, n. 4, p. 82-85, April 2003.

AGOSIN E, VOLPE D, MUNOZ G, SAN MARTIN R, CRAWFORD A . Effect of culture conditions on spore shelf life of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, vol.13, pp. 225-232, 1997.

ALEXOPOULOS, Constantine J.; MINS, Charles W. & BLACKWEL, M. **Introductory Mycology**, 4ed., New York, Wiley & Sons, Inc., 869p, 1996

ALMEIDA, F.B.R.; CERQUEIRA, F.M.; SILVA, R.N.; ULHOA, C.J.; LIMA, A.L. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic production. **Biotechnol Lett**, v.29, p.1189-1193, 2007.

BAKER, K. F. & COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens**, W. H. Freeman, San Francisco. 1974, 433 p.

BEDENDO, I.P. Doenças vasculares, In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3ed. São Paulo: Agronômica Ceres., Cap.44, v.1, p.838-847,1995.

BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C.R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, n.4, p. 379-382, 1982.

BELLOTTI, A.C. Controle Biológico no contexto da Agricultura Sustentável. In: III SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO. Águas de Lindóia, SP. **Anais**. Jaguariúna: EMBRAPA- CNPDA, Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura. p. 2-5, 1992.

BENHAMOU, Nicole & CHET, Ilan. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. **Phytopathology**, v. 83, n10, p.1062-1071. 1993.

BENITEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C.. Bioncontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **Int. Microbiol.** Madrid, v. 7, n.4, 2004.

BERNI, R.F.; SILVEIRA, P.M.da; COSTA, J.L.S. Influência do preparo de solo e da rotação de culturas na severidade de podridões radiculares no feijoeiro comum. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 32, n.2, p. 69-74, 2002.

BERTHIER, Yvette T.; BRUCKART, William L.; CHABOUDEZ, Pierre; LUSTER, Douglas G.. Polymorphic restriction patterns of ribosomal internal transcribed spacers in the biocontrol fungus *Puccinia carduorum* correlate with weed host origin. **Appl. Environ. Microbiol**, v.62, n.8, p. 3037-3041, Aug. 1996.

BETTIOL, W. Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 5, p. 59 - 97, 1997.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M.. Manual de fitopatologia: doença das plantas cultivadas. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p.376-399, 1997.

BRAGA, N. A., PESSOA, M. N. G., TEÓFILO, E. M.. Tratamento químico e biológico de sementes de caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., Visando o controle de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid.1 Biological and chemical treatment of cowpea seeds, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., for *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. control. **Revista Ciência Agronômica**, vol. 34, n.2, p. 193 – 199, 2003.

BRIDGE, P. e SPOONER, B.. Soil fungi: diversity and detection. **Plant and Soil**, v. 232, n. 1-2, p. 147-1548, May 2001.

CARDOSO, J.E. **Doenças do feijoeiro causadas por patógenos de solo**. Goiânia: Embrapa-CNPAF, 1990. 30p. (Embrapa-CNPAF. Documentos, 30).

CASSIOLATO, A.M.R. Parasitismo de *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) De Bary por mutantes de *Trichoderma harzianum* Rifai. Piracicaba, 1995. 133p. Tese (Doutoramento) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

CASSIOLATO, A.M.R., BAKER, R., MELO, I.S. Parasitismo de *Sclerotinia sclerotiorum* e *S. minor* por mutantes de *Trichoderma harzianum* em segmentos de aipo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 120-122, 1996.

CAVALCANTI, M.A.de.; OLIVEIRA, L.G. de; FERNANDES, M. J. e L.; MASSA, D. Fungos filamentosos isolados do solo em municípios na região Xingó, Brasil. **Acta Bot. Bras.** vol. 20, n. 4, p. 831-837, 2006.

CENTRO DE INTELIGÊNCIA DO FEIJÃO. <http://www.cifeijao.com.br/>.

CHET, I.; VITERBO A.; BROTMAN, Y.. Plant Biocontrol by *Trichoderma* spp. **Department of Biological Chemistry**, 2005.

