

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA: MICROBIOLOGIA APLICADA

---

**MARIA LÚCIA GARCIA SIMÕES**

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Moniliophthora perniciosa*, AGENTE CAUSAL DA  
VASSOURA DE BRUXA DO CACAUEIRO, POR DIFERENTES ESPÉCIES E  
LINHAGENS DE *Trichoderma spp***

Rio Claro- SP  
2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**MARIA LÚCIA GARCIA SIMÕES**

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Moniliophthora perniciosa*, AGENTE CAUSAL DA  
VASSOURA DE BRUXA DO CACAUEIRO, POR DIFERENTES ESPÉCIES E  
LINHAGENS DE *Trichoderma* spp**

**ORIENTADOR: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Sâmia Maria Tauk-Tornisielo**

**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Givaldo Rocha Niella**

TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DO CAMPUS DE RIO CLARO, UNIVERSIDADE ESTADUAL  
PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO, COMO PARTE  
DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ÁREA:  
MICROBIOLOGIA APLICADA).

**RIO CLARO**

**2010**

589.2 Simões, Maria Lucia Garcia  
S593c        Controle biológico de Moniliophthora perniciosa, agente causal da  
vassoura de bruxa do cacauero, por diferentes espécies e linhagens e  
linhagens de Trichoderma spp / Maria Lucia Garcia Simões. - Rio Claro :  
[s.n.], 2010  
220 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de  
Bióciências de Rio Claro  
Orientador: Sâmia Maria Tauk-Tornisielo  
Co-Orientador: Givaldo R. Niella

1. Fungos. 2. Controle biológico. 3. Trichoderma. 4. Moniliophthora  
perniciosa. 5. Vassoura de bruxa. 6. Enzimas hidrolíticas. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
CAMPUS DE RIO CLARO  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE RIO CLARO

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** Estudos aplicados de *Trichoderma* spp no controle biológico da vassoura de bruxa do cacauzeiro

**AUTORA:** MARIA LUCIA GARCIA SIMÕES

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. SAMIA MARIA TAUk TORNISIELO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA) , pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. SAMIA MARIA TAUk TORNISIELO  
CENTRO DE ESTUDOS AMBIENTAIS – CEA - UNESP - Rio Claro

Prof. Dr. ANTONIO CARLOS MONTEIRO  
Departamento de Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. IRACEMA HELENA SCHOENLEIN-CRUSIUS  
Micologia e Liqueologia - Df / Instituto de Botânica

Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI  
Depto de Tecnologia Agro-Industrial e Sócio-Economia Rural/UFSCAR

Prof. Dr. CARLOS RENATO CORSO  
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Data da realização: 25 de agosto de 2010.

## Aos meus amores

Mamãe, Odila

Papai, Sidney

Meu esposo, Daniel

Meus filhos, Rodrigo e Paolla

Minha nora, Mayara

Meu genro, Alexandre

Meus animais companheiros....

## Ao meu amigo

Niella

DEDICO.....

## AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo Daniel, que teve paciência em me ouvir falar diariamente dos experimentos por quatro anos e por ter me ajudado em tudo....

À minha mãe e meu pai, que me receberam, me apoiaram e cuidaram de mim todas as vezes que precisei.

À Prof. Dr<sup>a</sup> Sâmia, por ter me orientado e acompanhado por todos estes últimos anos.

Ao Prof. Dr. Niella, pela sabedoria e orientação, mas mais ainda pela amizade e dedicação nestes quatro anos de trabalho.

À Prof. Dr<sup>a</sup> Sandra Francheti (UNESP) pelo estímulo à busca de novos horizontes de pesquisa para o Programa de Pós Graduação da UNESP na área de Microbiologia Aplicada.

Ao Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC-CEPLAC), pelo suporte técnico.

À diretoria da CEPLAC, cuja parceria com a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, permitiu a realização deste trabalho e pela hospedagem no primeiro ano de trabalho.

À UESB, que disponibilizou toda estrutura física para execução dos trabalhos que foram realizados e pela concessão de bolsa cedida.

Ao Prof. Dr. José Luiz Bezerra (CEPEC-CEPLAC), por ter me ajudado e orientado.

A Prof. Dr<sup>a</sup> Karina P. Gramacho (CEPEC-CEPLAC), que cedeu os isolados de *M. perniciosa* utilizados neste trabalho

Ao Prof. Dr. João de Cássia do B. Costa (CEPEC-CEPLAC), pelos isolados de *Trichoderma* cedidos para a realização deste trabalho.

À amiga Prof. Dr<sup>a</sup> Silvana N. Matsumoto (UESB), pela disponibilização de seus equipamentos.

Ao Prof. Dr. Anselmo Eloy Silveira Viana (UESB) pelo suporte estatístico prestado.

A Prof<sup>a</sup> Janice de Marco (UNB) pela ajuda nos protocolos enzimáticos.

A Sara (CEA-UNESP) pela amizade e constante ajuda.

Ao meu amigo Alex Fernando de Almeida (CEA-UNESP) pela longa amizade e pela constante ajuda que me deu.

As funcionárias do CEA, Eleni e Francisca que sempre me apoiaram.

A todos que de qualquer forma me ajudaram.....

## RESUMO

Diferentes isolados de *Trichoderma* (*T. stromaticum*, *T. pseudokoningii*, *T. harzianum*, e *T. viride*) e um isolado de *T. atroviride*, *T. longibrachiatum*, *T. virens* e *T. pilulliferum* foram estudados para uso no biocontrole de quatro subgrupos genéticos de *Moniliophthora perniciosa*, designados como Mp1441, Mp1445, Mp1893 e Mp1916. A associação das características dos isolados de *Trichoderma* avaliados quanto à velocidade de crescimento micelial, germinação, produção de esporos e produtividade massal de esporos em arroz, além das suas capacidades de antibiose e micoparasitismo a cada subgrupo do patógeno, resultou na determinação do índice denominado Potencial para uso no biocontrole (%PCB) a cada subgrupo de *M. perniciosa*. Os %PCBs variaram, demonstrando haver variabilidade genética entre os isolados do antagonista quanto às características avaliadas, como também nos níveis de resistência do patógeno. *T. harzianum* 911 apresentou o melhor %PCB para todos os subgrupos de *M. perniciosa*, sendo o pior apresentado por *T. reesei* 1612. Mp1445 foi o subgrupo que apresentou a menor capacidade de supressão aos antagonistas, sendo a maior apresentada por Mp1916. *T. harzianum* 906 inibiu o crescimento de Mp1916 por metabólitos não voláteis e todos os isolados de *Trichoderma* avaliados inibiram todos os subgrupos do patógeno pela ação de metabólitos voláteis, variando, porém, os percentuais de inibição entre as espécies e entre isolados da mesma espécie. Mp1445 inibiu o crescimento de *T. virens* 2007 por metabólitos não voláteis, sendo comprovada, portanto, a possibilidade do patógeno inibir o antagonista. *T. harzianum* 911 apresentou capacidade de micoparasitismo em placa e em vassouras infectadas individualmente pelos subgrupos do patógeno, além de produzir as enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase, quitinase, protease, FPase, CMCase e amilase, tanto em substratos específicos como em cultivos individuais com micélio seco de todos os subgrupos do patógeno como fonte de carbono. *T. virens* 2007 apresentou as mesmas capacidades, com exceção à Mp1445, *T. pseudokoningii* 1052 com exceção à Mp1445, 1893 e 1916 e *T. longibrachiatum* 3188 a nenhum subgrupo. Os resultados obtidos demonstram que a capacidade de *Trichoderma* spp em micoparasitar o patógeno depende das atividades sinérgicas das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase, sendo a produção de  $\beta$ -1,3-glucanase anterior e maior que a de quitinase, uma vez que apenas os isolados que produziram ambas as enzimas apresentaram capacidade de micoparasitismo em placa e em vassouras infectadas pelo patógeno.

**Palavras chave:** *Trichoderma*, *M. perniciosa*, Cacau, Vassoura de Bruxa, Controle Biológico, Micoparasitismo, Antibiose, Enzimas Hidrolíticas.



## SUMMARY

Different isolates of *Trichoderma* (*T. stromaticum*, *T. pseudokoningii*, *T. harzianum* and *T. viride*) and one isolate of *T. atroviride*, *T. longibrachiatum*, *T. virens* e *T. pilulliferum* were studied for their usage in biocontrol of four genetic subgroups of *Moniliophthora perniciosa* named as Mp1441, Mp1445, Mp1893 e Mp1916. The association of the characteristics of the *Trichoderma* isolates evaluated regarding to velocity of mycelial growth, germination, spores production in Petri dish and mass production of spores in rice, besides their capacities of antibiosis and mycoparasitism to each subgroup of the pathogen, resulted in the determination of the index named Potential to be used in Biocontrol (%PCB) to each subgroup of *M. perniciosa*. The %PCBs varied, pointing out that there is a genetic variability among the antagonistic isolates regarding to the evaluated characteristics, as well as the levels of the pathogen resistance. *T. harzianum* 911 showed the best %PCB for all subgroups of *M. perniciosa*, being the worst presented by *T. reesei* 1612. Mp1445 was the subgroup that presented the lowest antagonistic suppression capacity, being the highest presented by Mp1916. *T. harzianum* 906 inhibited the growth of Mp1916 by non-volatile metabolites and all the evaluated isolates of *Trichoderma* inhibited all the subgroups through volatile metabolites, varying, although, the percentages of inhibition among the species and among the isolates of the same species. Mp1445 inhibited the growth of *T. virens* 2007 by non-volatile metabolites, being proved, therefore, the possibility of the pathogen to inhibit the antagonist. *T. harzianum* 911 presented the mycoparasitism capacity in Petri dishes and in brooms infected individually by the pathogen, besides the production of  $\beta$ -1,3-glucanase, chitinase, protease, FPase, CMCCase and amilase, in both specific substrates and in cultivations with dried mycelia of the pathogen subgroups as carbon source. *T. virens* 2007 presented the same capacities, but to Mp1445, *T. pseudokoningii* 1052 but Mp1445, 1893 e 1916 and *T. longibrachiatum* 3188 to none of the subgroups. The results obtained depict that the capacity of *Trichoderma* spp to mycoparasite the pathogen depend on the synergic activities of the enzymes  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase, being the production of  $\beta$ -1,3-glucanase prior and higher than chitinase, once the isolates that produced both enzymes presented the capacity on mycoparasitism in plates and in brooms infected by the pathogen.

**Key words:** *Trichoderma*, *M. perniciosa*, Cocoa, Witch's broom, Biological Control, Mycoparasitism, Antibiosis, Hydrolytic Enzymes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Vista parcial de um cacauero, com destaque em seus frutos.....	27
Figura 2.	Regiões produtoras de cacau no Brasil.....	28
Figura 3.	Fruto do cacau (A); sementes do cacau (B).....	29
Figura 4.	Produtos do cacau.....	30
Figura 5.	Ciclo de vida de <i>M. pernicioso</i> em <i>Theobroma cacao</i> .....	35
Figura 6.	Sintomatologia da vassoura de bruxa.....	36
Figura 7.	Cacauero infectado por <i>M. pernicioso</i> .....	36
Figura 8.	Componentes estruturais da parede celular de fungos filamentosos.....	49
Figura 9.	Estrutura da $\beta$ -D- glucana com ligações $\beta$ - 1,3 e $\beta$ -1,4.....	49
Figura 10.	Estrutura da quitina.....	50
Figura 11.	Hifa de <i>Trichoderma</i> spp ao redor do fitopatógeno <i>Rhizoctonia solani</i> .....	52
Figura 12.	Microcultivo de esporos de <i>Trichoderma</i> spp em lâmina de microscopia.....	63
Figura 13.	Esquematização de cultura pareada em placa com <i>Trichoderma</i> spp e <i>M. pernicioso</i> .....	64
Figura 14.	Infecção de vassouras de bruxa esterilizadas por <i>M. pernicioso</i> , crescido em meio farelo de trigo e vermiculita.....	81
Figura 15.	Potencial de velocidade de crescimento micelial (%IVCM) de <i>Trichoderma</i> spp <i>in vitro</i> .....	87
Figura 16.	Aspecto morfológico das colônias de isolados de <i>Trichoderma</i> spp após cultivo em BDA por 9 d à temperatura de $24 \pm 2^\circ$ C e fotoperíodo de 12 h.....	89
Figura 17.	Potencial de esporulação em placa (%PE) de <i>Trichoderma</i> spp <i>in vitro</i> .....	90
Figura 18.	Potencial de Germinação de esporos (%PGe) de <i>Trichoderma</i> spp após microcultivo em lâmina em meio BDA a $24 \pm 2^\circ$ C por 15 h..	91
Figura 19.	Germinação de esporos de <i>T. pilulliferum</i> (Tpl925) e <i>T. reesei</i> (Tr1612) após microcultivo em lâmina em meio BDA a $24 \pm 2^\circ$ C por 15 h .....	92
Figura 20.	Potencial de crescimento (%PC) de <i>Trichoderma</i> spp <i>in vitro</i> .....	93

Figura 21.	Índice de velocidade de crescimento radial (IVCM) de <i>M. pernicioso</i> subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916 em cultivos de 3 a 25 d em meio BDA a $24 \pm 2$ °C.....	94
Figura 22 A.	Cultivo pareado de <i>T. reesei</i> 1612 e os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> .....	97
Figura 22 B.	Cultivo pareado de <i>T. atroviride</i> 2076 e os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> .....	98
Figura 22 C.	Cultivo pareado de <i>T. longibrachiatum</i> 3188 e os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> .....	99
Figura 22 D.	Cultivo pareado de <i>T. pilulliferum</i> 925 e os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> .....	100
Figura 22 E.	Cultivo pareado de <i>T. virens</i> 2007 e os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> .....	101
Figura 22 F-1.	Cultivo pareado de <i>T. viride</i> 905 e os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> .....	102
Figura 22 F-2.	Cultivo pareado de <i>T. viride</i> 1643 e os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> .....	103
Figura 22 G-1.	Cultivo pareado de <i>T. harzianum</i> 906 e os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> .....	104
Figura 22 G-2.	Cultivo pareado de <i>T. harzianum</i> 911 e os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> .....	105
Figura 22 G-3.	Cultivo pareado de <i>T. harzianum</i> 1058 e os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> .....	106
Figura 22 G-4.	Cultivo pareado de <i>T. harzianum</i> 1070 e os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> . ....	107
Figura 22 H-1.	Cultivo pareado de <i>T. pseudokoningii</i> 907 e os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> .....	108
Figura 22 H-2.	Cultivo pareado de <i>T. pseudokoningii</i> 909 e os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> . ....	109
Figura 22 H-3.	Cultivo pareado de <i>T. pseudokoningii</i> 913 e os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> .....	110
Figura 22 H-4.	Cultivo pareado de <i>T. pseudokoningii</i> 1052 e os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> . ....	111
Figura 22 I-1.	Cultivo pareado de <i>T. stromaticum</i> 3109 e os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> . ....	112
Figura 22 I-2.	Cultivo pareado de <i>T. stromaticum</i> 1441 e os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> .....	113

Figura 22 I-3.	Cultivo pareado de <i>T. stromaticum</i> 1445 e os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> . .....	114
Figura 22 I-4.	Cultivo pareado de <i>T. stromaticum</i> 2994 e os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> . .....	115
Figura 22 I-5.	Cultivo pareado de <i>T. stromaticum</i> 3454 e os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> . .....	116
Figura 22 I-6.	Cultivo pareado de <i>T. stromaticum</i> 3461 e os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> . .....	117
Figura 22 I-7.	Cultivo pareado de <i>T. stromaticum</i> 3768 e os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> .....	118
Figura 22 I-8.	Cultivo pareado de <i>T. stromaticum</i> 4077 e os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> .....	119
Figura 23.	Potencial de antibiose (%PAT) de <i>Trichoderma</i> spp a <i>M. pernicioso</i> subgrupo 1441 pelo método da cultura pareada por 25 d de cultivo.....	120
Figura 24.	Potencial de antibiose (%PAT) de <i>Trichoderma</i> spp a <i>M. pernicioso</i> subgrupo pelo método da cultura pareada por 25 d de cultivo.....	121
Figura 25.	Potencial de antibiose (%PAT) de <i>Trichoderma</i> spp a <i>M. pernicioso</i> subgrupo 1893 pelo método da cultura pareada por 25 d de cultivo.....	122
Figura 26.	Potencial de antibiose (%PAT) de <i>Trichoderma</i> spp a <i>M. pernicioso</i> subgrupo 1916 pelo método da cultura pareada por 25 d de cultivo.....	122
Figura 27.	Potenciais de antibiose (%PAT) apresentados por isolados de <i>Trichoderma</i> spp acumulados para os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> em cultivo pareado de 25 d.....	123
Figura 28.	Potencial de micoparasitismo (%PM) de <i>Trichoderma</i> spp a <i>M. pernicioso</i> subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916 pelo método da cultura pareada.....	127
Figura 29.	Potencial antagônico (%PA) de <i>Trichoderma</i> spp a <i>M. pernicioso</i> subgrupo 1441 <i>in vitro</i> .....	129
Figura 30.	Potencial antagônico (%PA) de <i>Trichoderma</i> spp a <i>M. pernicioso</i> subgrupo 1445 <i>in vitro</i> .....	130
Figura 31.	Potencial antagônico (%PA) de <i>Trichoderma</i> spp a <i>M. pernicioso</i> subgrupo 1893 <i>in vitro</i> . .....	131
Figura 32.	Potencial antagônico (%PA) de <i>Trichoderma</i> spp a <i>M. pernicioso</i> subgrupo 1916 <i>in vitro</i> .....	131

Figura 33.	Potenciais antagônicos (%PA) apresentados por isolados de <i>Trichoderma</i> spp acumulados para os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> .....	133
Figura 34.	Potencial de Produtividade de Esporos (%PPE) apresentados por isolados de <i>Trichoderma</i> spp em arroz como substrato.....	137
Figura 35.	Potencial de <i>Trichoderma</i> spp para uso no Controle Biológico (%PCB) de <i>M. pernicioso</i> subgrupo 1441.....	138
Figura 36.	Potencial de <i>Trichoderma</i> spp para uso no controle biológico (%PCB) de <i>M. pernicioso</i> subgrupo 1445.....	138
Figura 37.	Potencial de <i>Trichoderma</i> spp para uso no controle biológico (%PCB) de <i>M. pernicioso</i> subgrupo 1893.....	139
Figura 38.	Potencial de <i>Trichoderma</i> spp para uso no controle biológico (%PCB) de <i>M. pernicioso</i> subgrupo 1916.....	140
Figura 39.	Comparação dos Potenciais de isolados <i>Trichoderma</i> spp para uso no biocontrole dos diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> (%PCB).....	141
Figura 40.	Potenciais de biocontrole (%PCB) apresentados por isolados de <i>Trichoderma</i> spp acumulados para os diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> .....	142
Figura 41.	Potencial de antibiose de <i>M. pernicioso</i> 1445 a <i>T. virens</i> 2007 por metabólitos não voláteis.....	145
Figura 42.	Produção da enzima protease no extrato enzimático bruto de <i>Trichoderma</i> spp cultivado em substrato específico (caseína).....	150
Figura 43.	Produção da enzima celulase total (FPase) por <i>Trichoderma</i> spp cultivado em substrato específico (papel de filtro).....	151
Figura 44.	Produção da enzima endoglucanase (CMCase) por <i>Trichoderma</i> spp cultivado em substrato específico (carboximetilcelulose).....	152
Figura 45.	Produção da enzima $\beta$ -1-3-glucanase por <i>Trichoderma</i> spp cultivado em substrato específico (laminarina).....	153
Figura 46.	Produção da enzima amilase dextrinizante ( $\alpha$ -amilase) por <i>Trichoderma</i> spp cultivado em substrato específico (amido solúvel).....	154
Figura 47.	Produção da enzima amilase sacarificante ( $\beta$ -amilase) por <i>Trichoderma</i> spp cultivado em substrato específico. (amido solúvel).....	154
Figura 48.	Produção da enzima quitinase por <i>Trichoderma</i> spp cultivado em substrato específico.....	155

Figura 49.	Produção das enzimas $\beta$ -1,3-glucanase (Bgnase), quitinase (Qnase) e protease (Ptase) por <i>T. harzianum</i> 911 (Th911) cultivado individualmente em meio contendo micélio seco de <i>M. pernicioso</i> subgrupo 1441 (A) e subgrupo 1445 (B), como única fonte de carbono.....	157
Figura 50.	Produção das enzimas $\beta$ -1,3-glucanase (Bgnase), quitinase (Qnase) e protease (Ptase) por <i>T. harzianum</i> 911 (Th911) cultivado individualmente em meio contendo micélio seco de <i>M. pernicioso</i> subgrupo 1893 (A) e subgrupo 1916 (B), como única fonte de carbono.....	158
Figura 51.	Produção das enzimas $\beta$ -1,3-glucanase (Bgnase), quitinase (Qnase) e protease (Ptase) por <i>T. longibrachiatum</i> 3188 (Tlg3188) cultivado individualmente em meio contendo micélio seco de <i>M. pernicioso</i> subgrupo 1441 (A) e subgrupo 1445 (B), como única fonte de carbono.....	160
Figura 52.	Produção das enzimas $\beta$ -1,3-glucanase (Bgnase), quitinase (Qnase) e protease (Ptase) por <i>T. longibrachiatum</i> 3188 (Tlg3188) cultivado individualmente em meio contendo micélio seco de <i>M. pernicioso</i> subgrupo 1893 (A) e subgrupo 1916 (B), como única fonte de carbono.....	161
Figura 53.	Produção das enzimas $\beta$ -1,3-glucanase (Bgnase), quitinase (Qnase) e protease (Ptase) por <i>T. pseudokoningii</i> 1052 (Tps1052) cultivado individualmente em meio contendo micélio seco de <i>M. pernicioso</i> subgrupo 1441 (A) e subgrupo 1445 (B), como única fonte de carbono.....	162
Figura 54.	Produção das enzimas $\beta$ -1,3-glucanase (Bgnase), quitinase (Qnase) e protease (Ptase) por <i>T. pseudokoningii</i> 1052 (Tps1052) cultivado individualmente em meio contendo micélio seco de <i>M. pernicioso</i> subgrupo 1893 (A) e subgrupo 1916 (B) como única fonte de carbono.....	163
Figura 55.	Produção das enzimas $\beta$ -1,3-glucanase (Bgnase), quitinase (Qnase) e protease (Ptase) por <i>T. virens</i> 2007 (Tvi2007) cultivado individualmente em meio contendo micélio seco de <i>M. pernicioso</i> subgrupo 1441 (A) e subgrupo 1445 (B) como única fonte de carbono.....	164
Figura 56.	Produção das enzimas $\beta$ -1,3-glucanase (Bgnase), quitinase (Qnase) e protease (Ptase) por <i>T. virens</i> 2007 (Tvi2007) cultivado individualmente em meio contendo micélio seco de <i>M. pernicioso</i> subgrupo 1893 (A) e subgrupo 1916 (B), como única fonte de carbono.....	165
Figura 57.	Produção da enzima amilase dextrinizante ( $\alpha$ -amilase) por isolados de <i>Trichoderma</i> spp cultivados individualmente em meio contendo micélio seco dos diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> como única fonte de carbono.....	173

Figura 58.	Produção da enzima endoglucanase (CMCase) por isolados de <i>Trichoderma</i> spp cultivados individualmente em meio contendo micélio seco dos diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> como única fonte de carbono.....	174
Figura 59.	Teste de esterilização de vassouras infectadas por <i>M. pernicioso</i> .....	176
Figura 60.	Infecção de vassouras esterilizadas por <i>M. pernicioso</i> em meio farelo de trigo (MFT) .....	176
Figura 61.	Capacidade de micoparasitismo de <i>T. harzianum</i> 911 (Th911) em colonizar vassouras infectadas <i>in vitro</i> por <i>M. pernicioso</i> subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916.....	178
Figura 62.	Capacidade de micoparasitismo de <i>T. virens</i> 2007 (Tvi2007) em colonizar vassouras infectadas <i>in vitro</i> por <i>M. pernicioso</i> subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916.....	180
Figura 63.	Capacidade de micoparasitismo de <i>T. pseudokoningii</i> 1052 (Tps1052) em colonizar vassouras infectadas <i>in vitro</i> por <i>M. pernicioso</i> subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916.....	181
Figura 64.	Capacidade de micoparasitismo de <i>T. longibrachiatum</i> 3188 (Tlg3188) em colonizar vassouras infectadas <i>in vitro</i> por <i>M. pernicioso</i> subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916.....	183
Figura 65.	Capacidade de <i>Trichoderma</i> spp em colonizar vassouras esterilizadas.....	184

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição bioquímica da parede celular de diferentes Filos do Reino Fungi.....	50
Tabela 2.	Nomenclatura e ação das $\beta$ -glucanases.....	55
Tabela 3.	Subgrupos de <i>Moniliophthora perniciosa</i> utilizados e seus respectivos locais de origem.....	58
Tabela 4.	Isolados de <i>Trichoderma</i> spp utilizados e seus respectivos locais de origem.....	59
Tabela 5.	Elaboração da curva padrão de BSA.....	72
Tabela 6.	Elaboração da curva padrão de glicose.....	79
Tabela 7.	Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de isolados de <i>Trichoderma</i> spp calculado a partir de cultivos em BDA à temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h.....	85
Tabela 8.	Produção de Esporos (PE) por isolados de <i>Trichoderma</i> spp após cultivos em BDA por 9 d à temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h.....	88
Tabela 9.	Produção de Esporos (PEA) e Produtividade de Esporos (PPE) em arroz como substrato por <i>Trichoderma</i> spp.....	135
Tabela 10.	Potencial de antibiose de isolados de <i>Trichoderma</i> spp aos diferentes subgrupos de <i>M. perniciosa</i> por metabólitos não voláteis (%AMNV)....	144
Tabela 11.	Potencial de antibiose de isolados de <i>Trichoderma</i> spp aos diferentes subgrupos de <i>M. perniciosa</i> por metabólitos voláteis (%AMV).....	146
Tabela 12.	Relação de isolados de <i>Trichoderma</i> spp produtores de metabólitos voláteis e não voláteis no processo antagônico a fitopatógenos, citados por outros autores.....	148
Tabela 13.	Resumo esquemático das capacidades enzimáticas e de micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> spp aos diferentes subgrupos de <i>M. perniciosa</i> .....	168



## LISTA DE SIGLAS

Tspp	<i>Trichoderma</i> spp
Tps907	<i>T. pseudokoningii</i> isolado n. 907
Tps909	<i>T. pseudokoningii</i> isolado n. 909
Tps913	<i>T. pseudokoningii</i> isolado n. 913
Tps1052	<i>T. pseudokoningii</i> isolado n. 1052
Tps1541	<i>T. pseudokoningii</i> isolado n. 1541
Th906	<i>T. harzianum</i> isolado n. 906
Th911	<i>T. harzianum</i> isolado n. 911
Th1058	<i>T. harzianum</i> isolado n. 1058
Th1070	<i>T. harzianum</i> isolado n. 1070
Ts2994	<i>T. stromaticum</i> isolado n. 2994
Ts3454	<i>T. stromaticum</i> isolado n. 3454
Ts1441	<i>T. stromaticum</i> isolado n. 1441
Ts1445	<i>T. stromaticum</i> isolado n. 1445
Ts3461	<i>T. stromaticum</i> isolado n. 3461
Ts3504	<i>T. stromaticum</i> isolado n. 3504
Ts3768	<i>T. stromaticum</i> isolado n. 3768
Ts3109	<i>T. stromaticum</i> isolado n. 3109
Ts4077	<i>T. stromaticum</i> isolado n. 4077
Tlg3188	<i>T. longibrachiatum</i> isolado n. 3188
Tpl925	<i>T. cf. pilulliferum</i> isolado n. 925
Tvr905	<i>T. viride</i> isolado n. 905
Tvr1643	<i>T. viride</i> isolado n. 1643
Tr1612	<i>T. reesei</i> isolado n. 1612
Tat2076	<i>T. atroviride</i> isolado n. 2076
Tvi2007	<i>T. virens</i> isolado n. 2007
Mp	<i>M. perniciosa</i>
MpSD	<i>M. perniciosa</i> de subgrupo desconhecido
Mp1441	<i>M. perniciosa</i> Subgrupo 1445
Mp1445	<i>M. perniciosa</i> Subgrupo 1445
Mp1893	<i>M. perniciosa</i> Subgrupo 1893

Mp1916	<i>M. pernicios</i> a Subgrupo 1916
IVCM	Índice de Velocidade de Crescimento Micelial
%IVCM	Potencial de Velocidade de Crescimento Micelial
PE	Produção de Esporos em placa por <i>Trichoderma</i> spp
%PE	Potencial de Produção de Esporos em placa por <i>Trichoderma</i> spp
%PGe	Potencial de Germinação de esporos de <i>Trichoderma</i> spp
%PC	Potencial de Crescimento de <i>Trichoderma</i> spp
%PM	Potencial de Micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> spp a <i>M. pernicios</i> a
%PAT	Potencial de Antibiose de <i>Trichoderma</i> spp a <i>M. pernicios</i> a
%PA	Potencial Antagônico de <i>Trichoderma</i> spp a <i>M. pernicios</i> a
PEA	Produção de Esporos em Arroz por Tspp
PPE	Produtividade de Esporos em arroz por <i>Trichoderma</i> spp
%PPE	Potencial de Produtividade de Esporos em arroz por <i>Trichoderma</i> spp
RIP	Raio Inicial da colônia do Patógeno em cultivo pareado, antes da inoculação de <i>Trichoderma</i> spp
RFP	Raio Final da colônia do Patógeno, após 25 d de cultivo pareado com <i>Trichoderma</i> spp
%PCB	Potencial de Tspp para uso no Controle Biológico de <i>M. pernicios</i> a
%AMNV	Potencial de antibiose de <i>Trichoderma</i> spp a <i>M. pernicios</i> a por metabólitos não voláteis
%AMV	Potencial de antibiose de <i>Trichoderma</i> spp a <i>M. pernicios</i> a por metabólitos voláteis
Bgnase	$\beta$ -1,3-glucanase
Qnase	Quitinase
Ptase	Protease

## SUMÁRIO

<b>1.0</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>2.0</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	26
2.1.	O cacauero.....	26
2.1.1.	Características gerais.....	26
2.1.2.	Importância econômica.....	29
2.1.3.	Principais doenças do cacauero.....	31
2.2.	Vassoura de bruxa do cacauero.....	31
2.2.1.	A vassoura de bruxa no Brasil.....	31
2.2.2.	Agente etiológico.....	32
2.2.3.	Ciclo de vida de <i>M. pernicioso</i> no cacauero.....	33
2.2.4.	Sintomas da vassoura de bruxa.....	35
2.2.5.	Principais métodos de controle da doença.....	36
2.2.5.1.	Poda fitossanitária.....	37
2.2.5.2.	Utilização de genótipos resistentes.....	37
2.2.5.3.	Controle químico.....	38
2.2.5.4.	Indução de resistência sistêmica adquirida (SAR).....	39
2.2.5.5.	Controle Biológico.....	39
2.2.5.6.	Controle integrado.....	41
2.3.	O uso do gênero <i>Trichoderma</i> no controle da vassoura de bruxa do cacauero.....	41
2.4.	Mecanismos antagônicos de <i>Trichoderma</i> spp a fitopatógenos.....	43
2.4.1.	Biocontrole por Competição.....	44
2.4.2.	Biofertilização e estimulação dos mecanismos de defesa da planta.....	45
2.4.2.1	Colonização das raízes de plantas.....	45
2.4.2.2.	Biofertilização.....	45
2.4.3.	Modificações na rizosfera.....	46
2.4.4.	Antibiose por produção de metabólitos e antibióticos.....	46

2.4.5.	Antibiose por produção de enzimas hidrolíticas-Micoparasitismo.....	47
2.5.	Principais enzimas hidrolíticas produzidas por <i>Trichoderma</i> spp durante o micoparasitismo a <i>M. pernicioso</i> .....	52
2.5.1.	Quitinases.....	52
2.5.2.	$\beta$ – Glucanases.....	54
2.5.3.	Proteases.....	56
2.5.4	Amilases.....	57
<b>3.0</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>58</b>
3.1.	Microrganismos.....	58
3.1.1.	Microrganismos utilizados.....	58
3.1.2.	Métodos de manutenção das cepas.....	59
3.1.3.	Produção dos inóculos.....	60
3.2.	Estudo das características de crescimento micelial, esporulação e germinação de Tspp <i>in vitro</i> .....	61
3.2.1.	Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) e Potencial de Velocidade de Crescimento Micelial (%IVCM) de Tspp <i>in vitro</i> .....	61
3.2.2.	Produção de Esporos (PE) e Potencial de Esporulação (%PE) em placa por Tspp .....	61
3.2.3.	Percentual de Germinação de esporos (%PGe) de Tspp <i>in vitro</i> .....	62
3.2.4.	Potencial de Crescimento (%PC) de Tspp <i>in vitro</i> .....	63
3.3.	Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de Mp subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916 <i>in vitro</i> .....	63
3.4.	Estudo das características antagônicas de Tspp a Mp subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916.....	64
3.4.1.	Cultivo de Tspp e Mp subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916 pelo método da cultura pareada.....	64
3.4.2.	Potencial de Micoparasitismo (%PM) de Tspp sobre Mp subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916.....	65
3.4.3.	Potencial de Antibiose (%PAT) de Tspp sobre Mp subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916 (%PPI).....	65
3.4.4.	Potencial Antagônico (%PA) de Tspp a Mp subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916.....	66
3.5.	Produção de Esporos em Arroz (PEA), Produtividade de Esporos em arroz (PPE) e Potencial de Produtividade de Esporos em arroz (%PPE) por Tspp.....	66
3.6.	Potencial de Tspp para uso no Controle Biológico (%PCB) de Mp subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916.....	67

3.7.	Potencial de antibiose de Tspp a Mp por metabólitos voláteis e não voláteis e antibiose de Mp a Tspp por metabólitos não voláteis.....	67
3.7.1.	Potencial de antibiose de Tspp a Mp por metabólitos não voláteis (AMNV). Técnica do líquido metabólico.....	67
3.7.2.	Potencial de antibiose de Mp a Tvi2007 por metabólitos não voláteis..	68
3.7.3.	Potencial de antibiose de Tspp a Mp por metabólitos voláteis (AMV)- Técnica da placa invertida.....	69
3.8.	Mecanismo de micoparasitismo por enzimas hidrolíticas produzidas por Tspp a Mp subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916.....	70
3.8.1.	Produção de enzimas hidrolíticas por Tspp em meios específicos.....	70
3.8.2.	Produção de enzimas por Tspp em meio com Mp como única fonte de carbono.....	71
3.8.3.	Proteínas Totais.....	71
3.8.4.	Protease total e específica.....	73
3.8.5.	Celulase.....	73
3.8.5.1	FPase.....	73
3.8.5.2.	CMCase.....	74
3.8.6	$\beta$ 1-3 glucanase.....	75
3.8.7.	Amilase.....	75
3.8.7.1.	$\alpha$ - amilase (atividade dextrinizante).....	76
3.8.7.2.	$\beta$ - amilase (atividade sacarificante).....	76
3.8.8.	Quitinase.....	77
3.8.9.	Determinação dos açúcares redutores totais (ART).....	78
3.8.10.	Determinação da Curva de Calibração de Glicose pelo método de ART.....	78
3.9.	Crescimento e esporulação de Tspp sobre vassouras esterilizadas e vassouras infectadas por Mp.....	79
3.9.1.	Desinfecção e esterilização de vassouras infectadas por Mp para testes de colonização por Tspp.....	79
3.9.1.1	Teste de esterilização de vassouras.....	80
3.9.2	Produção de micélio de Mp subgrupos 1441, 1445 e 1893 em meio farelo de trigo e vermiculita (MFV) .....	80
3.9.3.	Infecção de vassouras esterilizadas por Mp subgrupos 1441, 1445,	

	1893 e 1916.....	80
3.9.4.	Colonização de vassouras infectadas <i>in vitro</i> por Mp subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916 por Tspp .....	81
3.9.5	Colonização de vassouras esterilizadas por Tspp .....	82
3.10.	Análises estatísticas dos resultados.....	82
<b>4.0</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>83</b>
4.1.	Estudo das características de crescimento micelial, esporulação e germinação de isolados de <i>Trichoderma</i> spp e <i>M. perniciosa in vitro</i> ...	83
4.1.1.	Considerações Preliminares.....	83
4.1.2.	Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) e Potencial de Crescimento Micelial (%IVCM) de isolados de <i>Trichoderma</i> spp <i>in vitro</i> .....	84
4.1.3.	Produção de Esporos (PE) e Potencial de Esporulação (%PE) de isolados de <i>Trichoderma</i> spp em placa.....	87
4.1.4.	Potencial de Germinação de esporos (%PGe) de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	91
4.1.5.	Potencial de Crescimento (%PC) de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	92
4.1.6.	Índice de Velocidade de Crescimento Micelial de <i>M. perniciosa</i> subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916.....	93
4.2.	Estudo das características antagônicas de <i>Trichoderma</i> spp a diferentes subgrupos de <i>M. perniciosa</i> .....	95
4.2.1.	Avaliação da metodologia proposta para análise das capacidades de micoparasitismo e antibiose de isolados de <i>Trichoderma</i> spp a diferentes subgrupos de <i>M. perniciosa</i> pelo método da cultura pareada.....	95
4.2.2.	Antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp a diferentes subgrupos de <i>M. perniciosa</i> pelo método da cultura pareada.....	96
4.2.3.	Potencial de Antibiose (%PAT) de isolados de <i>Trichoderma</i> spp <i>in vitro</i> sobre <i>M. perniciosa</i> subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916.....	119
4.2.4.	Potencial de micoparasitismo (%PM) de <i>Trichoderma</i> spp sobre <i>M. perniciosa</i> subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916.....	126
4.3.	Produção de Esporos em Arroz como substrato (PEA), Produtividade de Esporos (PPE) e Potencial de Produtividade de Esporos (%PPE) por <i>Trichoderma</i> spp.....	134
4.4.	Potencial de isolados de <i>Trichoderma</i> spp para uso no Controle Biológico (%PCB) de <i>M. perniciosa</i> subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916.....	137

4.5.	Potencial de antibiose de isolados de <i>Trichoderma</i> spp aos diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> por metabólitos não voláteis e voláteis e antibiose de <i>M. pernicioso</i> 1445 a <i>T. virens</i> 2007 por metabólitos não voláteis.....	143
4.5.1.	Potencial de antibiose de isolados de <i>Trichoderma</i> spp aos diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> por metabólitos não voláteis (AMNV).....	143
4.5.2.	Potencial de antibiose de <i>M. pernicioso</i> 1445 a <i>T. virens</i> 2007 por metabólitos não voláteis.....	144
4.5.3.	Potencial de antibiose de isolados de <i>Trichoderma</i> spp aos diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> por metabólitos voláteis (AMV)- Técnica da placa invertida.....	145
4.6.	Caracterização do mecanismo antagônico de <i>Trichoderma</i> spp aos diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> por enzimas hidrolíticas.....	149
4.6.1.	Enzimas hidrolíticas produzidas por isolados de <i>Trichoderma</i> spp em substratos específicos.....	149
4.6.2.	Enzimas hidrolíticas produzidas por isolados de <i>Trichoderma</i> spp em substratos contendo micélio seco dos diferentes subgrupos de <i>M. pernicioso</i> como única fonte de carbono.....	156
4.7.	Crescimento e esporulação de isolados de <i>Trichoderma</i> spp sobre vassouras de bruxa esterilizadas e vassouras de bruxa infectadas por diferentes isolados de <i>M. pernicioso</i> .....	175
<b>5.0.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>186</b>
<b>6.0</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>188</b>
<b>7.0.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>189</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L) é uma planta pertencente à família *Malvaceae*, provavelmente originada na Bacia Amazônica e cultivada nas regiões tropicais do mundo. O interesse no cultivo desta espécie está no aproveitamento de suas sementes (amêndoas) para produção de manteiga de cacau e chocolate.

A importância sócio-econômica do cultivo de cacau é muito grande para os países produtores, em particular para o Brasil, onde esta cultura marcou época na economia brasileira, sendo uma das principais fontes geradoras de divisas na década de 70, quando quase 90% da produção eram destinadas à exportação (BASTOS, 1987). Neste período, as principais regiões produtoras se localizavam nos estados da Amazônia e Bahia, sendo este último responsável por cerca de 80% da produção nacional. Mas a partir de 1997, o Brasil passou a importar o produto, sendo que em 2000 foram importadas 71.000 toneladas de amêndoas de cacau (COMPANHIA DAS DOCAS DO ESTADO DA BAHIA, 2002). Um dos principais fatores que desencadearam a queda da produção de cacau foi a introdução do patógeno causador da doença vassoura de bruxa, causada pelo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* Stahel (Singer) na Bahia.

*Moniliophthora perniciosa* Stahel (Singer) infecta principalmente frutos novos nas regiões meristemáticas das plantas, lançamentos e almofadas florais, ocasionando queda acentuada na produção e enfraquecimento geral da planta. Atualmente, a doença constitui-se no maior problema fitopatológico das regiões produtoras de cacau do Continente Americano,



atingindo, no Brasil, os cacauais da Amazônia (Pará, Rondônia, Amazonas, Mato Grosso e Acre) e especialmente os do estado da Bahia, a maior região produtora de cacau do Brasil.