COHEN-KUPIEC, R.; BROGLIE, K. E.; FRIESEM, D.; BROGLIE, R. M.; CHET, I. Molecular characterization of a novel β -1,3-exoglucanase related to mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. **Gene**, v.226, p.147–154, 1999.

MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, Cap. 8. v. 2, p. 263-304 In: (Ed) 2000.

COLLINGE DB, KRAGH KM, MIKKELNSEN JD, NIELSEN KK, RASMUSSEN U & VAD K. Plant chitinases. **Plant J.** v.3, p. 31–40, 1993.

COOK, R. J. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogen. **Annual Review Phytopathology**, v. 31, p. 53-80. 1993.

DI PIERO, R. M. E GARDA, M. V.. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesq. agropec. bras.**, vol. 43, n. 9, p. 1121-1128, 2008.

DJONOVIC S., POZO M.J., DANGOTT L.J., HOWELL C.R., KENERLEY C.M. Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, v.19, p.838–853, 2006.

DRUZHININA IS, KOPCHINSKIY AG. **TRICHOKEY**. A DNA Oligonucleotide BarCode Program for the Identification of Multiple Sequences of *Hypocrea* and *Trichoderma* . In: Meyer W, Pearce C, editors. **International Proceedings of the 8th International Mycological Congress**. Cairns, Australia, Medimond, Bologna, Italy. 2006. v. 2.

ELAD, Y. and KAPT, A. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. **Eur. J. Plant Pathol.**, v.105, p.177-189, 1999.

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

ETHUR, L.Z.; CEMBRANEL, C.Z.; SILVA, A.C.Fda. Seleção de *Trichoderma* spp. Visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. **Ciência Rural**, v.31, n.5, 2001.

ETHUR, L.Z.; CEMBRANEL, C.Z.; SILVA, C.F.da. Seleção de *Trichoderma* spp. Visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 31, n5, 2005..

ETHUR, Luciana Z.; BLUME, Elena; MUNIZ, Marlove; SILVA, Antônio Carlos F.; STEFANELO, Daniela R. e ROCHA, Edileusa K. da. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, Abril, 2005

ETHUR, Luciana Zago; BLUME, Elena; MUNIZ, Malove Fátima Brião; FLORES, Georgina Veiga Flores. Seleção de antagonistas fúngicos a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* em substrato comercial para mudas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 6, Dec. 2007.

ETHUR, Luciana Zago; BLUMEI, Elena; MUNIZ, Marlove Fátima Brião; ANTONIOLLI, Zaida Inês NICOLINI, Cícero; MILANESI, Paola; FORTES, Fabiano de Oliveira. Presença dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* em solo rizosférico e não rizosférico cultivado com tomateiro e pepineiro, em horta e estufa. Santa Maria, **Ciência Rural**, v.38, n.1, p, 19-26, jan-fev. 2008.

FERREIRA, E. P. de B.; DUSI, ANDRÉ N.; XAVIER, G. R. E RUMJANEK, N. G.. Rhizosphere bacterial communities of potato cultivars evaluated through PCR-DGGE profiles. **Pesq. agropec. bras.**, v. 43, n. 5, p. 605-612, 2008.

FLORES, A.C.I.; HERRERA-ESTRELLA, A.. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* strains by overexpression of the proteinase encoding gen *prb1*. **Curr Genet.**, v.31, p.30-37, 1997.

FRANCESCHINI, M.; GUIMARÃES, P, A.; CAMASSOLA, M.; FRAZZON, P, A.; BARATTO, M, C.; KOGLER, V.; SILVA, V, M.; DUTRA, V.; NAKAZOTO, L.; CASTRO, L.; SANTI, L.; VAINSTEIN, H, M.; SCHRANK, A. 2001. Biotecnologia aplicada ao controle biológico. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, nº 23.

FRAVEL, D.R.. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v.43, p.337–359, 2005.

FRIGHETTO, R. T. S.. Influência do manejo de agrotóxicos no meio ambiente. **Fitopatologia brasileira**, v. 25, n. suplemento, p. 271-274, 2000.

FUNGARO, Maria Helena P.. PCR na micologia. **Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento**. v.3, p.12-16. 2000.

GOMES, N.C.M.; FAGBOLA, O.; COSTA, R.; RUMJANEK, N.G.; BUCHNER A.; HAGLER-M.,L.; SMALLA, K.. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 69, n.7, p. 3758-3766, July. 2003.

GOODAY, G. The ecology of chitin degradation. **Microb. Ecol.**, v.10, p.387-431, 1990.

GORDON, T.R.; MARTYN, R.D.. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p.111-128, 1997.

GRONDONA I, HERMOSA R, TEJADA M, GOMIS MD, MATEOS PF, BRIDGEPD, MONTE E, GARCIA-ACHA I. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. **Appl Environ Microbiol**, v.63, p.3189–3198, 1997.

GROSCH, R., SCHERWINSKI, K., LOTTMANN, J., BERG, G.. Fungal antagonists of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*: selection, control efficacy and influence on the indigenous microbial community. **Mycological Research**, p.1464-1474, 2006.

GUETSKY, R.D.; SHTIENBERG, D.; ELAD, Y.; FICHER, Y.; DINOOR, A.. Improving Biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. **Phytopathology**, v.92, n.9, 2002.

HADAR, Y.; HARMAN, G. E.; TAYLOR, A. G. Evaluation of *Trichoderma koningii* and *Trichoderma harzianum* from New York soils for biological control of seed rot caused by *Pythium* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v.74, n.1, p.106-110, 1984.

HARMAN GE. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Dis.**, vol.84. p 377-393, 2000.

HARMAN, G. E.. Myths and Dogmas of Biocontrol. **Plant Disease**, v.84, n.4, p.377-393, 2000.

HARMAN, G. E.. Overview of Mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, n2, p.190-194, 2006.

HAWSKWORTH, D.I.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C.; PEGLER, D.M. . Ainsworth and bisby's dictionary of the fungi. Eghani, United Kingdom: International Mycological Institute, 8.ed, 1995.

HIBBETT, D.S.. Ribosomal RNA and fungal systematics. **Trans. Mycol. Soc.**, v.33, p.533-556, 1992.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAGIA E ESTATÍSTICA. 2008. **Produção agrícola municipal: Cereais, leguminosas e oleaginosas.**

ILLIPRONTI JR., R.A. & MACHADO, J.C. Antagonismo de fungos a *Sclerotinia sclerotiorum* em soja e feijão. *Fitopatologia Brasileira*, v. 18, pp. 162-166. 1993.

JIN X, HARMAN GE, TAYLOR AG. Conidial biomass and desiccation tolerance of *Trichoderma harzianum* produced at different medium water potentials. **Biol. Control**, vol. 7, pp. 267-243, 1991.

JULIATTI, F. C.; RUANO, O. **Controle de doenças. Doenças causadas por fungos e bactérias.** In: VALE, F.X.R. & ZAMBOLIM L. Controle de doenças de plantas .Grandes Culturas. Vol. 2. UFV, Departamento de Fitopatologia, Brasília, Distrito Federal : Ministério da agricultura e do abastecimento, 1997, p. 555-570. apud SILVA, V. A. S.; JULIATTI, F. C.; JULIATTI, F. C. 2007. Estudo preliminar da variabilidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em *Gossypium hirsutum*. *Preliminary study of variability of Fusarium oxysporum*

f. sp. vasinfectum in Gossypium hirsutum. **Journal of Biosciences**, Uberlândia, v. 23, n. 1, p. 1-6.

KUBICEK, C. P., MACH, R. L., PETERBAUER, C. K. & LORITO M.. *Trichoderma*: From genes to biocontrol. **J. Plant Pathol.**, v.83, n.2, p.11-23, 2001.

KUHN, Odair J. e PASCHOLATI, Sérgio F. Custo adaptativo da indução de resistência em feijoeiro mediada pela rizobactéria *Bacillus cereus* ou acibenzolar-S-metil: atividade de enzimas, síntese de fenóis e lignina e biomassa. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 36, n. 2, p. 107-114, 2010.