A enfermidade foi detectada no sul da Bahia em 1989 (PEREIRA et al., 1990), restrita em dois municípios, mas hoje se encontra espalhada em todos os 600.000 ha. de cultivo, ocasionando queda na produção de aproximadamente 60%.

A diminuição da produção associada aos baixos preços do produto praticados no mercado internacional fez com que as divisas geradas com a cultura diminuíssem, nestes últimos 11 anos, de US\$ 700 milhões/ano para cerca de US\$ 260 milhões. Além do impacto econômico, destaca-se ainda a crise social, visto que a cultura do cacau gera uma grande quantidade de empregos diretos e indiretos, afetando cerca de três milhões de pessoas que habitam, aproximadamente, 90 km<sup>2</sup> do sul da Bahia.

Várias técnicas são utilizadas de forma integrada no controle dessa doença, como a poda sanitária de ramos infectados do cacauzeiro, a utilização de genótipos de cacauzeiros resistentes e uso de defensivos químicos. Tais práticas, entretanto, resultam em aumento do custo de produção e, em razão disso, tornam-se, com frequência, antieconômicas.

As vassouras secas, acumuladas no chão após a poda fitossanitária, tornam-se focos de disseminação na época das chuvas, uma vez que o patógeno entra em seu ciclo sexuado formando os basidiocarpos que liberam esporos. Entretanto, a remoção manual dos vassoureiros encarece demais o produto e a coleta mecânica torna-se impossível, uma vez que máquinas não entram nas plantações. Desta forma, técnicas de controle biológico que visam o favorecimento da conservação e do uso sustentável dos recursos biológicos, empregam pulverizações de esporos do fungo *Trichoderma* spp sobre as vassouras secas, com o objetivo de acelerar a decomposição deste material infectado.

Atualmente, esporos de *Trichoderma stromaticum* são produzidos para biocontrole da vassoura de bruxa, entretanto, apesar deste fungo ter bom crescimento em campo, não apresenta boa produtividade em larga escala.

Assim, este trabalho teve como objetivos:

1. Avaliar *in vitro* as características de crescimento de diferentes espécies e isolados da mesma espécie de *Trichoderma* spp e de diferentes subgrupos genéticos de *M. pernicioso*.
2. Determinar o potencial de produção massal de esporos por *Trichoderma* spp por grama de substrato seco (arroz).
3. Avaliar e comparar *in vitro* as capacidades de micoparasitismo e antibiose de *Trichoderma* spp frente a diferentes subgrupos genéticos de *M. pernicioso*.

4. Caracterizar parcialmente o mecanismo de antibiose de *Trichoderma* spp a *M. pernicioso* por metabólitos voláteis e não voláteis e de micoparasitismo pela produção de enzimas hidrolíticas.

5. Avaliar a capacidade de colonização de vassouras esterilizadas e infectadas por diferentes subgrupos genéticos de *M. pernicioso* por *Trichoderma* spp.

Os resultados dos experimentos aqui apresentados visam contribuir para maior conhecimento da interação entre o fungo *Trichoderma* spp e *M. pernicioso*, além de possibilitar a utilização de outras espécies no controle desta doença.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. O CACAUEIRO

#### 2.1.1. Características Gerais

O *Theobroma cacao* L. é uma planta diplóide, dicotiledônea e preferencialmente alógama, típica de clima tropical e nativa da região de floresta úmida da América, onde vegeta no sub-bosque (CHEESMAN, 1944) e possui grande diversidade nas populações selvagens que vão desde a Amazônia Brasileira ao México (SOUNIGO et al., 2003).

Anteriormente classificada como da família *Sterculiaceae*, hoje reclassificada como *Malvaceae*, *Theobroma* é o gênero de maior importância, devido à relevância econômica do cacaueteiro (*T. cacao*), possuindo 22 espécies, distribuídas em 6 seções, tendo o Brasil representantes de todas elas, com exceção da seção *Andropetalum*. As espécies de ocorrência brasileira (*T. grandiflorum*, *T. obovatum*, *T. subincanum*, *T. speciosum*, *T. sylvestre*, *T. microcarpum*, *T. bicolor*, *T. cacao*, *T. glaucum* e *T. canumanense*) restringem-se à Amazônia. No Brasil *T. glaucum* ocorre, esporadicamente, no oeste da Amazônia, próximo da fronteira com Peru e Colômbia, e a existência de *T. canumanense* baseia-se na descrição de duas exsiccatas coletadas próximo ao rio Canumão, no município de Borba (AM), (CUATRECASAS, 1964).

O cacaeiro (Figura 1) é uma planta perene, uma vez que seu ciclo produtivo pode ultrapassar 100 anos, sendo o ciclo ideal em torno de 35 anos, com início da produção econômica a partir dos seis anos após o plantio (SUFRAMA, 2005).



**Figura 1-** Vista parcial de um cacaeiro, com destaque em seus frutos. Fonte: CEPEC-CEPLAC (<http://www.ceplac.gov.br/radar/cacau.htm>)

O fruto do cacaeiro apresenta pericarpo carnoso composto por três partes distintas: o epicarpo que é carnoso e espesso, cujo extrato epidérmico exterior pode estar pigmentado; o mesocarpo que é delgado e duro, mais ou menos lignificado; e o endocarpo, que é carnoso e mais ou menos espesso (SILVA NETO, 2001).

A semente do cacau apresenta formato ora elipsóide, ora ovóide, com 2 a 3 cm de comprimento e recoberta por uma polpa mucilaginosa branca, de sabor açucarado e ácido. São muito sensíveis às mudanças de temperatura e situações de desidratação, sendo que suas amêndoas representam a principal matéria prima para a indústria de chocolate, também na utilização da manteiga de cacau, polpas, geléias, dentre outros produtos (SUFRAMA, 2005).

As principais regiões produtoras de cacau no mundo situam-se entre 15° N e 20° S de latitude, embora existam pequenas áreas de produção em latitudes subtropical (23° S), como é o caso do Estado de São Paulo. A maior concentração de plantios, no entanto, está localizada entre as latitudes de 10° acima e abaixo do Equador (ALVIM e KOZLOWSKY, 1977). Nos locais de maior concentração de plantios, a temperatura média situa-se em torno de 22 a 25° C

e a precipitação pluvial é elevada e bem distribuída ao longo do ano, algo em torno de 1200 a 2000 mm, com um mínimo mensal variando entre 100 a 130 mm.

O continente africano é responsável por 72,4% da produção mundial de cacau, concentrada principalmente na Costa do Marfim (56%). O Brasil atualmente está em quinto lugar no mundo, com 165.000 ton. (4,7%) (QUARTERLY BULLETIN OF COCOA STATISTICS, 2004/ 05); na década de 70, era o segundo maior produtor mundial de cacau. Segundo o levantamento sistemático desta produção brasileira (setembro de 2005), a Bahia contribui com 65,5%, seguida por Pará (18,3%) Rondônia (9,7%), Espírito Santo (5,8%), Amazonas (0,6%) e Mato Grosso (0,1%) (IBGE, 2005).

Na Bahia, o cacauzeiro foi introduzido pelo colono francês Luiz Frederico Warneaux no ano de 1746, através de sementes da variedade comum, trazidas do Pará e no município de Canavieiras (VELLO e GARCIA, 1971). Atualmente, esta variedade se encontra concentrada nas microregiões de Itabuna, Ilhéus e Camacã, contribuindo com 83% da oferta brasileira. Em proporções menores estão o estado do Pará com 9,9% e Rondônia participando com 5,4% (Figura 2).

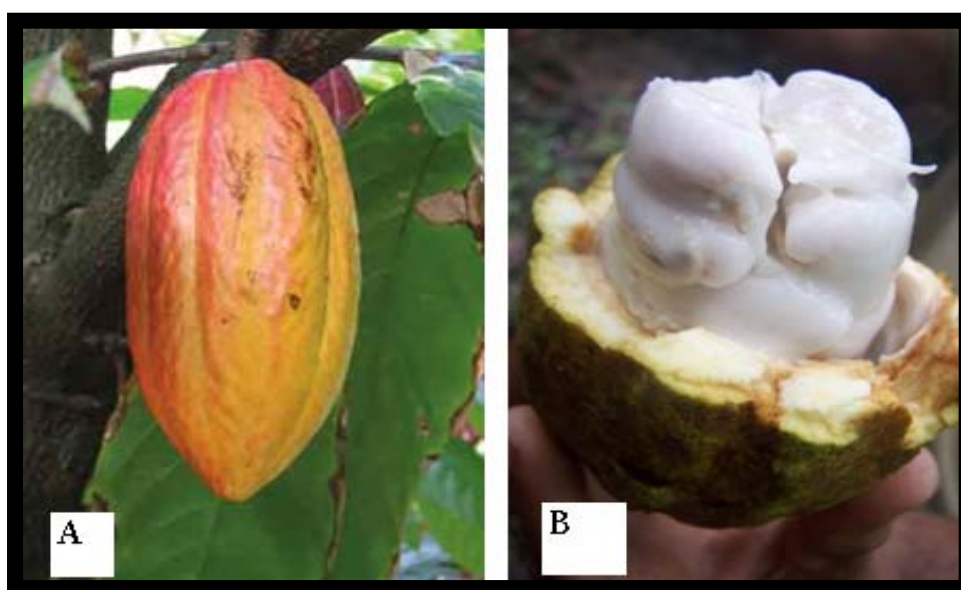


Figura 2- **Regiões produtoras de cacau no Brasil destacadas com a cor verde.** Fonte: CEPEC-CEPLAC

(<http://www.ceplac.gov.br/radar/cacau.htm>)

### 2.1.2. Importância econômica

Dos frutos do cacaveiro (Figura 3A) se extraem sementes (Figura 3B) que, após sofrerem fermentação, transformam-se em amêndoas (Figura 4A), das quais são produzidos o cacau em pó (Figura 4B) e a manteiga de cacau (Figura 4C). Em fase posterior do processamento, obtém-se o chocolate (Figura 4D), produto alimentício de alto valor energético, licores (Figura 4E) e produtos cosméticos (Figura 4F). Envolvendo as sementes, encontra-se grande volume de polpa mucilaginosa, branca e açucarada, com a qual se produzem sucos (Figura 4G), geléias (Figura 4H) e medicamentos (Figura 4I). Da casca extrai-se a pectina, que após simples processamento mecânico, se transforma em ração animal, ou ainda, por transformações biológicas, pode ser usada como fertilizante orgânico. Outros produtos são ainda manufacturados do cacau, tais como mel, néctar, geleiado, polpa, vinagre e destilados (CEPEC/CEPLAC).



**Figura 3-** Fruto do cacau (A); sementes do cacau (B). Fonte: CEPEC/CEPLAC (<http://www.ceplac.gov.br/radar/cacau.htm>)



**Figura 4** – Produtos do cacau: (A) amêndoas, (B) cacau em pó, (C) manteiga de cacau, (D) chocolate, (E) licores, (F) cosméticos, (G) polpa, (H) geléia e (I) suplementos.

Fonte: CEPEC/CEPLAC (<http://www.ceplac.gov.br/radar/cacau.htm>)

A produção de cacau no Brasil, principalmente na região Sul da Bahia, teve um papel importante no desenvolvimento regional, trazendo empregos e colocando o país em destaque no cenário econômico internacional (SOUZA e DIAS, 2001). A produção da Bahia já chegou próxima a 400 mil toneladas na década de 80, dominando 95% da produção nacional. Vivenciou uma queda abrupta de 68% entre as safras de 1980/81 e 1999/00, atingindo o menor volume dos últimos anos, em torno de 96.000 toneladas, tendo como principal fato desencadeador a contaminação das plantações da região com o fungo *M. perniciosa*, causador da doença vassoura de bruxa. Esta devastou a região e fez com que muitos agricultores abandonassem suas fazendas, provocando migrações de pessoas da zona rural para a zona urbana, o que afetou, por conseguinte, o cenário geográfico das cidades devido à formação de

favelas em suas imediações. Acrescenta-se a essa crise, a baixa nos preços internacionais do cacau e a má distribuição das chuvas, provocando cerca de 200 mil desempregos (TREVIZAN, 1996).

Na safra de 2003/04 foram produzidas 114.195 toneladas de amêndoas de cacau tendo sido projetada uma meta de produção de 340 mil toneladas a partir de 2013, de acordo com a Secretaria de Agricultura do Estado da Bahia (SEAGRI, 2005). Hoje a Bahia, além de ainda ser o maior estado produtor de cacau, abriga 95% das empresas moageiras no Brasil, responsáveis pelo processamento das amêndoas secas para obtenção dos derivados como manteiga, licor, torta e o pó de cacau.

### **2.1.3 Principais doenças do cacauero**

Estima-se que, em média, 20% da produção mundial do cacau sejam perdas, anualmente, pela incidência de doenças (PAULIN e ESKES, 1995).

Para cada região produtora existe uma doença de maior importância econômica, haja vista, a presença da vassoura de bruxa (*Moniliophthora perniciosa*) na Bahia, Brasil, e também na Amazônia brasileira. A podridão parda (*Phytophthora palmivora*) é outra doença que, apesar de não ser tão danosa quanto à vassoura de bruxa, se encontra disseminada por todas as áreas que produzem cacau no mundo, enquanto que a vassoura de bruxa está restrita às Américas. A monilíase (*Monilia roleri*), outra temível doença que ataca os frutos, ocorre em toda a América do Sul, exceto no Brasil. A VSD ("vascular streak dieback" ou morte descendente), causada pelo fungo *Oncobasidium theobromae*, é a principal doença da Malásia (SILVA, 1985).

Além dessas, existem outras doenças de menor importância, como o mal rosado por *Phanerochaete salmonicolor*, a murcha por *Verticillium dahliae*, a antracnose por *Glomerella cingulata*, o cancro e a podridão das raízes, dentre outras. As últimas duas doenças são causadas por um complexo de patógenos, porém, neste contexto, os principais são *Phytophthora sp.* e *Rosellinia sp.*, respectivamente.

## **2.2. Vassoura de bruxa do cacauero**

### **2.2.1. A vassoura de bruxa no Brasil**



Os cacauzeiros da Bahia se desenvolveram e permaneceram isentos de *M. pernicioso* até o final da década de 80. No Brasil todos os registros e informações disponíveis dos órgãos encarregados da defesa fitossanitária vegetal indicavam que a vassoura de bruxa estava presente somente na Região Amazônica – seu local de origem (MAKI, 2006), onde já foram registradas perdas superiores a 70% da produção (ALBUQUERQUE et al., 1995).

A cacauicultura amazônica, entretanto, convive muito bem com a vassoura de bruxa, cuja época de dispersão não coincide com a época de floração do cacauzeiro amazônico (ao contrário do cacauzeiro baiano, onde há esta coincidência), possibilitando aos produtores amazônicos incorrerem em custos médios de produção bem inferiores aos experimentados em outras regiões do país.

O patógeno foi detectado pela primeira vez no Sul da Bahia em 1989, região responsável por aproximadamente 85% da produção nacional de cacau da época (PEREIRA et al., 1990). Nesta região a devastação foi pior do que em qualquer outra região atacada pela vassoura de bruxa, devido principalmente à alta densidade de fazendas de cacau na região, às condições climáticas propícias ao desenvolvimento de epidemias e à presença de variedades suscetíveis (GRIFFITH, 2004).

Segundo Pereira et al. (1990) a introdução do *M. pernicioso* na Bahia ocorreu por intermédio da ação humana, pelo movimento de mudas infectadas vindas da Região Amazônica, uma vez que a viabilidade dos basidiósporos do patógeno não ultrapassa poucas horas. Em contrapartida, Evans e Barreto (1996) sugeriram que a introdução da vassoura de bruxa na Bahia foi originada por solanáceas nativas. Além dessas introduções, outro agravante é a presença de *M. pernicioso* em outros hospedeiros considerados alternativos para a proliferação da doença.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) classifica *M. pernicioso* como A2, ou seja, de distribuição restrita a alguns Estados Brasileiros e que está sob controle da Legislação Fitossanitária Brasileira, segundo Instrução Normativa 38, de 26/10/1999. Através de Atos, Resoluções, Portarias, Instruções Normativas e Leis, o MAPA tem estabelecido exigências quanto à importação, exportação e controle de qualidade de cacau e seus derivados, não só no transporte internacional, mas também, no interestadual e intermunicipal (FREITAS e MENDES, 2005).

### **2.2.2. Agente etiológico**

O fungo *Moniliophthora perniciosa*, anteriormente denominado *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer é o agente etiológico da doença vassoura de bruxa, que tem provocado trágicas perdas em cacau. Pertence à divisão Eumycota, subdivisão Basidiomycotina, ordem Agaricales e família Tricholomataceae (EVANS, 1978), primeiramente nomeado como *Marasmius perniciosus*, em 1915 por Stahel, sendo posteriormente reclassificado por Singer em 1942 como *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer (SINGER, 1942) sendo recentemente renomeado como *Moniliophthora perniciosa* (AIME e PHILLIPS-MORA, 2005).

De acordo com o hospedeiro os isolados de *M. perniciosa* podem ser classificados em biotipos, incluindo o biotipo C, patogênico ao cacau e a outras espécies de *Theobroma* e *Herrania*; o biotipo S quando afetam inúmeras espécies de *Solanaceae* (BASTOS e EVANS, 1985); o biotipo B quando são isolados de *Bixa orellana* (urucum) (BASTOS e ANDEBEHAN, 1986); o biotipo L quando isolados de lianas, geralmente assintomáticos (GRIFFITH e HEDGER, 1994) e o biotipo H isolado de *Heteropterys acutifolia* (RESENDE et al., 2000).

### 2.2.3. Ciclo de vida de *M. perniciosa* no cacau

O ciclo de vida de *M. perniciosa* (Figura 5-1) é comparável em muitos aspectos com de outros basidiomicetos, em que dois núcleos dentro do basídio sofrem cariogamia seguida de meiose e migração dos núcleos haplóides aos quatro basidiósporos (ALEXOPOULOS et al., 1996), sendo os basidiósporos a única forma infectiva da doença (ROCHA e WHEELER, 1985).

Em lamelas médias localizadas na parte inferior do píleo do basidioma são produzidos os basidiósporos, externamente às estruturas que produzem esporos, o basídio, e são subdivididas em dois grandes grupos: homobasidiomicetos e heterobasidiomicetos. *M. perniciosa* pertence ao grupo dos homobasidiomicetos, por apresentar a produção de basidiósporos em basídios, na superfície de membranas, que se desenvolvem em um basidiocarpo visível (NIELLA, 2000). Os basidiósporos são unicelulares, hialinos, com parede fina, medindo cerca de 12 µm x 6 µm (BAKER e CROWDY, 1943), são descarregados geralmente entre 18:00 h e 6:00 h, pois são suscetíveis à luz ultravioleta e ao dessecamento. Podem ser produzidos 1500 a 4000 basidiósporos/ pico de liberação (CROP PROTECTION COMPENDIUM, 2002).

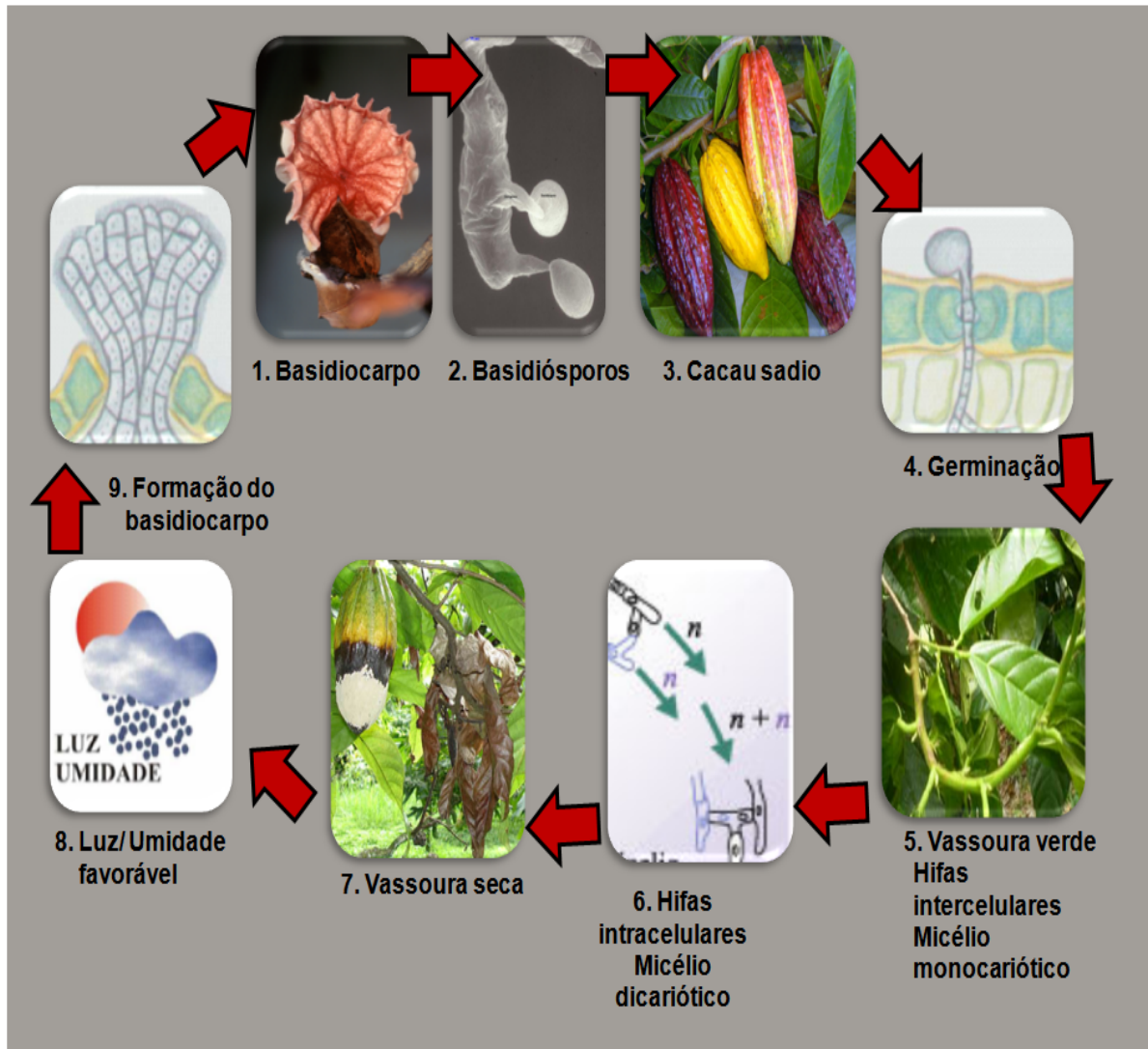
Para que haja infecção é preciso que os basidiósporos (Figura 5-2) sejam depositados sobre regiões meristemáticas (gemas vegetativas, florais e/ou frutos em formação até os três

meses de idade), onde penetram diretamente ou através dos estômatos. Nas gemas dormentes, a infecção torna-se latente, assumindo o aspecto de pequenos cancrs ou pontos necróticos que entram em atividade quando a planta reinicia a brotação. Essas infecções latentes têm importância epidemiológica, pois permitem a sobrevivência do fungo entre os períodos sucessivos de crescimento (lançamentos foliares) e de frutificação (safra) da planta (LUZ et al., 1997). A disseminação dos esporos a grande distância é feita pelo vento e a pequena, pela água de chuva. Outra via de disseminação é o transporte de mudas e sementes presentes em frutos infectados, vassouras localizadas na copa, as principais fontes de inóculo segundo Alves (2002). Estudos efetuados na Bahia mostram que os casqueiros também são importantes fontes de inóculo (NIELLA, 1997).

Os basidiósporos de *M. perniciosus* infectam os tecidos meristemáticos do cacauzeiro, tais como gemas vegetativas, frutos, brotos e almofadas florais (EVANS, 1981) (Figura 5-3), e germinam formando um micélio primário (monocariótico) entre as células (micélio intercelular) (Figura 5-4). Nessa fase, denominada parasítica ou biotrófica, o fungo se localiza entre as células do tecido infectado, o qual permanece vivo e apresenta nítidos sintomas de hiperplasia e hipertrofia. Nessa fase o tecido infectado é denominado de vassoura verde e permanece assim por alguns dias (Figura 5-5).

A partir de um determinado momento, por razões ainda desconhecidas as hifas originam clamidósporos que germinam e formam hifas com grampos de conexão e células binucleadas, as quais vão dar origem ao basidiocarpo. Este micélio sapróbio pode ser isolado em meio de cultura, mas, não infecta o hospedeiro (RUDGARD et al., 1993) (Figura 5-6). Na fase sapróbia, o tecido do hospedeiro torna-se necrosado (EVANS, 1980). A morfologia do ramo infectado pelo fungo guarda semelhança com a forma de uma vassoura, surgindo assim o nome popular de vassoura de bruxa ou vassoura seca (EVANS, 1980) (Figura 5-7). Existem duas hipóteses para a morte da vassoura: a primeira seria que as células morreriam em consequência da infecção primária, induzindo a dicarionização do fungo e, assim, à fase sapróbia (ORCHARD et al., 1994), ou como sugerido por Evans (1980), a dicarionização ocorreria primeiro, resultando na fase sapróbia, e, posteriormente, na morte da vassoura.

O fungo sobrevive sob frutos, folhas e vassouras secas até encontrar condições favoráveis (Figura 5-8) para a produção de basidiocarpos, a qual é favorecida pela ocorrência de dias chuvosos seguidos por dias secos, ou vice-versa. Em regiões com chuvas bem distribuídas, como na Bahia, a produção de basidiocarpos (Figura 5-9) é durante o ano inteiro. A produção de basidiocarpos é maior nas partes jovens da planta (ápice) do que no solo (pouca chance de serem disseminados) (PRIA e CAMARGO, 1997).



**Figura 5-** Ciclo de vida de *M. pernicioso* em *Theobroma cacao*. Fonte: CEPEC/CEPLAC (<http://www.ceplac.gov.br/radar/cacau.htm>)

Segundo estudos de Luz et al. (1994), as diferentes fases do ciclo vital de *M. pernicioso* apresentam, em média, os seguintes períodos: incubação de quatro semanas; aparecimento de vassouras verdes e o seu secamento de sete semanas e meia; dormência das vassouras secas de 13 semanas, podendo variar para mais ou para menos, dependendo do tamanho e da localização da vassoura; atividade da vassoura seca de 22 meses; atividade do fruto mumificado de 24 meses e liberação de esporos durante todo ano (na Bahia), na dependência de chuvas, com picos maiores nos meses mais frios (julho, agosto e setembro) e menores variando de época, de ano para ano (ALMEIDA e LUZ, 1995).

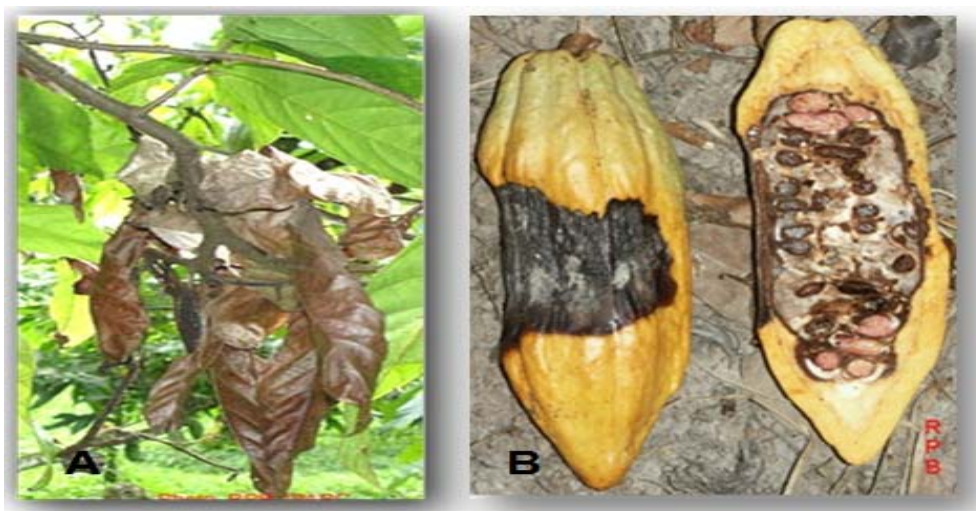
#### 2.2.4. Sintomas da vassoura de bruxa

A vassoura de bruxa tem como sintoma característico, a formação dos brotos hipertrofiados, desenvolvimento excessivo nas regiões terminais da planta, aparecimento de inúmeras ramificações com entre nó curtos (Figura 6) e folhas geralmente grandes, curvadas ou retorcidas, aparentando vassouras (Figura 7A).

No início, o desenvolvimento das vassouras é rápido, porém depois de 5-12 semanas começam a secar (WHEELER e MEPSTED, 1988), podendo cair ou permanecer na planta.



**Figura 6-** Sintomatologia da vassoura de bruxa: brotação hipertrofiada. Fonte: CEPEC/CEPLAC (<http://www.ceplac.gov.br/radar/cacau.htm>)



**Figura 7-** Cacaueiro infectado por *M. pernicioso* com folhas aparentando vassouras secas (A) e frutos apodrecidos ou endurecidos e petrificados (B). Fonte: CEPEC/CEPLAC (<http://www.ceplac.gov.br/radar/cacau.htm>)

### 2.2.5. Principais métodos de controle da doença

### **2.2.5.1. Poda fitossanitária**

A eficácia da poda fitossanitária no controle da vassoura de bruxa já foi demonstrada (ALMEIDA e ANDEBRHAN, 1989). A remoção sistemática das partes infectadas pelo fungo (vassouras, frutos e almofadas florais), com queima ou cobertura dessas partes com folhas, impede a formação de basidiomas e constitui a poda fitossanitária. Esta prática tem grande eficiência no controle da doença e é realizada na Amazônia durante a estação seca, com repasse no início do período chuvoso. Na região cacauceira da Bahia, onde os maiores picos da doença ocorrem em setembro e outubro, são recomendadas quatro remoções por ano: fevereiro, maio, agosto e novembro, atendendo a estratégia de manter a infecção em níveis controláveis (LUZ et al., 1997). Todavia, a recuperação dos cacauais podados é lenta e gradual; a produção e o nível de perdas serão estabilizados somente a partir do terceiro ano após a poda. Até a estabilização da produção e a queda na incidência da doença, são necessários investimentos por parte do cacauicultor, pois os custos com mão-de-obra serão altos e o fluxo de receita só se restabelecerá a partir do terceiro ou quarto ano. Em áreas menores que 3 a 5 ha., o produtor pode realizar essa prática, utilizando-se da mão-de-obra familiar.

### **2.2.5.2. Utilização de genótipos resistentes**

Quanto ao uso de resistência genética como fonte de controle, vários esforços foram realizados. No passado, o grande número de progênies e indivíduos envolvidos no melhoramento e a ênfase à 'imunidade', não permitiram análises criteriosas da resistência ao patógeno e vários genótipos com características de tolerância foram perdidos. Atualmente, as dificuldades no controle da variabilidade genética do patógeno e o pouco entendimento das interações com o hospedeiro, são as principais limitações para identificação de variedades para o melhoramento visando à resistência (ANDEBRHAN et al., 1998).

O Brasil tem a maior coleção de germoplasma de cacau estabelecido na Estação de Recursos Genéticos do Cacauceiro, em Marituba (PA), e a identificação de genótipos resistentes tem sido dificultada por vários fatores. *M. perniciosa* multiplica-se, no entanto, unicamente por meio de basidiósporos que, por sua vez, possuem vida média de poucas horas (BAKER e CROWDY, 1943). A grande maioria dos fungos não se enquadra no modelo clássico de genética de população. Eles possuem variados métodos de colonização, dispersão, sobrevivência e suas populações podem se sobrepor ao longo do tempo. Com isso, a análise

genética de isolados do fungo recém coletados pode refletir, com alta fidelidade, a variabilidade genética da população naquele momento (ANDERSON e KOHN, 1998).

Um modo para identificação de genótipos de cacau resistentes a *M. pernicioso* pode ser por meio da germinação de esporos na seiva extraída de diferentes genótipos de cacau. Bastos e Albuquerque (2000) verificaram que a seiva de clones resistentes inibiu a germinação dos esporos, enquanto a seiva de plantas susceptíveis não teve efeito inibitório. Nas últimas duas décadas houve esforços no sentido de controlar a doença ou reduzi-la a níveis aceitáveis. As medidas de controle utilizadas até o momento não têm alcançado resultados satisfatórios, principalmente, devido à alta variabilidade do patógeno e às condições ambientais, o que inviabiliza e dificulta a obtenção de cultivares resistentes, além do desenvolvimento de variedades de cacauzeiros resistentes ao patógeno (GRIFFITH et al., 1994).

Atualmente, jardins clonais, com plantas resistentes a *M. pernicioso*, têm sido implantados em várias áreas de produção de cacau, sendo dessa forma um início da reestruturação da cacauicultura na Bahia. Tendo em vista que esta resistência pode ser quebrada pelo patógeno, entretanto, estudos para melhor entendimento deste patossistema devem ser mantidos. Neste contexto, o melhor conhecimento da variabilidade genética de *M. pernicioso* poderia permitir o melhor entendimento da interação entre este patógeno e as diferentes espécies hospedeiras, bem como o desenvolvimento de estratégias de controle deste fungo.

### 2.2.5.3 - Controle químico

O controle químico da vassoura de bruxa com fungicidas de contato não é suficiente, pois estes não protegem os tecidos em crescimento ativo, necessitando inúmeras pulverizações (CRONSHAW, 1979). Embora fungicidas sistêmicos pudessem restringir o número de aplicações necessárias, a maioria tem demonstrado eficiência somente em testes *in vitro* não apresentando esta repetibilidade no campo. O tebuconazole tem demonstrado eficiência no controle de *M. pernicioso in vitro* e no campo, porém o seu uso apresenta limitações devido ao alto custo do produto comercial (TOVAR, 1991).

Almeida et al. (1998) testaram o efeito da poda fitossanitária associada à aplicação de óxido cuproso na concentração de 3,6 a 9g de ia/planta/aplicação. Foi observado que o cobre controlou as infecções eficazmente em frutos, mas não em gemas vegetais ou almofadas florais. Foi verificado ainda, que a aplicação deste produto não foi viável economicamente em

todas as áreas tratadas. A aplicação do óxido cuproso, fungicida de contato, juntamente com o fungicida sistêmico triadimenol (Bayfidan) mostrou um bom controle da doença durante o período de aplicação (PEREIRA et al., 1996). Também, Bastos e Medeiros (1979) avaliaram *in vitro* a ação de 41 fungicidas nas concentrações de 10, 50 e 100 ppm sobre o crescimento de *M. pernicioso*. Dos 12 fungicidas sistêmicos, entretanto, somente Bayleton foi eficaz a 10 ppm. Os fungicidas cúpricos foram eficientes nas concentrações de 50 e 100 ppm.

Vários compostos químicos vêm sendo testados com o objetivo de prevenir ou erradicar a vassoura de bruxa, porém os resultados não têm sido satisfatórios, pois o rápido crescimento da superfície dos frutos durante os dois ou três meses de desenvolvimento, faz com que o fungicida tenha que ser aplicado frequentemente e isto é especialmente difícil em árvores muito altas (KRAUSS e SOBERANIS et al., 2000).

#### **2.2.5.4. Indução de resistência sistêmica adquirida (SAR)**

Outro método de controle é a indução na planta hospedeira de resistência sistêmica adquirida (SAR), este consiste em ativar o sistema de defesa da planta antes que ocorra a interação patógeno-hospedeiro. A SAR se desenvolve sistêmica ou de forma localizada em resposta a um patógeno que causa uma lesão necrotrófica, reação de hipersensibilidade (HR), ou por aplicação exógena de ácido salicílico (AS) ou compostos sintéticos como o benzotiadiazole (BHT) e o ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA). Neste caso, a resistência geralmente é efetiva contra um amplo espectro de patógenos e está associada à produção de proteínas relacionadas à patogenicidade (HAMMERSCHMIDT e SMITH-BECKER, 1999).

Resende et al. (2000) avaliaram a capacidade do benzotiadiazole em induzir SAR contra *M. pernicioso*, neste caso, foi verificada uma redução de 33,5 a 84,5% na incidência da doença, quando pulverizado a 3, 15 ou 30 dias antes da inoculação de plântulas de cacau do tipo Catongo. O efeito do BHT na proteção de mudas foi comparado ao efeito do óxido cuproso e tebuconazole. O BHT reduziu a incidência da doença em 60,2% indicando um melhor desempenho que o tebuconazole e tendência a superar o óxido cuproso.

#### **2.2.5.5. Controle Biológico**

O conceito de controle de doenças mudou nas últimas décadas. Anteriormente, o objetivo era eliminar completamente o patógeno com o uso indiscriminado e contínuo de produtos químicos, sem medir as conseqüências. Este procedimento provocou alterações



como a seleção de patógenos resistentes, ocorrência de surtos de doenças consideradas como secundárias e diminuição de microrganismos benéficos além de causar efeitos deletérios (nocivos) ao homem, aos animais e ao ambiente, através do acúmulo de resíduos no solo, na água e nos alimentos. Com isto, cada vez mais estudos vêm sendo realizados com o intuito de obter eficiente controle de fitopatógenos, com a utilização de produtos e técnicas alternativas e eficazes (GRIGOLETTI et al., 2000).

Assim, o interesse pelos programas de controle biológico de pragas tem crescido consideravelmente no mundo, em função do novo direcionamento internacional da produção agrícola em favorecer a conservação e o uso sustentável dos recursos biológicos, requisitos básicos da Convenção da Biodiversidade. Políticas internacionais demandam fortemente alternativas para os agrotóxicos, e a utilização de inimigos naturais de doenças é uma alternativa promissora (FUNDAG, 2004).

O controle biológico é definido como a redução do inóculo ou da atividade deletéria do patógeno com um ou mais organismos que não o homem, porém com a participação ativa deste último (COOK e BAKER, 1983). Costuma-se classificar o controle biológico sob dois aspectos: o natural, que mantém sem qualquer influência humana as criaturas em perfeito equilíbrio dentro de seus habitats; e o aplicado, que consiste na introdução e manipulação de inimigos naturais pelo homem (MELO, 1991). Formas vegetativas, conídios, blastósporos e clamidósporos podem ser utilizados como propágulos fúngicos infectivos para uso em controle biológico (NAHAR, 2004)

Os primeiros registros de pesquisas com o controle biológico da vassoura de bruxa do cacauero remontam ao final da década de 1970. Na oportunidade foram testados alguns microrganismos em condições de laboratório. Ainda no final da década de 1970 foi encontrado o primeiro microrganismo com algum potencial para o controle da doença, o fungo *Cladobotryum amazonense*, encontrado no Pará parasitando basidiocarpos de *Moniliophthora (M. perniciosa)*. Em ensaios, verificou-se que este antagonista era capaz de colonizar basidiocarpos do patógeno impedindo a produção de inóculo. Porém, este fungo é de difícil produção (BASTOS et al., 1981).

Optou-se então pelo uso do sobrenadante obtido com o cultivo desse antagonista, pois este já havia demonstrado ser ativo contra *M. perniciosa* e outros patógenos de outras culturas. O composto ativo foi identificado e demonstrou ser absorvido e translocado por mudas de cacauero (BASTOS, 1988b). Outro fungo com características semelhantes, *Verticillium lamellicola*, também foi detectado parasitando basidiocarpos de *M. perniciosa* e

também demonstrou produzir uma substância altamente antagônica ao patógeno (ANDEBRHAN, 1981).

Os resultados mais positivos na região cacauzeira até o momento têm sido verificados com a aplicação de formulações a base de esporos de fungos como *Trichoderma* e *Clonostachys*, considerados micoparasitas que apresentam o maior número de vantagens e, portanto, têm sido os mais estudados no controle biológico de enfermidades (MELO, 1996).

#### **2.2.5.6. Controle integrado**

Em 1957 foi criado pelo Governo Federal a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) com o objetivo de auxiliar os produtores de cacau no manejo das culturas. Desde que a doença começou a dizimar as culturas de cacau na Bahia, porém um dos objetivos da CEPLAC tornou-se o estudo e desenvolvimento de técnicas para controlar a doença.

Não há, entretanto, até a presente data, um controle químico eficiente e a proposta da CEPLAC consiste no manejo integrado contra a vassoura de bruxa e propõe: i) uso da poda fitossanitária para remover o material infectado; ii) aplicação de produtos químicos para proteção dos frutos em desenvolvimento; iii) utilização de genótipos com tolerância ao fungo; e iv) aplicação do fungicida biológico "Tricovab" (*Trichoderma stromaticum*) sobre o material removido e deixado no solo. Espera-se, com esse procedimento, reverter o quadro desolador criado por essa doença na referida região.

### **2.3. O uso de *Trichoderma* no controle da vassoura de bruxa do cacauzeiro**

As linhagens de *Trichoderma* pertencem ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Euascomycetes, Ordem Hypocreales, Família Hypocreaceae, e ainda que a classificação do gênero seja fácil, a identificação das espécies é complexa (CHET, 1987), existindo atualmente 75 espécies descritas por Samuels (1996). As espécies de *Trichoderma* são oportunistas, avirulentas e simbiotes de plantas, vivendo dentro de células superficiais das raízes. A descoberta de espécies de *Trichoderma* vivendo endofiticamente em troncos de árvores das espécies de *Theobroma* sugeriu a existência de uma inter-relação ainda não bem conhecida (HARMAN et al., 2004).

Representantes de *Trichoderma* podem ser facilmente reconhecidos em cultivos por seus característicos esporos verdes (JENSEN e WOLFFHECHEL, 1995), sendo as principais

características do gênero: conidióforos hialinos muito ramificados e não verticilados, fiálides individuais ou em grupo, conídios unicelulares hialinos, ovóides e nascidos de pequenos ramos terminais (BARNETT e HUNTER, 1999). Os conidióforos não são bem definidos e os conídios tendem a acumular-se dentro de massas pulvinadas (SAMUELS, 1996).

Como se espera de fungos sapróbios do solo, os representantes de *Trichoderma* utilizam variedade de compostos como fontes de carbono e nitrogênio. Os requerimentos de energia e carbono podem ser supridos por monossacarídeos e dissacarídeos (DANIELSON e DAVEY, 1973), polissacarídeos complexos, purinas, pirimidinas e aminoácidos (TYE e WILLETS, 1973), taninos condensados e catequinas (ARRIETA-ESCOBAR e BELIN, 1982).

São os fungos mais usados no controle de fitopatógenos devido a sua ubiquidade, à facilidade de cultivo e observação, seu crescimento rápido em um grande número de substratos e o fato de não serem patógenos de plantas superiores (PAPAVIZAS et al., 1982). Um grande número de cepas fúngicas de *Trichoderma* atua como agentes de controle biológico e cujas propriedades antagônicas se baseiam na ativação de mecanismos muito diversos, exercendo antagonismo a vários fitopatógenos através de parasitismo e/ou antibiose (KRUGNER e BACCHI, 1995), bem como, por hiperparasitismo (MELO, 1998).

A capacidade antagonística do *Trichoderma* foi descrita em meados do século XX (WEINDLING, 1932), porém só recentemente, com o interesse voltado para o controle biológico e o desenvolvimento da biotecnologia em agricultura, é que produtos comerciais vêm sendo desenvolvidos, a exemplo de F-Stop®, Tricodex® e Supravit®, à base de *T. harzianum*, registrados para uso em Israel no controle de doenças causadas por *Rhizoctonia* spp, *Pythium* spp, *Fusarium* spp, *Botrytis cinerea* e *Sclerotium rolfsii* (MELO, 1998), e Tricovab®, desenvolvido no Brasil a partir de *T. stromaticum*, disponibilizado pelo CEPEC para o controle da vassoura de bruxa do cacauero (OLIVEIRA e LUZ, 2005).

Segundo Hjorth et al. (2003) linhagens de *Trichoderma* causam aceleração e decomposição de vassouras mortas e tecidos de frutos infectados levando à redução da produção de basidiocarpos e conseqüente diminuição dos níveis de basidiósporos liberados. *Trichoderma stromaticum* tem sido mais estudado para o biocontrole da vassoura de bruxa do cacauero (SAMUELS et al., 2000; SANOGO et al., 2002; DE SOUZA et al., 2006; POMELLA et al., 2007), sendo também relatada a eficácia de *T. harzianum* (DE MARCO et al., 2000; AZEVEDO et al., 2000; DE MARCO e FELIX, 2002; DE MARCO et al., 2003; ANEJA et al., 2005), *Trichoderma ovalisporum* (HOLMES et al., 2004), *T. viride* (BASTOS, 1988a; 1996a; 1996b; 1996c; BASTOS e DIAS, 1992) e *Trichoderma polysporum* (COSTA et al., 1996).

Até o momento, *T. stromaticum* foi encontrado apenas na América Latina, em regiões cacaeiras do Brasil, Colômbia, Equador e Peru. No Brasil, *T. stromaticum* foi descoberto nos Estados do Pará, Rondônia e Bahia. Provavelmente o fungo é originário da região amazônica, mesmo centro de origem do cacau e de *M. perniciosa*, surge então a hipótese de que o mesmo evoluiu juntamente com o cacau e o patógeno, tornando-o um candidato com superior potencial para reduzir as perdas ocasionadas pela vassoura de bruxa (ANDERBRHAN, 1984).

Na região cacaeira da Bahia, utilizando o isolado de *T. stromaticum*, verificou-se inibição expressiva da produção de basidiomas de *C. perniciosa* em “vassoureiro” (COSTA e BEZERRA, 2000) e estudos realizados no campo em Marituba (PA) mostraram a ação do antagonista *T. stromaticum* reduzindo a infecção em ramos e almofadas florais e a formação de basidiomas nas vassouras deixadas tanto na copa quanto na serrapilheira dos cacauzeiros (BASTOS, 2000).

No momento, dentro do enfoque do controle biológico, já existe uma alternativa disponibilizada pelo CEPEC aos produtores da região cacaeira da Bahia, que é a utilização do produto Tricovab®, que foi desenvolvido a partir do fungo *T. stromaticum* Samuels e Pardo-Shultheiss (OLIVEIRA e LUZ, 2005). Atualmente o fungo é produzido em alta escala pela Unidade de Biocontrole do CEPEC na CEPLAC, em Itabuna, BA, sendo a aplicação do produto recomendada como parte do manejo integrado da vassoura-de-bruxa (BASTOS, 2008). Como atualmente a CEPLAC possui uma coleção de mais de 300 isolados de *T. stromaticum*, sendo a sua grande maioria constituída de organismos nativos, provavelmente mais adaptados à região cacaeira baiana, se continua buscando isolados nativos que tenham maior eficiência no controle de *M. perniciosa*.

#### **2.4. Mecanismos antagônicos de *Trichoderma* spp a fitopatógenos**

As interações interespecíficas entre fungos ajudam não só a explicar mudanças dentro da estrutura das comunidades fúngicas, mas também o contexto dentro do qual podem ser explorados fungos para controlar patógenos sob condições naturais ou semi-naturais (WIDDEN, 1997). Várias espécies de *Trichoderma* têm sido relatadas como efetivas no controle de doenças de plantas incluindo a vassoura de bruxa do cacauzeiro (KRAUSS e SOBERANIS, 2001).

Os mecanismos antagônicos exercidos por espécies de *Trichoderma* são complexos e o biocontrole obtido é o resultado final de mecanismos diferentes agindo sinergicamente

(HOWELL, 2003). Estes mecanismos envolvem competição por nutrientes e espaço como resultado da habilidade de *Trichoderma* em produzir e/ou resistir a metabólitos que ou impedem a germinação dos esporos (fungistase), ou mata as células (antibiose) ou modifica a rizosfera, como por exemplo, acidificando a terra, de forma que patógeno não pode crescer. O biocontrole também pode resultar de uma ação micoparasítica do agente biocontrolador sobre o patógeno, o qual envolve contato físico e liberação de enzimas hidrolíticas, compostos tóxicos e/ou antibióticos que agem sinergisticamente com as enzimas. *Trichoderma* spp também podem exercer papel de biofertilizantes aumentando o crescimento da planta e estimulando seus mecanismos de defesa (BENITEZ et al., 2004).

#### 2.4.1. Biocontrole por Competição

O fato das linhagens de *Trichoderma* apresentarem rápido crescimento, conídios persistentes e com boa germinação e utilizarem um amplo espectro de substratos, faz com que se tornem eficientes competidores por nutrientes e espaço com outros microrganismos na natureza (HJELJORD e TRONSMO, 1998). Além disto, são hábeis em produzir e/ou resistir a metabólitos que impedem a germinação de esporos, matam as células ou modificam a rizosfera. A deficiência de nutrientes é uma das principais causas de morte em microrganismos e a competição se torna importante para o biocontrole de fitopatógenos (BENITEZ et al., 2004).

No solo, *Trichoderma* tem elevada capacidade na mobilização de nutrientes quando comparado a outros organismos. Esta capacidade está baseada na sua habilidade de obter ATP do metabolismo de diferentes açúcares, como celulose, hemicelulose glucanas e quitina entre outros, tendo como produto final a glicose (CHET et al., 1997). Os componentes fundamentais do metabolismo da glicose incluem enzimas de assimilação e permeases, junto com proteínas envolvidas na membrana e modificações da parede celular (DELGADO-JARANA et al., 2003).

O mecanismo antagônico por competição de *T. stromaticum* a *M. pernicioso* já foi descrito por Bastos (2000), em que o antagonista elimina o patógeno por inanição, uma vez que compete por nutrientes e espaço. Outros estudos também revelam a capacidade de competição por nutrientes exercida por isolados de *Trichoderma* a diversos fitopatógenos (SIVAN e CHET et al., 1989a; KOHL e FOKKEMA, 1998; HARMAN, 2006; ABDEL-FATTAH et al., 2007; GALLETI et al., 2008).

## **2.4.2. Biofertilização e estimulação dos mecanismos de defesa da planta**

Alguns autores definiram as espécies de *Trichoderma* como simbioses de planta, organismos avirulentos oportunistas, capazes de colonizar raízes de plantas através de mecanismos semelhantes às micorrizas e produzir combinações que estimulam crescimento e mecanismos de defesa de planta (HARMAN et al., 2004; VITERBO et al., 2005).

### **2.4.2.1. Colonização das raízes de plantas**

As espécies de *Trichoderma* sempre são associadas com raízes de plantas e ecossistemas de raiz. Esta colonização implica na habilidade de aderir e reconhecer raízes de plantas, além de resistir a metabólitos tóxicos produzidos pela planta em resposta a invasão por um organismo, seja ele patógeno ou não. A interação planta x fungo micorrízico, é modulada por flavonóides produzidos pela planta e auxinas produzidas pelo fungo, seguida de eventos morfogênicos que incluem, por exemplo, o desenvolvimento de apressórios. Em adição, genes que codificam hidrofobinas e outras proteínas estruturais da parede celular são especificamente expressos e/ou regulados (FRANKEN et al., 2002).

Algumas espécies de *Trichoderma* estabelecem uma colonização duradoura com raízes de plantas penetrando em sua epiderme, onde produzem e secretam compostos que induzem uma resposta de resistência localizada ou sistêmica à invasão de outros microrganismos. A reação da planta a estes compostos resulta na síntese de fitoalexinas, flavonóides e terpenóides, derivados fenólicos e outros compostos de natureza antimicrobiana, constituindo-se em controle à invasão de outros organismos sensíveis. Espécies de *Trichoderma* são geralmente resistentes a estes compostos e a habilidade de colonizar raízes de plantas depende da capacidade de cada espécie em tolerar estes compostos (HARMAN et al., 2004).

### **2.4.2.2. Biofertilização**

A colonização de raízes de plantas por *Trichoderma* spp frequentemente aumenta o crescimento, desenvolvimento, produtividade, resistência a estresse ambiental e estimula a captação de nutrientes (ARORA et al., 1992). A produtividade em campo pode aumentar em 30% após a adição ao solo ou em sementes produzidas em estufas com esporos de *Trichoderma* (CHET et al., 1997). O mesmo foi observado quando sementes que estavam separadas de *Trichoderma* por uma membrana de celofane tinham sua taxa de germinação

aumentada indicando que *Trichoderma* produz fatores de crescimento (BENITEZ et al., 1998). Os relatos de espécies que produzem fatores de crescimento detectados e identificados em laboratório, porém, são poucos (auxinas, citoquinas e etileno (ARORA et al., 1992). Foi realizada, porém, a identificação de muitos fungos filamentosos que produzem fito-hormônios, como ácido indol acético (IAA) e etilenos, cujas rotas metabólicas foram identificadas. Além disto, foram também identificadas espécies de *Trichoderma* que produzem moléculas semelhantes à citoquina, que poderiam conduzir a maior biofertilização (OSIEWACZ, 2002).

Juntamente com a síntese ou estimulação da produção de fito-hormônios, muitas espécies de *Trichoderma* acidificam o solo pela secreção de ácidos orgânicos, como ácido glucônico, cítrico e fumárico (GÓMEZ-ALARCÓN e DE LA TORRE, 1994). Estes ácidos que resultam do metabolismo de outras fontes de carbono, principalmente glicose, permitem que fosfatos, micronutrientes e cátions minerais, manganês e magnésio sejam solubilizados (HERMOSA et al., 2000).

#### **2.4.3. Modificações na rizosfera**

Há dados abundantes na literatura que descrevem modificações da rizosfera por agentes biológicos utilizados em controle biológico de fitopatógenos, que impedem a colonização de plantas por patógenos através da liberação de antibióticos e metabólitos tóxicos produzidos (VEY et al., 2001).

O pH ambiental é um dos principais fatores que afetam a atividade de *Trichoderma* e os fatores de patogenicidade secretados por diferentes microrganismos. Alguns antibióticos são degradados em pH alto; baixa umidade do ar e baixo pH podem induzir degradação de enzimas através de proteases ácidas (DELGADO-JARANA et al., 2000; 2003); e o crescimento de muitos fungos é inibido por ácidos fracos, como ácido sórbico, devido a um rápido declínio do pH vacuolar e do citosol (ARST e PEÑALVA, 2003). Então, a habilidade de sobreviver em uma faixa diversa de pH se torna um componente importante do jogo complexo de características que *Trichoderma*, melhor adaptado a terra ácida, dispõe durante sua interação com outros organismos.

#### **2.4.4. Antibiose por produção de metabólitos e antibióticos**

Segundo Baker e Griffin (1995) a antibiose é definida como a condição pela qual ocorre inibição ou morte de um microrganismo pela produção metabólica de outro, incluindo enzimas hidrolíticas, metabólitos secundários voláteis e não voláteis e pequenas moléculas tóxicas. A antibiose acontece durante interações envolvendo compostos difusíveis de baixo peso molecular ou antibióticos produzidos por espécies de *Trichoderma*, que inibem o crescimento de outros microrganismos.

Muitas espécies de *Trichoderma* produzem metabólitos voláteis e não voláteis que impedem a colonização de outros microrganismos como, por exemplo, ácido harziânico, ácido pelargônico, alameticinas, tricolinas, peptobols, antibióticos, 6-pentil- $\alpha$ -pirona, massoilactona, viridinas, gliovirinas, glisopreninas e ácido heptelídico, entre outros (VEY et al., 2001).

A capacidade antagônica de um isolado, porém, alcança um nível elevado quando apresenta a combinação de enzimas hidrolíticas e antibióticos, quando comparado ao antagonismo de outro isolado que utiliza apenas um dos mecanismos (HOWELL, 1998; MONTE, 2001).

A exata correlação entre metabólitos produzidos em cultivos líquidos e a atividade biológica do solo não pode *a priori* ser afirmada, mas uma série de evidências, em alguns casos, mostra que esta correlação existe (WILLIAMS e VICKERS, 1986).

Muitas perguntas permanecem sem resposta quanto à natureza do metabólito antifúngico produzido por espécies de *Trichoderma* e seu papel no biocontrole. Estudos devem ser realizados no sentido das perspectivas de que estas substâncias apresentam para o desenvolvimento de melhores fungicidas além do conhecimento da ocorrência de ecotipos, uma vez que podem existir diferentes tipos químicos de *Trichoderma* dentro da mesma espécie, que podem conseqüentemente mostrar diferentes atividades antibióticas (BREWER et al., 1987).

#### **2.4.5. Antibiose por produção de enzimas hidrolíticas- Micoparasitismo**

Micoparasitismo é o ataque direto de um fungo a outro constituindo um processo muito complexo que envolve eventos subseqüentes, tais como reconhecimento, ataque e penetração e morte do patógeno (HARMAN et al., 2004), podendo, entretanto, se constituir em um simples atachamento e espoliação de nutrientes (WHIPPS, 1987).

*Trichoderma* spp pode exercer biocontrole por parasitismo (micoparasitismo) a uma série de fungos, os reconhecendo, crescendo em direção a eles e secretando enzimas



hidrolíticas que atuam na parede celular do hospedeiro, tais como quitinases, proteases, glucanases, entre outras. Durante o processo de micoparasitismo ocorre a destruição das estruturas celulares do microrganismo hospedeiro e a primeira barreira encontrada ao longo desse processo é a parede celular (CHET, 1990).

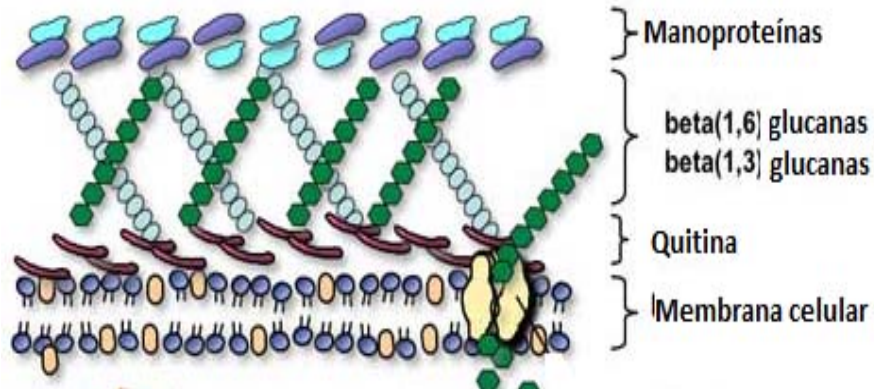
Nos fungos, tanto as células leveduriformes quanto o micélio estão envolvidos por uma camada protetora externa denominada de parede celular, quimicamente diferente da parede encontrada em vegetais, ainda que possa exercer os mesmos tipos de funções (MADIGAN et al., 2008).

A parede celular fúngica pode ser caracterizada como uma estrutura relativamente rígida, porém dinâmica, que participa de vários processos biológicos essenciais à célula e representando cerca de 60 a 90% do peso seco da célula (CHAUD e SGARBIERI, 2006). Ela determina o formato da célula, fornece suporte osmótico, proteção física, além de estar relacionada a eventos de sinalização celular, adesão e reprodução (MAGNELLI et al., 2005), sendo por isso necessária para o crescimento e desenvolvimento dos fungos nos ambientes onde são encontrados (DURAN e NOMBELA, 2004).

O crescimento micelial é dependente do processo de translocação, onde o material celular é direcionado para as regiões em desenvolvimento, permitindo a formação das estruturas celulares, como a parede, e com isso facilitando a ocupação dos ambientes pelo microrganismo (BOSWELL et al., 2003). Polissacarídeos bioativos isolados da parede celular fúngica têm sido caracterizados como homopolímeros, heteropolímeros ou, ainda, encontram-se ligados aos resíduos de proteínas formando complexos polissacarídeo-proteína (KIM et al., 2003). São divididos em dois grupos (Figura 8), os componentes estruturais sendo a quitina e glucanas os principais e os que compõem a matriz, tais como as  $\alpha$  ou  $\beta$ - glucanas solúveis em álcali e manoproteínas.

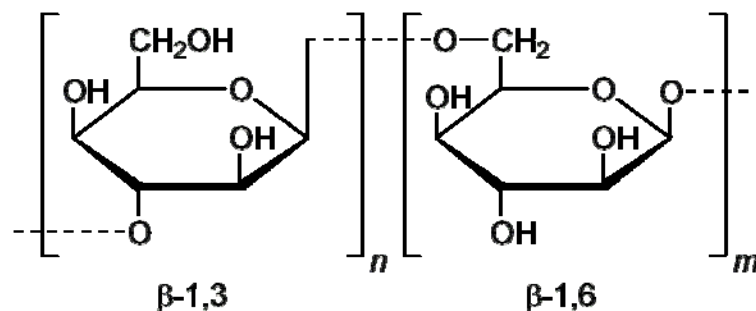
As glucanas são os homopolissacarídeos mais comuns. A maioria é linear, com diferentes disposições de suas ligações glicosídicas, pertencentes à série alfa ( $\alpha$ ) ou beta ( $\beta$ ). As  $\beta$ -glucanas são a forma predominante, podendo estar livres ou associadas às proteínas, lipídeos e outros polissacarídeos (WILLIAMS, 1997). São constituídas de homopolímeros de D-glicose unidos por ligações  $\beta$  -1,3,  $\beta$ -1,4 e  $\beta$ -1,6 sendo entretanto, as  $\beta$  -1,3 e  $\beta$  -1,6-glucanas (Figura 9) as que representam a maior parte das  $\beta$  - glucanas presentes na parede celular de fungos filamentosos. Os Basidiomycetos, incluindo *M. perniciosa* diferem dos demais Filos, pois apresentam na camada exterior da parede, acima da camada de glucanas amorfas com ligações  $\beta$  - 1,3 e  $\beta$  - 1,6, glucanas amorfas com ligações  $\alpha$  - 1,3, além de

proteínas e microfibrilas de celulose e cuja hidrólise enfraquece a parede podendo resultar na morte celular (HONG e MENG, 2003).



**Figura 8-** Componentes estruturais da parede celular de fungos filamentosos. **Fonte:** Doctor Fungus.

([http://www.doctorfungus.org/thedrugs/antif\\_pharm.htm](http://www.doctorfungus.org/thedrugs/antif_pharm.htm))



**Figura 9-** Estrutura da beta-D- glucana com ligações beta- 1,3 e beta -1,4.

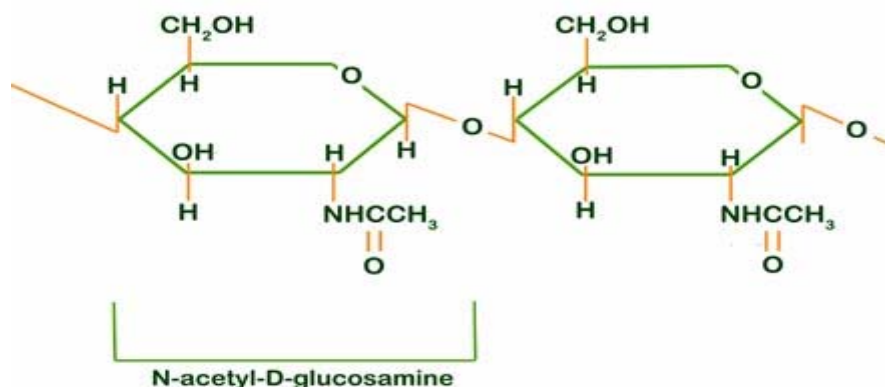
**Fonte:** Wikimedia Commons

(<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Beta-1,3-1,4-glucan.png>)

Embora muitos fungos possuam a capacidade de sintetizar beta-glucanas para o espaço extracelular ou citoplasmático, elas estão localizadas normalmente na parede celular. A natureza e a localização das beta-glucanas da parede, no entanto, sugerem que elas podem ser degradadas e utilizadas como fontes nutricionais, depois da exaustão de nutrientes externos ou por mudanças na composição da parede celular durante morfogênese (HARAN et al., 1996).

A quitina, que compreende cerca de 10 a 20% da parede celular de fungos filamentosos é formada pelo homopolímero de N-acetil-glicosamina com ligações beta-1,4 (Figura 10) e pontes de hidrogênio intercadeia, que dão origem a microfibrilas de quitina. Essas estruturas

suportam grandes pressões e, portanto, tornam-se responsáveis pela integridade da parede celular.



**Figura 10-** Estrutura da quitina. **Fonte:** Chitin Research. (<http://www.ceoe.udel.edu/horseshoecrab/research/chitin.html>)

Quando a síntese da quitina é interrompida, a parede celular torna-se desorganizada e a célula fúngica sofre deformações e instabilidade osmótica (BOWMANN e FREE, 2006). O mesmo polímero quando encontrado na sua forma não acetilada é definido como quitosana (LOGUERCIO-LEITE e ESPOSITO, 2004). Por microscopia eletrônica, verificou-se que a quitina presente em fungos forma uma rede de fibrilas submersas em uma matriz amorfa e usando digestões enzimáticas e químicas estabeleceu-se que seu índice varia de 3- 5% a aproximadamente 60% (PATIL et al., 2000).

**Tabela 1-** Composição bioquímica da parede celular de diferentes Filos do Reino Fungi.

Filo	Componentes fibrilares	Componentes matriciais
Chytridiomycota	Quitina, quitosana	$\beta$ glucanas
Zygomycota	Quitina, quitosana	Ácido poligalacturônico, proteína glucuronomano
Ascomycota	Quitina, $\beta$ -1,3- e $\beta$ -1,6-glucanas	$\alpha$ -1,3-glucana, proteína galactomano
Basidiomycota	Quitina, $\beta$ -1,3- e $\beta$ -1,6-glucanas	$\alpha$ -1,3-glucana, proteína xilomano

Fonte: adaptado de Loguercio-Leite e Espósito (2004).

A constituição química da parede, entretanto, é diferente à medida que se consideram os diferentes Filos do Reino Fungi (Tabela 1) (LOGUERCIO-LEITE e ESPOSITO, 2004). A

constituição da parede pode ainda mudar substancialmente nos diferentes estágios do ciclo de vida, demonstrando assim que tanto a estrutura como a competição refletem a necessidade funcional de um fungo (DEACON, 1997).

Como a viabilidade celular depende da integridade destes componentes, a ação das enzimas fúngicas degradadoras da parede celular torna-se o ponto inicial das interações envolvidas no processo de antagonismo entre fungos (LORITO et al., 1994), constituindo uma das mais importantes características dos microrganismos antagônicos (ELAD et al., 1982; ELAD et al., 1984). Assim, é esperado que microrganismos superprodutores de hidrolases apresentem capacidade antagônica superior (TIMMIS et al., 1994).

Há duas hipóteses que explicam atualmente a forma como se dá o crescimento das hifas. A primeira explica que esse crescimento se dá por um balanço entre a lise da parede e síntese de novos polímeros de parede. Isso ocorre devido à rigidez da mesma, que impediria o crescimento do micélio (LOGUERCIO-LEITE e ESPOSITO, 2004). Outra hipótese diz que o ápice hifal é inerentemente viscoso, elástico e expansível, e a parede nova sintetizada neste ápice consiste de uma mistura de quitina não-cristalizada e  $\beta$  glucana. A rigidez da parede seria resultado da ligação desses polímeros à mesma (WESSELS, 1993). Durante o crescimento apical de fungos filamentosos, quitina e fibras de  $\beta$ - 1,3-glucanas são sintetizadas simultaneamente no ápice das hifas em crescimento, que ficam desta forma, expostas a hidrólise (ORDENTLICH et al., 1988).

Chet et al. (1998) descreveram as etapas sucessivas que fundamentam o complexo processo do micoparasitismo por *Trichoderma sp.* através de enzimas hidrolíticas. O antagonismo inicia-se com o crescimento quimiotrópico do *Trichoderma* em resposta a algum estímulo químico da hifa do hospedeiro, detectando-o. O primeiro sinal de interação demonstrado por *Trichoderma* ao seu hospedeiro é específico e controlado. O reconhecimento e ligação do micoparasita ao hospedeiro se dão através da interação de carboidratos específicos da parede celular do micoparasita com lecitinas presentes nos polissacarídeos extracelulares do hospedeiro (ELAD, 1990). Diferentes carboidratos interagem com diferentes lecitinas, conferindo especificidades de ligação entre isolados diferentes e seu(s) respectivo(s) hospedeiros (HJELJORD e TRONSMO, 1998).

Quando o micoparasita faz este contato físico com seu hospedeiro, suas hifas aderem-se por meio de estruturas especializadas denominadas apressórios, que contem altas concentrações de solutos osmóticos tal como o glicerol (MCINTYRE et al., 2004) e enrolam-se ao redor das hifas do hospedeiro (Figura 11) (CHET et al., 1998). Esse contato físico é o disparador da emissão de enzimas hidrolíticas pelo micoparasita (LORITO et al., 1994), que

devem manter-se presentes para exercer um papel lítico significativo (CHET et al., 1998) e peptobols, que facilitam a entrada da hifa de *Trichoderma* no interior do fungo hospedeiro além de assimilar o conteúdo da parede celular (HOWELL, 2003).



**Figura 11-** Hifa de *Trichoderma* spp ao redor do fitopatógeno *Rhizoctonia solani*.  
**Fonte:** Chet et al. (2006).

## **2.5. Principais enzimas hidrolíticas produzidas por *Trichoderma* spp durante o micoparasitismo a *M. pernicioso***

### **2.5.1. Quitinases**

As quitinases (EC 3.2.1.14) são proteínas comumente produzidas por micoparasitas, altamente específicas e envolvidas na hidrólise das ligações do tipo  $\beta$ -1,4 da quitina, presente na parede celular de fungos. As quitinases têm sido estudadas e seu substrato não é encontrado em plantas (COLLINGE et al., 1993), nem na maioria dos procariotos (GOODAY, 1990). Esta enzima representa, porém, um grande potencial no controle biológico de fungos, uma vez que a quitina é comumente um componente estrutural de importantes patógenos e pragas de plantas (COLLINGE et al., 1993).

Sahai e Manocha (1993) descreveram três tipos de quitinases baseando-se nos produtos de hidrólise de quitina: a) exoquitinases – liberam somente diacetilquitobioses ou apenas quitobioses (dímeros de N-acetilglicosamina) de uma forma progressiva a partir da extremidade não redutora do polímero; b) endoquitinases – agem aleatoriamente liberando oligossacarídeos como quitotetrose, quitotriose e quitobiose; c)  $\beta$ -1,4-N-

acetilglicosaminidases – são enzimas que hidrolisam os oligossacarídeos formando monômeros de N-acetilglicosamina (GlcNAc) a partir da quitobiase.

A nomenclatura das enzimas citadas no parágrafo anterior foi revista por Harman et al. (1993), que propuseram, considerando a Nomenclatura Enzimática e trabalhos de purificação e caracterização das respectivas enzimas, uma simplificação: a) exoquitinases: ( $\beta$ -1,4-N-acetilglicosaminidases ou glicosaminidases) – liberam monômeros das extremidades não redutoras e necessitam de, no mínimo, uma quitobiase como substrato para atuarem; b)  $\beta$ -1,4-quitobiosidases – liberam unidades diméricas não redutoras e necessitam de, no mínimo, uma quitotriose como substrato para atuarem; c) endoquitinases – clivam aleatoriamente polímeros ou oligômeros e não reconhecem as extremidades não redutoras. Necessitam de, no mínimo, uma quitotetrose como substrato para atuarem.

O sistema quitinolítico pode ser formado por diferentes quitinases como, por exemplo, o de *Trichoderma harzianum* que é formado por duas  $\beta$ -1,4-N-acetilglicosaminidases e quatro endoquitinases sendo que o hospedeiro define qual enzima se expressa primeiramente no processo (LORITO et al., 1993). As propriedades das quitinases, seu envolvimento nos processos antagônicos e sua importância no controle biológico têm despertado grande interesse. Os sistemas quitinolíticos, assim como os celulolíticos, mais bem estudados são aqueles produzidos por fungos do gênero *Trichoderma*. A espécie que apresenta maior número de trabalhos identificando a presença de quitinases no controle biológico é *T. harzianum* (LORITO et al., 1998).

As quitinases podem agir no crescimento de fungos, inibindo a esporulação (GOLDMAN et al., 1994), podendo ainda induzir a produção de metabólitos secundários e outras enzimas que degradam a parede celular de fungos como proteases,  $\beta$ -1, 3 - glucanase e  $\beta$  -1,6-glucanase (DE LA CRUZ et al., 1995), podendo ainda agir em sinergismo com as mesmas. Enquanto a quitinase lisa a parede celular pela hidrólise da quitina, peptobols inibem a síntese de ligações entre a quitina e  $\beta$ -glucanas, impedindo a hifa de reparar os efeitos da quitinase (BENNETT, 2004).

Alguns estudos têm sido realizados para entender como a produção de quitinase é induzida durante a interação com o hospedeiro. Inbar e Chet (1995) demonstraram que a quitinase é secretada pela interação física do antagonista com lecitinas de parede do hospedeiro, sugerindo ser o primeiro evento da interação. Com a degradação da quitina ocorre a liberação de oligômeros que induzem as exoquitinases, começando assim o ataque micoparasítico. Segundo Harman et al. (2004) o padrão de indução enzimática difere de uma espécie de *Trichoderma* para outra, mas acredita-se que *Trichoderma* spp secreta

exoquitinases constitutivamente em baixos níveis e quando as quitinases degradam a parede celular do patógeno, liberam oligômeros que induzem as exoquitinases e o ataque continua.

Foi demonstrado também que *T. harzianum*, capaz de parasitar *M. pernicioso*, causador da vassoura de bruxa do cacau (BASTOS, 1996a), produz uma quitinase quando crescido em meio indutor contendo quitina como fonte de carbono. Foi observado que essa quitinase era capaz de afetar drasticamente a parede celular de *C. pernicioso* em ensaios *in vitro* (DE MARCO et al., 2000).

Embora o gene de quitinases esteja presente numa grande quantidade de organismos, os fungos e bactérias filamentosos foram descritos com mais capacidade de degradar quitina do que outros microrganismos não-filamentosos. Já foi mostrado que bactérias do solo, com capacidades quitinolíticas, são mais eficientes no antagonismo a fungos do que outras bactérias, uma vez que interferem no crescimento das hifas. A ação da quitinase isolada, entretanto, não inibia esse crescimento, e os níveis de produção de quitinase de diferentes bactérias não estão relacionados às suas capacidades como fungicida (DE BOER et al., 1998).

Em certos fungos a estrutura de quitina, mesmo no ápice das hifas, pode ser protegida por uma série de proteínas, conferindo ao fungo resistência a quitinases (SIVAN e CHET, 1989b).

### 2.5.2. $\beta$ - Glucanases

As  $\beta$ -glucanas são hidrolisadas por  $\beta$ -glucanases que são classificadas de acordo com o tipo de ligação  $\beta$  do substrato em que agem e pelo mecanismo de ataque (PITSON et al., 1993). As diversas  $\beta$ -glucanases se encontram listadas na Tabela 2. As celulasas são endoglucanases amplamente encontradas em fungos, assim como as  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,2 glucanases, sendo que as  $\beta$ -1,6-glucanases são menos comuns (MARQUARDT et al., 1996). As celulasas hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos ou entre um carboidrato e uma porção não carboidrato. Apresenta como nomes alternativos: avicelase, beta-1,4-endoglucano hidrolase, beta-1,4-glucanase, carboximetil celulase, celudextrinase, endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase, endo-1,4- $\beta$ -glucanase, endoglucanase (BAPTISTA, 2006).

Cada isoforma das glucanases podem ocorrer em situações diferentes, dependendo da fonte de carbono utilizada no crescimento (NORONHA et al., 2000). Muitas  $\beta$ -1,3-glucanases de fungos podem hidrolisar polissacarídeos extracelularmente para um eventual transporte para o interior da célula e assimilação, viabilizando, assim, o uso de  $\beta$ -glucanas como única fonte de carbono (DE LA CRUZ et al., 1995).

**Tabela 2-** Nomenclatura e ação das  $\beta$ -glucanases.

Código N°	Nome comum	Nome científico	Ação
3.2.1.4	Celulase	1,4-(1,3;1,4)- $\beta$ -D-glucana 4-glucanohidrolase	Endohidrólise das ligações $\beta$ -1,4 da celulose e $\beta$ -D-glucanas que contêm ligações $\beta$ -1,3 e $\beta$ -1,4
3.2.1.6	Laminarinase	1,4-(1,3;1,4)- $\beta$ -D-glucana 3(4)-glucanohidrolase	Endohidrólise das ligações $\beta$ -1,3 ou $\beta$ -1,4 de $\beta$ -D-glucanas quando o resíduo de glicose cujo grupo redutor envolvido na ligação a ser hidrolisada é substituído pelo C-3
3.2.1.21	$\beta$ -glicosidase	$\beta$ -D-glicoside glucohidrolase	Hidrólise dos resíduos terminais não reduzidos de $\beta$ -D-glicosil, com liberação de $\beta$ -D-glicose
.2.1.39	Endo-1,3- $\beta$ - glucanase	1,3- $\beta$ -D-glucana glucanohidrolase	Endohidrólise das ligações $\beta$ -1,3 das 1,3- $\beta$ -D-glucanas
3.2.1.58	Exo-1,3- $\beta$ - glucanase	1,3- $\beta$ -D-glucana glucohidrolase	Exohidrólise das ligações $\beta$ -1,3 das $\beta$ -1,3- $\beta$ -D-glucanas, com liberação de $\alpha$ - glicose
3.2.1.71	Endo-1,2- $\beta$ - glucanase	1,2- $\beta$ -D-glucana glucanohidrolase	Endohidrólise das ligações $\beta$ -1,2 das $\beta$ -1,2- $\beta$ -D-glucanas
3.2.1.73	Lichenase	1,3-1,4- $\beta$ -D-glucana 4- glucanohidrolase	Endohidrólise das ligações $\beta$ -1,4 das $\beta$ -D-glucanas contendo ligações $\beta$ -1,3 e $\beta$ -1,4
3.2.1.74	Exo-1,4- $\beta$ - glucanase	1,4- $\beta$ -D-glucana glucohidrolase	Exohidrólise das ligações $\beta$ -1,4 das $\beta$ -1,4-glucanas
3.2.1.75	Endo-1,6- $\beta$ - glucanase	1,6- $\beta$ -D-glucana glucanohidrolase	Endohidrólise das ligações $\beta$ -1,6 das $\beta$ -1,6-glucanas

Fonte: Adaptado de Pitson et al. (1993).

As  $\beta$ -1,6-glucanases (EC 3.2.1.75) também estão envolvidas na degradação da parede celular de fungos e o micoparasitismo. Em *Trichoderma harzianum* a produção desta enzima foi induzida pela presença de quitina (DE LA CRUZ e LLOBELL, 1999), ou com parede celular de fungos como fonte de carbono no meio indutor, o que corrobora a hipótese da ação



desta enzima no micoparasitismo (MONTERO et al., 2005). Tanto as  $\beta$ -1,3- quanto às  $\beta$ -1,6-glucanases são capazes também de inibir a germinação de esporos e o crescimento celular de fitopatógenos (DE LA CRUZ et al., 1995).

A espécie que apresenta maior número de trabalhos relatando a produção de glucanases no processo de controle biológico à fitopatógenos é *T. harzianum* (LORITO et al., 1998; DE MARCO et al., 2003; DE MARCO e FELIX, 2007). Evidências indicam que as glucanases atuam em sinergismo com outras enzimas hidrolíticas para lisar a parede celular dos fitopatógenos hospedeiros (DE LA CRUZ et al., 1995).

### 2.5.3. Proteases

A camada externa da parede celular de fungos é composta de proteínas diversas que sustentam cadeias laterais de polissacarídeos compostos de manoses. Constituem uma fração pequena do material da parede, raramente mais de 20%, e frequentemente como glicoproteínas. Nem todas têm papel estrutural, mas o acoplamento, reconhecimento, modificações da parede e a nutrição envolvem ligações protéicas da parede (PITARCH et al., 2002).

As proteases pertencem ao grupo das hidrolases as quais tem em comum o envolvimento da água na formação do produto e referem-se a todas as enzimas que clivam ligações peptídicas, podendo ser classificadas quanto às condições hidrogeniônicas ótimas para sua ação (láticas, neutras e alcalinas), quanto à especificidade ao substrato (colagenase, elastase e outras), ou quanto à similaridade com proteases bem caracterizadas (pepsina, tripsina, catepsina e outras) (KUBICEK, 1992).

Durante a reação de hidrólise das ligações peptídicas ocorre transferência de componentes do substrato para a água (WHITAKER, 1994). Esse processo proteolítico resulta em uma mudança específica da função da proteína sendo um importante mecanismo biológico (LOPEZ-OTIN e OVERALL, 2002).

A presença de proteases produzidas por *Trichoderma* já foi detectada em vários trabalhos (FLORES et al., 1997; ELAD e KAPAT, 1999; HAGGAG et al., 2006; SZEKERES et al., 2006), mas são poucos quanto ao biocontrole de *M. perniciosa*, embora demonstrem estar envolvidas nos processos de biocontrole por micoparasitismo (DE MARCO e FELIX 2002).

Enquanto as enzimas degradadoras da parede celular atuam na integridade da célula (LORITO et al., 1993; DE MARCO et al., 2000), proteases produzidas pelos microrganismos

antagonistas inativam as enzimas produzidas pelo patógeno (ELAD, 2000), retardando assim o desenvolvimento da doença (DE MARCO e FELIX, 2002).

Kapat et al. (1998) e Elad e Kapat (1999), mostraram que enzimas hidrolíticas produzidas por *B. cinerea* foram parcialmente desativadas por proteases produzidas por *H. lixii* e demonstraram que a protease produzida por *Trichoderma* em cultura líquida reduziu a germinação de esporos do patógeno. Foi observado num isolado de *T. harzianum* a produção da protease - caseína em meio de cultura líquida, apresentando propriedade de hidrólise da parede celular de *M. pernicioso* (DE MARCO e FELIX, 2002), sendo que provavelmente atuam lisando lipídios e proteínas da parede celular do hospedeiro (FLORES et al. 1997).

#### 2.5.4. Amilases

O amido é um polímero de resíduos de glicose ligados uns aos outros através de ligações glicosídicas que são estáveis em pH alcalino, mas hidrolisadas em pH ácido. Dois tipos de polímeros estão presentes no amido: amilose e amilopectina. Amilose é um polímero linear constituído de até cerca de 6000 resíduos de glicose ligados por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4. A amilopectina consiste de pequenas cadeias lineares de 10 a 60 resíduos de glicose unidos por ligações  $\alpha$ -1,6 (BULÉON et al., 1998). As amilases são enzimas que atuam sobre as ligações  $\alpha$ -1-4 de polímeros de glicose como o amido e glicogênio, sendo as mais importantes as  $\beta$  e  $\alpha$  amilases.