KULLINIG, C. M.; KRUPICA, T.; WOO, S. L.; MARCH, R. L.; REY, M.; BENITEZ, T.; LORITO, M. & KUBICEK, C. P.. Confusions abounds over identities of *Trichoderma* biocontrol isolates. **Mycol. Res.**, p.105-796, 2001.

KURAMAE, Eiko E.; SOUZA, Nilton L. Variabilidade genética entre *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* através de RAPD e sequências de regiões ITS e rDNA. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.24, n.5, p.1481-1485, 2002.

LIMA, L. H. C.; MARCO, J. L.; FELIX, C. R. Enzimas Hidrolíticas Envolvidas no Controle Biológico por Micoparasitismo. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Controle Biológico**. 1 ed. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, v.2, p.263-304, 2000.

LINHARES, Andréa I.; MATSUMURA, Aida T.S. & LUZ, Vilmar C. Avaliação da amplitude da ação antagonística de microrganismos epifitas do trigo sobre o crescimento radial de *Drechslera tritici-repentis*. **Rev. Bras. de AGROCIÊNCIA**, v.1, n.3, p.119-126, Set.-Dez., 1995

LISBOA, Bruno B.; BOCHESI, Carla C.; VARGAS, Luciano K.; SILVEIRA, José R. P.; RADIN, Bernadete; OLIVEIRA, Andréia M. R. de. Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na redução da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. **Ciência Rural**, v.37, n.5, set-out, 2007.

LOBO JUNIOR, Murilo; ABREU, Mário S. de. Inibição do crescimento micelial de *sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em

diferentes temperaturas e pH's¹. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.24, n.2, p.521-526, abr./jun., 2000.

LORITO M, WOO SL, FERNANDEZ IG, COLUCCI G, HARMAN GE, PINTOR- TORO JA, FILIPPONE E, MUCCIFORA S, LAWRENCE CB, ZOINA A, TUZUN S & SCALA F Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p.7860–7865, 1998.

LORITO M, WOO S, IACCARINO M, SCALA F. Microrganismi antagonisti. In: Microrganismi benefici per le piante, M. Iaccarino (ed). Idelson-Gnocchi s.r.l., **Napoli**, Itália, pp. 146-175, 2006.

MARCO, J.L.de e FELIX, C.R.. Purification and Characteriation of a β -glucanase produced by *Trichoderma harzianum* showing biocontrol potential. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, n.1, p.21-29, 2007.

MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção “*in vitro*” para controle microbiológico. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.1, p.369–409, 1993.

MARINGONI, A.C.; LAURETTI, R.B.. Reação de genótipos de feijoeiro comum a *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli. *Macrophomina phaseolina* e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.34, n. 4, abr. 1999.

MARRA, R.; AMBROSINO, P.; CARBONE, V.; VINALE, F.; WOO, S. L.; RUOCCO, M.; CILIENTO, R.; LANZUISE, S.; FERRAIOLI, S.; SORIENTE, I.; GIGANTE, S.; TURRA, D.; FOGLIANO, V.; SCALA, F.; LORITO, M. Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. **Current Genetics**, v.50, n.5, p. 307–21, Aug. 2006.

MARTINS-CORDER, M.P.; MELO, I.S. de. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. A *Verticillium dahliae* KLEB. **Sci. agric**, vol. 55 n. 1 Piracicaba. Jan-Apr. 1998.

MEDEIROS, E.V.de; ALBUQUERQUE, J.F.C.de; MICHEREFF, S.J.; JUNIOR, R.S. e NUNES, G.H.D.S. Controle de *Monosporascus cannonballus* por tiazolidina-2,4-diona e efeito sobre o agente de controle biológico *Trichoderma* spp. **Revista Caatinga**. Mossoró. v.19, n.1, p.44-50, jan/mar 2006.

MELLO, I.S.de; AZEVEDO, J.L.de. 2000. **Controle Biológico**. Embrapa Meio Ambiente, 338p, Jaguariúna, SP.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA-CNPDA, 1998. p.17-67.