As  $\beta$  amilases são enzimas sacarificantes que hidrolisam o amido fornecendo maltose, sendo que as  $\alpha$  amilases são enzimas dextrinizantes que atacam as ligações ao acaso, fornecendo uma mistura de substâncias denominada dextrina. As amilases parecem não ter nenhum envolvimento nos processos antagônicos entre fungos. Porém, devido à ampla distribuição deste polímero de glicose, o mesmo pode ter de forma indireta, um papel importante na sobrevivência dos antagonistas (AZEVEDO et al., 2000).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Microrganismos

##### 3.1.1. Microrganismos utilizados

Foram utilizados quatro subgrupos genéticos de *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Singer (Tabela 3) e diferentes espécies e isolados de *Trichoderma* spp (Tabela 4), representantes de diferentes regiões produtoras de cacau da Bahia e outros estados. As linhagens de *Trichoderma* spp, doravante designadas por T spp foram coletadas, identificadas morfológicamente e cedidas pelo Centro de Pesquisas (CEPEC) e de *M. perniciosa*, doravante designadas por Mp, pelo Laboratório de Fitopatologia Molecular, ambos da CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira), Ilhéus, Bahia - Brasil.

**Tabela 3-** Subgrupos de *Moniliophthora perniciosa* utilizados e seus respectivos locais de origem

subgrupos	Local de coleta
Mp1441	Ilhéus - BA
Mp1445	Ilhéus - BA
Mp1893	Mutuípe - BA
Mp1916	Macarani - BA

**Tabela 4** - Isolados de *Trichoderma* spp utilizados e seus respectivos locais de origem.

Isolado	Identificação	Hospedeiro	Local de coleta	Data da coleta
Tps907	<i>T. pseudokoningii</i>	Tronco de cacau	Uruçuca-BA	1991
Tps909	<i>T. pseudokoningii</i>	Solo	CEPEC- Ilhéus- BA	1991
Tps913	<i>T. pseudokoningii</i>	Madeira	CEPEC- Ilhéus- BA	1991
Tps1052	<i>T. pseudokoningii</i>	Vassouras/cacau	Rondônia - RO	1991
Tps1541	<i>T. pseudokoningii</i>	Vassoureiro	Piracicaba-SP	1993
Th906	<i>T. harzianum</i>	Madeira	Uruçuca - BA	1991
Th911	<i>T. harzianum</i>	Solo	CEPEC- Ilhéus- BA	1991
Th1058	<i>T. harzianum</i>	Vassouras/cacau	CEPEC- Ilhéus- BA	1991
Th1070	<i>T. harzianum</i>	Solo	Ubatã - BA	1991
Ts2994	<i>T. stromaticum</i>	Vassouras/cacau	Jaguariúna - BA	2001
Ts3454	<i>T. stromaticum</i>	Cacau / Vassouras	Ilhéus - BA	1992
Ts1441	<i>T. stromaticum</i>	Cacau / Vassouras	CEPEC- Ilhéus- BA	2008
Ts1445	<i>T. stromaticum</i>	Cacau / Vassouras	CEPEC- Ilhéus- BA	2008
Ts3461	<i>T. stromaticum</i>	Cacau/Fruto	Ilhéus - BA	1992
Ts3768	<i>T. stromaticum</i>	Cacau / Vassouras	Santo Amaro - BA	1993
Ts3109	<i>T. stromaticum</i>	Vassouras/cacau	Jaguariúna-SP	2001
Ts4077	<i>T. stromaticum</i>	Cacau / Vassouras	Almirante Cacau - BA	2004
Tlg3188	<i>T. longibrachiatum</i>	Cacau/ folha viva	Jacareci - BA	2001
Tpl925	<i>T. cf. pilulliferum</i>	Solo	Camacã - BA	1991
Tvr905	<i>T. viride</i>	Solo	Uruçuca - BA	1991
Tvr1643	<i>T. viride</i>	Cacau / Vassouras	Belém-PA	1994
Tr1612	<i>T. reesei</i>	Cacau / Vassouras	Ilhéus - BA	1994
Tat2076	<i>T. atroviride</i>	Vassoureiro	Uruçuca - BA	1997
Tvi2007	<i>T. virens</i>	Vassoureiro	Ipiaú - BA	2004

### 3.1.2. Métodos de manutenção das cepas

Vários métodos foram utilizados para conservação dos fungos:

- 1) Método 1 (CASTELLANI, 1967) para manutenção de Tspp e Mp: Foram adicionados 30 mL de água destilada em vidros de penicilina de 50 mL, fechados e

autoclavados. Após resfriamento, blocos de 0,5 cm de diâmetro obtidos de culturas jovens dos fungos em meio agar batata dextrose (BDA- MERCK n. 1.10130), contendo micélio e esporos, foram adicionados nos vidros e em seguida lacrados e mantidos à temperatura ambiente ( $\pm 24^\circ \text{C}$ ) no escuro. O meio BDA foi preparado a 20% e vertido em placas de Petri (90 mm) em uma quantidade maior que o habitual para que os blocos ficassem mais espessos e submersos na água. Foi o método mais rotineiramente utilizado para obtenção de inóculos por ser mais prático e de baixa contaminação.

2) Método 2- preservação em leite (MOTA et al., 2003): vidros de penicilina de 50 mL foram adicionados de 20 g de sílica gel previamente desidratada, fechados e autoclavados; os vidros que após autoclavação apresentaram ganho de umidade (coloração rósea) foram descartados. Uma placa de Petri contendo cultivo de 8 d de Tsp<sub>p</sub> foi adicionada de 15 mL de leite em pó a 10% previamente esterilizado e com auxílio de um bastão de ponta romba, os esporos foram emulsionados ao leite. Pedacos de 0,5 x 0,5 cm de papel de filtro esterilizado foram adicionados à placa, embebidos com a solução de esporos e transferidos para outra placa de Petri contendo papel de filtro estéril, onde permaneceram até secagem parcial. Em seguida, com auxílio de uma pinça, uma média de seis pedacos de papel contendo estruturas fúngicas foi transferida para cada vidro de penicilina previamente preparado. Os vidros foram lacrados e mantidos à temperatura ambiente ( $\pm 24^\circ \text{C}$ ) no escuro.

3) Método 3- preservação em arroz (BUENO et al., 2007): sacos de polipropileno contendo 100 g de arroz parboilizado e 60 mL de água destilada foram autoclavados e após resfriamento foram inoculados com blocos de agar BDA contendo estruturas fúngicas. Os sacos foram fechados e após esporulação, grãos foram transferidos para vidros de penicilina estéreis contendo sílica gel desidratada.

### **3.1.3. Produção dos inóculos**

Nos experimentos realizados foram utilizadas estruturas fúngicas mantidas pelos métodos descritos anteriormente. Um ou mais blocos de agar, pedacos de papel de filtro ou grãos de arroz contendo estruturas fúngicas foram inoculados em meio BDA acondicionado em placas de Petri de 90 mm e mantidas a temperatura ambiente ( $24 \pm 2^\circ \text{C}$ ), por um período de 9 d (Tsp<sub>p</sub>) e 25 d (Mp), em fotoperíodo de 12 h. Inóculos posteriores foram reproduzidos a partir desta placa apenas até a quarta repicagem, sendo posteriormente os inóculos obtidos a partir dos fungos em estoque, a fim de não se perder as características genéticas dos mesmos.

### **3.2. Estudo das características de crescimento micelial, esporulação e germinação de *Trichoderma spp in vitro***

#### **3.2.1. Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) e Potencial de Velocidade de Crescimento Micelial (%IVCM) de *Trichoderma spp in vitro*.**

A metodologia aplicada neste experimento foi baseada em Jackisch - Matsuura e Menezes (1999) para a determinação do crescimento micelial e da taxa de crescimento dos isolados de Tspp (Tabela 3). Com auxílio de alça cromo níquel, blocos de BDA de 5 mm de diâmetro contendo estruturas fúngicas de Tspp com 9 d de idade foram individualmente retirados das placas e transferidos para placas de Petri contendo meio BDA (triplicata). As placas foram seladas e mantidas a temperatura ambiente ( $24 \pm 2^\circ \text{C}$ ) em regime de foto período de 12 h, sendo o experimento realizado em delineamento inteiramente casualizado. O crescimento micelial radial foi quantificado através da medida (mm) do diâmetro, previamente marcado na parte externa do fundo da placa de Petri com auxílio de régua milimetrada, em dois intervalos de tempo, 24 e 48 h. Os resultados foram utilizados para o cálculo do IVCM segundo a fórmula de Oliveira (1991) modificada e o crescimento expresso em  $\text{cm. } 24 \text{ h}^{-1}$ :

$$IVCM = ((D_{24h} - 0) + (D_{48h} - D_{24h})) / 2$$

Onde:

IVCM = Índice de Velocidade de Crescimento Micelial

$D^{24h}$  = Diâmetro médio em 24 h de incubação

$D^{48h}$  = Diâmetro médio 48 h de incubação

Os percentuais individuais de IVCM (%IVCM) dos isolados de Tspp avaliados foram determinados tomando-se como 100% o maior valor de velocidade de crescimento micelial médio encontrado.

#### **3.2.2. Produção de Esporos (PE) e Potencial de produção de esporos (%PE) em placa por *Trichoderma spp***

A produção de esporos foi avaliada coletando-se de uma placa de Petri contendo micélio e esporos de Tspp de 9 d de idade (triplicata), um bloco de agar de 0,5 cm de diâmetro

da região central, um da região intermediária e um da região periférica. Os blocos foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de uma mistura estéril na proporção de 1:1 de solução de NaCl (0,89%, p/v) e Tween 80 (0,1%, v/v), perfazendo um total de nove tubos para cada isolado. Após remoção dos esporos por agitação em agitador Vortex por 3 min., foi efetuada a contagem de esporos ao microscópio em Câmara de Neubauer. O resultado, expresso em número de esporos por mL de suspensão, foi efetuado segundo a fórmula  $N = ne \cdot F / nq \cdot Vq$  (SPIER, 2005), em que:

$N$  = número de esporos por mL de suspensão (esporos. mL<sup>-1</sup>),

$F$  = diluição

$ne$  = número total de esporos contados,

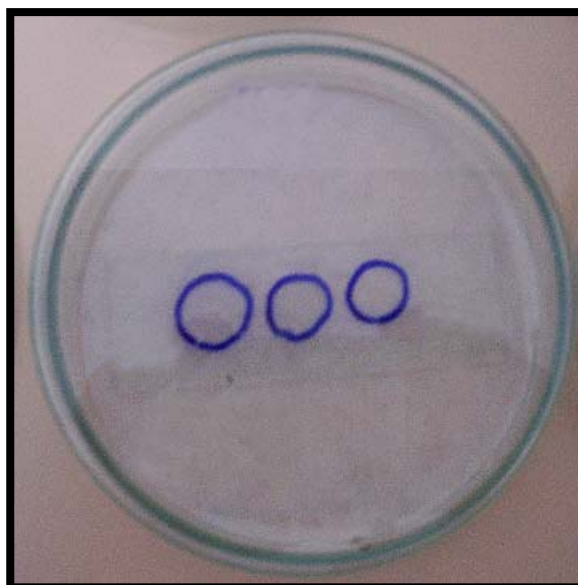
$nq$  = número de quadrículos contados,

$Vq$  = volume do quadrículo:  $4 \times 10^{-6}$ . mL<sup>-1</sup>.

Os Potenciais individuais de Esporulação (%PE) dos isolados de *Tspp* avaliados foram determinados tomando-se como 100% o maior valor médio de esporulação encontrado.

### 3.2.3. Percentual de Germinação de esporos (%PGe) de *Trichoderma spp in vitro*

A viabilidade dos esporos das linhagens avaliadas foi quantificada através de microcultivo e exame direto em lâmina (MARQUES et al., 2004). Para a realização dos ensaios, foram previamente marcados três círculos na face inferior de uma lâmina (triplicata) sendo na face oposta de cada círculo adicionada com auxílio de pipeta automática (10 µL) uma fina camada de BDA liquefeito. Cada lâmina foi colocada em placa de Petri estéril, cujo fundo foi recoberto por disco de papel de filtro umedecido com 5 mL de água destilada estéril. Após solidificação do meio de cultura, foram inoculados em cada círculo 25 µL de suspensão de esporos na concentração de  $1 \times 10^7$  esporos. mL<sup>-1</sup> (Figura 12), sendo então as lâminas mantidas a temperatura ambiente ( $24 \pm 2^\circ$  C) durante 15 h. Após este período, foi adicionada uma gota de corante lactofenol de Aman sobre a área de cada círculo, para deter a germinação e facilitar a visualização dos esporos. Em seguida, 100 esporos em cada área da lâmina foram observados, utilizando-se microscópio com 400 aumentos. Foram contados esporos germinados e não germinados, estabelecendo-se então a porcentagem de germinação. Cada lâmina correspondeu a uma repetição e para cada tratamento fizeram-se três lâminas. Foram considerados germinados os esporos com tubo germinativo maior, ou igual, a sua menor dimensão (CHEAH e HORLOCK, 2007).



**Figura 12-** Microcultivo de esporos de *Trichoderma* spp em lâmina de microscopia

### 3.2.4. Potencial de Crescimento (%PC) de *Trichoderma* spp *in vitro*

O potencial de crescimento dos isolados de Tspg foi determinado pela média aritmética de seus percentuais individuais de velocidade de crescimento micelial (%IVCM), percentual de produção de esporos em placa (%PE) e o percentual de germinação de esporos (%PGe), através da fórmula:

$$\%PC = (\%IVCM + \%PE + \%PGe) / 3$$

### 3.3. Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de *M. pernicioso* subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916 *in vitro*

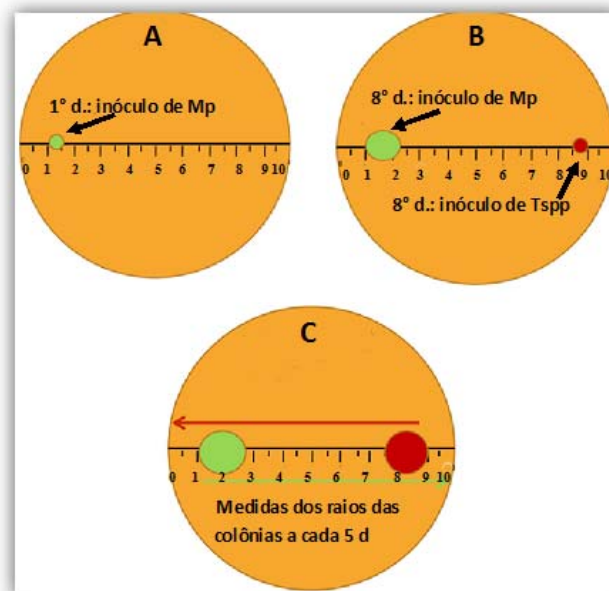
A metodologia aplicada neste experimento foi a mesma utilizada para determinação do IVCM dos isolados de Tspg (JACKISCH - MATSUURA e MENEZES, 1999), sendo que os cultivos foram incubados por 25 d e as medidas dos diâmetros radiais efetuadas no 3°, 7°, 15°, 20° e 25° d. Os resultados foram utilizados para o cálculo do IVCM segundo a fórmula de Oliveira (1991) modificada e o crescimento expresso em cm. 24 h<sup>-1</sup>.



### 3.4. Estudo das características antagônicas de *Trichoderma* spp a *M. pernicioso* subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916.

#### 3.4.1. Cultivo de *Trichoderma* spp e *M. pernicioso* subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916 pelo método da cultura pareada

As culturas pareadas do patógeno e antagonista (MARIANO, 1993) foram efetuadas transferindo-se inicialmente para uma placa de Petri (10 cm) com meio BDA (triplicata), a uma distância de aproximadamente 1,0 cm da borda, um bloco de 0,5 cm de diâmetro da porção periférica de placa contendo meio de agar batata dextrose (BDA) com micélio Mp 1441, 1445, 1893 e 1916. As culturas foram incubadas a  $24 \pm 2^\circ \text{C}$  em fotoperíodo de 12 h, sendo efetuadas fotos diariamente dos cultivos com câmara digital Kodak C310 (Figura 13 A). No 8º d de cultivo, foi transferido para o lado oposto à colônia de Mp, um bloco de 0,5 cm de diâmetro obtido da margem periférica de placa contendo meio BDA com micélio e esporos de Tspp (Figura 13 B).



**Figura 13-** Esquematização de cultura pareada em placa com *Trichoderma* spp (círculo vermelho) e *M. pernicioso* (círculo verde). A - inoculação de Mp; B- inoculação de Tspp após 8 d; C - medidas dos crescimentos radiais das colônias do antagonista e patógenos a cada 5 d.

As culturas foram incubadas a  $24 \pm 2^\circ \text{C}$  com foto período de 12 h, sendo efetuadas fotos dos cultivos a cada 5 d por um período de 17 d, perfazendo o total de 25 d de cultivo (Figura 13 C). As fotos dos cultivos foram individualmente editadas em Adobe Photoshop CS3 10.10 para obtenção de contraste de imagem das colônias do antagonista e patógeno, sendo efetuadas medidas de crescimento das colônias com auxílio de uma régua virtual (Desktop Ruler 3.28).

#### **3.4.2. Potencial de Micoparasitismo (%PM) de *Trichoderma* spp sobre *M. perniciosa* subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916**

Os Potenciais de Micoparasitismo de T spp a Mp subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916 em cultivo pareado foram determinados através das medidas dos raios das colônias do antagonista (RCA) em direção ao patógeno, sendo considerado  $RAC = 9,0 \text{ cm}$  equivalente a um  $\%PM = 100\%$ , sendo a colônia do patógeno sobreposta pela colônia do antagonista. Isolados de T spp com valores de  $RCA < 9,0$  foram considerados com um  $\%PM = 0\%$ .

#### **3.4.3. Potencial de Antibiose (%PAT) de *Trichoderma* spp sobre *M. perniciosa* subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916**

O potencial de T spp em inibir o crescimento dos subgrupos de Mp (%PAT) por antibiose foram determinados através do método do cultivo pareado (MARIANO, 1993), sendo o tempo de incubação dos cultivos determinado através de placas controle, em que um bloco de 0,5 cm de diâmetro de meio BDA com micélio dos subgrupos de Mp foi individualmente transferido a 1,0 cm da borda de uma placa de Petri (90 mm) com meio BDA (triplicata). As culturas foram incubadas a  $24 \pm 2^\circ \text{C}$  com foto período de 12 h até que pelo menos a colônia de um dos subgrupos de Mp atingisse a extremidade oposta da placa, o que se deu com Mp1445 aos 25 d de cultivo, sendo este o tempo de cultivo utilizado para os cultivos pareados. Os Potenciais de Antibiose (%PAT) de T spp a cada subgrupo de Mp foram calculados pela fórmula modificada de Edington et al. (1971):

$$\%PAT = [RCP - (RFP - RIP) / RCP] \times 100$$

Onde:

%PAT: Potencial de Antibiose

RFP: raio final da colônia do patógeno (cm) no 25° d de cultivo pareado

RIP: raio inicial da colônia do patógeno (cm) no 8° d de cultivo, ainda sem a presença do antagonista

RCP: raio da colônia do patógeno na placa controle em cultivo individual (25° d de cultivo)

#### **3.4.4. Potencial Antagônico (%PA) de *Trichoderma* spp a *M. perniciosus* subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916**

O Potencial Antagônico (%PA) de Tspp aos subgrupos de Mp foi determinado pela fórmula:

$$\%PA = (\%PAT + \%PM) / 2$$

Onde:

%PA: Potencial Antagônico de Tspp a Mp

%PM: Potencial de Micoparasitismo de Tspp a Mp

%PAT: Potencial de Antibiose de Tspp a Mp

#### **3.5. Produção de Esporos em Arroz (PEA), Produtividade de Esporos em arroz (PPE) e Potencial de Produtividade de Esporos em arroz (%PPE) por *Trichoderma* spp.**

Sacos de polipropileno de 30 cm x 20 cm foram adicionados de 100 g de arroz parboilizado e 60 mL de água destilada. Após homogeneização da mistura, a borda livre dos sacos foi dobrada três vezes e fechada com 3 grampos equidistantes sendo então autoclavados por 30 min. Após esterilização, os sacos foram resfriados por 24 h, sendo o substrato destorroado manualmente. Com auxílio de seringas descartáveis os sacos foram inoculados individualmente (triplicata) com 6 mL de suspensão de esporos na concentração de  $1 \cdot 10^7$  mL<sup>-1</sup> dos isolados de Tspp avaliados. Após homogeneização os sacos foram incubados a temperatura de  $24 \pm 2^\circ \text{C}$  por 3 d, sob fotoperíodo de 12 h para crescimento de micélio (NIELLA, 2005). Após o período de 3 d de incubação o substrato com micélio foi homogeneizado manualmente, sendo os sacos abertos e incubados por mais três d nas mesmas condições, para esporulação, sendo posteriormente retirados assepticamente 5 g de arroz de

cada saco e transferidos para placas adicionadas de sílica gel e papel de filtro, onde permaneceram para secagem por 3 d à temperatura ambiente. Após secagem, o arroz de cada placa foi transferido individualmente para Erlenmeyers contendo 200 mL de água destilada estéril. Os frascos foram agitados em agitador Vortex por 3 min. para obtenção de solução de esporos, que foram contados em microscópio em câmara de Neubauer, sendo o resultado (PEA) expresso em esporos. gds<sup>-1</sup> (gds= grama de substrato seco). A produtividade de esporos (PPE) por Tspp foi expressa em esporos. gds<sup>-1</sup>. dia<sup>-1</sup>, sendo considerado o número de dias que cada isolado levou para colonizar todo substrato e esporular.

Os Potenciais de Produtividade de Esporos (%PPE) dos isolados de Tspp foram determinados a partir dos valores individuais de produtividade, tomando-se como referência de 100% o maior valor de produtividade médio encontrado.

### **3.6. Potencial de *Trichoderma* spp para uso no Controle Biológico (%PCB) de *M. perniciosus* subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916**

O Potencial de Tspp para uso no Controle Biológico (%PCB) de Mp subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916, foi determinado pela fórmula:

$$\%PCB = (\%PC + \%PA + \%PPE) / 3$$

Onde:

%PCB: Potencial para uso no Controle Biológico de Mp

% PC: Potencial de Crescimento de Tspp in vitro

% PA: Potencial Antagônico de Tspp in vitro

% PPE: Potencial de Produtividade de Esporos por Tspp em arroz.

### **3.7. Potencial de antibiose de *Trichoderma* spp a *M. perniciosus* por metabólitos voláteis e não voláteis e antibiose de *M. perniciosus* a *Trichoderma* spp por metabólitos não voláteis**

#### **3.7.1. Potencial de antibiose de *Trichoderma* spp a *M. perniciosus* por metabólitos não voláteis termoresistentes (%AMNV). Técnica do líquido metabólico (KEXIANG et al., 2002)**

Foram escolhidos para os experimentos que avaliaram a produção de metabólitos não voláteis, os isolados que apresentaram a formação de halo entre as colônias nos cultivos pareados com Mp (Tr1612 com Mp1441 e Mp1445; Tlg3188 com Mp1441, 1445 e 1916; Tvi2007 com Mp1445; Th906 com Mp1916; Tps907 com Mp1445, Mp1893 e 1916 e Tps909 com Mp1445 e 1893). Frascos Erlenmeyers de 250 mL (triplicata) contendo 75 mL de meio BD (batata dextrose) foram adicionados individualmente de 1 mL de uma suspensão de esporos de Tspg na concentração de  $1 \times 10^7$  esporos. mL<sup>-1</sup>. Os frascos foram mantidos a temperatura ambiente ( $24 \pm 2^\circ$  C) por 20 d, sendo posteriormente os cultivos individualmente filtrados com bomba de vácuo em papel de filtro Whatman n. 1, sendo o filtrado considerado como extrato metabólico bruto de Tspg. Após centrifugação a 8000 rpm por 10 min., os filtrados foram acondicionados em tubos de ensaio e autoclavados a  $121^\circ$  C por 15 min. (TIANHUI e DEXUN, 1994). Placas de Petri de 9 cm de diâmetro foram adicionadas individualmente de 18 mL de meio BDA na concentração de 1,5% de agar e 2 mL de extrato metabólico bruto de Tspg (triplicata). Um bloco de  $\pm 0,5$  cm de agar BDA, contendo micélio de Mp foi inoculado no centro das placas, que foram mantidas a temperatura ambiente ( $24 \pm 2^\circ$  C) por 25 d. As placas controle foram constituídas de cultivos de Mp nas mesmas condições sem extrato metabólico bruto de Tspg. Após período de incubação foram efetuadas as medidas do crescimento radial das colônias de Mp e comparadas às medidas do crescimento radial das colônias das placas controle, sendo o percentual de inibição calculado pela fórmula:

$$\%AMNV = \left[ (D1 - D2) / D1 \right] \times 100$$

Onde:

%AMNV: potencial de antibiose por metabólitos não voláteis

D1: diâmetro médio das colônias de Mp nas placas controle.

D2: diâmetro médio das colônias de Mp em cultivo com extrato metabólico bruto de Tspg.

### **3.7.2. Potencial de Antibiose de Mp1445 a Tvi2007 por Metabólitos não Voláteis termoresistentes (%AMNV)**

Como em cultura pareada ocorreu formação de halo entre as colônias de Tvi2007 e Mp1445, foi avaliada a capacidade de Mp1445 em inibir o crescimento de Tvi2007 por metabólitos não voláteis. Para comparação de resultados realizou-se o mesmo experimento utilizando-se Tvi2007 e Mp1893, que em cultura pareada não apresentaram formação de halo. Frascos Erlenmeyers de 250 mL (triplicata) contendo 75 mL de meio BD (batata dextrose) foram adicionados individualmente de 3 blocos de meio BDA contendo micélio de Mp1445 e Mp1893. Os frascos foram mantidos a temperatura ambiente ( $24 \pm 2^\circ \text{C}$ ) por 20 d, sendo posteriormente o micélio separado por filtração e o filtrado considerado como extrato metabólico bruto de Mp. Após centrifugação a 8000 rpm por 10 min., os filtrados foram acondicionado em tubos de ensaio e autoclavados a  $121^\circ \text{C}$  por 15 min. (TIANHUI e DEXUN, 1994). Placas de Petri de 9 cm foram adicionadas individualmente de 18 mL de meio BDA na concentração de 1,5% de agar e 2 mL de extrato metabólico bruto de Mp. Um bloco de  $\pm 0,5$  cm de agar BDA contendo estruturas fúngicas de Tvi2007 foi inoculado no centro de uma placa de Petri (triplicata) e mantida a temperatura ambiente ( $24 \pm 2^\circ \text{C}$ ) por 7 d. As placas controle foram constituídas de cultivos de Tvi2007 nas mesmas condições sem extrato metabólico bruto de Mp. Após período de incubação foram efetuadas as medidas do crescimento radial das colônias de Tvi2007 e comparadas às medidas do crescimento radial das colônias das placas controle, sendo o percentual de inibição calculado pela fórmula:

$$\%Inibição = \left[ \frac{(D1 - D2)}{D1} \right] \times 100$$

Onde:

D1: diâmetro médio das colônias de Tvi2007 nas placas controle.

D2: diâmetro médio das colônias de Tvi2007 em cultivo com extrato metabólico de Mp

### **3.7.3. Potencial de Antibiose de *Trichoderma* spp a *M. perniciosus* por Metabólitos Voláteis (%AMV)- Técnica da placa invertida.**

Para os experimentos que avaliaram a produção de metabólitos voláteis foram escolhidos isolados de T spp que apresentaram diferentes graus de antibiose aos subgrupos de Mp (Th911, Th1070, Tat2076, Tvr905, Tvi2007, Tlg3188, Tps1052, Tpl925 e Tr1612).

O método da placa invertida (BHARAT et al., 1980) foi modificado devido ao fato de Mp apresentar um crescimento muito lento comparado ao rápido crescimento de T spp. Placas

de Petri (90 mm) contendo meio BDA 2 % foram inoculadas individualmente com blocos de meio BDA contendo micélio dos diferentes subgrupos de Mp (triplicata), posicionados no centro da placa. As culturas foram incubadas por 3 d a  $24 \pm 2^0$  C, em fotoperíodo de 24 h. Após o período de incubação, bases de placas de Petri (90 mm) contendo meio BDA e inoculadas individualmente com blocos de meio BDA contendo micélio e esporos de Tspp, foram posicionadas contra as bases de placas contendo cultivos de 3 d dos diferentes subgrupos de Mp. As placas foram firmemente seladas com parafilme e mantidas de forma que o antagonista ficasse na posição inferior e o patógeno na superior, a  $24 \pm 2^0$  C e em fotoperíodo de 12 h, até que as colônias das placas controle cobrissem toda superfície do agar (9 cm). As placas controle receberam apenas Mp tanto na parte superior como na parte inferior da placa de Petri. Após período de incubação, o crescimento radial das colônias do patógeno foi mensurado (cm) e os valores obtidos foram comparados com aqueles das colônias das placas controle, sendo o percentual de inibição calculado pela fórmula:

$$\%AMV = [(D1 - D2) / D1] \times 100$$

Onde:

%AMV: potencial de antibiose por metabólitos voláteis

D1: diâmetro médio das colônias de Mp nas placas controle.

D2: diâmetro médio das colônias de Mp em cultivo pelo método da placa invertida com Tspp.

### **3.8. Mecanismo de micoparasitismo por enzimas hidrolíticas produzidas por *Trichoderma* spp a *M. pernicioso* subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916.**

#### **3.8.1. Produção de enzimas hidrolíticas por *Trichoderma* spp em meios específicos**

Foram utilizados neste experimento, isolados de Tspp que apresentaram diferentes Potenciais para uso no Controle Biológico (%PCB) de Mp subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916. Assim, os isolados Tr1612, Ts3454, Tvr2007, Tvi905, Th911, Th1070, Tat2076, Tlg3188, Tpl925 e Tps1052 foram avaliados quanto às suas atividades enzimáticas em meio líquido contendo substratos específicos. Erlenmeyers de 150 mL foram adicionados de 50 mL

de meio TLE (glicose, 0,05%; uréia, 0,03%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1%;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,14%;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,03%;  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,03%) e 1,0% do substrato específico para produção de enzimas (quitina regenerada para quitinase, caseína para protease, amido de milho para amilase, papel de filtro para celulase total e carboximetilcelulose para endoglucanase), sendo o pH ajustado em 5,0 usando-se HCl 1N (DE MARCO et al., 2000). Os meios (triplicata) foram inoculados individualmente com 1 mL de suspensão de esporos  $1 \times 10^7$  esporos.  $\text{mL}^{-1}$  obtidos de cultivos de 8 d em meio BDA dos isolados de T spp avaliados. As culturas foram incubadas a  $24 \pm 2^\circ \text{C}$  por 72 h, sendo posteriormente a massa micelial separada por filtração e o filtrado centrifugado por 10 min. a 8000 rpm. O sobrenadante (extrato enzimático bruto) foi separado e mantido sob refrigeração por no máximo 24 h.

### **3.8.2. Produção de enzimas por *Trichoderma* spp em meio com *M. perniciosus* como única fonte de carbono**

Os isolados Tvr2007, Th911, Tlg3188 e Tps1052, que apresentaram diferentes capacidades de micoparasitismo tiveram seus perfis enzimáticos estudados em meio líquido, suplementado individualmente com micélio seco de Mp como única fonte de carbono. Frascos Erlenmeyers (250 mL) contendo 100 mL de meio Batata Dextrose (BD) foram adicionados individualmente (triplicata) de 5 blocos de 0,5 cm de diâmetro contendo micélio dos diferentes subgrupos de Mp e incubados a  $24 \pm 2^\circ \text{C}$  por 20 d. Após crescimento, o micélio foi coletado por filtração em gaze dobrada 4 vezes e lavado com água destilada estéril por 3 vezes, sendo posteriormente transferido para placas de Petri contendo papel de filtro. As placas foram mantidas em estufa a  $40^\circ \text{C}$  até secagem do micélio que foi posteriormente finamente triturado e utilizado como fonte de carbono.

Frascos Erlenmeyers (125 mL) contendo 25 mL de meio TLE (triplicata) foram suplementados individualmente de micélio seco dos subgrupos de Mp na concentração de 0,5% e adicionados individualmente de 1 mL de suspensão de esporos de ( $1.0 \times 10^7$  esporos.  $\text{mL}^{-1}$ ) de T spp. Os cultivos foram incubados a  $24 \pm 2^\circ \text{C}$  por 24, 48 e 72 h, sendo retiradas alíquotas de líquido metabólico e centrifugados a  $4^\circ \text{C}$  por 10 min. a 8000 rpm. Os sobrenadantes (extrato enzimático bruto) foram separados e mantidos sob refrigeração por no máximo 24 h.

### **3.8.3. Proteínas Totais**



Foi determinada de acordo com o Método do Biureto descrito por Layne (1957). É um método colorimétrico, cuja cor, que varia de rosa a púrpura, é formada devido ao complexo de íons de cobre e o nitrogênio das ligações peptídicas, obtidas quando soluções de proteínas em meio fortemente alcalino são tratadas com soluções diluídas de íons cúpricos. Preparo do reagente de Biureto: 1,5 g de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) e 6,0 g de tartarato duplo de sódio e potássio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) foram dissolvidos em 500 mL de água destilada. Sob agitação constante, foram adicionados 300 mL de solução de NaOH a 10% e 1 g de iodeto de potássio (KI). O volume foi completado para 1L com água destilada e o reagente guardado em frasco âmbar.

As proteínas totais foram quantificadas adicionando-se aos tubos de reação (triplicata) 250  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático bruto, 250  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio (0,05 M, pH 6,0) e 3 mL do reagente Biureto, sendo o tubo “branco” (triplicata) constituído de 500  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio (0,05 M, pH 6,0) e 3 mL do reagente Biureto. Os tubos foram levemente homogeneizados, permanecendo em repouso por 10 min. a temperatura ambiente ( $24 \pm 2^\circ \text{C}$ ) e as absorbâncias determinadas a 540 nm. Para o cálculo da concentração de proteínas a partir das absorbâncias obtidas foi construída uma curva de calibração utilizando soro albumina bovina (BSA- Sigma CO.) na concentração de 0,3 mg.  $\text{mL}^{-1}$  como padrão, conforme metodologia descrita na Tabela 5.

**Tabela 5-** Elaboração da curva padrão de BSA.

Tubo s	BSA (0,3 mg. $\text{mL}^{-1}$ ) ( $\mu\text{L}$ )	$\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{L}$ )	Biureto (mL)
Branco	0	500	2,0
1	50	450	2,0
2	100	400	2,0
3	150	350	2,0
4	200	300	2,0
5	250	250	2,0
6	300	200	2,0

Com base na equação  $C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$ , foram calculadas as concentrações finais ( $C_f$ ) de BSA em cada tubo, sendo expressa em mg.  $\text{mL}^{-1}$ . A média das absorbâncias e concentrações finais de BSA de cada tubo foram plotadas (eixos y e x, respectivamente) no programa Excel

2007 para obtenção da equação da reta ( $y = ax + b$ ). Com base na equação da reta ( $x = y - b / a$ ), em que “y” representa o valor das absorbâncias obtidas das leituras e “a” e “b” os coeficientes lineares e angulares da reta fornecidos pela equação da curva de BSA, foi calculado o valor de “x”, correspondente às concentrações de BSA desconhecidos. As concentrações obtidas foram multiplicadas pelo fator de diluição das amostras e o resultado expresso em  $\text{mg. mL}^{-1}$ .

#### **3.8.4. Protease total e específica**

A atividade de protease total foi avaliada adicionando-se aos tubos de reação (triplicata) 500  $\mu\text{L}$  de solução de caseína 0,5% em tampão acetato de sódio (0,05 M, pH 6,0) e 250  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio; o tubo “branco” foi constituído de 500  $\mu\text{L}$  de solução de caseína 0,5% e 500  $\mu\text{L}$  de tampão acetato. Os tubos permaneceram incubados em Banho Maria a 37° C por 5 min. para estabilização da temperatura e após foi adicionado 250  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático bruto aos tubos de reação. O sistema reacional permaneceu em Banho Maria a 37° C por mais 20 min., sendo os tubos suavemente agitados a cada 5 min. para manter a caseína em suspensão. Após período de incubação a reação foi paralisada pela adição de 1,25 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10% gelado, sendo os tubos agitados e transferidos para banho de gelo por 40 min., centrifugados por 10 min. a 8.000 rpm e o sobrenadante transferido para outros tubos. As absorbâncias dos sobrenadantes foram determinadas a 280 nm e comparadas com as concentrações de uma curva padrão de tirosina. Uma unidade de atividade proteolítica ( $\text{U. mL}^{-1} \cdot \text{min.}^{-1}$ ) correspondeu à quantidade de enzima requerida para hidrolisar a caseína e produzir 1  $\mu\text{g}$  de tirosina por minuto (WORTHINGTON ENZYME MANUAL, 1982).

A atividade proteásica específica foi calculada pela razão entre a atividade proteásica total e a quantidade de proteínas contidas em 1 mL da amostra ( $\text{U. mg. mL}^{-1}$ ).

#### **3.8.5. Celulase**

Foram dosadas as seguintes atividades celulolíticas: FPase que expressa a atividade de celulase total e CMCase que expressa a atividade de endoglucanase (CARVALHO, 2008).

##### **3.8.5.1. FPase**

Tiras de aproximadamente 1 x 8 cm (70 mg) de papel de filtro Whatman #1 (GHOSE, 1986), recortadas e enroladas, foram adicionadas a tubos de ensaio pré-incubados a 50°C contendo 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mM e 1 mL de extrato enzimático bruto. Após 40 min. de incubação, a hidrólise foi interrompida com a adição de 3 mL de ácido dinitrosalicílico (ADNS) e seguiu-se a quantificação pelo Método de Açúcares Redutores, sendo a absorvância da solução medida em 540 nm. Para quantificação dos açúcares redutores (AR) formados foi utilizada a equação de reta obtida da curva de calibração constituída de padrões de glicose. Uma unidade de atividade enzimática (UFP) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de glicose por mL por minuto, segundo a equação:

$$UFP = AR \times D \times V_t / T \times G \times V_e$$

Onde:

AR: açúcares redutores

D: diluição (mL)

V<sub>t</sub>: volume total da reação (mL)

T: tempo da reação (min.)

G: µmol de glicose (0,18 mg)

V<sub>e</sub>: volume utilizado do extrato enzimático bruto (mL)

### 3.8.5.2. CMC<sub>Case</sub>

A atividade da enzima endoglucanase foi avaliada pela medida da quantidade de açúcares formados a partir da hidrólise da carboximetilcelulose (CMC) (GHOSE, 1986). Aliquotas de 0,6 mL de CMC de média viscosidade a 0,1% em tampão acetato (50 mmol/l, pH 5,0) foram adicionadas aos tubos de reação e tubos “branco” (triplicata) e mantidos em banho Maria a 50°C por 5 min. para estabilização da temperatura. Posteriormente, foram adicionados aos tubos de reação 0,3 mL de extrato enzimático bruto e aos tubos do “branco” 0,3 mL de tampão acetato. Os tubos permaneceram incubados em banho Maria a 50° C por mais 30 min., sendo agitados a cada 10 min. para manutenção do substrato em suspensão. Após o período de incubação, a reação foi interrompida com a adição de 1,5 mL da solução de ADNS, sendo os tubos transferidos para banho de água fervente por exatamente 5 minutos, sendo em seguida resfriados em banho de água à temperatura ambiente. Após, foram

adicionados 3 mL de água destilada sendo o meio homogeneizado mediante inversão dos tubos e a absorbância das amostras determinada em 540 nm. Para quantificação dos açúcares redutores (AR) formados foi utilizada a equação de reta obtida da curva de calibração constituída de padrões de glicose. Uma unidade de atividade enzimática (UCMC) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu\text{mol}$  de glicose por mL por minuto, segundo a equação:

$$UCMC = \frac{AR \times D \times V_t}{T \times G \times V_e}$$

Onde:

AR: açúcares redutores

D: diluição (mL)

V<sub>t</sub>: volume total da reação (mL)

T: tempo da reação (min.)

G:  $\mu\text{mol}$  de glicose (0,18 mg)

V<sub>e</sub>: volume utilizado do extrato enzimático bruto (mL)

### 3.8.6. $\beta$ 1-3 glucanase

A atividade  $\beta$ -1,3-glucanase foi determinada pelo método descrito por Silva (2008), medindo-se a quantidade de açúcar redutor liberado de laminarina. Em 100  $\mu\text{L}$  de solução de laminarina 1% diluída em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de extrato bruto. A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos e posteriormente acrescentado 800  $\mu\text{L}$  do reagente DNS. O sistema foi fervido em Banho Maria por 5 minutos e a quantidade de açúcar redutor formado foi estimada espectrofotometricamente a 540 nm, utilizando glicose como padrão. A quantidade de açúcar redutor formada foi quantificada espectrofotometricamente, utilizando-se uma curva padrão construída com glicose. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor por minuto, sendo expressa em  $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ .

### 3.8.7. Amilase

Nos ensaios utilizando substrato específico, a atividade amilolítica foi determinada por dois métodos diferentes, utilizando amido como substrato. O primeiro denominado de

atividade dextrinizante ( $\alpha$ -amilase), baseia-se na variação da intensidade da cor do complexo iodoamido. O segundo denominado de método sacarificante ( $\beta$ -amilase), baseia-se na produção de açúcares redutores (MILLER, 1959). Nos ensaios utilizando Mp como substrato, foi avaliada apenas a atividade amilolítica dextrinizante.

#### **3.8.7.1. $\alpha$ -amilase (atividade dextrinizante) (FUWA, 1954)**

Para a atividade de  $\alpha$ -amilase, foram adicionados aos tubos de reação (triplicata) 0,3 mL de solução de amido solúvel a 1,0% (previamente aquecido em Banho Maria para dissolução total do amido), 0,3 mL de tampão acetato de sódio 0,1M (pH 5,0) e 0,2 mL do extrato enzimático bruto. A mistura foi incubada a 50°C por 20 min. e a reação interrompida com a adição de 0,3 mL de ácido acético (1 M) e 0,3 mL da solução de iodo/iodeto (1% de iodo em etanol absoluto, 10% de iodeto de potássio e água destilada na proporção de 1v: 1v: 3v) e 10 mL de água destilada. Após homogeneização, a absorbância foi determinada a 660 nm. A quantidade de amido consumido é calculada de acordo com a equação da reta derivada de uma curva padrão construída com quantidades crescentes de amido solúvel (0 – 1,5 mg. mL<sup>-1</sup>) a partir de uma solução estoque a 83,3 mg. mL<sup>-1</sup>. Uma unidade de atividade amilolítica dextrinizante (UAD) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1mg de amido por minuto de reação.

#### **3.8.7.2. $\beta$ -amilase (atividade sacarificante)**

A atividade de  $\beta$ -amilase foi determinada pelo método descrito por Okolo et al. (1995). Os tubos de reação (triplicata) foram adicionados de 1,0 mL de amido solúvel a 1% (previamente aquecido em Banho Maria para dissolução total do amido), 0,5 mL de tampão acetato de sódio 0,1M (pH 5,0) e 0,3 mL do extrato enzimático bruto. Após 10 min. de incubação a 50° C, foram adicionados aos tubos 2 mL de reagente ADNS. Os tubos foram fervidos por 5 min. em Banho Maria, resfriados e a leitura das absorbâncias efetuadas em 540 nm. Os tubos “branco” consistiram apenas de 1,0 mL de amido solúvel a 1%, 1,0 mL de tampão acetato de sódio 0,1M (pH 5,0) e 2 mL de reagente ADNS. A equação da reta de uma curva utilizando a glicose como padrão foi usada para o cálculo da concentração de  $\beta$  amilase (mg. mL<sup>-1</sup>), sendo o resultado multiplicado pelo fator de diluição. Uma unidade de  $\beta$  amilase (UBA) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 mg de açúcar redutor por minuto de reação.

### 3.8.8. Quitinase

A atividade de quitinase foi determinada pela quantificação dos açúcares redutores (método do ADNS) (MILLER, 1959) liberado da quitina. Os tubos de reação foram adicionados de 0,5 mL de quitina regenerada (0,25%) dissolvida em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 (MOLANO et al., 1977) e incubados por 5 min. a 37° C. Após este período, os tubos foram acrescentados de 0,5 mL de extrato enzimático bruto, permanecendo incubados por 12 h a 37° C, sob agitação. Os tubos “brancos” foram constituídos de quitina regenerada e tampão (2 mL). Após período de incubação, os tubos foram centrifugados a 8.000 rpm por 15 minutos, sendo 0,25 mL dos sobrenadantes transferidos para outros tubos e acrescentados de 1 mL do reagente ADNS. Os tubos foram fervidos em Banho Maria por 5 min., esfriados em água e a absorbância lida em 540 nm. A quantidade de açúcares redutores formados (AR) foi calculada utilizando a equação de reta obtida de uma curva utilizando a glicose como padrão (AGUSTINHO, 2007). Uma unidade de enzima (UQ) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de açúcar redutor por h, sendo utilizada a fórmula:

$$UQ = AR \times D \times \frac{Vt}{T} \times G \times Ve$$

Onde:

AR: açúcares redutores

D: diluição (mL)

Vt: volume total da reação (mL)

T: tempo da reação (min.)

G: μmol de glicose (0,18 mg)

Ve: volume utilizado do extrato enzimático bruto (mL)

A quitina regenerada foi preparada pela acetilação de quitosana conforme descrito por Molano et al. (1977). Um grama de quitosana foi dissolvido em 100 mL de ácido acético 10% (v/v), macerado em um graal de porcelana e incubado por 17 h a temperatura ambiente. Após este período foram adicionados, lentamente, 30 mL de metanol e a solução obtida foi filtrada em gaze. O filtrado foi adicionado de anidrido acético, sob agitação lenta, até que a solução ficasse gelatinosa. Essa solução foi deixada para solidificar por 30 minutos a temperatura ambiente. A mistura gelatinosa foi homogeneizada em um liquidificador com 1,0 volume de

metanol e, posteriormente, centrifugada a 8.000 rpm por 30 minutos. O sedimento foi lavado exaustivamente com água destilada até a sua neutralização (pH 7,0) e em seguida utilizado.

### **3.8.9. Determinação dos açúcares redutores (AR)**

As atividades das enzimas  $\beta$  1-3 endoglucanase,  $\beta$  - amilase, CMCase, FPase e quitinase foram determinadas pela quantificação dos açúcares redutores (AR), procedida pelo método do ácido 3,5- dinitrosalicílico (ADNS) (MILLER, 1959), conforme recomendação da IUPAC (GHOSE, 1986). De acordo com este método, o ADNS sofre redução de um de seus grupos nitro ao reagir com os carboidratos, formando um composto que apresenta forte absorção em 540 nm., conforme esquema abaixo:

O reagente ADNS foi preparado com a dissolução de 7,49 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 14 g de NaOH em 1000 mL de água destilada. Após a dissolução, foram adicionados 216,10 g de tartarato duplo de sódio e potássio (Sal de Rochelle), 5,37 mL de fenol (fundido a 50°C) e 5,86 g de metabissulfito de sódio. O reagente foi rotineiramente armazenado na temperatura ambiente. Para o procedimento analítico, foi adicionado um volume apropriado do reagente DNS a um determinado volume das amostras a serem analisadas em tubos de ensaio, conforme o ensaio enzimático realizado. O meio reacional permaneceu em água fervente em Banho Maria por exatamente 5 minutos e, em seguida, foi resfriado em banho de água à temperatura ambiente. Após a homogeneização do meio mediante inversão dos tubos e quando necessário, uma alíquota de 1 mL foi retirada e diluída para possibilitar a medição da absorbância e adequação à Lei de Lambert Beer. A absorbância das amostras foi medida em 540 nm e a quantificação dos AR foi realizada através de uma curva de calibração utilizando o açúcar redutor de interesse como padrão. As soluções-padrão também foram submetidas ao mesmo procedimento das amostras.

### **3.8.10. Determinação da Curva de Calibração de Glicose pelo método de AR**

Para elaboração da curva padrão de glicose, dez tubos de ensaio (triplicata) foram numerados de 1 a 10, sendo o tubo "0" destinado ao branco. Aos tubos foi adicionado um volume inicial de uma solução de glicose 10 mg. mL<sup>-1</sup> de água destilada e de ADNS conforme indicado na Tabela 6.

Após fervura em Banho Maria e resfriamento, os tubos foram adicionados de 2,5 mL de água destilada e as absorbâncias determinadas a 540 nm. Com base na equação  $C_i \cdot V_i = C_f \cdot$

$V_f$  foram calculadas as concentrações finais (Cf) de glicose em cada tubo, sendo expressa em mg. mL<sup>-1</sup>. A média das absorvâncias e concentrações finais de glicose de cada tubo foram plotadas (eixos y e x, respectivamente) no programa Excel 2007 para obtenção da equação da reta ( $y = ax + b$ ).

**Tabela 6-** Elaboração da curva padrão de glicose

Tubos	Glicose 10 mg. mL <sup>-1</sup> (mL)	Água (mL)	ADNS (mL)
0	0,000	0,500	0,3
1	0,050	0,450	0,3
2	0,075	0,425	0,3
3	0,100	0,400	0,3
4	0,150	0,350	0,3
5	0,175	0,325	0,3
6	0,200	0,300	0,3
7	0,250	0,250	0,3
8	0,275	0,225	0,3
9	0,300	0,200	0,3
10	0,350	0,150	0,3

Com base na equação da reta ( $x = y - b / a$ ), em que representa “y” o valor das absorvâncias obtidas das leituras e “a” e “b” os coeficientes angulares da reta fornecidos pela equação da curva de glicose, foi calculado o valor de “x”, correspondente às concentrações de açúcares redutores (AR) desconhecidos. As concentrações obtidas foram multiplicadas pelo fator de diluição das amostras e o resultado expresso em mg. mL<sup>-1</sup>.

### **3.9. Crescimento e esporulação de *Trichoderma* spp sobre vassouras de bruxa esterilizadas e sobre vassouras de bruxa infectadas por Mp subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916**

#### **3.9.1. Desinfecção e esterilização de vassouras infectadas por *M. pernicioso* para testes de colonização por *Trichoderma* spp**



Vassouras de bruxa secas e infectadas por MpSD (subgrupo desconhecido), cedidas pelo Laboratório de Biocontrole do CEPEC- CEPLAC (Ilhéus, Bahia), foram cortadas em segmentos de 10 cm, lavadas em água corrente, submersas por 20 min. em solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) e lavadas novamente com água destilada estéril, sendo posteriormente transferidas para cestas vazadas para eliminação do excesso de desinfetante (PURDY, 1990). As vassouras desinfetadas foram transferidas para sacos de polipropileno e esterilizadas a 121° C por 1 h por 3 d consecutivos e alternados (tindalização). As vassouras esterilizadas foram mantidas nos sacos em temperatura ambiente até sua utilização.

### **3.9.1.1. Teste de esterilização de vassouras (SANOGO et al., 2002)**

Para testar se os segmentos de um determinado grupo de vassouras infectadas e esterilizadas (item 3.9.1) não apresentavam mais infecção por MpSD, 5 segmentos de vassouras esterilizadas foram retirados de cada saco de polipropileno e transferidos para câmaras úmidas constituídas de placas de Petri de 15 cm adicionadas de duas camadas de papel de filtro estéril e 5 mL de água destilada estéril. As placas foram mantidas a temperatura de  $24 \pm 2^\circ$  C por 20 d. Os controles consistiram de segmentos não autoclavados e que tiveram o mesmo tratamento. A ausência de micélio branco emergindo das extremidades distais dos segmentos após o período de incubação indicava ausência de infecção.

### **3.9.2. Produção de micélio de *M. perniciosus* subgrupos 1441, 1445 e 1893 em meio farelo de trigo e vermiculita (MFV)**

Vidros de boca larga foram adicionados de 30 g de meio sólido (MFV) constituído de uma mistura homogênea de farelo de trigo (50 g), vermiculita (40 g),  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (12 g),  $\text{CaCO}_3$  (1,5 g) e 120 mL de água destilada, sendo os vidros tampados com polipropileno e esterilizados a 121° C por 30 min. (NIELLA, 2000). Após resfriamento, o meio foi homogeneizado assepticamente com espátula e individualmente inoculado com 5 blocos de BDA contendo cultivo de 20 d de Mp subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916 (quintuplicata) e incubados a  $24 \pm 2^\circ$  C sob fotoperíodo de 12 h até colonização de todo meio (15 a 25 d).

### **3.9.3. Infecção de vassouras esterilizadas por *M. perniciosus* subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916**

Segmentos de vassouras esterilizadas (item 3.9.1) foram submersos em Beckers contendo água destilada previamente esterilizada por 20 a 30 min., a fim de se elevar o conteúdo de umidade das vassouras a aproximadamente 40%. Média de 8 segmentos de vassouras umedecidas foram individualmente inoculadas pelas suas extremidades distais nos vidros com MFV, contendo os cultivos dos diferentes grupos de Mp (item 3.11.3) (Figura 14), de modo a produzir, em média, 40 vassouras infectadas de cada subgrupo. Os vidros foram incubados a  $24 \pm 2^\circ \text{C}$  sob fotoperíodo de 12 h, até que a colonização atingisse  $\frac{3}{4}$  dos segmentos de vassoura (20 a 40 d), ficando, portanto a extremidade final livre de micélio de Mp.



**Figura 14-** Infecção de vassouras de bruxa esterilizadas por *M. pernicioso*, crescido em meio farelo de trigo e vermiculita.

#### **3.9.4. Colonização de vassouras infectadas *in vitro* por *M. pernicioso* subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916 por *Trichoderma* spp**

Isolados de Tspp que apresentaram *in vitro* diferentes potenciais de micoparasitismo a Mp foram avaliados quanto às suas capacidades de colonizar vassouras infectadas por Mp. Assim, Th911 foi avaliado quanto a sua capacidade de colonizar vassouras infectadas por Mp 1445 e Mp1916; Tvi2007 por vassouras infectadas por Mp Mp1893; Tlg3188 por vassouras infectadas por Mp 1445 e Mp1893 e Tps1052 por vassouras infectadas por Mp1441 e Mp1445. Três segmentos de vassouras infectados por cada subgrupo de Mp (item 3.9.3), após

imersão em água destilada estéril por 20 a 30 min., foram acondicionadas em placas de Petri de 12 cm de diâmetro (triplicata) contendo 2 discos de papel de filtro estéreis e 8 mL de água destilada estéril. Sobre o ¼ final de cada vassoura de bruxa, livre de micélio de Mp, foram inoculados individualmente esporos de Tspg obtidos de cultivos de 8 d em BDA. As placas foram seladas com parafilme e mantidas a  $24 \pm 2^\circ \text{C}$  sob fotoperíodo de 12 h, por 20 a 25 d. As placas controle consistiram de vassouras esterilizadas não tratadas com Tspg. Após o período de incubação, foi observada a presença de esporos na superfície dos segmentos. A capacidade de colonização foi considerada positiva quando foram observados esporos sobre a superfície dos segmentos.

### **3.9.5. Colonização de vassouras esterilizadas por *Trichoderma* spp**

Foram utilizados neste experimento isolados de Tspg que apresentaram em cultivos pareados diferentes capacidades de micoparasitismo (Th911, Tps1052, Tlg3188 e Tvi2007) e segmentos de vassouras esterilizadas (item 3.9.1). Após imersão em água destilada estéril por 20 a 30 min., três segmentos de vassouras esterilizadas foram acondicionados em placas de Petri de 12 cm de diâmetro (triplicata) contendo 2 discos de papel de filtro estéreis e 8 mL de água destilada estéril. Com auxílio de uma alça, foram transferidas para as extremidades distais das vassouras, esporos de Tspg obtidos de cultivos de 8 d em BDA. As placas foram seladas com parafilme e mantidas a  $24 \pm 2^\circ \text{C}$  sob fotoperíodo de 12 h, por 20 a 25 d. As placas controle consistiram de vassouras esterilizadas não tratadas com Tspg. Após o período de incubação, foi observada a presença de estruturas fúngicas de Tspg na superfície dos segmentos.

### **3.10. Análises estatísticas dos resultados**

Os resultados obtidos nos ensaios de crescimento micelial, esporulação em placa e em arroz, germinação de esporos, potenciais antagônicos e potenciais para uso em controle biológico, foram submetidos à análise de variância, seguido do teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (SCOTT e KNOTT, 1974). Os demais ensaios foram submetidos à análise de variância pelo teste t e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, pelo programa SPSS Statistic 17.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Estudo das características de crescimento micelial, esporulação e germinação de isolados de *Trichoderma spp in vitro***

#### **4.1.1. Considerações preliminares**

A maioria dos trabalhos de pesquisa sobre biocontrole avalia isoladamente diversas características do antagonista e patógeno de importância ao processo antagônico, entretanto, como a escolha de um bom antagonista depende do mesmo reunir uma série de qualidades que atuem em conjunto na natureza, como obter um índice que as represente? Assim, neste trabalho foram estabelecidos “índices” que buscam definir quais os isolados de *Tspp* que reúnem as melhores características de importância para o controle biológico de *Mp*. As características avaliadas foram transformadas em “valores percentuais”, os quais representam os “Potenciais” dos isolados: Potencial de Crescimento (%PC), que resulta da média aritmética dos Potenciais de Velocidade de Crescimento Micelial (%IVCM), de Esporulação em placa (%PE) e de Germinação de esporos (%PGe); Potencial Antagônico (%PA), que expressa a média aritmética dos Potenciais de Micoparasitismo (%PM) e Antibiose (%PAT) e Potencial de Produtividade de esporos em arroz (%PPE), representados pelos percentuais de produtividade de esporos em arroz. A média aritmética destes potenciais resulta no Potencial

do isolado para uso em Controle Biológico (%PCB), obtendo-se, portanto, um índice que determina qual o(s) isolado(s) que apresenta *in vitro* o melhor conjunto das qualidades necessárias a um candidato para uso em biocontrole. Posteriormente, estes resultados foram confrontados com a habilidade de crescimento no substrato alvo (vassoureiro), entre outros estudos.

#### **4.1.2. Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) e Potencial de Crescimento Micelial (%IVCM) de isolados de *Trichoderma* spp *in vitro***

Os isolados de *Trichoderma* utilizados neste estudo tiveram suas capacidades de crescimento micelial avaliadas para se determinar *in vitro* quais os isolados mais agressivos. Na natureza, o antagonista deve competir por espaço e nutrientes com o fitopatógeno (MARTINS-CORDER e MELO, 1998) e, portanto, é de extrema importância que um fungo a ser utilizado em biocontrole apresente uma boa velocidade de colonização, o que determina sua habilidade em se estabelecer no substrato alvo (SANOGO et al., 2002). Se o fungo não apresentar abundante esporulação e elevada germinação dos esporos, pode degenerar e resultar em uma baixa colonização do substrato ou formação de propágulos de vida curta (SANOGO et al., 2002).

Os resultados da velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos isolados de *Tspp* avaliados estão apresentados na tabela 7. Os isolados que apresentaram maior crescimento micelial nas primeiras 24 h foram Ts1441 e Ts1445 (2,47 cm) seguidos de Tpl925 e Ts3109 (2,40 cm). Nas 24 h seguintes, entretanto, Tpl925 apresentou crescimento mais agressivo (6,24 cm), resultando no maior IVCM ( $p \leq 0,05$ ), de 4,32 cm. Tps909 não apresentou crescimento nas primeiras 24 h, obtendo o pior IVCM ( $p \leq 0,05$ ), de 1,35 cm.

Deve se levar em consideração que o meio de cultura pode afetar o crescimento micelial de fungos (DOMINGUES et al., 2000), sendo que a resposta diferencial dos isolados à velocidade de crescimento em meio BDA pode ter ocorrido pelo fato dos microrganismos metabolizarem nutrientes com habilidades diferentes e com isto afetar a síntese de macromoléculas essenciais ao crescimento (GRIFFIN, 1993).

Observa-se ainda na tabela 7, que isolados da mesma espécie diferem em seus IVCMs, como por exemplo, *T. harzianum* 911, 1058 e 1070 ( $p \geq 0,05$ ), o mesmo ocorrendo entre isolados de *T. pseudokoningii* (1052, 907, 1541, 913 e 909), *T. viride* (1643 e 905) e de *T. stromaticum* (1445, 1441, 4077, 3461, 3454 e 2994). Th911 e Th906, Ts1441 e Ts3768,

porém apresentaram o mesmo IVCm ( $p \geq 0,05$ ). Estes resultados demonstram existir grande variabilidade intraespecífica em relação a esta característica.

**Tabela 7** – Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de isolados de *Trichoderma* spp calculado a partir de cultivos em BDA à temperatura de  $24 \pm 2^\circ \text{C}$  e fotoperíodo de 12 h.

Isolados	Crescimento radial das colônias (cm)		
	24 h	48 h	IVCM (cm. $24 \text{ h}^{-1}$ )
Tpl925	2,40 ( $\pm 0,003$ )	6,24 ( $\pm 0,015$ )	4,32 ( $\pm 0,009$ ) <sup>A</sup>
Tps1052	1,83 ( $\pm 0,006$ )	5,84 ( $\pm 0,006$ )	3,84 ( $\pm 0,000$ ) <sup>B</sup>
Tvi2007	2,13 ( $\pm 0,006$ )	5,46 ( $\pm 0,009$ )	3,80 ( $\pm 0,003$ ) <sup>C</sup>
Tat2076	0,30 ( $\pm 0,006$ )	6,98 ( $\pm 0,006$ )	3,64 ( $\pm 0,007$ ) <sup>D</sup>
Th911	1,92 ( $\pm 0,009$ )	5,30 ( $\pm 0,007$ )	3,61 ( $\pm 0,003$ ) <sup>E</sup>
Th906	1,33 ( $\pm 0,015$ )	5,80 ( $\pm 0,015$ )	3,57 ( $\pm 0,015$ ) <sup>E</sup>
Ts1445	2,47 ( $\pm 0,017$ )	4,40 ( $\pm 0,043$ )	3,44 ( $\pm 0,015$ ) <sup>F</sup>
Tlg3188	1,52 ( $\pm 0,006$ )	5,32 ( $\pm 0,007$ )	3,42 ( $\pm 0,000$ ) <sup>F</sup>
Ts3109	2,40 ( $\pm 0,009$ )	4,41 ( $\pm 0,023$ )	3,40 ( $\pm 0,015$ ) <sup>F</sup>
Ts1441	2,47 ( $\pm 0,021$ )	4,02 ( $\pm 0,033$ )	3,24 ( $\pm 0,023$ ) <sup>G</sup>
Ts3768	1,98 ( $\pm 0,041$ )	4,44 ( $\pm 0,026$ )	3,21 ( $\pm 0,013$ ) <sup>G</sup>
Tvr1643	1,08 ( $\pm 0,015$ )	5,22 ( $\pm 0,020$ )	3,15 ( $\pm 0,017$ ) <sup>H</sup>
Ts4077	1,02 ( $\pm 0,020$ )	4,84 ( $\pm 0,023$ )	2,93 ( $\pm 0,021$ ) <sup>I</sup>
Tvr905	0,82 ( $\pm 0,003$ )	4,89 ( $\pm 0,003$ )	2,86 ( $\pm 0,003$ ) <sup>I</sup>
Ts3461	1,63 ( $\pm 0,035$ )	3,62 ( $\pm 0,019$ )	2,63 ( $\pm 0,009$ ) <sup>J</sup>
Th1058	1,07 ( $\pm 0,037$ )	4,03 ( $\pm 0,046$ )	2,55 ( $\pm 0,003$ ) <sup>K</sup>
Tps907	0,45 ( $\pm 0,029$ )	4,20 ( $\pm 0,006$ )	2,33 ( $\pm 0,012$ ) <sup>L</sup>
Ts3454	1,16 ( $\pm 0,009$ )	3,44 ( $\pm 0,006$ )	2,30 ( $\pm 0,000$ ) <sup>L</sup>
Th1070	1,28 ( $\pm 0,003$ )	3,20 ( $\pm 0,009$ )	2,24 ( $\pm 0,003$ ) <sup>M</sup>
Tps1541	0,13 ( $\pm 0,010$ )	4,14 ( $\pm 0,012$ )	2,14 ( $\pm 0,010$ ) <sup>N</sup>
Tps913	0,70 ( $\pm 0,015$ )	2,99 ( $\pm 0,019$ )	1,85 ( $\pm 0,015$ ) <sup>O</sup>
Tr1612	0,72 ( $\pm 0,015$ )	2,17 ( $\pm 0,007$ )	1,45 ( $\pm 0,007$ ) <sup>P</sup>
Ts2994	0,50 ( $\pm 0,006$ )	2,29 ( $\pm 0,010$ )	1,40 ( $\pm 0,003$ ) <sup>Q</sup>
Tps909	0,00 ( $\pm 0,000$ )	2,70 ( $\pm 0,012$ )	1,35 ( $\pm 0,006$ ) <sup>R</sup>

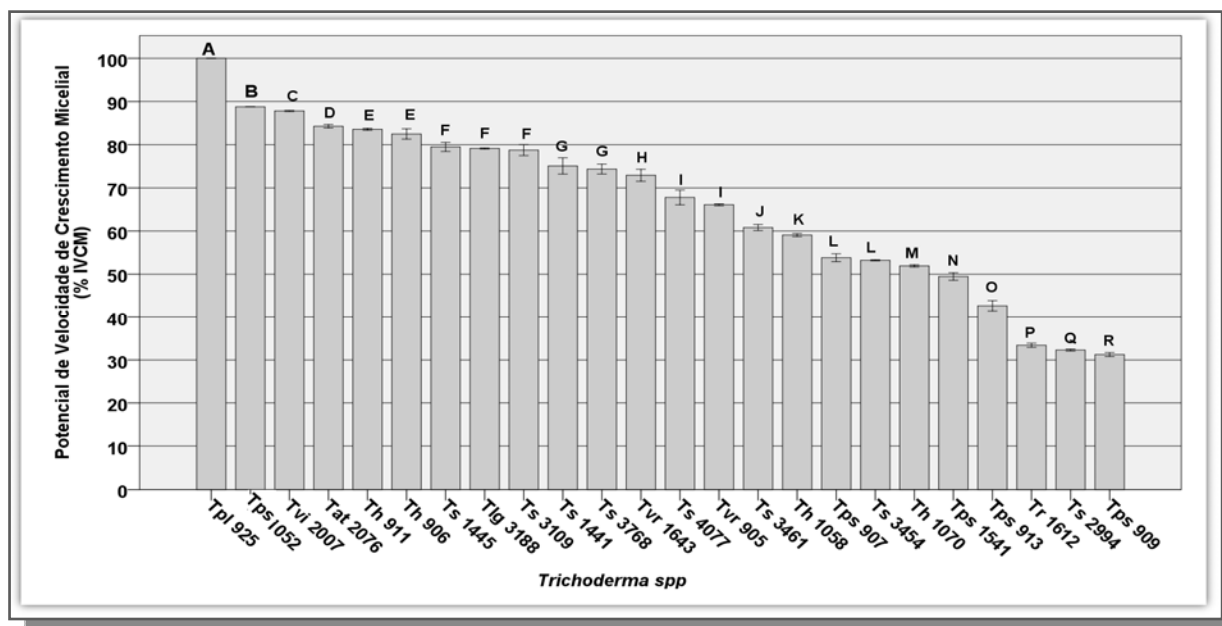
Os resultados representam as médias das triplicatas estando os erros padrão indicados entre parênteses. Médias seguidas da mesma letra não são significantes ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste Scott-Knott.

Os valores de crescimento micelial obtidos são semelhantes aos encontrados por outros autores com *T. harzianum*: 6,48 a 9,0 cm. 48 h<sup>-1</sup> (PERES e MELO, 1995), 3,76 a 7,83 cm. 48 h<sup>-1</sup> (LISBOA et al., 2007) e 8,78 a 7,23 cm. 48 h<sup>-1</sup> (ALVARENGA et al., 2007); já com *Trichoderma sp.*, Moino Jr e Alves (1999) encontraram um crescimento micelial de 6,6 cm. 48 h<sup>-1</sup>, sendo que estes resultados também comprovam a existência de variabilidade intraespecífica. As diferenças nos valores de crescimento micelial citadas e as obtidas neste trabalho podem não ser devidas a real capacidade dos isolados, mas às condições experimentais utilizadas que interferem no crescimento micelial, tais como a composição e pH do meio de cultura (KÜES e LIU, 2000) e temperatura (COLAUTO et al., 2008), que afetam a disponibilidade e absorção de nutrientes.

Os resultados de IVCM descritos na tabela 7 foram transformados em valores percentuais para obtenção do Potencial de crescimento micelial (%IVCM) dos isolados avaliados, sendo considerado como 100% o valor apresentado por Tpl925 e posteriormente calculado os valores percentuais dos demais isolados, estando os resultados apresentados na Figura 15. O isolado de maior %IVCM foi Tpl925 seguido de Tpl925, Tps1052, Tvi2007, Tat2076, Th911 e Th906, que apresentaram um %IVCM entre 80% e 90%, em relação a Tpl925.

A habilidade de *Trichoderma spp* crescer profusamente sob condições climáticas diversas e de apresentar rápido crescimento micelial (ANTAL et al., 2000), faz com que seja um ótimo competidor, uma vez que compete por espaço e nutrientes em detrimento a outros microrganismos, podendo suprimir o crescimento de fitopatógenos (SIMON e SIVASITHAMPARAM, 1998).

Esse gênero apresenta características essenciais para um agente de controle biológico, como ausência de impacto negativo ao meio ambiente, presença de estruturas de reprodução de fácil propagação, principalmente em substratos naturais (SPIEGEL e CHET, 1998), capacidade de sobreviver em ambientes desfavoráveis, além de conter populações de patógenos em condições de solo diferentes (VINALE et al., 2008).



**Figura 15-** Potencial de Velocidade de Crescimento Micelial (%IVCM) de *Trichoderma* spp *in vitro*. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas). Médias seguidas da mesma letra não são significantes de acordo com o teste Scott-Knott.

Especificamente no biocontrole de Mp, a pulverização de esporos de Tspp visa a colonização das vassouras que apresentam o patógeno na fase saprofítica e consequente diminuição da formação de basidiomas (BASTOS, 1988a), que são as formas que disseminam a doença através da liberação de esporos. Neste sentido, apresentar um rápido crescimento micelial, competindo com Mp presente nos tecidos das vassouras secas o torna um ótimo competidor natural. O mecanismo antagônico por competição de *T. stromaticum* a Mp já foi descrito por Bastos (2000), no qual o antagonista elimina o patógeno por inanição, uma vez que compete por nutrientes e espaço, mas não foram encontrados relatos sobre a velocidade de crescimento micelial. Outros pesquisadores também relataram em seus trabalhos a capacidade de competição por nutrientes exercida por isolados de *Trichoderma* a diversos fitopatógenos (SIVAN e CHET et al., 1989a; KOHL e FOKKEMA, 1998; HARMAN, 2006; ABDEL-FATTAH et al., 2007; GALLETTI et al., 2008).

#### 4.1.3. Produção de Esporos (PE) e Potencial de Esporulação (%PE) de isolados de *Trichoderma* spp em placa

Os resultados da produção de esporos em placa, apresentados na tabela 8, mostram que Tvr905 apresentou a maior produção de esporos em placa, de  $9,40 \cdot 10^8$  esporos.  $\text{mL}^{-1}$  ( $p \leq 0,05$ ), seguido de Tvi2007, sendo a menor produção apresentada por Ts4077 com 0,31.



$10^8$  esporos.  $\text{mL}^{-1}$ . A produção de esporos é freqüentemente expressa em índice de esporulação, o qual indica o número de esporos produzidos por grama de matéria seca ou por grama de substrato carbonado inicialmente presente nos meios de cultura (ROUSSOS, 1985).

**Tabela 8** – Produção de Esporos (PE) por isolados de *Trichoderma* spp após cultivos em BDA por 9 d à temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 h.

Tspp	Esporos. $10^8$ . $\text{mL}^{-1}$	Tspp	Esporos. $10^8$ . $\text{mL}^{-1}$	Tspp	Esporos. $10^8$ . $\text{mL}^{-1}$
Tvr905	9,40 ( $\pm 0,044$ ) <sup>A</sup>	Tps907	2,82 ( $\pm 0,040$ ) <sup>H</sup>	Tr1612	0,65 ( $\pm 0,017$ ) <sup>L</sup>
Tvi2007	8,38 ( $\pm 0,023$ ) <sup>B</sup>	Tpl925	2,68 ( $\pm 0,039$ ) <sup>H</sup>	Ts3768	0,56 ( $\pm 0,031$ ) <sup>M</sup>
Tps913	6,31 ( $\pm 0,046$ ) <sup>C</sup>	Tvr1643	2,52 ( $\pm 0,038$ ) <sup>H</sup>	Ts3461	0,46 ( $\pm 0,017$ ) <sup>M</sup>
Th1070	6,23 ( $\pm 0,044$ ) <sup>C</sup>	Tps1052	2,31 ( $\pm 0,038$ ) <sup>I</sup>	Ts4077	0,31 ( $\pm 0,017$ ) <sup>N</sup>
Tps1541	5,99 ( $\pm 0,023$ ) <sup>D</sup>	Ts1441	1,98 ( $\pm 0,029$ ) <sup>J</sup>		
Th911	5,81 ( $\pm 0,043$ ) <sup>D</sup>	Ts3454	1,98 ( $\pm 0,029$ ) <sup>J</sup>		
Th906	5,78 ( $\pm 0,029$ ) <sup>D</sup>	Ts1445	1,36 ( $\pm 0,049$ ) <sup>K</sup>		
Tps909	5,54 ( $\pm 0,030$ ) <sup>E</sup>	Ts3109	1,31 ( $\pm 0,046$ ) <sup>K</sup>		
Tat2076	4,43 ( $\pm 0,039$ ) <sup>F</sup>	Ts1058	0,75 ( $\pm 0,050$ ) <sup>L</sup>		
Tlg3188	3,79 ( $\pm 0,023$ ) <sup>G</sup>	Ts2994	0,73 ( $\pm 0,054$ ) <sup>L</sup>		

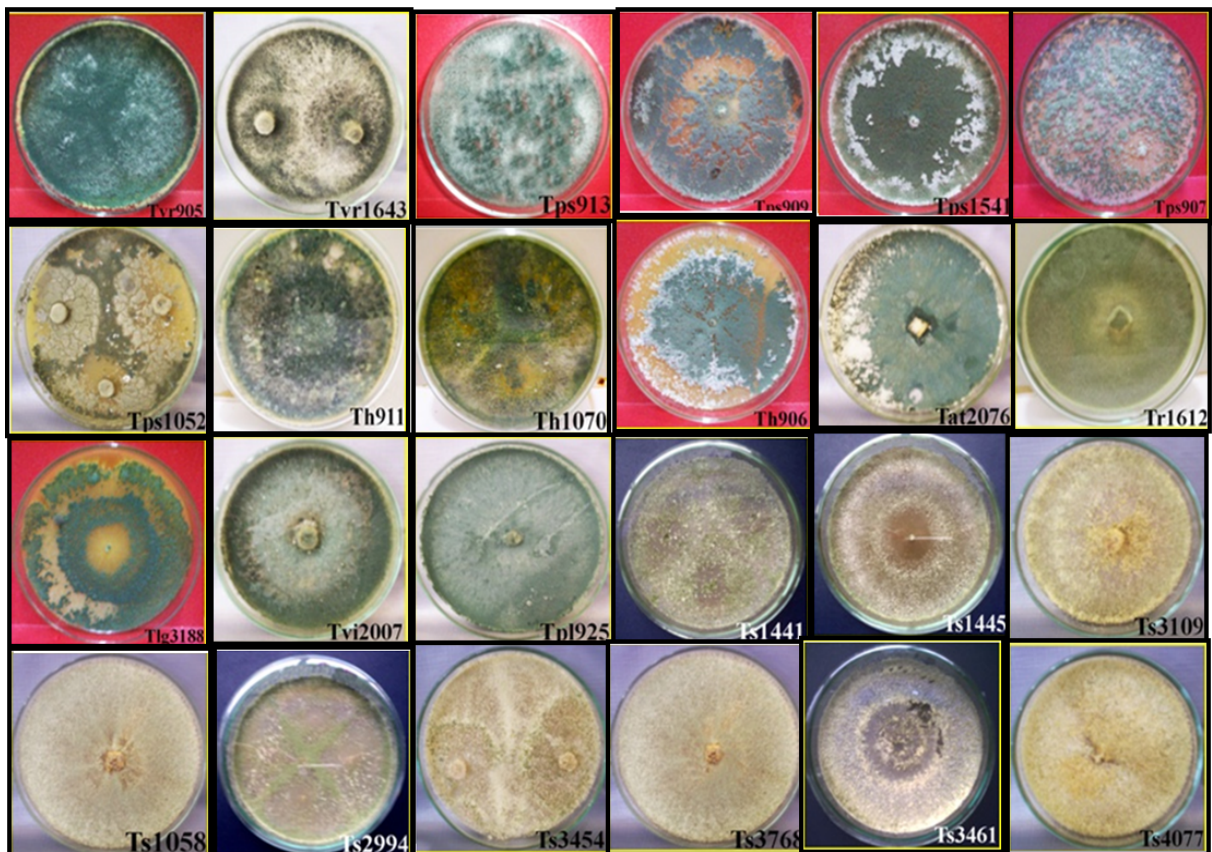
Os resultados representam as médias (triplicatas) estando os erros padrão apresentados entre parênteses. Médias seguidas da mesma letra não são significantes ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste Scott-Knott.

Tpl925, que apresentou o melhor %IVCM (Tabela 7), não teve boa produção de esporos ( $2,68 \cdot 10^8$  esporos.  $\text{mL}^{-1}$ ) (Tabela 8), o que significa que nem sempre estas características estão relacionadas, fato relatado também em outro estudo com *Trichoderma* sp. (BRITO, 2009) e com outros fungos (BARBOSA et al., 2002; DA CRUZ e PRESTES, 2009).

A comparação dos resultados apresentados na tabela 8 revela que os valores encontrados são promissores quanto àqueles de outros autores, além de se comprovar a variabilidade na produção de esporos em placa por *Trichoderma* sp. Peres e Melo (1995) estudando *T. harzianum* obtiveram produção que variou de 0,017 a  $0,836 \cdot 10^8$  esporos.  $\text{mL}^{-1}$ . Cassiolato e Melo (1999) encontraram variação entre 0,1 a  $38 \cdot 10^6$  esporos.  $\text{mL}^{-1}$  com mutantes de *T. harzianum* e Karnataka (2007) obteve  $0,0015 \cdot 10^8$  esporos.  $\text{mL}^{-1}$  por *T. viride*. Resultados semelhantes foram encontrados por Pádua et al. (2007), que obtiveram a produção de  $8,15 \cdot 10^8$  esporos.  $\text{mL}^{-1}$  por um isolado de *T. harzianum* e Alvarenga et al. (2007) obtiveram a produção máxima por um dos isolados de *T. harzianum* avaliados (CEN168) de  $5,04 \cdot 10^9$  esporos.  $\text{mL}^{-1}$ .

Quanto à produção de esporos (Tabela 8), os isolados também apresentaram variabilidade intraespecífica, o que é demonstrada pelos resultados apresentados por *T. viride* 905 e 1643 ( $p \leq 0,05$ ), por *T. pseudokoningii* 913, 1541, 909, 907 e 1052 ( $p \leq 0,05$ ), por *T. harzianum* 1070, 911 e 1058 ( $p \leq 0,05$ ) e por vários de *T. stromaticum*. Igualmente ao IVCM, Th911 e Th906 apresentaram a mesma produção de esporos ( $p \geq 0,05$ ), o mesmo ocorrendo com Ts1441 e Ts3454, Ts1445 e Ts3109, Ts1058 e Ts2994 e Ts3768 e Ts3461. A variabilidade intraespecífica quanto à velocidade de crescimento micelial e produção de esporos provavelmente se devem ao fato dos isolados serem de diferentes regiões cacaueiras e provavelmente adaptados às condições locais específicas.

Na figura 16 se visualiza claramente as diferenças de esporulação entre os isolados de *Tspp*, além das diferenças quanto às características de colônia quanto à coloração de esporos, que no gênero *Trichoderma* são tipicamente verdes, sendo, entretanto, os produzidos por *T. stromaticum* de coloração amarela.

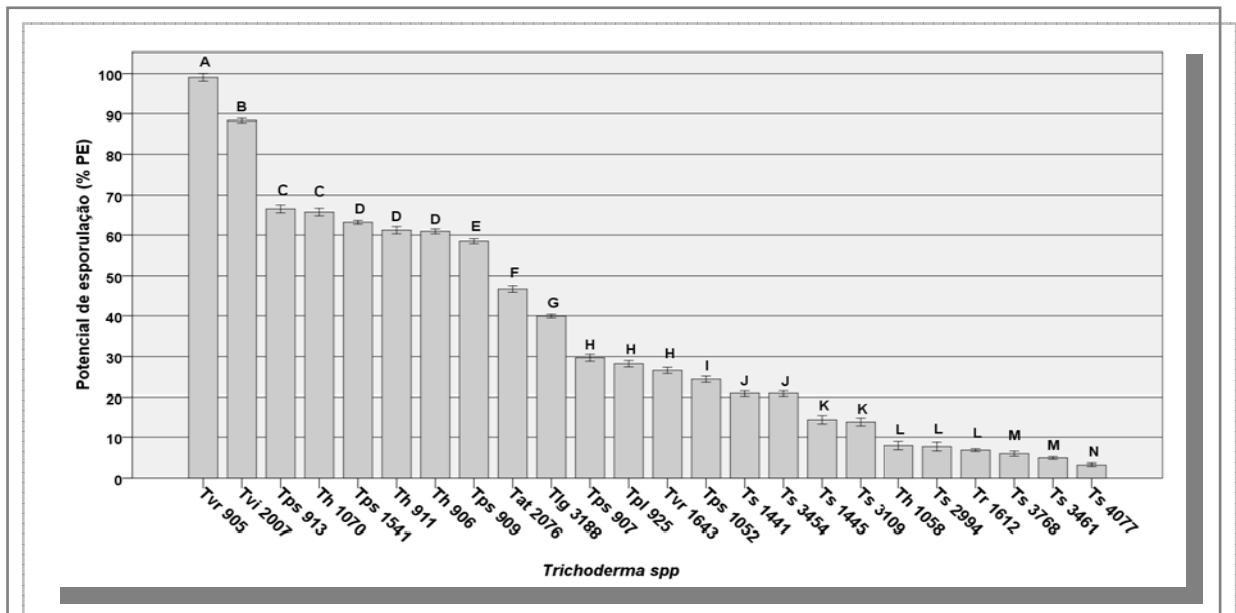


**Figura 16-** Aspecto morfológico das colônias de isolados de *Trichoderma* spp após cultivo dêm BDA por 9 d à temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 h.