MELO, I. S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de Plantas. In: BETTIOL, W. (org.) **Controle biológico de doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1991. p.7-23.

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

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. 1998. **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 262 p.1998.

MELO, I.S.de; FAULL, J.L.. Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. **Scientia Agricola**, v.57, p.55-59, 2000.

MENEZES, Josiane Pacheco; LUPATINI, Manoeli; ANTONIOLLI, Zaida I.; BLUME, Elena; JUNGES, Emanuele; MANZONI, Clarice G. . Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 34, n. 1, Feb. 2010 .

MENTEN, J. O. M.; MINUSSI, C. C.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. "in vitro". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.

MIRANDA, B.A.de M.; JUNIOR, M.L., CUNHA, M.G. dez.. Reação de cultivares do feijoeiro comum as podridões radiculares causadas por *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani* f. sp *phaseoli*. Goiânia-GO, Brasil . **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.37, n.4, p. 221-226, 2007.

MISCHKE, N. O. A. S. "Genetic Transformation of the Biocontrol Fungus *Gliocladium virens* to Benomyl Resistance." **Applied and Environmental Microbiology**. v.56, n.10, p. 3052-3056, 1990.

MONTE, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. **International of Microbiology**, v.4, p.1-4, 2001.

MONTEIRO, Valdirene N.; ULHOA, Cirano J.. Biochemical Characterization of a β -1,3 Glucanase from *Trichoderma koningii* Induced by Cell Wall of *Rhizoctonia solani*. **Current Microbiology**. v. 52, n.2, p. 92–96, Feb. 2006.

MORANDI, M.A.B. & BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. *In*: Bettiol, W. & Morandi, M.A.B. (eds.). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectives. **Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna. 2009.

MORANDI, M.A.B. & BETTIOL, W.. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. *In*: Bettiol, W. & Morandi, M.A.B. (eds.). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectives. **Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna, 2009.

MUKHERJEE, PRASUN K. and KENERLEY, CHARLES M.. Regulation of Morphogenesis and Biocontrol Properties in *Trichoderma virens* by a VELVET Protein, Vell. **Appl Environ Microbiol**, vol.76, n.7, pp2345-2352.2010.

NAPOLEÃO, R.; FILHO, A.C.C.; LOPES, C.A.; NASSER, L.C.B.; MAROVELLI, W.A.. Efeito da frequência da rega e da umidade do solo sobre a germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Summa phytopatol**. Botucatu, v.33, n.1, 2007.

NAPOLEÃO, R; FILHO, A.C.C.; NASSER, L.C.B.; LOPES, C.A.; SILVA, H.R.. Intensidade do mofo branco do feijoeiro em plantio convencional e direto sob diferentes lâminas d'água. **Fitopatol. Bras**. Brasilia, v.30, n.4, 2005.

NEEGAARD, P. **Seed pathology**. London: McMillan Press. 1977. 2v., 839p.

NORONHA, E. F. & ULHOA, C. J.. Characterization of a 29-Kda β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiol. Rev**. 183:119-123, 2000.

NORONHA, E.F. AND ULHOA, C.J.. Purification and characterization of an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **Can. J. Microbiol.**, v.42, p.1039-1044, 1996.

OLIVEIRA, Geovana G. *Trichoderma* spp. no crescimento vegetal e no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* e de patógenos em sementes de cártamo (*Carthamus tinctorius*).

2007. 80f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), 2007.

OLIVEIRA, V.C. DE & COSTA, J.L.da.. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* de *F. solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p. 631-634, 2002.

OLIVEIRA, S.H.F. Manejo do mofo branco. **Revista DBO Agrotologia**. Ano 2, n.4, 2005.

OLMEDO-MONFIL, V.; MENDOZO-MENDOZA, A.; GÓMEZ, I.; COTÉS, C.; HERRERA-ESTRELA, A.. Multiple environmental signals deremining the transcriptional activation of the mycoparasitism related gene *prb1* in *Trichoderma atroviride*. **Mol. Gen. Genom.**, v.267, p. 703-712, 2002.

OMERO, C.; INBAR, J., ROCHA-RAMIREZ, V.; HERRERA-ESTRELA, A.; CHET, I.; HORWITZ, B. A. G.. Protein activators and cAMP promote mycoparasitic behaviour in *Trichoderma harzianum*. **Mycological Research**, Cambridge, v.103, p. 1637-1642, 1999.

OTERO, Laura; DUCASSE, Daniel; MILLER, Robert N. G.. Variability in ribosomal DNA genic and spacer regions in *Verticillium dahliae* isolates from different hosts. **Fitopatol. bras.**, Brasília, v. 29, n. 4, Ag. 2004 .

OZBAY, N. & NEWMAN, S.E. Biological control with *Trichoderma* spp. With emphasis on *T. harzianum*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 7, n.4, p.478-84, 2004.

PARISI, J.J.D.; PATRÍCIO, F.R.A.; OLIVEIRA,S.H.G.. Método do rolo de papel toalha modificado para a detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Summa Phytopathologica**, v..32, n.3, p.288-290, 2006.

PAULITZ, T.C. & BÉLANGER, R.R. Biological control in greenhouse systems. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39,pp.103–133, 2001.

PEREIRA, O. A. P. Doenças do milho (*Zea mays* L.). In: KIMATI, H. et. al. **Manual de fitopatologia, doenças das plantas cultivadas**, v.2, p. 538-555, 1997.

PIRES, C.S.S; FONTES, E.M.G; SUJII, E.R. 2003. **Impacto ecológico de plantas geneticamente modificadas: O algodão como estudo de caso**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

POMELLA, A.W.V. & RIBEIRO, R.T.S.. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas: uma visão empresarial. *In*: Bettiol, W. & Morandi, M.A.B. (eds.). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectives. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, 2009.

POZO, M. J; BAEK, J.M. ;GARCÍA, J.M; KENERLEY, C. M.. Funcional analysis of *tvsp*, a serine protease-encoding gene in the biocontrol agent *Trichoderma virens*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, p. 336-348, 2004.

PUNJA, Z.K. e UTKHEDE, R.S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, v.21, p. 400-7, 2003.

RODRIGUES, F. de Á.; FERNANDES, J.J.; MARTINS, M.. Influência de semeaduras sucessivas de feijoeiro na severidade da mancha-angular e ferrugem e perdas na produção. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.34, n. 8, ago. 1999.

ROSA, Daniel D.; MARQUE, Marianno de; FENILLE, Roseli C.; SOUZA, Nilton Luiz de e KURAMAE, Eiko E. Análise filogenética de *Phytophthora capsici* Leonian do Estado de São Paulo baseada na seqüência de nucleotídeos da região ITS-5.8S rDNA. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. Maringá, v. 25, n. 2, p. 429-434, 2003.

SALLAM NASHWA A.; ABO-ELYOUSR, K. A. and HASSAN, M. A.. Evaluation of *Trichoderma* Species as Biocontrol Agents for Damping-Off and Wilt Diseases of *Phaseolus vulgaris* L. and Efficacy of Suggested Formula. **Egypt. J. Phytopathol.**, vol. 36, n.1-2, p. 81-93, 2008

SAMUELS G.J., DODD, S., LU, B.S., PETRINI, O., SCHROERS, H.J. and DRUZHININA, I.S. The *Trichoderma koningii* aggregate species. **Stud. Mycol.** 56: 67-133,. 2006.

SAMUELS, G.J.. *Trichoderma*: Systematics, the Sexual State, and Ecology. **Phytopathology** v.96, n.2, p.195-206, 2006.

SANZ, L.; MONTERO, M.; REDONDO, J.; LLOBELL, A.; MONTE, E.. Expression of an α -1,3 glucanase during mycoparasitic interaction of *Trichoderma asperellum*. **FEBS Journal**, v.272, p 493-499, 2005.

SEGARRA G., CASANOVA E., BELLIDO D., ODENA M.A., OLIVEIRA E., TRILLAS I. Proteome, salicylic acid and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. **Proteomics**, v.7, p.3943–3952, 2007.