Apesar das linhagens de *Trichoderma* spp caracterizarem-se por um crescimento rápido, há consideráveis variações em seu crescimento e esporulação até mesmo quando são

comparados os isolados da mesma espécie (PERES e MELO, 1995), o que está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, sendo que diferenças na esporulação entre isolados de uma mesma espécie são relatadas também para outros fungos. Barbosa et al. (2002) encontraram variação no crescimento radial e esporulação entre dois isolados de *Verticillium lecanii*, entomopatôgeno usado no controle biológico de pragas, quando cultivados em meios diversos. Posteriormente, Monteiro et al. (2004) encontraram, para os mesmos isolados, diferença nas temperaturas preferenciais de esporulação. Sosa-Gómez e Alves (2000) também encontraram diferença significativa na produção de conídios entre dois isolados de *Beauveria bassiana* (fungo entomopatogênico). Além disso, a esporulação é afetada pelas condições de cultivo, tais como fonte de carbono (FRIELL et al., 2008), luminosidade e injúrias ao micélio (CASAS-FLORES et al., 2004) e fonte de nitrogênio e pH (STEYAERT et al., 2010a e 2010b).

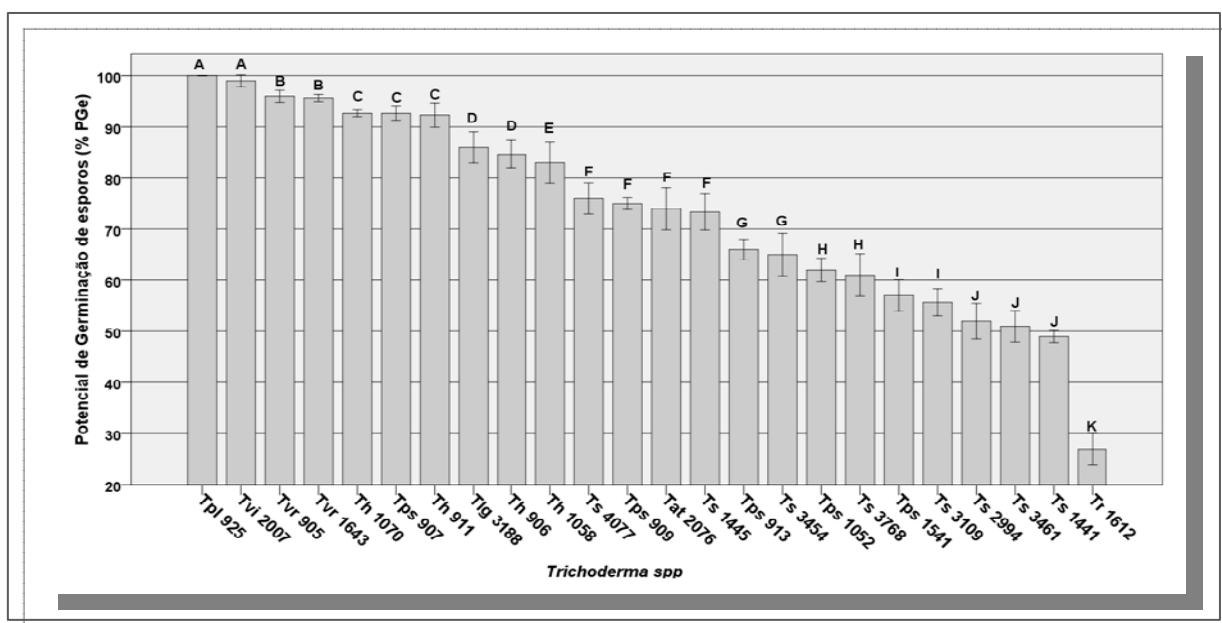
Para obtenção de índices percentuais que expressem os Potenciais de produção de esporos (%PE) em placa, foi tomado como 100% o valor apresentado por Tvr905 e posteriormente efetuado os cálculos dos valores percentuais dos demais isolados, estando os resultados apresentados na figura 17. Observa-se claramente um percentual decrescente no %PE, principalmente pelos isolados de *T. stromaticum* (Ts) em relação a Tvr905, não sendo encontrada na literatura relatos de produção de esporos em placa por esta espécie.



**Figura 17-** Potencial de Esporulação em placa (%PE) de isolados de *Trichoderma* spp *in vitro*. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas). Médias seguidas da mesma letra não são significantes de acordo com o teste Scott-Knott.

#### 4.1.4. Potencial de Germinação (%PGe) de isolados de *Trichoderma* spp

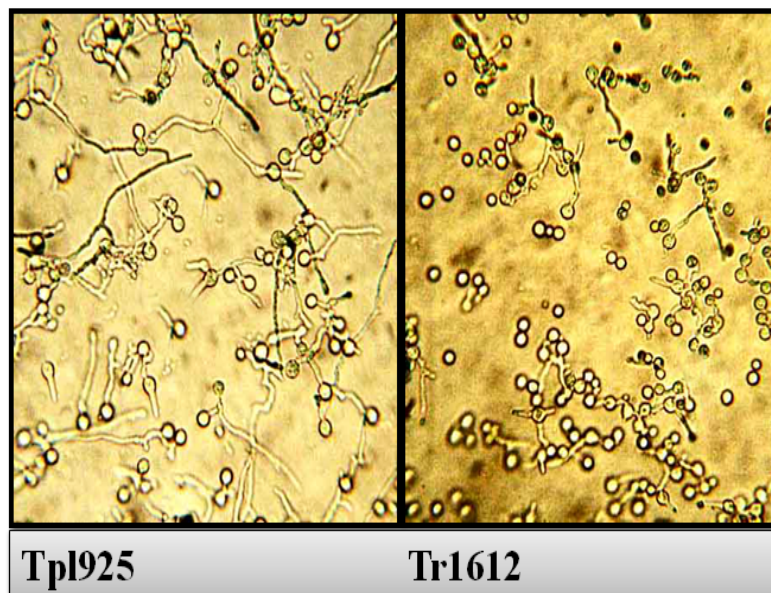
Os resultados dos Potenciais de germinação de esporos (%PGe) de T spp estão apresentados na figura 18. Tpl925 e Tvi2007 obtiveram o melhor índice de %PGe (100% e 99%, respectivamente), não sendo significativa a diferença entre eles ( $p \geq 0,05$ ). Outros isolados apresentaram um %PGe acima de 90%, tais como Tvr905 e Tvr1643 (97 e 96%, respectivamente) que não apresentaram diferença estatisticamente significativa na produção ( $p \geq 0,05$ ), assim como Th1070, Tps907 e Th911 (93, 92 e 90%, respectivamente) para os quais as diferenças também não foram significativas ( $p \geq 0,05$ ). A variabilidade intraespecífica de resultados também foi observada quanto à germinação de esporos por T spp.



**Figura 18-** Potencial de Germinação de esporos (%PGe) de *Trichoderma* spp após microcultivo em lâmina em meio BDA a  $24 \pm 2^\circ \text{C}$  por 15 h. As barras verticais representam os erros padrão das médias (triplicatas). Médias seguidas da mesma letra não são significantes de acordo com o teste Scott- Knott.

Resultados semelhantes foram obtidos quanto à germinação de esporos por *Trichoderma*. Jackson et al. (1991) obtiveram também elevado percentual de germinação de esporos de *T. viride* e *T. pseudokoningii* (95%) em meio com peptona a 1% após 20h de incubação. Mesmo em formulações de esporos armazenados, a viabilidade dos esporos de *Trichoderma* se mantém, como relatado por Pedreschi e Aguilera (1997) que obtiveram uma germinação entre 100 e 70% de esporos armazenados a 8 e  $33^\circ \text{C}$ , respectivamente. Nascimento et al. (2000) obtiveram média de germinação entre 80 e 100% de conídios de *Trichoderma* armazenados em óleos vegetais.

Os isolados de Ts apresentaram os menores %PGe<sub>s</sub>, entre 70 a 30% em relação a Tpl925, sendo o menor Potencial de germinação apresentado por Tr1612. Na figura 19, observa-se a germinação em microcultivo de 15 horas de Tpl925 (100%) e de Tr1612 (26%).



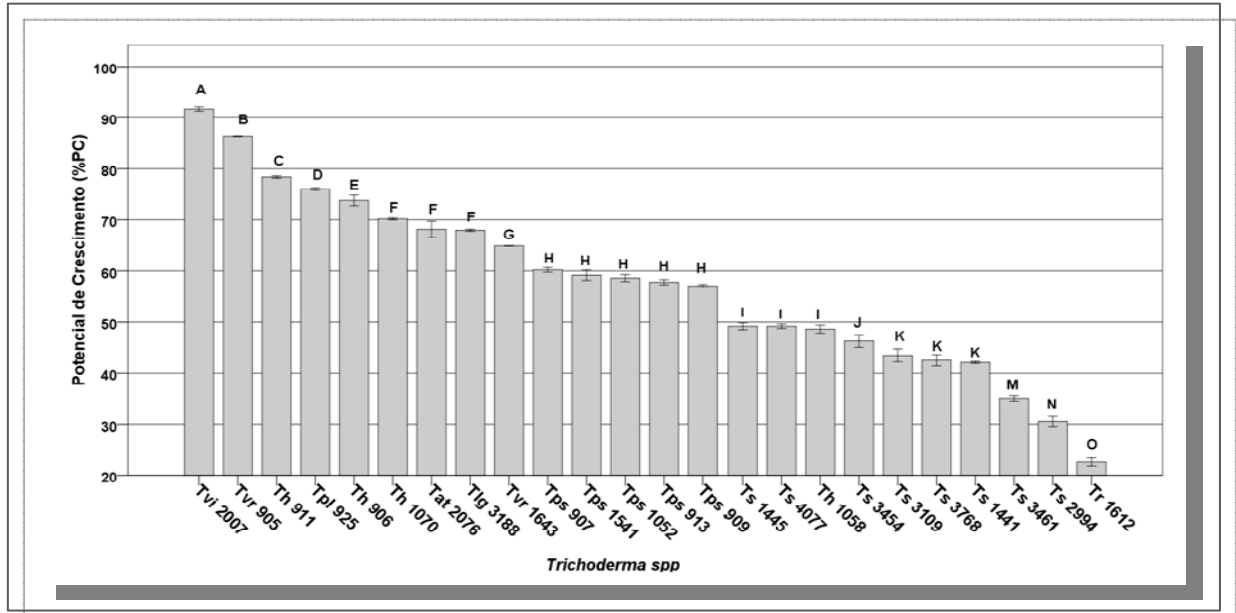
**Figura 19-** Germinação de esporos de *T. pilulliferum* (Tpl925) e *T. reesei* (Tr1612) após microcultivo em lâmina em meio BDA a  $24 \pm 2^\circ \text{C}$  por 15 h. (x 200).

#### 4.1.5. Potencial de Crescimento (%PC) de isolados de *Trichoderma* spp

A associação dos Potenciais de Velocidade de Crescimento Micelial (%IVCM), Esporulação (%PE) e Germinação de esporos (%PGe), resulta no Potencial de Crescimento dos isolados avaliados (%PC), estando os resultados apresentados na figura 20, sendo o maior %PC obtido por Tvi2007 (91,72%), seguido por Tvr905 (86,39%), Th911 (78,40%), Tpl925 (76,04%) e Th906 (73,82%), sendo todos significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ). Já Th1070, Tat2076 e Tlg3188 apresentaram %PCs semelhantes ( $p \geq 0,05$ ). Teoricamente, os isolados de maior %PC teriam maior chance de colonização do substrato na natureza, não por apresentarem isoladamente uma ou outra característica vantajosa, mas por no conjunto apresentarem um bom crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos.

*T. reesei* apresentou o menor %PC, uma vez que não houve nenhum bom resultado das características avaliadas isoladamente (Figura 20). Os isolados de Ts, devido ao baixo %PE e %PGe (Figuras 17 e 18, respectivamente) também figuram com os piores %PCs, apesar de serem os mais estudados e utilizados para o biocontrole de *M. perniciosa* (BASTOS, 2000a;

SAMUELS, 2000). Não existem relatos na literatura quanto ao estudo do desempenho desta espécie quanto às características avaliadas.

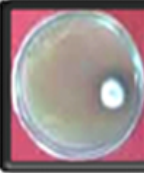





















**Figura 20-** Potencial de Crescimento (%PC) de *Trichoderma* spp *in vitro*. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas). Médias seguidas da mesma letra não são significantes ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste Scott-Knott.

Pelos resultados apresentados nas figuras 15, 17 e 18, se a seleção de um dos isolados avaliados fosse realizada pelo seu Potencial de crescimento micelial, Tpl925 seria o melhor candidato; se feita pela capacidade de esporulação e germinação seria Tvr905. No conjunto das características (Figura 20) Tvi2007 e Tvr905 se apresentaram como os mais promissores, sendo que todos os isolados de *T. pseudokoningii* e *T. stromaticum* seriam descartados da seleção.

#### 4.1.6. Índice de Velocidade de Crescimento Micelial de *M. perniciosus* subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916

O crescimento dos diferentes subgrupos de Mp foi avaliado em BDA, sendo efetuadas fotos a cada 5 d por 25 d, estando os resultados apresentados na figura 21.

Mp (subgrupos) (raio)	Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de Mp					IVCM cm (24 h <sup>-1</sup> )
	3 d	7 d	15 d	20 d	25 d	
<b>Mp1441</b>						<b>0,17</b> (± 0,003) <sup>D</sup>
	0,55 <sup>B</sup> (± 0,08)	0,68 <sup>C</sup> (± 0,02)	1,50 <sup>D</sup> (± 0,09)	2,38 <sup>D</sup> (± 0,14)	4,92 <sup>D</sup> (± 0,02)	
<b>Mp1445</b>						<b>0,28</b> (± 0,002) <sup>A</sup>
	0,52 <sup>B</sup> (± 0,12)	1,86 <sup>A</sup> (± 0,04)	5,22 <sup>A</sup> (± 0,03)	5,97 <sup>A</sup> (± 0,07)	7,52 <sup>A</sup> (± 0,05)	
<b>Mp1893</b>						<b>0,23</b> (± 0,002) <sup>B</sup>
	0,59 <sup>A</sup> (± 0,05)	0,90 <sup>B</sup> (± 0,03)	3,22 <sup>C</sup> (± 0,07)	5,35 <sup>C</sup> (± 0,10)	6,50 <sup>B</sup> (± 0,14)	
<b>Mp1916</b>						<b>0,21</b> (± 0,003) <sup>C</sup>
	0,52 <sup>B</sup> (± 0,03)	0,64 <sup>C</sup> (± 0,03)	4,01 <sup>B</sup> (± 0,11)	5,63 <sup>B</sup> (± 0,06)	5,82 <sup>C</sup> (± 0,08)	

**Figura 21-** Índice de velocidade de crescimento radial (IVCM) de *M. perniciosa* subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916 em cultivos de 3 a 25 d. Os resultados representam as médias das triplicatas, seguidos dos erros padrão. Letras da mesma cor representam comparação de médias entre subgrupos e sendo iguais não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Após 3 d de cultivo, o subgrupo Mp1893 apresentou uma diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) quanto à velocidade de crescimento micelial em relação aos outros isolados, que apresentaram crescimento semelhante ( $p \geq 0,05$ ). Aos 7 d de cultivo Mp1445 se destacou dos demais, com um crescimento radial de 1,86 cm ( $p \leq 0,05$ ), seguido de Mp1893, tendo Mp1441 e Mp1916 igual crescimento ( $p \geq 0,05$ ). Aos 25 d de cultivo, Mp1445 permaneceu com o maior crescimento radial, seguido por Mp1893, Mp1916 e Mp1441, todos diferentes entre si ( $p \leq 0,05$ , tendo os IVCMs dos isolados acompanhado o mesmo padrão.

## **4.2. Estudo das características antagônicas de *Trichoderma* spp a diferentes subgrupos de *M. perniciosa***

### **4.2.1. Avaliação da metodologia proposta para análise das capacidades de micoparasitismo e antibiose de isolados de *Trichoderma* spp a diferentes subgrupos de *M. perniciosa* pelo método da cultura pareada**

A maioria dos trabalhos revistos na literatura (RINI e SULOCHANA, 2007; LOUZADA et al., 2009 ; CARVALHO FILHO, 2008, entre outros) utiliza o método de Bell (1982) para avaliar a capacidade de micoparasitismo do antagonista sobre o patógeno em cultura pareada, que consiste em uma escala de notas que determina a capacidade do antagonista crescer sobre o patógeno, onde: classe 1= colonização de toda a superfície do meio por *Trichoderma*, este sobrepondo a colônia do patógeno; classe 2= colonização de pelo menos 2/3 da superfície do meio por *Trichoderma*, ainda sobrepondo a colônia do patógeno; classe 3= colonização de mais de 1/3 e menos de 2/3 da superfície do meio por ambos, *Trichoderma* e antagonista, sem sobreposição de um pelo outro; classe 4= colonização de 2/3 da superfície do meio pelo patógeno, este resistindo à invasão por *Trichoderma* e 5= colonização de toda a superfície do meio pelo patógeno, este sobrepondo a colônia de *Trichoderma*.

Segundo esta escala, na classe 2 pode ocorrer a sobreposição parcial do patógeno pelo antagonista, entretanto, se a capacidade de micoparasitismo é demonstrada por um fungo a um fitopatógeno é porque o antagonista possui genes que codificam a síntese de enzimas que degradam a parede celular do patógeno e que se expressam na presença dele, permitindo que ele cresça sobre o patógeno, dele se alimentando, ou seja, esta capacidade existe ou não existe.

Nos resultados dos cultivos pareados dos isolados de *Trichoderma* spp com os diferentes subgrupos de *M. perniciosa* (Figuras 20 A a I) pode-se comprovar que em nenhum cultivo ocorreu do antagonista sobrepor parcialmente o patógeno, assim como não foi encontrada na literatura nenhuma imagem de cultura pareada que demonstre que isto possa ocorrer, sendo consideradas as duas classes de micoparasitismo (PM; 0,0% quando o antagonista não cresceu sobre o patógeno e %PM: 100% quando sobrepôs a colônia do patógeno) efetivas na avaliação da capacidade de micoparasitismo dos isolados de *Trichoderma* spp avaliados.



A metodologia para avaliação da capacidade do antagonista em inibir o crescimento do patógeno em cultivo pareado, usualmente é realizada através da comparação do crescimento radial do patógeno em cultura pareada com o antagonista, ao crescimento radial do patógeno em placas controle, sendo o cálculo da antibiose efetuado pela fórmula de Edington et al. (1971). Mas, quando o antagonista cresce por toda superfície da placa é impossível na maioria dos casos, se observar a colônia do patógeno, sendo impossível se obter a medida do crescimento radial do mesmo e conseqüentemente se calcular o potencial de antibiose. Szekeres et al. (2006), estudando o antagonismo entre *Trichoderma* spp e *Fusarium culmorum*, também identificaram estes problemas e propuseram uma metodologia para se determinar mensurações baseadas em análises de imagens através de softwares especiais. Na ausência destes softwares, foram utilizadas ferramentas do Adobe Photoshop CS3 para a edição das fotos digitais dos cultivos pareados de Tspp e Mp, em que através da seleção de cores específicas e preenchimento por outras cores, além de outros atributos de edição, foi possível a visualização da colônia do patógeno e medição do crescimento radial através de uma régua virtual (Desktop Ruler, v. 3.28, Coder Ltd. Split, Croatia). Sem a edição das fotos seria impossível se determinar o potencial de inibição de Tspp aos subgrupos de Mp avaliados. Entretanto, ainda não foi considerado o método mais adequado, uma vez que cada foto teve um tratamento especial de modo a se obter a melhor visualização.

#### **4.2.2. Antagonismo de *Trichoderma* spp a diferentes subgrupos de *M. perniciosa* pelo método da cultura pareada**

Nas figuras 22 A a 22 I estão apresentados os cultivos pareados de 25 d de Tspp com os diferentes subgrupos de Mp, estando as colônias de Mp a esquerda e as de Tspp a direita das placas, sendo que: RCP representa o crescimento radial (cm) de Mp nas placas controle em cultivos individuais de 25 d, RIP representa o crescimento radial (cm) de Mp em cultivos de 7 d, antes do pareamento com Tspp, RFP o crescimento radial (cm) de Mp após 25 d de pareamento com Tspp (setas amarelas), e RAC o crescimento radial (cm) de Tspp após 25 d de cultivo de pareamento com Mp (setas vermelhas). As fotos foram tomadas a cada 5 d por 25 d e editadas em Photoshop CS3.

A figura 22 A mostra o crescimento de Tr1612 e os subgrupos de Mp em cultivo pareado. Observa-se que houve crescimento radial das colônias de todos os subgrupos de Mp entre o dia do pareamento com Tr1612 e o 5º d de cultivo, quando o antagonista entrou em contato com as colônias de Mp, uma vez que os raios das colônias são menores que os

respectivos raios iniciais (RIP); é possível ainda se observar um halo separando as colônias do antagonista e Mp1441 e Mp1445.

Após o contato com o antagonista, os subgrupos de Mp não apresentaram mais crescimento radial, sendo que os raios finais destes isolados (RFP) (setas amarelas) aos 25 d de cultivo foram menores que os raios das placas controle (RCP). Ficou evidente a capacidade de antibiose em diferentes níveis de Tr1612 a todos os subgrupos. A partir do 5º d de cultivo pode ser observado que a colônia do antagonista sobrepôs a colônia de Mp1916, esporulando fracamente. Ao final dos 25 d de cultivo o antagonista apresentou um RAC (seta vermelha) sobre Mp1916 de 9,0 cm, comprovando sua capacidade de micoparasitismo, que não foi verificada para os outros subgrupos ( $RAC \leq 9,0$  cm).

Figura 22 A										
Mp	RCP: Cultivo 25 d	RIP: Cultivo 7 d	Cultivo pareado Tr1612 e Mp					RFP:	RAC:	
			5 d	10 d	15 d	20 d	25 d			
1 4 4 1									2,96 ± 0,03	3,54 ± 0,03
1 4 4 5									3,39 ± 0,08	2,92 ± 0,02
1 8 9 3									5,92 ± 0,17	0,00 ± 0,00
1 9 1 6									1,96 ± 0,02	9,00 ± 0,00
	4,92 ± 0,02	0,68 ± 0,02								
	7,52 ± 0,05	1,86 ± 0,04								
	6,50 ± 0,14	0,90 ± 0,03								
	5,82 ± 0,08	0,64 ± 0,03								

**Figura 22 A-** Cultivo pareado de *T. reesei* 1612 e os diferentes subgrupos de *M. perniciosus*. Os resultados representam as médias das triplicatas, seguidos dos erros padrão.

RCP: média do crescimento radial do patógeno nas placas controle; RIP: média do crescimento radial inicial do patógeno no 7º d de cultivo, quando foi inoculado o antagonista; RFP: média do crescimento radial final do patógeno após 25 d de pareamento com o antagonista; RAC: média do crescimento radial do antagonista após 25 d de cultivo com o patógeno.

A figura 22 B mostra o crescimento de Tat2076 e os subgrupos de Mp em cultivo pareado. Observou-se que Tat2076 entrou em contato com Mp1445, 1893 e 1916 no 5º d de cultivo e com Mp1441 apenas no 10º d. Após o contato com o antagonista, todos os subgrupos não apresentaram mais crescimento radial até o final dos 25 d de cultivo, sendo os RFPs (setas amarelas) menores que os respectivos RCPs e comprovando a capacidade de inibição de Tat2076, que, entretanto se deram em diferentes níveis. A partir do 10º d todos os isolados de Mp apresentaram as colônias sobrepostas pelo antagonista e aos 25 d de cultivo (setas vermelhas), já com abundante esporulação, apresentou um RAC= 9,0 cm e comprovou a capacidade de micoparasitar todos os subgrupos de Mp.

Figura 22 B																	
Mp	RCP:	RIP:	Cultivo pareado Tat2076 e Mp					RFP:	RAC:								
	Cultivo 25 d	Cultivo 7 d	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d										
1 4 4 1									4,92 ± 0,02	0,68 ± 0,02						4,50 ± 0,18	9,00 ± 0,00
1 4 4 5									7,52 ± 0,05	1,86 ± 0,04						2,06 ± 0,05	9,00 ± 0,00
1 8 9 3									6,50 ± 0,14	0,90 ± 0,03						4,08 ± 0,16	9,00 ± 0,00
1 9 1 6									5,82 ± 0,08	0,64 ± 0,03						1,70 ± 0,04	9,00 ± 0,00

**Figura 22 B-** Cultivo pareado de *T. atroviride* 2076 e os diferentes subgrupos de *M. perniciosa*. Os resultados representam as médias das triplicatas, seguidos dos erros padrão. RCP: média do crescimento radial do patógeno nas placas controle; RIP: média do crescimento radial inicial do patógeno no 7º d de cultivo, quando foi inoculado o antagonista; RFP: média do crescimento radial final do patógeno após 25 d de pareamento com o antagonista; RAC: média do crescimento radial do antagonista após 25 d de cultivo com o patógeno.

A figura 22 C apresenta o crescimento de Tlg3188 e os subgrupos de Mp em cultivo pareado. Apenas Mp1441 apresentou crescimento entre o dia do pareamento e o 5º d de

cultivo, estando os raios das colônias menores que os raios iniciais (RIP). As colônias de Tlg3188 tocaram as colônias de todos os subgrupos de Mp aos 5 d de cultivo, tendo cessado o crescimento de Mp1441 e Mp1445 a partir desta data, entretanto, Mp1893 e Mp1916 apresentaram um discreto crescimento micelial até o 10º d de cultivo.


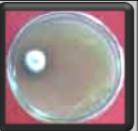




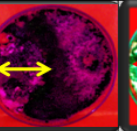
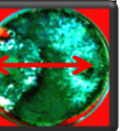




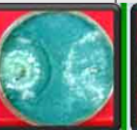

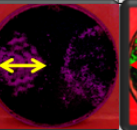
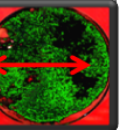








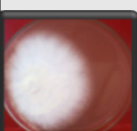


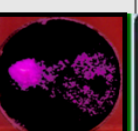

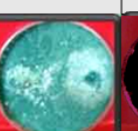

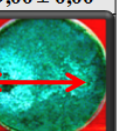
Figura 22 C																	
Mp	RCP: Cultivo 25 d	RIP: Cultivo 7 d	Cultivo pareado Tlg3188 e Mp					RFP: 25 d	RAC: 25 d								
			5 d	10 d	15 d	20 d	25 d										
1 4 4 1									$4,92 \pm 0,02$	$0,68 \pm 0,02$						$1,00 \pm 0,00$	$5,00 \pm 0,03$
1 4 4 5									$7,52 \pm 0,05$	$1,86 \pm 0,04$						$1,86 \pm 0,02$	$3,19 \pm 0,01$
1 8 9 3									$6,50 \pm 0,14$	$0,90 \pm 0,03$						$1,96 \pm 0,06$	$3,18 \pm 0,03$
1 9 1 6									$5,82 \pm 0,08$	$0,64 \pm 0,03$						$1,00 \pm 0,00$	$5,69 \pm 0,02$

**Figura 22 C-** Cultivo pareado de *T. longibrachiatum* 3188 e os diferentes subgrupos de *M. perniciososa*. Os resultados representam as médias das triplicatas, seguidos dos erros padrão.

RCP: média do crescimento radial do patógeno nas placas controle; RIP: média do crescimento radial inicial do patógeno no 7º d de cultivo, quando foi inoculado o antagonista; RFP: média do crescimento radial final do patógeno após 25 d de pareamento com o antagonista; RAC: média do crescimento radial do antagonista após 25 d de cultivo com o patógeno.

Observou-se a formação de um halo entre as colônias de Tlg3188 e Mp1445, que não foi observada para os demais. As setas amarelas no 25º d de cultivo de todos os isolados de Mp indicam que os valores dos RFPs são menores aos valores dos RCPs, demonstrando a capacidade de Tlg3188 em inibir o crescimento do patógeno. O antagonista não apresentou a capacidade de micoparasitismo a nenhum subgrupo, sendo o RAC de Tlg3188 menor que 9,0 cm para todos os subgrupos.

A figura 22 D mostra o crescimento de Tpl925 e os subgrupos de Mp em cultivo pareado. Todos os subgrupos, com exceção de Mp1445, apresentaram crescimento radial nos primeiros 5 d após o pareamento. Quando o antagonista entrou em contato com as colônias de todos os subgrupos o crescimento, entretanto, parou. Constatou-se que Tpl925 apresentou diferentes níveis de antibiose, sendo para todos os subgrupos os RFPs menores que os respectivos RCPs. A capacidade de micoparasitismo foi apresentada no 5º d de cultivo para Mp1916, no 10º d para Mp1441 e Mp1445 e no 15º d para Mp1893, sendo o RAC do antagonista de 9,0 cm aos 25 d de cultivo para todos os subgrupos. Verificou-se ainda abundante esporulação sobre o patógeno a partir do 5º d de cultivo para a maioria dos isolados.

Figura 22 D								
Mp	RCP: Cultivo 25 d	RIP: Cultivo 7 d	Cultivo pareado Tpl925 e Mp					
			5 d	10 d	15 d	20 d	25 d	
1 4 4 1								
	4,92 ± 0,02	0,68 ± 0,02					RFP: 3,28 ± 0,02	RAC: 9,00 ± 0,00
1 4 4 5								
	7,52 ± 0,05	1,86 ± 0,04					RFP: 2,22 ± 0,05	RAC: 9,00 ± 0,00
1 8 9 3								
	6,50 ± 0,14	0,90 ± 0,03					RFP: 3,60 ± 0,11	RAC: 9,00 ± 0,00
1 9 1 6								
	5,82 ± 0,08	0,64 ± 0,03					RFP: 2,54 ± 0,08	RAC: 9,00 ± 0,00

**Figura 22 D-** Cultivo pareado de *T. pilulliferum* 925 e os diferentes subgrupos de *M. pernicioso*. Os resultados representam as médias das triplicatas, seguidos dos erros padrão.

RCP: média do crescimento radial do patógeno nas placas controle; RIP: média do crescimento radial inicial do patógeno no 7º d de cultivo, quando foi inoculado o antagonista; RFP: média do crescimento radial final do patógeno após 25 d de pareamento com o antagonista; RAC: média do crescimento radial do antagonista após 25 d de cultivo com o patógeno.




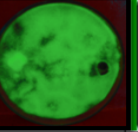
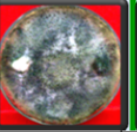
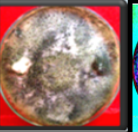
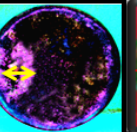
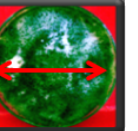


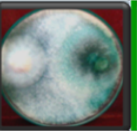
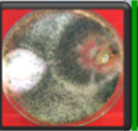


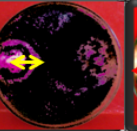



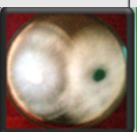
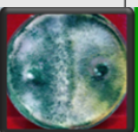


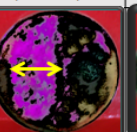

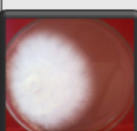


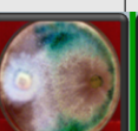

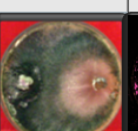
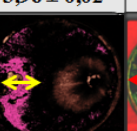
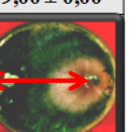
A figura 22 E mostra o crescimento de Tvi2007 e os subgrupos de Mp em cultivo pareado. Todos os subgrupos apresentaram crescimento radial em diferentes níveis nos primeiros 5 d após o confrontamento. Observou-se que no 5º d, Tvi2007 entrou em contato apenas com a colônia de Mp1445, não havendo mais crescimento radial do patógeno após esta data, o que aconteceu com Mp1441, 1893 e 1916 a partir do 10º d de cultivo. Os RFPs de todos os subgrupos, também em diferentes níveis, foram menores que os respectivos RCPs, comprovando a capacidade de antibiose de Tvi2007. Um halo de inibição é observado entre as colônias do antagonista e Mp1445 no 20º d de cultivo. A sobreposição dos subgrupos do patógeno pelo antagonista se deu com abundante esporulação no 10º d para Mp1893 e Mp1916, no 15º para Mp1441, com um RAC= 9,0 cm no 25º d de cultivo e demonstrando sua capacidade de micoparasitismo. Com um RAC  $\leq$  9,0 cm demonstrou não ter capacidade de micoparasitar Mp1445.

Figura 22 E								
Mp	RCP: Cultivo 25 d	RIP: Cultivo 7 d	Cultivo pareado Tvi2007 e Mp					
			5 d	10 d	15 d	20 d	25 d	
1 4 4 1								
	4,92 ± 0,02	0,68 ± 0,02					RFP: 3,25 ± 0,02	RAC: 9,00 ± 0,00
1 4 4 5								
	7,52 ± 0,05	1,86 ± 0,04					RFP: 2,64 ± 0,03	RAC: 3,72 ± 0,00
1 8 9 3								
	6,50 ± 0,14	0,90 ± 0,03					RFP: 3,12 ± 0,09	RAC: 9,00 ± 0,00
1 9 1 6								
	5,82 ± 0,08	0,64 ± 0,03					RFP: 2,48 ± 0,04	RAC: 9,00 ± 0,00

**Figura 22 E-** Cultivo pareado de *T. vires* 2007 e os diferentes subgrupos de *M. pernicioso*. Os resultados representam as médias das triplicatas, seguidos dos erros padrão.

RCP: média do crescimento radial do patógeno nas placas controle; RIP: média do crescimento radial inicial do patógeno no 7º d de cultivo, quando foi inoculado o antagonista; RFP: média do crescimento radial final do patógeno após 25 d de pareamento com o antagonista; RAC: média do crescimento radial do antagonista após 25 d de cultivo com o patógeno.

A figura 22 F (1 e 2) apresenta os resultados de dois isolados de *T. viride* (Tvr905 e Tvr1643) em cultivo pareado com os diferentes subgrupos de Mp em cultivo pareado. Observa-se na figura 22 F-1 que Tvr905 sobrepõe as colônias de Mp1441 e Mp1445 no 5º d, de Mp1893 no 10º d e de Mp1916 no 15º d de cultivo com intensa produção de esporos, apresentando em todos os cultivos de 25 d um RAC=9,0 cm, demonstrando sua capacidade de micoparasitismo. Após o contato das colônias n 5º d de cultivo, as colônias do patógeno cessaram o crescimento, sendo aos 25 d de cultivo todos os RFPs  $\leq$  RCPs, o que evidencia a capacidade de antibiose do antagonista em diferentes níveis.

Figura 22 F-1									
Mp	RCP: Cultivo 25 d	RIP: Cultivo 7 d	Cultivo pareado Tvr905 e Mp						
			5 d	10 d	15 d	20 d	25 d		
1 4 4 1									RFP: 1,80 ± 0,07 RAC: 9,00 ± 0,00
1 4 4 5									RFP: 1,89 ± 0,03 RAC: 9,00 ± 0,00
1 8 9 3									RFP: 3,96 ± 0,02 RAC: 9,00 ± 0,00
1 9 1 6									RFP: 1,58 ± 0,06 RAC: 9,00 ± 0,00

**Figura 22 F-1-** Cultivo pareado de *T. viride* 905 e os diferentes subgrupos de *M. perniciosa*. Os resultados representam as medias das triplicatas, seguidos dos erros padrão.

RCP: média do crescimento radial do patógeno nas placas controle; RIP: media do crescimento radial inicial do patógeno no 7º d de cultivo, quando foi inoculado o antagonista; RFP: média do crescimento radial final do patógeno após 25 d de pareamento com o antagonista; RAC: média do crescimento radial do antagonista após 25 d de cultivo com o patógeno.

Já na figura 22 F-2, verifica-se que Tr1643 sobrepôs a colônia de Mp1441 no 5º d, de Mp1916 no 10º d, sendo a produção de esporos intensa em ambos os casos. As colônias de Mp1445 e Mp1893 só foram sobrepostas pelo antagonista no 20º d de cultivo, também sendo grande a esporulação. No 25º d de cultivo, Tvr1643 apresentou com todos os subgrupos um RAC=9,0 cm, demonstrando sua capacidade de micoparasitismo. Embora a capacidade de micoparasitismo tenha sido demonstrada pelos dois isolados de *T. viride*, a mesma ocorreu com mais rapidez e intensidade por Tvr905, uma vez que o tempo de sobreposição e grau de esporulação foram maiores. Já quanto à capacidade de antibiose, Tvr1643 se igualou a Tvr905, uma vez que as colônias dos subgrupos de Mp tiveram seu crescimento cessado após o contato com o antagonista, sendo, entretanto diferentes os níveis de antibiose apresentados. Estes resultados revelam que embora sejam da mesma espécie, se comportaram diferentemente quanto às suas capacidades de antibiose e micoparasitismo.

Figura 22 F-2									
Mp	RCP: Cultivo 25 d	RIP: Cultivo 7 d	Cultivo pareado Tvr1643 e Mp						
			5 d	10 d	15 d	20 d	25 d		
1 4 4 1									RFP: 2,52 ± 0,01 RAC: 9,00 ± 0,00
1 4 4 5									RFP: 3,0 ± 0,11 RAC: 9,00 ± 0,00
1 8 9 3									RFP: 3,38 ± 0,03 RAC: 9,00 ± 0,00
1 9 1 6									RFP: 1,96 ± 0,02 RAC: 9,00 ± 0,00
	4,92 ± 0,02	0,68 ± 0,02							
	7,52 ± 0,05	1,86 ± 0,04							
	6,50 ± 0,14	0,90 ± 0,03							
	5,82 ± 0,08	0,64 ± 0,03							




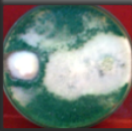






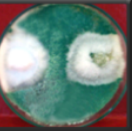
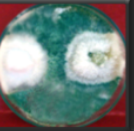




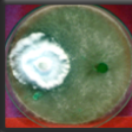






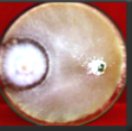




**Figura 22 F-2-** Cultivo pareado de *T. viride* 1643 e os diferentes subgrupos de *M. perniciosa*. Os resultados representam as médias das triplicatas, seguidos dos erros padrão.

RCP: média do crescimento radial do patógeno nas placas controle; RIP: média do crescimento radial inicial do patógeno no 7º d de cultivo, quando foi inoculado o antagonista; RFP: média do crescimento radial final do patógeno após 25 d de pareamento com o antagonista; RAC: média do crescimento radial do antagonista após 25 d de cultivo com o patógeno.



A figura 22 G (1, 2, 3 e 4) apresenta os resultados de quatro isolados de *T. harzianum* em cultivo pareado com os diferentes subgrupos de Mp.

Na figura 22 G-1, todos os subgrupos de Mp apresentaram crescimento nos primeiros 5 d de cultivo, com exceção de Mp1445 que não teve nenhum crescimento até o final dos 25 d. Quando as colônias de patógeno e antagonista se tocaram o crescimento de todos os subgrupos de Mp parou, apresentando no 25º d de cultivo RFPs  $\leq$  RCPs (setas amarelas), comprovando a capacidade de antibiose. Observa-se ainda a formação de um halo de inibição entre o antagonista e Mp19196. Embora tenha demonstrado um rápido crescimento, Th906 não encobriu as colônias dos subgrupos, evidenciando a falta de capacidade de micoparasitismo.

Figura 22 G-1									
Mp	RCP:	RIP:	Cultivo pareado Th906 e Mp						
	Cultivo 25 d	Cultivo 7 d	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d		
1 4 4 1									
	4,92 ± 0,02	0,68 ± 0,02					RFP: 0,96 ± 0,11	RAC: 5,88 ± 0,06	
1 4 4 5									
	7,52 ± 0,05	1,86 ± 0,04					RFP: 1,86 ± 0,00	RAC: 4,76 ± 0,02	
1 8 9 3									
	6,50 ± 0,14	0,90 ± 0,03					RFP: 1,28 ± 0,05	RAC: 4,13 ± 0,02	
1 9 1 6									
	5,82 ± 0,08	0,64 ± 0,03					RFP: 1,12 ± 0,05	RAC: 4,45 ± 0,03	

**Figura 22 G-1-** Cultivo pareado de *T. harzianum* 906 e os diferentes subgrupos de *M. perniciosa*. Os resultados representam as médias das triplicatas, seguidos dos erros padrão.

RCP: média do crescimento radial do patógeno nas placas controle; RIP: média do crescimento radial inicial do patógeno no 7º d de cultivo, quando foi inoculado o antagonista; RFP: média do crescimento radial final do patógeno após 25 d de pareamento com o antagonista; RAC: média do crescimento radial do antagonista após 25 d de cultivo com o patógeno.