SELITRENNIKOFF, Claude P. Antifungal Proteins. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 67, n.7, p. 2883-2894, July 2001.

SHORESH, M. and HARMAN G. Differential expression of maize chitinases in the presence or absence of *Trichoderma harzianum* strain T22 and indications of a novel exo- endo-heterodimeric chitinase activity. **BMC Plant Biology**. v.10, n.1, p. 136, Jul.2010.

SHORESH, M.; HARMAN, G.E.. The Molecular Basis of Shoot Responses of Maize Seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 Inoculation of the Root: A Proteomic Approach. **Plant Physiology**, v. 147, p. 2147-2163, 2008.

SIDIQUEE, S.; GUAN, F.A.T.S.; AZIZ, E.R.. Phylogenetic relationships of *Trichoderma harzianum* based on the sequence analysis of the internal transcribed spacer region – 1 of the rDNA. **Journal of Applied Sciences Research**, v.3,n.9, p. 896-903, 2007.

SILVA, A.C.F. 1997. **Uso de radiação gama para a obtenção de mutantes de *Trichoderma harzianum* Rifai. e *T. viride* Pers.Fr. com capacidade melhorada no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary.** 143f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

SILVA, A.C.F. da; ROSA, C.R.E.; MELO, I.S. de. Sensibilidade de isolados de *Trichoderma* spp. a benomil e iprodione. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.29, n.3, p.395-399, 1999.

SILVA, F. de A. S. e. & AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional ASSISTAT para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4,n.1, p71-78, 2002. (<http://www.assistat.com>).

SILVA, J.B.T. & MELO, S.C.M.. Utilização de *Trichoderma* no controle de fungos fitopatogênicos. **Documentos Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, 2007.

SILVA, V. A. S.; JULIATTI, F. C. e JULIATTI, F. C.. Estudo preliminar da variabilidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em *Gossypium hirsutum*. **Bioscience Journal**, v. 23, n.1, 2007.

SMALA, K. et al. October. Bulk and Rhizosphere Soil Bacterial Communities Studied by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: Plant-Dependent Enrichment and Seasonal Shifts Revealed. **Applied and Environmental Microbiology**., v. 67, n.. 10, p. 4742-4751, 2001.

SNEH, B.; BURPEE, L.; OGOSHI, A. **Identification of *Rhizoctonia* spp.** Minnesota: USA. APS Press, 1991. 133pag.

SUÁREZ, M. B.; VIZCAÍNO, J. A.; LLOBELL, A.; MONTE, E.. Characterization of genes encoding novel peptidases in the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413 using the TrichoEST functional genomics approach. **Springer-Verlag** 51:331–342, 2007.

SUÁREZ, B.; REY, M.; CASTILLO, P.; MONTE, E.; LLOBELL, A.. Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. **Applied Microbiology Biotechnology** 65:46–55, 2004.

TSENG, SHIH-CHI et al.. Proteomic Study of Biocontrol Mechanisms of *Trichoderma harzianum* ETS 323 in Response to *Rhizoctonia solani*. **J. Agric.Food Chem.** v. 56, n.16, p. 6914-6922, 2008.

Van BRUGGEN, A.H.C.; ARNESON, P.A. Path coefficient analysis of effects of *Rhizoctonia solani* on growth and development of dry beans. **Phytopathology**, v.76, p.874-878, 1986.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.36, n. 1, p. 453-483, 1998.

VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p.85-97, 1999.

VAN LOON, L.C., REP, M. & PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135-62. 2006.

VANTINI, JULIANA DA SILVA; FERRO, MARIA INÊS T.; FERRO, JESUS A.; DE OLIVEIRA, CEZAR F.. Expressão gênica diferencial da b-1,3-Glucanase (PR-2) nas interações compatível e incompatível entre *Xanthomonas axonopodis* e *Citrus sinensis*. **Científica**. Jaboticabal, v.36, n.2, p.139-147, 2008.