Na figura 22 G-2, observa-se que Th911 entrou em contato com as colônias de Mp no 5º d de cultivo, sendo que posteriormente Mp1445 e Mp1893 pararam de crescer e Mp1441 e Mp1916 apresentaram um discreto crescimento até o 25ºd de cultivo. Entretanto, ao final dos 25 d de cultivo todos os subgrupos apresentaram RFPs  $\leq$  RCPs, ficando comprovada a capacidade de antibiose de Th911 a todos os subgrupos, entretanto, em diferentes níveis. O antagonista encobriu a colônia de Mp1441 e Mp1916 no 10º d de cultivo com intensa esporulação, de Mp 1893 no 15º d e de Mp1445 no 20º d, também com intensa esporulação, tendo ao final dos 25 d um RAC=9,0 cm com todos os subgrupos, demonstrando sua atividade micoparasítica.

Figura 22 G-2									
Mp	RCP:	RIP:	Cultivo pareado Th911 e Mp						
	Cultivo 25 d	Cultivo 7 d	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d		
1 4 4 1									
	4,92 ± 0,02	0,68 ± 0,02						RFP: 3,25 ± 0,02	RAC: 9,00 ± 0,00
1 4 4 5									
	7,52 ± 0,05	1,86 ± 0,04						RFP: 2,64 ± 0,03	RAC: 9,00 ± 0,00
1 8 9 3									
	6,50 ± 0,14	0,90 ± 0,03						RFP: 3,12 ± 0,09	RAC: 9,00 ± 0,00
1 9 1 6									
	5,82 ± 0,08	0,64 ± 0,03						RFP: 2,48 ± 0,04	RAC: 9,00 ± 0,00

**Figura 22 G-2-** Cultivo pareado de *T. harzianum* 911 e os diferentes subgrupos de *M. perniciosa*. Os resultados representam as médias das triplicatas, seguidos dos erros padrão RCP: média do crescimento radial do patógeno nas placas controle; RIP: média do crescimento radial inicial do patógeno no 7º d de cultivo, quando foi inoculado o antagonista; RFP: média do crescimento radial final do patógeno após 25 d de pareamento com o antagonista; RAC: média do crescimento radial do antagonista após 25 d de cultivo com o patógeno.

Na figura 22 G-3, Th1058 encobriu as colônias de todos Mp aos 5 d de cultivo, com exceção de Mp1893, que foi sobreposta apenas ao 25º d (RAC). Ao final dos 25 d, Th906 apresentou um RAC=9,0 cm com todos os subgrupos, demonstrando sua capacidade de micoparasitismo. Mp1441 e Mp1445 não apresentaram crescimento nos primeiros 5 d de cultivo, pois como citado anteriormente, Th1058 já encobria os patógeno. Mp1893 e Mp1916 apresentaram pouco crescimento, mas que também cessou após contato com Th1058. Em todos os subgrupos os RFPs foram menores que os respectivos RCPs, ficando evidente a capacidade de antibiose, também em diferentes níveis.

Figura 22 G-3								
Mp	RCP:	RIP:	Cultivo pareado Th1058 e Mp					
	Cultivo 25 d	Cultivo 7 d	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d	
1 4 4 1								
	4,92 ± 0,02	0,68 ± 0,02					RFP: 0,90 ± 0,04	RAC: 9,00 ± 0,00
1 4 4 5								
	7,52 ± 0,05	1,86 ± 0,04					RFP: 2,86 ± 0,03	RAC: 9,00 ± 0,00
1 8 9 3								
	6,50 ± 0,14	0,90 ± 0,03					RFP: 1,54 ± 0,02	RAC: 9,00 ± 0,00
1 9 1 6								
	5,82 ± 0,08	0,64 ± 0,03					RFP: 2,44 ± 0,03	RAC: 9,00 ± 0,00

**Figura 22 G-3-** Cultivo pareado de *T. harzianum* 1058 e os diferentes subgrupos de *M. pernicioso*. Os resultados representam as médias das triplicatas, seguidos dos erros padrão. RCP: média do crescimento radial do patógeno nas placas controle; RIP: média do crescimento radial inicial do patógeno no 7º d de cultivo, quando foi inoculado o antagonista; RFP: média do crescimento radial final do patógeno após 25 d de pareamento com o antagonista; RAC: média do crescimento radial do antagonista após 25 d de cultivo com o patógeno.

Os resultados do confronto dos subgrupos de Mp e Th1070 estão apresentados na figura 22 G-4, onde se observa que o antagonista encobriu as colônias de todos os subgrupos aos 5 d de cultivo, que em consequência pararam seus crescimentos, exceto de Mp1916,

ocorrendo no 10º d. Para todos os subgrupos, os RFPs foram bem menores que os RCPs, demonstrando a antibiose por Th1070. Também ficou demonstrada a capacidade de micoparasitismo, uma vez que os RACs em todos os casos foram iguais a 9,0 cm. Igualmente a análise dos resultados apresentados pelos isolados de *T. viride*, constata-se que os isolados de *T. harzianum* também variaram quanto às suas capacidades de antibiose e micoparasitismo aos subgrupos de Mp.

Figura 22 G-4									
Mp	RCP:	RIP:	Cultivo pareado Th1070 e Mp						
	Cultivo 25 d	Cultivo 7 d	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d	RFP:	RAC:
1 4 4 1								1,94 ± 0,02	9,00 ± 0,00
	4,92 ± 0,02	0,68 ± 0,02							
1 4 4 5								1,86 ± 0,04	9,00 ± 0,00
	7,52 ± 0,05	1,86 ± 0,04							
1 8 9 3								2,54 ± 0,03	9,00 ± 0,00
	6,50 ± 0,14	0,90 ± 0,03							
1 9 1 6								3,47 ± 0,02	9,00 ± 0,00
	5,82 ± 0,08	0,64 ± 0,03							



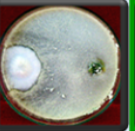
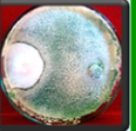
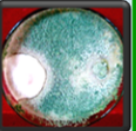
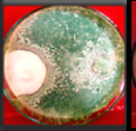
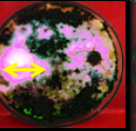


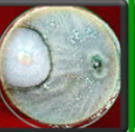



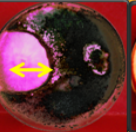



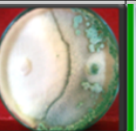









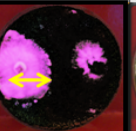
**Figura 22 G-4-** Cultivo pareado de *T. harzianum* 1070 e os diferentes subgrupos de *M. pernicioso*. Os resultados representam as médias das triplicatas, seguidos dos erros padrão. RCP: média do crescimento radial do patógeno nas placas controle; RIP: média do crescimento radial inicial do patógeno no 7º d de cultivo, quando foi inoculado o antagonista; RFP: média do crescimento radial final do patógeno após 25 d de pareamento com o antagonista; RAC: média do crescimento radial do antagonista após 25 d de cultivo com o patógeno.

A figura 22 H (1, 2, 3 e 4) apresenta os resultados de quatro isolados de *T. pseudokoningii*, Tps907, Tps909, Tps913 e Tps1052, respectivamente, onde podemos observar que em todos os casos os subgrupos de Mp apresentaram crescimento nos primeiros 5 d de cultivo pareado, que cessou após o contato com os isolados de Tps.

Figura 22 H-1										
Mp	RCP: Cultivo 25 d	RIP: Cultivo 7 d	Cultivo pareado Tps907 e Mp							
			5 d	10 d	15 d	20 d	25 d			
1 4 4 1									RFP: 1,86 ± 0,11	RAC: 5,60 ± 0,05
	4,92 ± 0,02	0,68 ± 0,02								
1 4 4 5									RFP: 1,86 ± 0,03	RAC: 4,42 ± 0,02
	7,52 ± 0,05	1,86 ± 0,04								
1 8 9 3									RFP: 1,86 ± 0,09	RAC: 4,41 ± 0,04
	6,50 ± 0,14	0,90 ± 0,03								
1 9 1 6									RFP: 1,42 ± 0,07	RAC: 4,45 ± 0,03
	5,82 ± 0,08	0,64 ± 0,03								


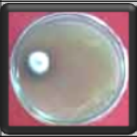
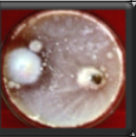



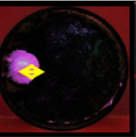
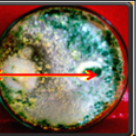

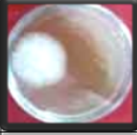


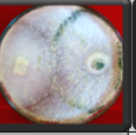

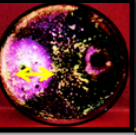
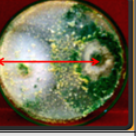


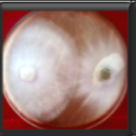

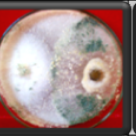

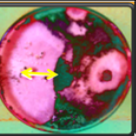
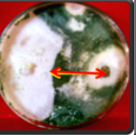

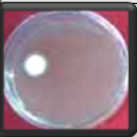

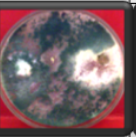

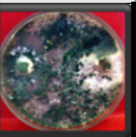
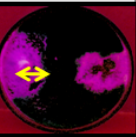
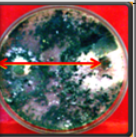
**Figura 22 H-1-** Cultivo pareado de *T. pseudokoningii* 907 e os diferentes subgrupos de *M. pernicioso*. Os resultados representam as médias das triplicatas, seguidos dos erros padrão RCP: média do crescimento radial do patógeno nas placas controle; RIP: média do crescimento radial inicial do patógeno no 7º d de cultivo, quando foi inoculado o antagonista; RFP: média do crescimento radial final do patógeno após 25 d de pareamento com o antagonista; RAC: média do crescimento radial do antagonista após 25 d de cultivo com o patógeno.

Foi observada a formação de halo entre Tps907 e Mp1893 e 1916 (Figura H-1), entre Tps909 e Mp1441, 1445 e 1893 (Figura 22 H-2), mas independente da formação de halos, os RFPs dos subgrupos aos 25 d de cultivo foram menores que os respectivos RCPs, evidenciando a capacidade de antibiose de Tps a todos os subgrupos de Mp.

Figura 22 H-2									
Mp	RCP: Cultivo 25 d	RIP: Cultivo 7 d	Cultivo pareado Tps909 e Mp					RFP:	RAC:
			5 d	10 d	15 d	20 d	25 d		
1 4 4 1								1,50 ± 0,01	4,25 ± 0,05
	4,92 ± 0,02	0,68 ± 0,02							
1 4 4 5								2,06 ± 0,07	3,66 ± 0,03
	7,52 ± 0,05	1,86 ± 0,04							
1 8 9 3								3,70 ± 0,07	1,93 ± 0,04
	6,50 ± 0,14	0,90 ± 0,03							
1 9 1 6								2,48 ± 0,05	4,12 ± 0,04
	5,82 ± 0,08	0,64 ± 0,03							

**Figura 22 H-2-** Cultivo pareado de *T. pseudokoningii* 909 e os diferentes subgrupos de *M. perniciosa*. Os resultados representam as médias das triplicatas, seguidos dos erros padrão. RCP: média do crescimento radial do patógeno nas placas controle; RIP: média do crescimento radial inicial do patógeno no 7º d de cultivo, quando foi inoculado o antagonista; RFP: média do crescimento radial final do patógeno após 25 d de pareamento com o antagonista; RAC: média do crescimento radial do antagonista após 25 d de cultivo com o patógeno.





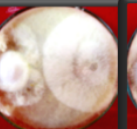

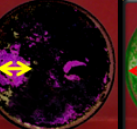
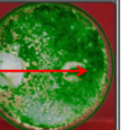





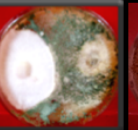
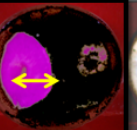

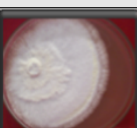

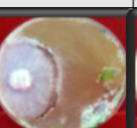
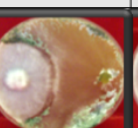
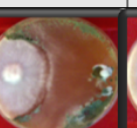
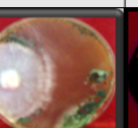
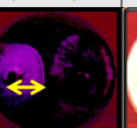
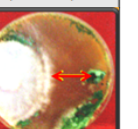
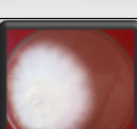
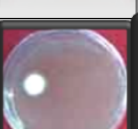
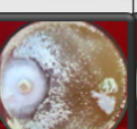
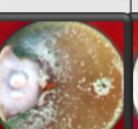
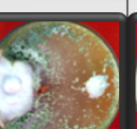
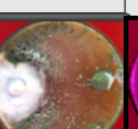
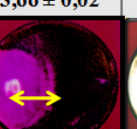
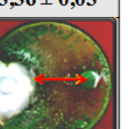
Apesar de ter apresentado um rápido crescimento em confronto com Mp em cultivo pareado (Figuras 22 H-1 e H-2), Tps907 e Tps909 não apresentaram capacidade de parasitar nenhum subgrupo (RAC  $\leq$  9,0 cm). Tps913 sobrepôs a colônias de Mp1916 no 10º d de cultivo, de Mp1441 e Mp1445 no 15º d, apresentando no 25º d um RAC= 9,0 cm, demonstrando sua atividade parasítica a estes subgrupos, apresentando ainda diferentes graus de esporulação, não sendo, entretanto capaz de parasitar Mp1893 (RAC  $\leq$  9,0 cm) (Figura 22 H-3).

Figura 22 H-3								
Mp	RCP: Cultivo 25 d	RIP: Cultivo 7 d	Cultivo pareado Tps913 e Mp					
			5 d	10 d	15 d	20 d	25 d	
1 4 4 1								
	4,92 ± 0,02	0,68 ± 0,02					RFP: 1,58 ± 0,03	RAC: 9,00 ± 0,00
1 4 4 5								
	7,52 ± 0,05	1,86 ± 0,04					RFP: 3,09 ± 0,01	RAC: 9,00 ± 0,00
1 8 9 3								
	6,50 ± 0,14	0,90 ± 0,03					RFP: 3,44 ± 0,04	RAC: 4,29 ± 0,04
1 9 1 6								
	5,82 ± 0,08	0,64 ± 0,03					RFP: 1,54 ± 0,04	RAC: 9,00 ± 0,00

**Figura 22 H-3-** Cultivo pareado de *T. pseudokoningii* 913 e os diferentes subgrupos de Mp. Os resultados representam as médias das triplicatas, seguidos dos erros padrão.

RCP: média do crescimento radial do patógeno nas placas controle; RIP: média do crescimento radial inicial do patógeno no 7º d de cultivo, quando foi inoculado o antagonista; RFP: média do crescimento radial final do patógeno após 25 d de pareamento com o antagonista; RAC: média do crescimento radial do antagonista após 25 d de cultivo com o patógeno.

Tps1052 por sua vez apresentou capacidade de parasitar apenas Mp14441 (RAC= 9,0 cm), encobrindo, entretanto, a colônia do patógeno apenas no 25º d de cultivo. Também com *T. pseudokoningii*, a variabilidade intraespecífica ficou comprovada quanto às características avaliadas (Figura 22 H-4).






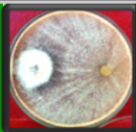
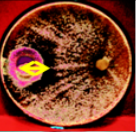
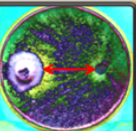




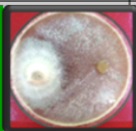
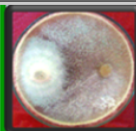
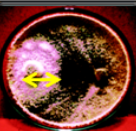
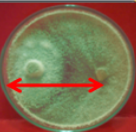
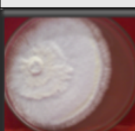

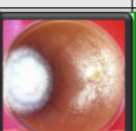
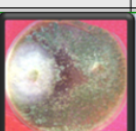
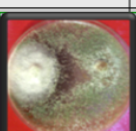
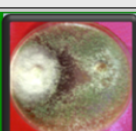
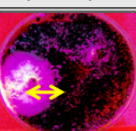
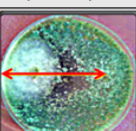
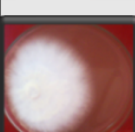
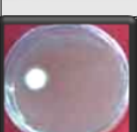
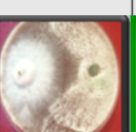
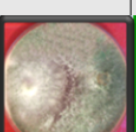
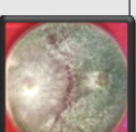
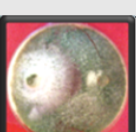


Figura 22 H-4									
Mp	RCP: Cultivo 25 d	RIP: Cultivo 7 d	Cultivo pareado Tps1052 e Mp					RFP:	RAC:
			5 d	10 d	15 d	20 d	25 d		
1 4 4 1									
	4,92 ± 0,02	0,68 ± 0,02					1,58 ± 0,08	9,00 ± 0,00	
1 4 4 5									
	7,52 ± 0,05	1,86 ± 0,04					3,24 ± 0,02	3,44 ± 0,04	
1 8 9 3									
	6,50 ± 0,14	0,90 ± 0,03					3,66 ± 0,02	3,36 ± 0,03	
1 9 1 6									
	5,82 ± 0,08	0,64 ± 0,03					2,06 ± 0,07	4,76 ± 0,04	

**Figura 22-H-4-** Cultivo pareado de *T. pseudokoningii* 1052 e os diferentes subgrupos de *M. perniciosus*. Os resultados representam as médias das triplicatas, seguidos dos erros padrão. RCP: média do crescimento radial do patógeno nas placas controle; RIP: média do crescimento radial inicial do patógeno no 7º d de cultivo, quando foi inoculado o antagonista; RFP: média do crescimento radial final do patógeno após 25 d de pareamento com o antagonista; RAC: média do crescimento radial do antagonista após 25 d de cultivo com o patógeno.

A figura 22-I (1 a 8) apresenta os resultados de *T. stromaticum* em cultivo pareado com Mp. A esporulação esverdeada observada nas placas, não corresponde ao grau de esporulação real, uma vez que por produzirem esporos amarelados e em pouca quantidade, foi necessária a edição das fotos em tons da cor verde para serem visualizados.




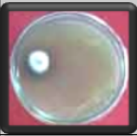


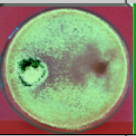
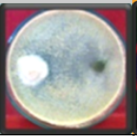
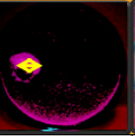
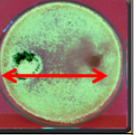
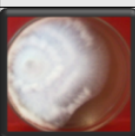





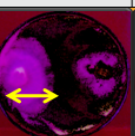

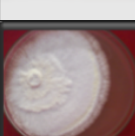
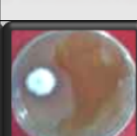



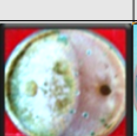
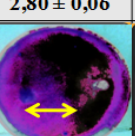

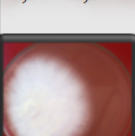
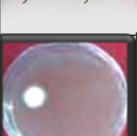
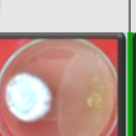
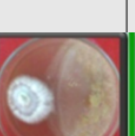
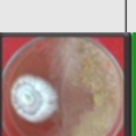
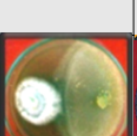
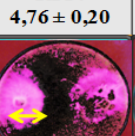

Na figura 22 I-1, os resultados do pareamento de Ts3109 mostram que o antagonista sobrepôs as colônias de Mp, 1445, 1893 e 1916 no 10º d de cultivo, tendo nestes casos um RAC= 9,0 cm no final do 25º d de cultivo e demonstrando sua atividade de micoparasitismo, o que, entretanto não ocorreu para Mp1441 (RAC  $\leq$  9,0 cm). Todos os subgrupos apresentaram crescimento micelial nos primeiros 5 d de cultivo, parando após contato com Ts3109. No final dos 25 d os RFPs foram menores que os respectivos RCPs evidenciando a atividade inibitória de Ts3109, embora em diferentes níveis. Não sobrepôs, entretanto, a colônia de Mp1441 e, portanto não apresentou capacidade de parasitar este subgrupo.

Figura 22 I-1																		
Mp	RCP: Cultivo 25 d	RIP: Cultivo 7 d	Cultivo pareado Ts3109 e Mp					RFP: 25 d	RAC: 25 d									
			5 d	10 d	15 d	20 d	25 d											
1 4 4 1									4,92 ± 0,02	0,68 ± 0,02							RFP: 1,48 ± 0,04	RAC: 4,57 ± 0,03
1 4 4 5									7,52 ± 0,05	1,86 ± 0,04							RFP: 2,38 ± 0,03	RAC: 9,00 ± 0,00
1 8 9 3									6,50 ± 0,14	0,90 ± 0,03							RFP: 2,12 ± 0,04	RAC: 9,00 ± 0,00
1 9 1 6									5,82 ± 0,08	0,64 ± 0,03							RFP: 3,12 ± 0,08	RAC: 9,00 ± 0,00

**Figura 22-I-1--** Cultivo pareado de *T. stromaticum* 3109 e os diferentes subgrupos de *M. perniciosus*. Os resultados representam as médias das triplicatas, seguidos dos erros padrão.


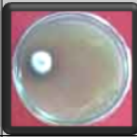


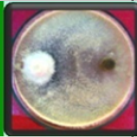

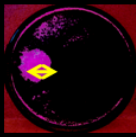
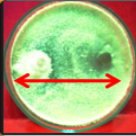


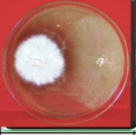
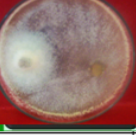
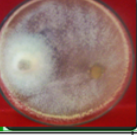

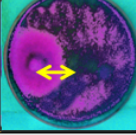
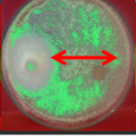





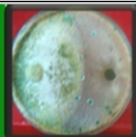
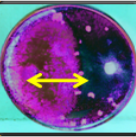
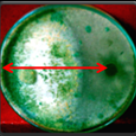


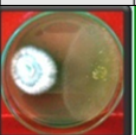
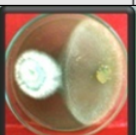
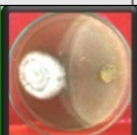
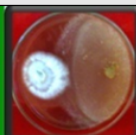
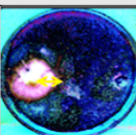
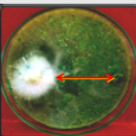
RCP: média do crescimento radial do patógeno nas placas controle; RIP: média do crescimento radial inicial do patógeno no 7º d de cultivo, quando foi inoculado o antagonista; RFP: média do crescimento radial final do patógeno após 25 d de pareamento com o antagonista; RAC: média do crescimento radial do antagonista após 25 d de cultivo com o patógeno.

A figura 22 I-2 apresenta os resultados do pareamento de Ts1441 com Mp. Os subgrupos Mp1441, 1445 e 1916, apesar de terem tido crescimento micelial nos primeiros 5 d, pararam de crescer após contato com Ts1441, tendo Mp 1893 continuado seu crescimento após contato com o antagonista. Entretanto, no final de 25 d os RFPs foram menores que os RCPs para todos os subgrupos, evidenciando a capacidade de antibiose, sendo, entretanto diferenciada entre os subgrupos. Ts1441 sobrepôs a colônia de Mp1441, 1445 e 1893 no 15º d de cultivo e tendo RAC= 9,0 cm no 25º d, não apresentando a capacidade de micoparasitismo para Mp1916 (RAC  $\leq$  9,0 cm).

Figura 22 I-2																		
Mp	RCP: Cultivo 25 d	RIP: Cultivo 7 d	Cultivo pareado Ts1441 e Mp					RFP: 25 d	RAC: 25 d									
			5 d	10 d	15 d	20 d	25 d											
1 4 4 1									4,92 ± 0,02	0,68 ± 0,02							RFP: 1,38 ± 0,03	RAC: 9,00 ± 0,00
1 4 4 5									7,52 ± 0,05	1,86 ± 0,04							RFP: 2,80 ± 0,06	RAC: 9,00 ± 0,00
1 8 9 3									6,50 ± 0,14	0,90 ± 0,03							RFP: 4,76 ± 0,20	RAC: 9,00 ± 0,00
1 9 1 6									5,82 ± 0,08	0,64 ± 0,03							RFP: 1,96 ± 0,03	RAC: 5,82 ± 0,06








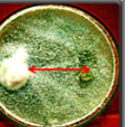







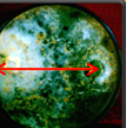






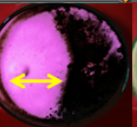
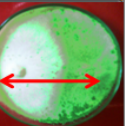

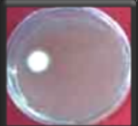

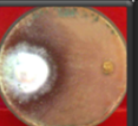


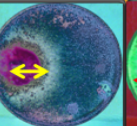
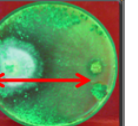
**Figura 22-I-2--** Cultivo pareado de *T. stromaticum* 1441 e os diferentes subgrupos de *M. perniciosus*. Os resultados representam as médias das triplicatas, seguidos dos erros padrão RCP: média do crescimento radial do patógeno nas placas controle; RIP: média do crescimento radial inicial do patógeno no 7º d de cultivo, quando foi inoculado o antagonista; RFP: média do crescimento radial final do patógeno após 25 d de pareamento com o antagonista; RAC: média do crescimento radial do antagonista após 25 d de cultivo com o patógeno.

A figura 22 I-3 apresenta os resultados do confronto entre Ts1445 e Mp. Todos os subgrupos tiveram crescimento micelial nos primeiros 5 d, principalmente Mp1893, mas pararam de crescer após contato com Ts1441. No final dos 25 d de cultivo todos Mp apresentaram os RFPs menores que os RCPs, comprovando a inibição sofrida pelo antagonista em diferentes graus. A sobreposição da colônia de Mp1441 se deu no 5º d, de Mp1893 no 10º, não ocorrendo sobreposição de Mp1445 e 1916 pelo antagonista (RAC > 9,0 cm), sendo para os demais demonstrada a capacidade de micoparasitismo (RAC > 9,0 cm).

Figura 22 I-3								
Mp	RCP:	RIP:	Cultivo pareado Ts1445 e Mp					
	Cultivo 25 d	Cultivo 7 d	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d	
1 4 4 1								
	4,92 ± 0,02	0,68 ± 0,02					RFP: 1,22 ± 0,06	RAC: 9,00 ± 0,00
1 4 4 5								
	7,52 ± 0,05	1,86 ± 0,04					RFP: 3,16 ± 0,02	RAC: 3,86 ± 0,02
1 8 9 3								
	6,50 ± 0,14	0,90 ± 0,03					RFP: 4,34 ± 0,05	RAC: 9,00 ± 0,00
1 9 1 6								
	5,82 ± 0,08	0,64 ± 0,03					RFP: 1,86 ± 0,02	RAC: 4,98 ± 0,05

**Figura 22-I-3--** Cultivo pareado de *T. stromaticum* 1445 e os diferentes subgrupos de *M. pernicioso*. Os resultados representam as médias das triplicatas, seguidos dos erros padrão. RCP: média do crescimento radial do patógeno nas placas controle; RIP: media do crescimento radial inicial do patógeno no 7º d de cultivo, quando foi inoculado o antagonista; RFP: média do crescimento radial final do patógeno após 25 d de pareamento com o antagonista; RAC: média do crescimento radial do antagonista após 25 d de cultivo com o patógeno.


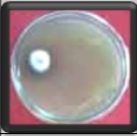




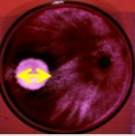
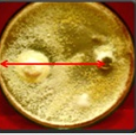


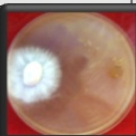
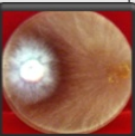
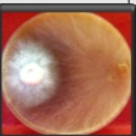
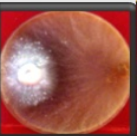

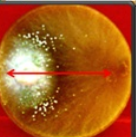

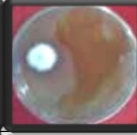
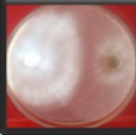



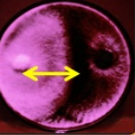
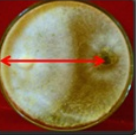
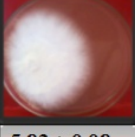

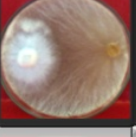
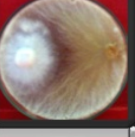
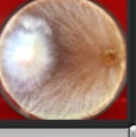


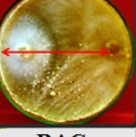
Os resultados do confronto entre Ts2994 e Mp estão apresentados na figura 22 I-4. Como ocorrido com Ts1445, todos os subgrupos tiveram crescimento micelial nos primeiros 5 d, principalmente Mp1893, mas pararam de crescer após contato com Ts2994. Os RFPs no final de 25 d de cultivo foram menores que os respectivos RCPs, demonstrando a atividade de inibição do antagonista em diferentes níveis a todos os subgrupos. Apesar de o antagonista entrar em contato com todos os Mp, sobrepôs as colônias de Mp14445 no 15º d e de Mp1893 e 1916 no 25º d de cultivo, não sobrepondo a colônia de Mp1441. Os subgrupos colonizados por Ts2994 tiveram aos 25 d de cultivo um RAC= 9,0 cm, sendo, portanto comprovada para estes subgrupos a capacidade de parasitismo.

Figura 22 I-4								
Mp	RCP: Cultivo 25 d	RIP: Cultivo 7 d	Cultivo pareado Ts2994 e Mp					
			5 d	10 d	15 d	20 d	25 d	
1 4 4 1								
	4,92 ± 0,02	0,68 ± 0,02					RFP: 0,90 ± 0,00	RAC: 2,73 ± 0,02
1 4 4 5								
	7,52 ± 0,05	1,86 ± 0,04					RFP: 3,24 ± 0,02	RAC: 9,00 ± 0,00
1 8 9 3								
	6,50 ± 0,14	0,90 ± 0,03					RFP: 3,96 ± 0,03	RAC: 9,00 ± 0,00
1 9 1 6								
	5,82 ± 0,08	0,64 ± 0,03					RFP: 2,08 ± 0,04	RAC: 9,00 ± 0,00

**Figura 22-I-4--** Cultivo pareado de *T. stromaticum* 2994 e os diferentes subgrupos de *M. pernicioso*. Os resultados representam as médias das triplicatas, seguidos dos erros padrão.

RCP: média do crescimento radial do patógeno nas placas controle; RIP: media do crescimento radial inicial do patógeno no 7º d de cultivo, quando foi inoculado o antagonista; RFP: média do crescimento radial final do patógeno após 25 d de pareamento com o antagonista; RAC: média do crescimento radial do antagonista após 25 d de cultivo com o patógeno.







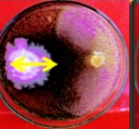







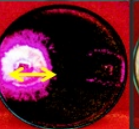
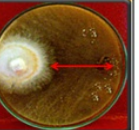


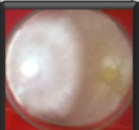



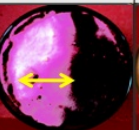
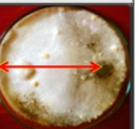
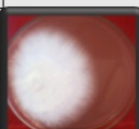

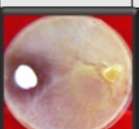
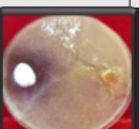
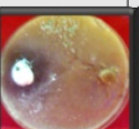


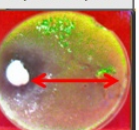
A figura 22 I-5, apresenta os resultados do pareamento de Ts3454 e Mp. Como ocorrido com Ts anteriores, todos os subgrupos tiveram crescimento micelial nos primeiros 5 d, principalmente Mp1893, mas pararam de crescer após contato com Ts3454. No final do 25° d de cultivo todos os subgrupos tiveram os RFPs menores que os respectivos RACs, tendo sido inibidos pelo antagonista. Ts3454 sobrepôs as colônias de todos os subgrupos entre o 20° e 25° d de pareamento, apresentando uma esporulação mais intensa apenas com Mp1441. Em todos os casos, Ts3454 apresentou RAC= 9,0 cm comprovando sua capacidade de micoparasitismo.

Figura 22 I-5									
Mp	RCP: Cultivo 25 d	RIP: Cultivo 7 d	Cultivo pareado Ts3454 e Mp						
			5 d	10 d	15 d	20 d	25 d		
1 4 4 1									
	4,92 ± 0,02	0,68 ± 0,02					RFP: 1,22 ± 0,03	RAC: 9,00 ± 0,00	
1 4 4 5									
	7,52 ± 0,05	1,86 ± 0,04					RFP: 1,90 ± 0,02	RAC: 9,00 ± 0,00	
1 8 9 3									
	6,50 ± 0,14	0,90 ± 0,03					RFP: 4,02 ± 0,04	RAC: 9,00 ± 0,00	
1 9 1 6									
	5,82 ± 0,08	0,64 ± 0,03					RFP: 2,44 ± 0,03	RAC: 9,00 ± 0,00	

**Figura 22-I-5--** Cultivo pareado de *T. stromaticum* 3454 e os diferentes subgrupos de *M. pernicioso*. Os resultados representam as médias das triplicatas, seguidos dos erros padrão. RCP: média do crescimento radial do patógeno nas placas controle; RIP: média do crescimento radial inicial do patógeno no 7° d de cultivo, quando foi inoculado o antagonista; RFP: média do crescimento radial final do patógeno após 25 d de pareamento com o antagonista; RAC: média do crescimento radial do antagonista após 25 d de cultivo com o patógeno.

Já os resultados do pareamento de Ts3461 com Mp (Figura 22 I-6) nos mostra que a capacidade de micoparasitismo foi demonstrada apenas para Mp1893, tendo iniciado a colonização no 15º d de cultivo e apresentando RAC= 9,0 cm no 25º d. Embora Ts3461 tenha entrado em contato com as colônias dos outros subgrupos, não houve sobreposição, sendo o RACs  $\leq 9,0$  cm no 25º d de cultivo e, portanto não apresentando a capacidade de micoparasitismo.



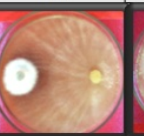
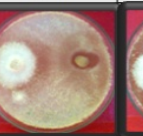
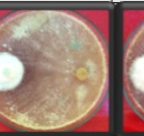

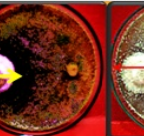







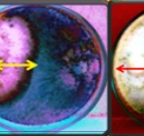
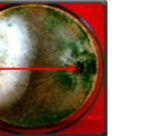
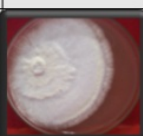
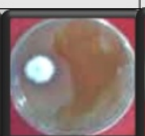
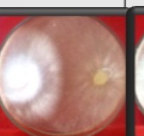


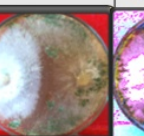
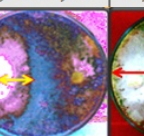

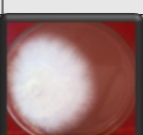
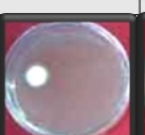
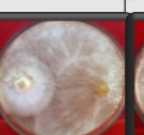
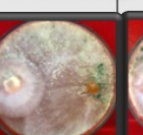

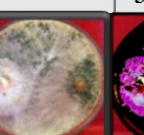

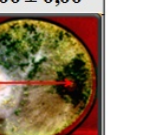
Como ocorrido com os Ts anteriores, todos os subgrupos tiveram crescimento micelial nos primeiros 5 d, principalmente Mp1893, mas pararam de crescer após contato com Ts3461. No final do 25º d de cultivo todos os subgrupos tiveram os RFPs menores que os respectivos RACs, tendo sido inibidos pelo antagonista em diferentes níveis.

Figura 22 I-6										
Mp	RCP:	RIP:	Cultivo pareado Ts3461 e Mp							
	Cultivo 25 d	Cultivo 7 d	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d			
1 4 4 1									RFP: 2,76 ± 0,08	RAC: 3,35 ± 0,03
1 4 4 5									RFP: 2,96 ± 0,03	RAC: 5,41 ± 0,02
1 8 9 3									RFP: 4,56 ± 0,02	RAC: 9,00 ± 0,00
1 9 1 6									RFP: 0,96 ± 0,04	RAC: 4,93 ± 0,02

**Figura 22-I-6**-Cultivo pareado de *T. stromaticum* 3461 e os diferentes subgrupos de *M. perniciosus*. Os resultados representam as médias das triplicatas, seguidos dos erros padrão. RCP: média do crescimento radial do patógeno nas placas controle; RIP: media do crescimento radial inicial do patógeno no 7º d de cultivo, quando foi inoculado o antagonista; RFP: média do crescimento radial final do patógeno após 25 d de pareamento com o antagonista; RAC: média do crescimento radial do antagonista após 25 d de cultivo com o patógeno.

A figura 22 I-7 mostra os resultados do pareamento de Ts3768 com Mp. Da mesma forma que os Ts anteriores, houve crescimento micelial de Mp nos primeiros 5 d de cultivo, quando ocorreu o contato com o antagonista e o crescimento parou. No 25º d todos apresentaram os RFPs menores que os RACs respectivos, sendo a capacidade de Ts3768 em inibir seus crescimentos comprovada.

As colônias do antagonista entraram em contato com o patógeno no 5º d, sendo que a sobreposição dos patógeno só ocorreu nos últimos 5 d de cultivo, que não é evidente nas fotos, mas foi observada esporulação sobre as colônias vistas a olho nu. Com todos os subgrupos o antagonista apresentou um RAC= 9,0 cm evidenciando sua atividade micoparasítica.

Figura 22 I-7									
Mp	RCP:	RIP:	Cultivo pareado Ts3768 e Mp						
	Cultivo 25 d	Cultivo 7 d	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d		
1 4 4 1									
	4,92 ± 0,02	0,68 ± 0,02					RFP: 1,32 ± 0,04	RAC: 9,00 ± 0,00	
1 4 4 5									
	7,52 ± 0,05	1,86 ± 0,04					RFP: 3,32 ± 0,02	RAC: 9,00 ± 0,00	
1 8 9 3									
	6,50 ± 0,14	0,90 ± 0,03					RFP: 3,22 ± 0,02	RAC: 9,00 ± 0,00	
1 9 1 6									
	5,82 ± 0,08	0,64 ± 0,03					RFP: 2,64 ± 0,02	RAC: 9,00 ± 0,00	

**Figura 22-I-7--** Cultivo pareado de *T. stromaticum* 3768 e os diferentes subgrupos de *M. perniciosa*. Os resultados representam as médias das triplicatas, seguidos dos erros padrão.

RCP: média do crescimento radial do patógeno nas placas controle; RIP: média do crescimento radial inicial do patógeno no 7º d de cultivo, quando foi inoculado o antagonista; RFP: média do crescimento radial final do patógeno após 25 d de pareamento com o antagonista; RAC: média do crescimento radial do antagonista após 25 d de cultivo com o patógeno.

Os resultados do pareamento de Ts4077 com Mp se encontram na figura 22 I-8. Neste caso, foi observado também crescimento dos subgrupos até o 5º d, principalmente de Mp1893, tendo cessado após contato com Ts4077. Os RFPs foram aos 25 d menores que os respectivos RCPs, sendo o mecanismo de antibiose comprovado. Com exceção de Mp1916, o antagonista apresentou com todos os subgrupos um RAC= 9,0 cm no 25º d de cultivo e, portanto capacidade de parasitismo.

Figura 22 I-8									
Mp	RCP:	RIP:	Cultivo pareado Ts4077 e Mp						
	Cultivo 25 d	Cultivo 7 d	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d		
1 4 4 1								RFP: 1,16 ± 0,03	RAC: 9,00 ± 0,00
1 4 4 5								RFP: 2,80 ± 0,04	RAC: 9,00 ± 0,00
1 8 9 3								RFP: 4,50 ± 0,07	RAC: 9,00 ± 0,00
1 9 1 6								RFP: 2,03 ± 0,03	RAC: 5,83 ± 0,02
	4,92 ± 0,02	0,68 ± 0,02							
	7,52 ± 0,05	1,86 ± 0,04							
	6,50 ± 0,14	0,90 ± 0,03							
	5,82 ± 0,08	0,64 ± 0,03							

**Figura 22-I-8--** Cultivo pareado de *T. stromaticum* 4077 e os diferentes subgrupos de *M. perniciosus*. Os resultados representam as médias das triplicatas, seguidos dos erros padrão. RCP: média do crescimento radial do patógeno nas placas controle; RIP: média do crescimento radial inicial do patógeno no 7º d de cultivo, quando foi inoculado o antagonista; RFP: média do crescimento radial final do patógeno após 25 d de pareamento com o antagonista; RAC: média do crescimento radial do antagonista após 25 d de cultivo com o patógeno.