VERMA, MAUSAM; BRAR, SATINDER K.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI R. Y. E VALÉRO, J. R. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, v.37. n.1, p.1-20. 2007.

VITERBO, A.; HAREL, M.; CHET, I. Isolation of two aspartyl proteases from *Trichoderma asperellum* expressed during colonization of cucumber roots. **FEMS Microbiol Letters**, v.238, p.151–158, 2004.

VITERBO, A.; RAMOT, O.; CHERNIN, L.; CHET, I. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 549-556, 2002.

WEINDLING, R. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. **Phytopathology**, v. 24, p. 1140-1153, 1964.

WEINDLING, R.. Studies on lethal principles effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. **Phytopathology**. v.24, p.1153-1179, 1934.

WEINDLING, R.. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. **Phytopathology**, v. 22, p.837-845, 1932.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In. INNIS, M. A. PCR protocols: a guide to methods and applications. **Academic Press, San Diego**, p. 315-322, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WOO, S; SCALA, F.; RUOCCO, M.; LORITO, M.. The Molecular Biology of the Interactions Between *Trichoderma* spp., Phytopathogenic Fungi, and Plants. **Phytopathology**. v96, n.2, 2006.

YANGUI, T.; RHOUMA, A.; TRIKI, M.A.; GARGOURI, K. and BOUZID, J.. Control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* using olive mill waste water and some of its indigenous bacterial strains, **Crop Protection**, v.27 , p. 189–197, 2008.

YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; CHET, I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, n.3, p.1061-1070, Mar. 1999.

ZITTER, T.A.; HOPKINS, D.L.; THOMAS, C.E. Compendium of cucurbit diseases. **APS Press**: St. Paul, v.57, 1996.

CALDARI JÚNIOR, Pedro e KIMATI, Hiroshi. **Caracterização morfológica, esporulação e sensibilidade a fungicidas de isolados de *Botrytis cinerea* de flores e plantas ornamentais**. 1998. 51f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.1998.

CASSIOLATO, Ana Maria Rodrigues. **Parasitismo de *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) De Bary por mutantes de *Trichoderma harzianum* Rifai**. Piracicaba, 1995. 133p. Tese (Doutoramento) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. 1995.

DEISING, Holger B.; REIMANN, Sven; PASCHOLATI, Sérgio F.. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 39, n. 2, June 2008 .

DEL SORBO, Giovanni; SCHOONBEEK, Henk-jan and De WAARD, Maarten A.. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. **Fungal Genet. Biol.**, v. 30, n.1, p. 1-15, 2000.

ELAD, Y.; GULLINO, Maria Lodovica; SHTIENBERG, D.; ALOI, C.. Managing *Botrytis cinerea* on tomatoes in greenhouses in the Mediterranean. **Crop Protection**, v.14, n.2, p. 105-109. Março, 1995.

INGLIS, Peter W.; TIGANO, Myrian S.; VALADARES-INGLIS, M. Cléria. Transformation of the entomopathogenic fungi, *Paecilomyces fumosoroseus* and *Paecilomyces lilacinus* (deuteromycotina: hyphomycetes) to benomyl resistance. **Genet. Mol. Biol.** São Paulo, v.22, n.1, Mar. 1999.

MELO, I.S.; SILVA, A.C. Resistance of U.V. induced mutants of *Trichoderma harzianum* to benzimidazole and dicarboximide fungicides. **Petria**, v.1, p.151-152, 1991.

MOINO JR., Alcides; ALVES, Sérgio Batista. Efeito Antagônico de *Trichoderma* sp. No Desenvolvimento de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Sci. agric.**, Piracicaba, v. 56, n. 1, p.217-224, 1999 .

PAPAVIZAS, G. C.. *Trichoderma* and Gliocladium: biology, ecology and potential for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology** . v.23, n.1, p. 23-54, Setembro, 1985.

SILVA, Antonio Carlos Ferreira da; ROSA, Carlos Renato Echeveste da; MELO, Itamar

VITERBO, A, RAMOT, O, CHEMIN, L Y CHET, I. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. **Ant. van Leeuw**, v.81, 549-556, 2002.