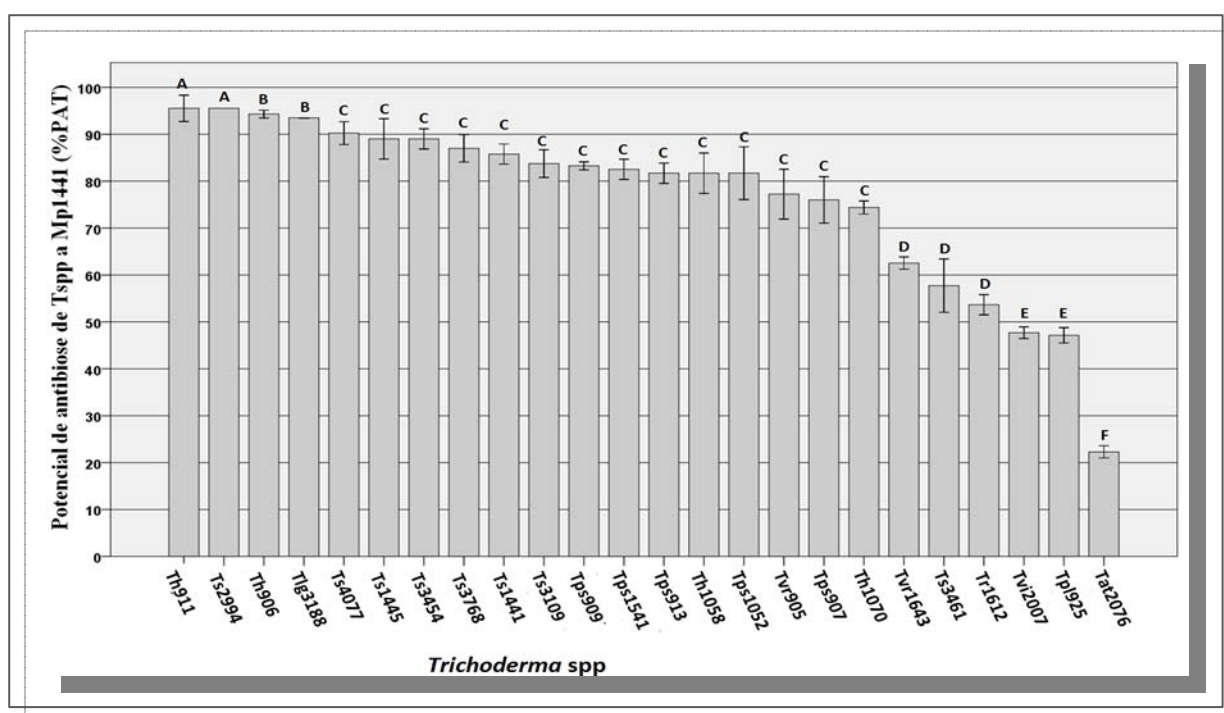
#### 4.2.3. Potencial de Antibiose (%PAT) de isolados de *Trichoderma* spp *in vitro* sobre *M. perniciosus* subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916

Quer a antibiose tenha ocorrido por ação de metabólitos secundários ou por competição, com as medidas de crescimento de Mp nas placas controle (RCP) e as obtidas



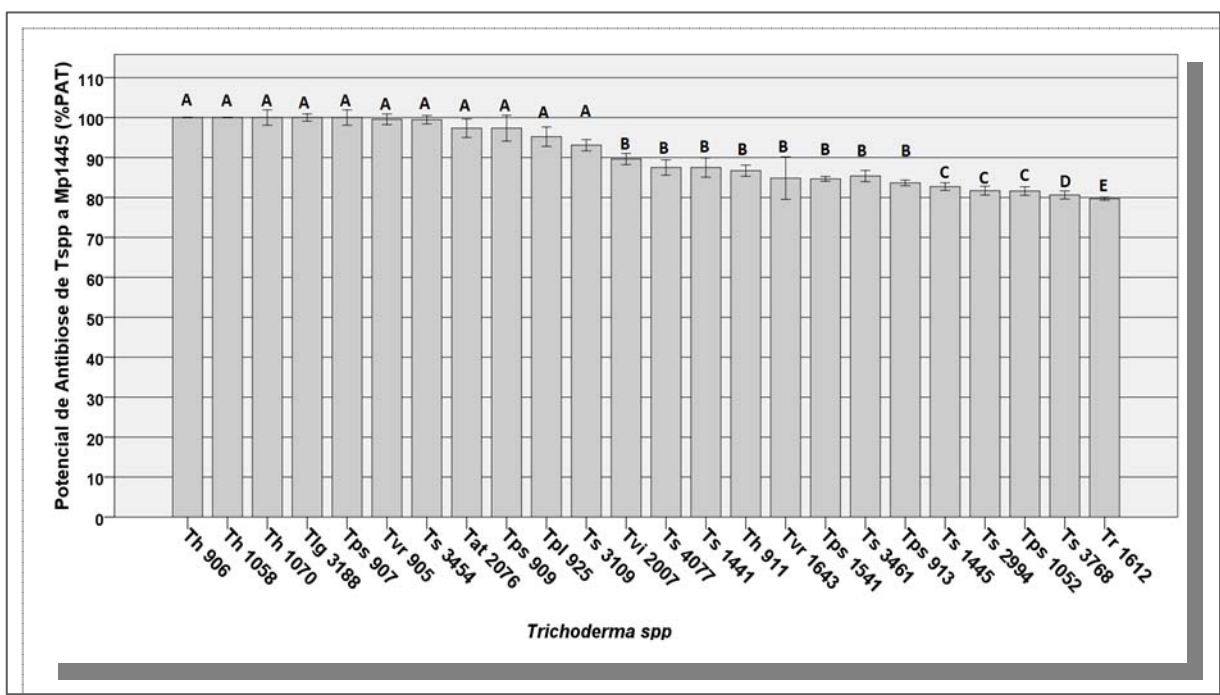
dos cultivos pareados com Tspp (RIP e RFP - Figuras 22A-1 a I-8), foi possível determinar os Potenciais de inibição (%PAT) do patógeno por Tspp, através da aplicação da fórmula de Edington et al. (1971). As figuras 23, 24, 25 e 26 apresentam os %PAT de Tspp a Mp1441, Mp1445, Mp1893 e Mp1916, respectivamente.

Na figura 23 pode ser observado que o maior %PAT a Mp1441 (em torno de 95%) foi apresentado por Th911 e Ts2994 ( $p \leq 0,05$ ), não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles, sendo seguidos por Th906 e Tlg3188 ( $p \geq 0,05$ ) (entre 90 e 95%). Tat2076 apresentou o menor %PAT (22%). Foi observada variação nos resultados entre todos os isolados de *T. harzianum* e *T. viride*, sendo também observada entre alguns isolados de *T. stromaticum*.



**Figura 23-** Potencial de antibiose (%PAT) de *Trichoderma* spp a Mp1441 pelo método da cultura pareada por 25 d de cultivo. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas); médias seguidas das mesmas letras não são significantes entre si de acordo com teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

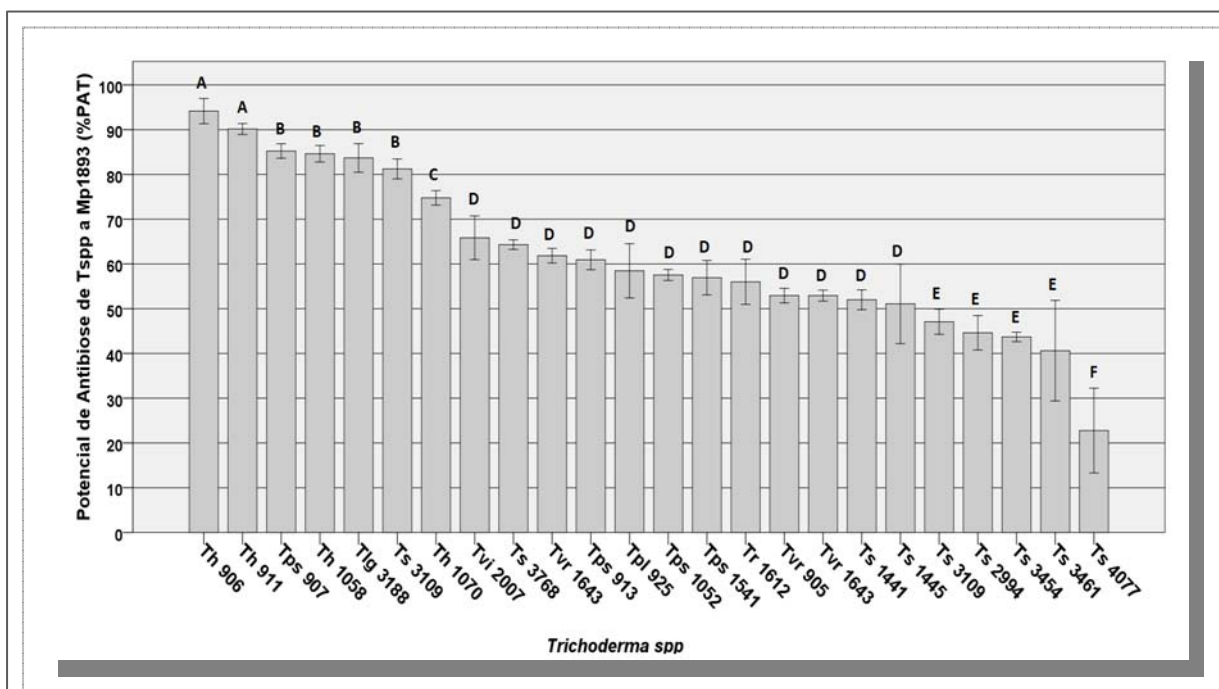
A figura 24 nos mostra um grande número de isolados de *Tspp* que apresentou %PAT de 100% ( $p \leq 0,05$ ) para Mp1445, tendo os demais isolados apresentado %PATs entre 90 e 80%, o que demonstra de forma geral maior grau de inibição a este subgrupo. Verificou-se que Th911 e Ts2994 não mantiveram para Mp1445 a mesma capacidade inibitória apresentada a Mp1441, estando Ts2994 entre os menores %PATs. A variabilidade intraespecífica se mostrou menor que a apresentada para Mp1441, embora presente entre os dois isolados de *T. viride* e entre alguns isolados de *T. pseudokoningii* e *T. stromaticum*.



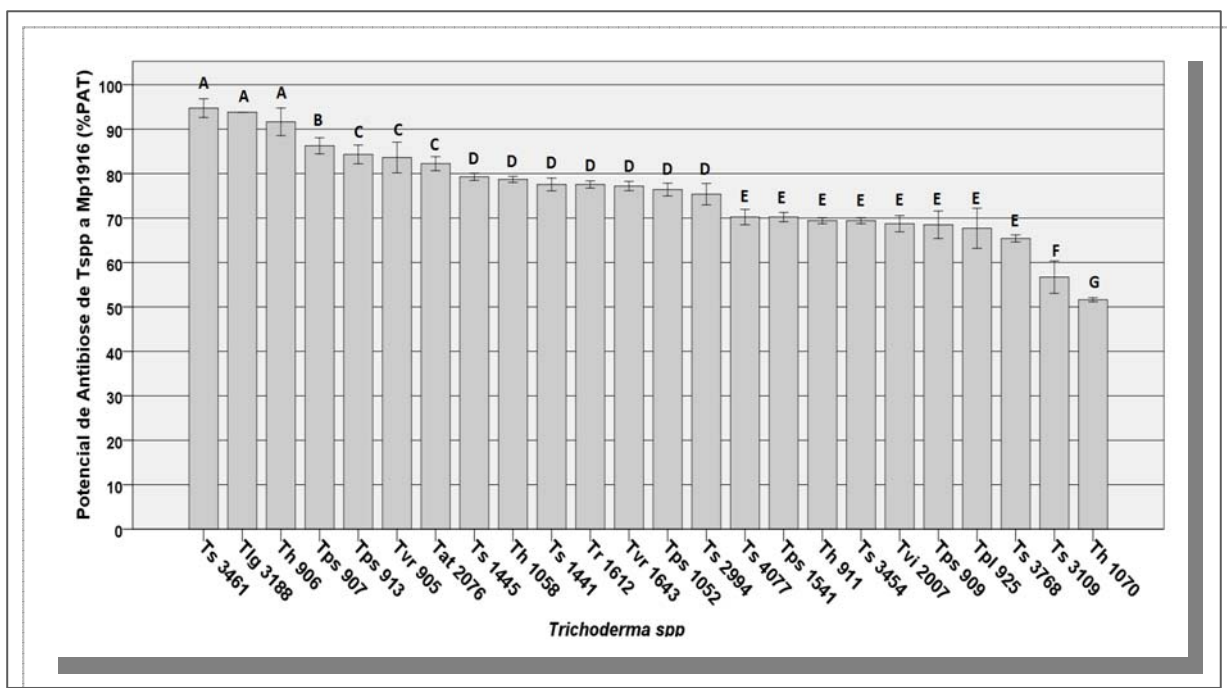
**Figura 24-** Potencial de antibiose (%PAT) de *Trichoderma* spp a Mp1445 pelo método da cultura pareada por 25 d de cultivo. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas); médias seguidas das mesmas letras não são significantes entre si de acordo com teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Na figura 25 verifica-se que Th906 e Th911 apresentaram %PAT a Mp1893 ( $p \leq 0,05$ ) entre 90 e 93%, não tendo sido significativa a diferença entre eles ( $p > 0,05$ ), estando Ts2994 entre os menores %PAT. A variabilidade dos resultados intraespecífica também se mostrou pequena em relação a Mp1893, embora presente entre alguns isolados de *T. harzianum*, *T. pseudokoningii* e *T. stromaticum*.

Os %PATs de *Tspp* a Mp1916 estão apresentados na figura 26 onde se observa que Ts3461, Tlg3188 e Th906 tiveram o mesmo %PAT, não tendo sido significativa a diferença entre eles ( $p > 0,05$ ). O %PAT menos expressiva foi apresentada por Th1070 (em torno de 31%), sendo que com Mp1916, houve a maior variabilidade intraespecífica dos resultados.



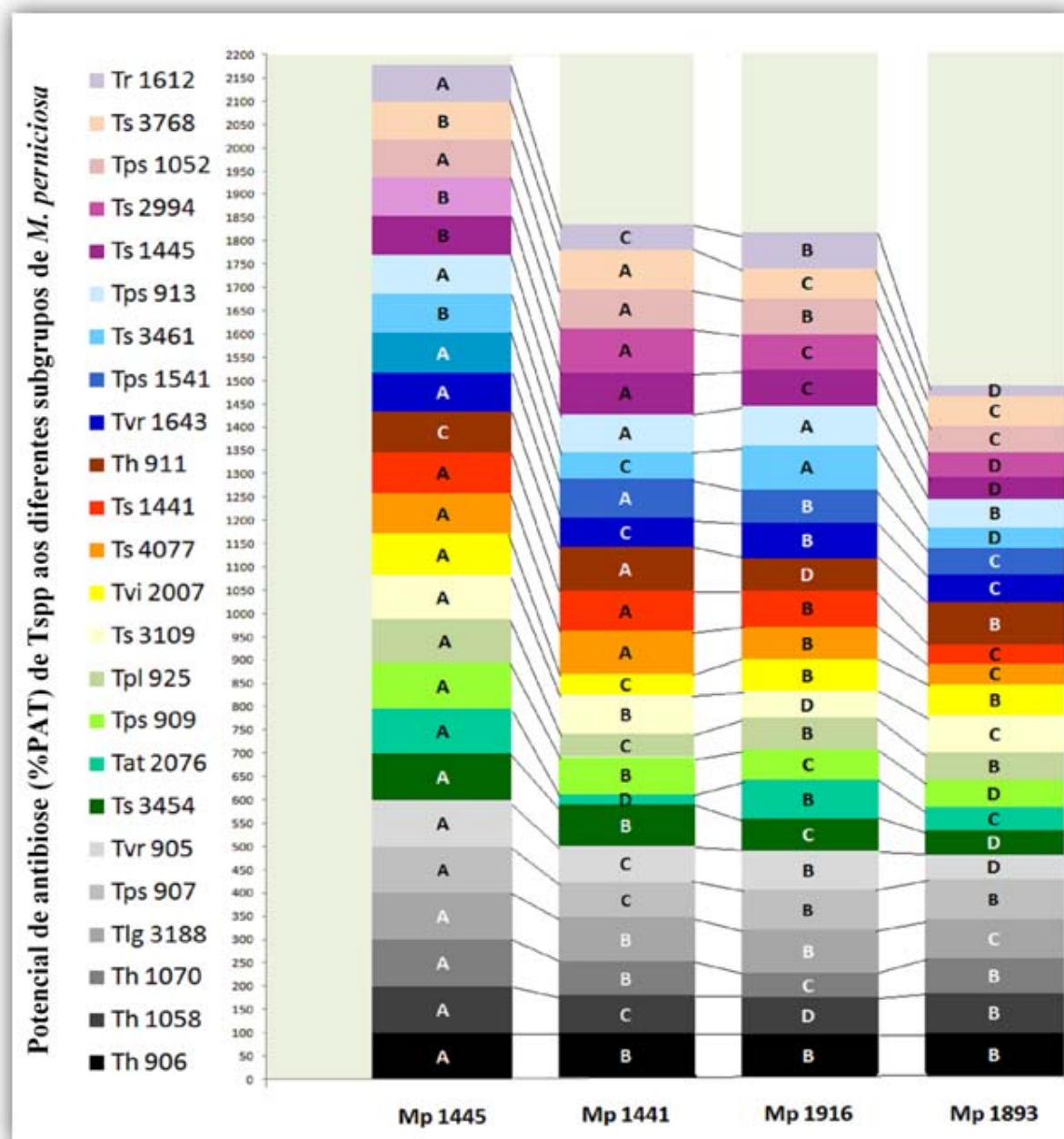
**Figura 25-** Potencial de antibiose (%PAT) de *Trichoderma* spp a Mp1893 pelo método da cultura pareada por 25 d de cultivo. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas); médias seguidas das mesmas letras não são significantes entre si de acordo com teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.



**Figura 26-** Potencial de antibiose (%PAT) de *Trichoderma* spp a Mp1916 pelo método da cultura pareada por 25 d de cultivo. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas); médias seguidas das mesmas letras não são significantes entre si de acordo com teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A variação dos resultados do Potencial de antibiose (%PAT) apresentados por isolados de uma mesma espécie a um mesmo subgrupo de Mp, como também a variação do %PAT de

um isolado frente aos quatro subgrupos de Mp pode ser melhor visualizada na figura 27, onde a comparação de médias é intergrupos.



**Figura 27-** Variação do %PAT de isolados de *Trichoderma* spp entre os subgrupos de *M. pernicioso* em cultivo pareado. Médias entre subgrupos seguidas das mesmas letras não são significantes entre si de acordo com teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A comparação das médias (significância: 0,05%) dos PAT<sub>s</sub>% de cada isolado em relação a cada subgrupo (Figura 27) demonstra que nenhum isolado apresentou o mesmo %PAT para todos os subgrupos de Mp. Th906, por exemplo, apresentou a mesma capacidade

de antibiose à Mp1445, Mp1893 e Mp1916 ( $p \geq 0,05$ ), sendo esta capacidade, entretanto, menor para Mp1441 ( $p \leq 0,05$ ). Th1058 por sua vez, apresentou %PAT diferente para todos os subgrupos, sendo o melhor resultado apresentado para Mp1445 ( $p \leq 0,05$ ), seguido por Mp1893, Mp1441 e Mp1916. Observa-se também que o maior grau de antibiose se deu ao subgrupo Mp1445, para o qual a maioria dos isolados de Tspp apresentou a maior %PAT ( $p \leq 0,05$ ), sendo que para Mp1893 não se obteve o maior %PAT com nenhum dos isolados e, portanto, sofrendo a menor inibição por Tspp. Isto significa que a ação antagônica de um fungo não depende apenas da espécie avaliada, mas também do patógeno. Tal variação pode ser causada pelo fato do antagonista reagir de maneira diferente quando confrontado com os diferentes subgrupos de Mp ou, os subgrupos de Mp apresentam diferentes graus de resistência aos diferentes isolados, ou ainda uma combinação dos dois fatores. A variabilidade intraespecífica existente entre isolados de *Trichoderma* e *M. perniciosa* é bastante citada na literatura e devido à sua importância, este tópico será discutido adiante.

A antibiose de um patógeno por um antagonista pode ocorrer através de um ou mais mecanismos associados: através da produção e liberação pelo antagonista de compostos tóxicos voláteis ou não voláteis que se difundem no meio, de antibióticos (HOWELL, 2003) ou ainda por competição por espaço e/ou nutrientes (carbono, nitrogênio, íons ferro, etc.), quando estes se encontram limitados no meio (WELLER, 1988), inibindo o crescimento do patógeno e podendo levá-lo a morte ou não. Mas como caracterizar este processo inibitório nos resultados apresentados?

Quando ocorre a formação de halo entre o antagonista e patógeno o processo de antibiose é considerado como sendo devido à liberação de substâncias tóxicas difusíveis no meio (HAJIEGHRARI et al., 2008; ROCHA et al., 2009). Somente os isolados Tr1612, Tlg3188, Tvi2007, Th906, Tps909 e Tps907 formaram halos (com Mp1441 e Mp1445; Mp1441, Mp1445 e Mp1916; Mp1445; Mp1916; Mp1893 e Mp1916 e Mp1445 e Mp1893; respectivamente). Sendo assim, apenas nestes casos a secreção de substâncias inibitórias difusíveis não voláteis no meio foi considerada como causa do mecanismo inibitório.

A produção de diversos antibióticos por *Trichoderma* spp é bem conhecida, tais como Trichodermim, Trichodermol, Harzianum A e Harzianolide (DENNIS e WEBSTER, 1971b; KUÇUK e KIVANÇ, 2004) e tem sido citada a formação de halos no confronto de *Trichoderma* spp frente a diversos patógenos. Macagnan et al. (2008) constataram a produção de sideróforos por actinomicetos em confronto com *M. perniciosa* e a formação de halos entre o patógeno e antagonista. Remuska e Pria (2007) também observaram a formação de halo de inibição entre *Trichoderma* sp. e *Bacillus thuringiensis*. Rubini et al. (2005) citaram a

formação de halos entre *M. pernicioso* e fungos endofíticos do cacauzeiro, entretanto, não foi encontrada nenhuma referência da formação de halo de inibição entre *Trichoderma* e Mp em outros trabalhos de pesquisa consultados.

Não se deve, entretanto, descartar a possibilidade do patógeno também inibir o crescimento do antagonista, uma vez que nesta interação, ambos podem produzir metabólitos antifúngicos e competir por espaço e nutrientes. Como Tspp apresenta crescimento mais rápido do que Mp, era de se esperar que após 48 h de cultivo pareado com Mp, os isolados de Tspp mantivessem as mesmas medidas de crescimento radial apresentadas em cultivos individuais, o que não ocorreu com muitos isolados. Isto pode ser observado comparando-se, por exemplo, o crescimento radial em cultivo individual de Tvi2007 (Tabela 7), que foi em 48 h de cultivo de 5,46 cm, ao apresentado em confronto com Mp1445 (Figura 22 E), onde se observa um crescimento de 3,72 cm em 25 d de cultivo (Figura 22 F-2). A inibição de Tvi2007 em cultivo pareado com Mp1445 pode então ter ocorrido por metabólitos antifúngicos produzidos por Mp1445 ou Mp1445 foram mais hábil que Tvi2007 na competição por espaço e/ou nutrientes. O decréscimo das medidas dos crescimentos radiais de Tspp em comparação às medidas apresentadas em confronto com Mp ocorreu também com diversos outros isolados de Tspp: Th906 com Mp1445, Mp1893 e Mp1916, Th1058 com Mp1441, Tlg3188 com Mp1445 e Mp1893, Tps907 com Mp1441, Mp1445, Mp1893 e Mp1916, Tps1541 com Mp1441, Mp1893 e Mp1916, Tr1612 com Mp1441, Mp1445 e Mp1893, Ts2994 com Mp1441 e Ts3461 com Mp1441 e Mp1916. Uma discussão mais aprofundada sobre este assunto será abordada adiante.

O fato de que nos outros cultivos pareados não ter havido inibição de Tspp por Mp, não significa que a produção de metabólitos por Mp não tenha ocorrido, uma vez que linhagens de *Trichoderma* podem apresentar a capacidade de detoxificação de compostos tóxicos (COONEY e LAUREN, 1998).

A ação antagônica de *T. stromaticum* a Mp foi estudada por Bastos (2000) e Samuels (2000) *in vitro*, por meio do pareamento de cultura, não sendo observada formação de zonas de inibição. Realmente, nos resultados apresentados por *T. stromaticum* (Figuras 22 I) não foi verificada a formação de halos de inibição, não sendo caracterizada, portanto, antibiose por produção de metabólitos.

Segundo Lockwood (1988), entre outros, o método do pareamento não permite que se defina se o processo de antibiose ocorreu por competição de espaço e/ou nutrientes. Com raras exceções, todos os subgrupos de Mp apresentaram crescimento nos primeiros 5 d de cultivo, entretanto, tiveram o crescimento interrompido após contato com os isolados de Tspp.

Se estes dados forem associados aos resultados dos índices de crescimento micelial (IVCM) dos subgrupos de Mp (Figura 21) observam-se que os mesmos variaram entre 0,17 e 0,28 cm. 24 h<sup>-1</sup>, sendo que o IVCM dos isolados de Tspp (Tabela 7) variou de 1,35 a 4,32 cm. 24 h<sup>-1</sup>, dando um indicativo da elevada velocidade de crescimento de Tspp em relação a Mp.

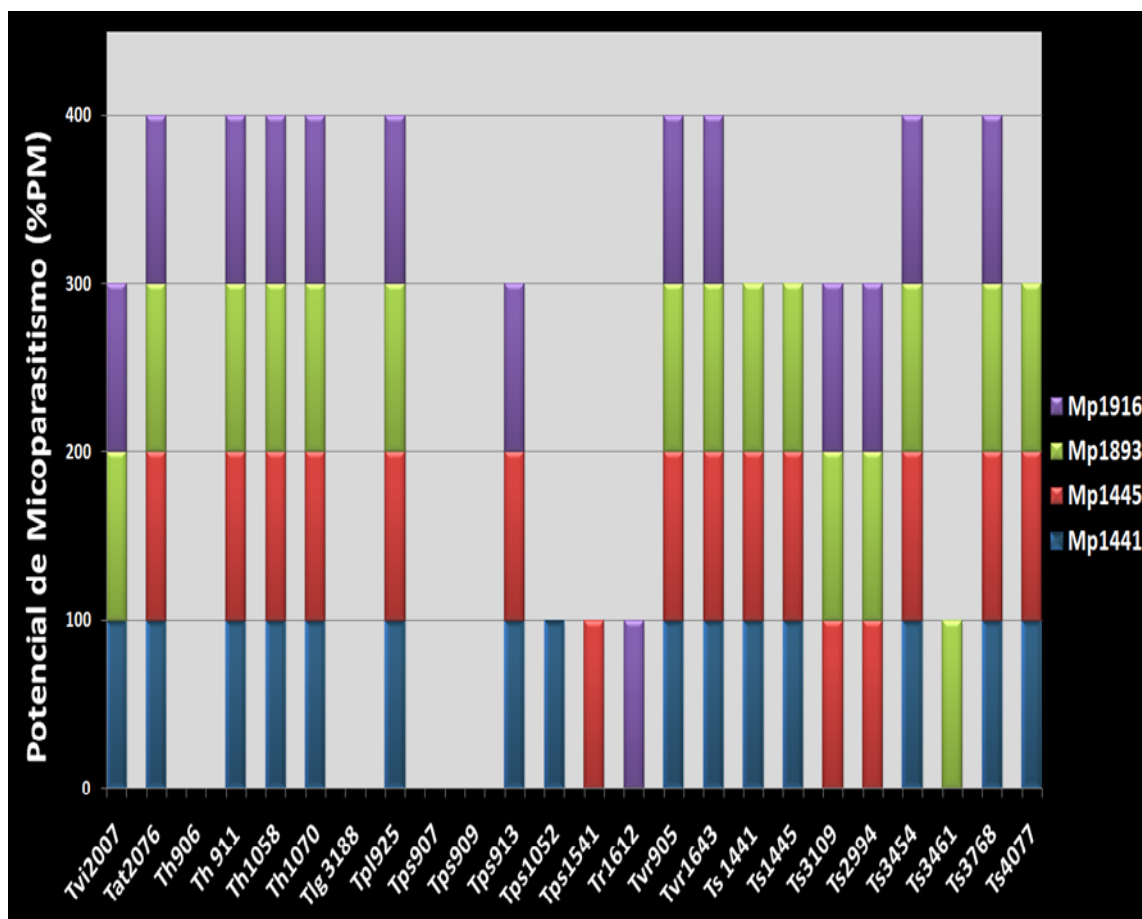
Estes resultados podem ser indícios que o processo de inibição, quando não houve formação de halos, se deu por competição de espaço e nutrientes, onde Tspp teve grande dominância, causando depleção de nutrientes conforme a literatura (ORTIZ e ORDUZ, 2000). A parada de crescimento do patógeno após contato com o antagonista e a constatação do mecanismo de competição foi observada em diversos estudos de antagonismo de *Trichoderma* spp e diversos fitopatógenos (ORTIZ e ORDUZ, 2000; REY et al., 2001; IKOTUN e ADEKUNLE, 2007; SANCHEZ et al., 2007; BURMEISTER, 2008).

A idéia de ter sido o mecanismo de competição o responsável pelos %PATs apresentados por Tspp a Mp, foi reforçada pelo fato de que se tivesse ocorrido produção de metabólitos voláteis antifúngicos por Tspp, a inibição teria sido observada com as colônias ainda sem contato. Bushell (1989), entretanto, observou aumento na produção de metabólitos por *T. harzianum in vitro* conforme o cultivo ficava mais velho, o que pode ser uma resposta do microrganismo em face de uma situação de stress devido à depleção de nutrientes. Isto conduz à hipótese de que alguns agentes de controle biológico podem estar em fase de declínio no seu crescimento, antes que possam produzir elevadas quantidades de metabólitos antibióticos, sugerindo que em termos de economia um microrganismo desvia seu esforço metabólico para secretar antibióticos, somente quando está em competição por um substrato necessário ao seu crescimento. Assim, pode ser que a liberação destes compostos por Tspp avaliada em confronto com os subgrupos de Mp (Figura 22) só tenha se dado no momento em que o antagonista teve que competir com Mp por espaço e nutrientes, o que se deu quando as colônias se tocaram (5º d de cultivo).

Desta forma, o processo de antibiose nos resultados apresentados provavelmente se deu inicialmente por competição podendo posteriormente ter ocorrido a produção de compostos inibitórios, fato que será discutido no Capítulo 3.

#### **4.2.4. Potencial de micoparasitismo (%PM) de *Trichoderma* spp sobre *M. perniciosa* subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916**

Para a análise do Potencial de micoparasitismo, os resultados do pareamento de Mp e Tspp apresentados (RCA) foram utilizados para obtenção dos Potenciais de micoparasitismo (%PM) do patógeno por Tspp (Figura 28).



**Figura 28-** Potencial de micoparasitismo (%PM) de *Trichoderma* spp a *M. pernicioso* subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916 pelo método da cultura pareada. Os resultados representam as médias das triplicatas.

Verifica-se na figura 28 que Tat2076, Th911, Th1058, Th1070, Tpl925, Tvr905, Tvr1643, Ts3454 e Ts3768 apresentaram a capacidade de parasitar todos os subgrupos de Mp, embora a velocidade de colonização do patógeno tenha variado. Por sua vez, Tvi2007 não apresentou esta capacidade apenas a Mp1445, Tps913 apenas a Mp1893, Ts1441 e Ts1445 apenas a Mp1441 e Ts4077 apenas a Mp1916. Tps1052, Tps1541, Tr1612 e Ts3461 parasitaram apenas Mp1441, Mp1445, Mp1916 e Mp1893, respectivamente. Já Th906, Tlg3188, Tps907 e Tps909 não tiveram a capacidade de micoparasitar nenhum subgrupo do patógeno. Constata-se, portanto, não só variação dos resultados quanto à capacidade de micoparasitismo entre as espécies quanto interespecífica.



A parede celular fúngica não só age como barreira estrutural protegendo as células contra condições hostis do meio ambiente como também constitui alvo de reconhecimento por outro microrganismo (OSIEWACZ, 2002), uma vez que possui em sua superfície moléculas que podem interagir com moléculas de outro fungo (VITERBO e CHET, 2006), estando envolvidas também na formação de estruturas especializadas de fixação como os apressórios (HARMAN et al., 2004). Glicoproteínas da parede celular interagem com glucanas, quitina e manoproteínas estruturais, formando adesinas que exercem papel na aderência do fungo ao hospedeiro (MRSA e TANNER, 1999). Após a aderência entre dois fungos pode ocorrer uma série de eventos de degradação do hospedeiro (micoparasitismo), mediada pela secreção de hidrolases, como ocorre com *Trichoderma* a diversos fitopatógenos (FRAVEL, 2005). Assim, a incapacidade de alguns isolados de T spp em micoparasitar Mp pode ter ocorrido pela ausência de especificidade entre patógeno e hospedeiro, seja no processo de reconhecimento, aderência, ou produção de hidrolases, resultando na incapacidade de micoparasitismo.

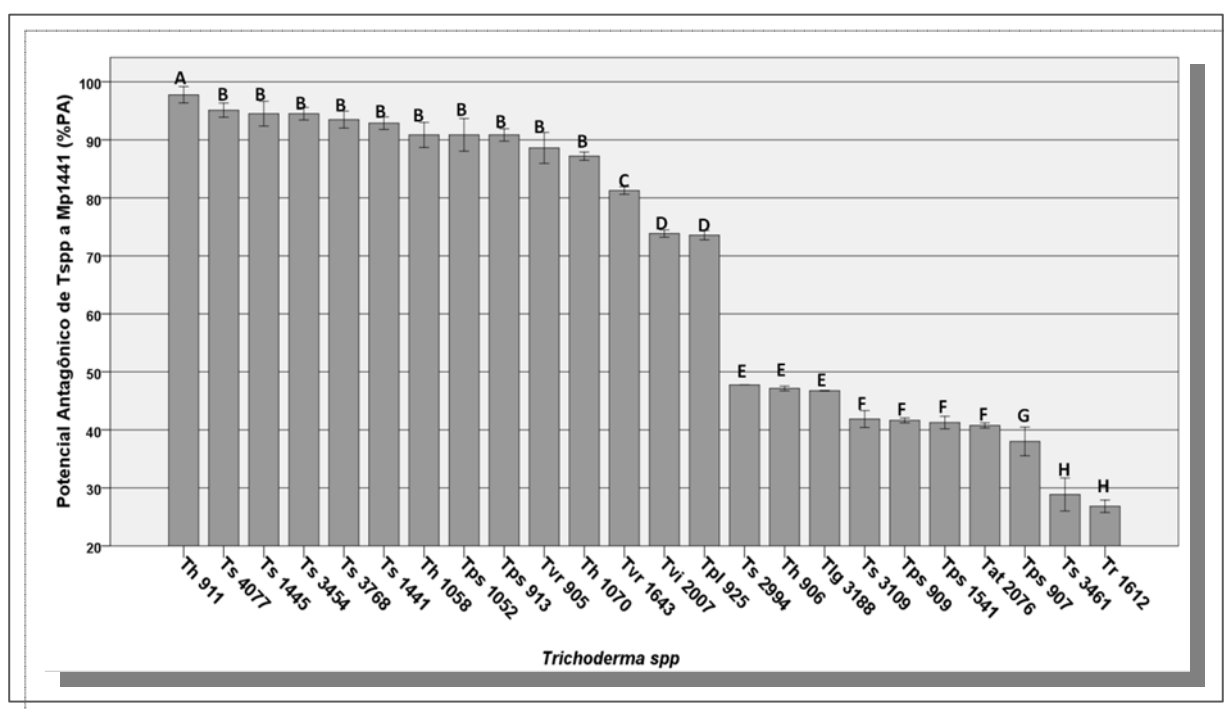
As afinidades, entretanto, não são representadas apenas pelos poderes destrutivos do antagonista, mas também pelos poderes defensivos do patógeno, sendo o sucesso do controle biológico diretamente proporcional ao poder destrutivo do microrganismo antagônico e inversamente proporcional ao poder de escape do patógeno às agressões impostas. Em ambos os casos, as intensidades são graduais e a virulência dos patógenos não é uma escolha autônoma (DEACON e BERRY, 1992). Kilaru et al. (2007) relatam a capacidade de *M. pernicioso* em produzir hormônios com capacidade de suprimir o antagonista, podendo ter sido a causa da ausência da capacidade de micoparasitismo demonstrada por alguns isolados de T spp.

A capacidade de micoparasitismo de *Trichoderma* no controle de *M. pernicioso* tem sido estudada, principalmente por isolados de *T. stromaticum* (SAMUELS et al., 2000; BASTOS, 2000; SANOGO et al., 2002; BEZERRA et al., 2003; CARVALHO, 2006; DE SOUZA et al., 2006; PEREIRA et al., 2007), por *T. viride* (BASTOS, 1966a; BASTOS, 1966b; BASTOS, 1988b) e *T. harzianum* (EL-KATATNY et al. 2000; SOBOWALE et al., 2005) *T. polysporum* (COSTA et al., 1996), sendo na maioria dos trabalhos relatada a variação das capacidades antagônicas apresentadas entre isolados de *Trichoderma* a *M. pernicioso*. Diversos outros trabalhos que estudaram o micoparasitismo de *Trichoderma* a diversos fitopatógenos relataram resultados semelhantes, em que diferentes isolados da mesma espécie resultam em diferentes graus de micoparasitismo (ALMEIDA et al., 2007; SANCHEZ et al., 2007; GACHOMO e KOTCHONI, 2008; LOQUERCIO et al., 2009). Não

foram encontrados na literatura outros trabalhos que avaliem a capacidade antagônica de *Trichoderma* com vários subgrupos de *M. perniciosa*.

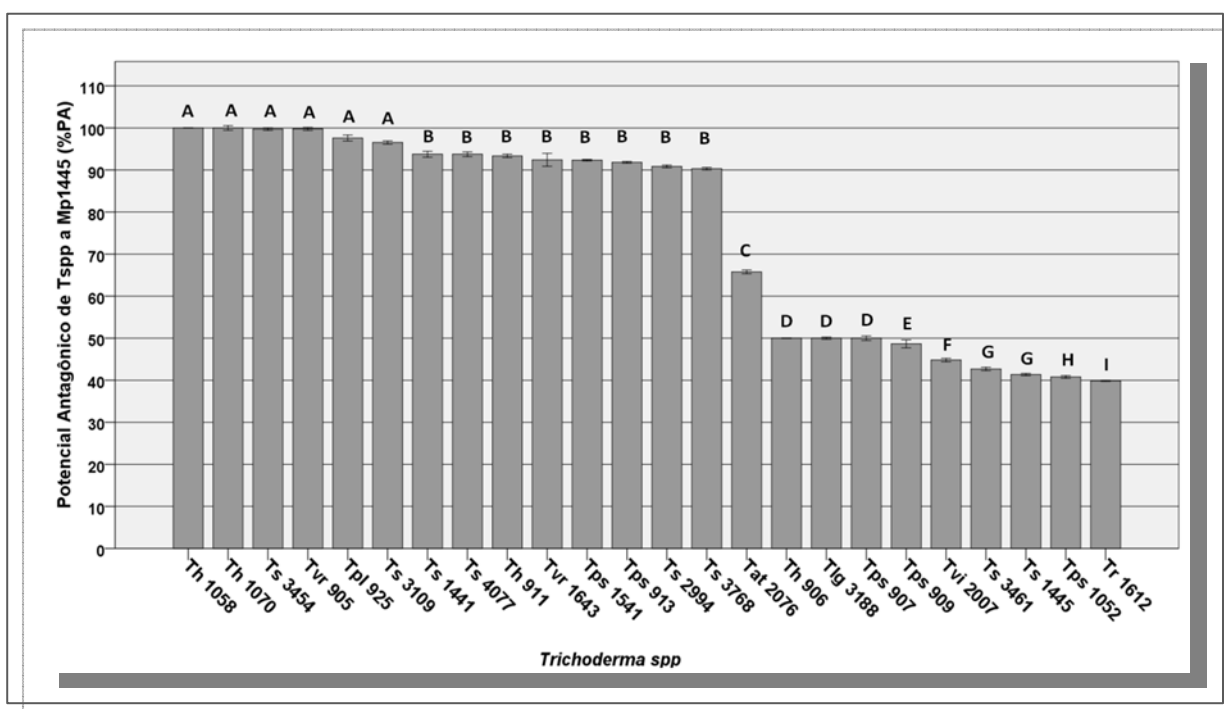
O antagonismo de um fungo a um patógeno, entretanto, se deve geralmente ao sinergismo de todas suas capacidades, sendo mais eficiente aquele que apresenta os mecanismos de competitividade, de antibiose e de micoparasitismo agindo sinergisticamente no hospedeiro (LORITO et al., 1996; STEFANOVA et al., 1999; VERMA et al., 2007; ABDEL-FATTAH et al., 2007).

Assim, a somatória das capacidades de crescimento (%PC), de antibiose (%PAT) e de micoparasitismo (%PM) frente aos diferentes subgrupos de Mp estão apresentadas nas figuras 29, 30, 31 e 32 e representa o que neste estudo denominamos de %PA (Potencial Antagônico). A figura 29 indica que o isolado com maior %PA (97,76%) para Mp1441 foi Th911 ( $p \leq 0,05$ ), seguido de Ts4077, 1445, 3454, 3768, 1441, Th1058, Tps1052, Tps913 e Tvr905 e Th1070, para os quais as diferenças não foram estatisticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) e posteriormente os outros isolados com %PAs decrescentes, sendo Ts3461 e Tr1612 os de menor %PA ( $P \geq 0,05$ ).



**Figura 29-** Potencial antagônico (%PA) de *Trichoderma* spp a Mp1441 *in vitro*. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas); médias seguidas das mesmas letras não são significantes entre si de acordo com teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

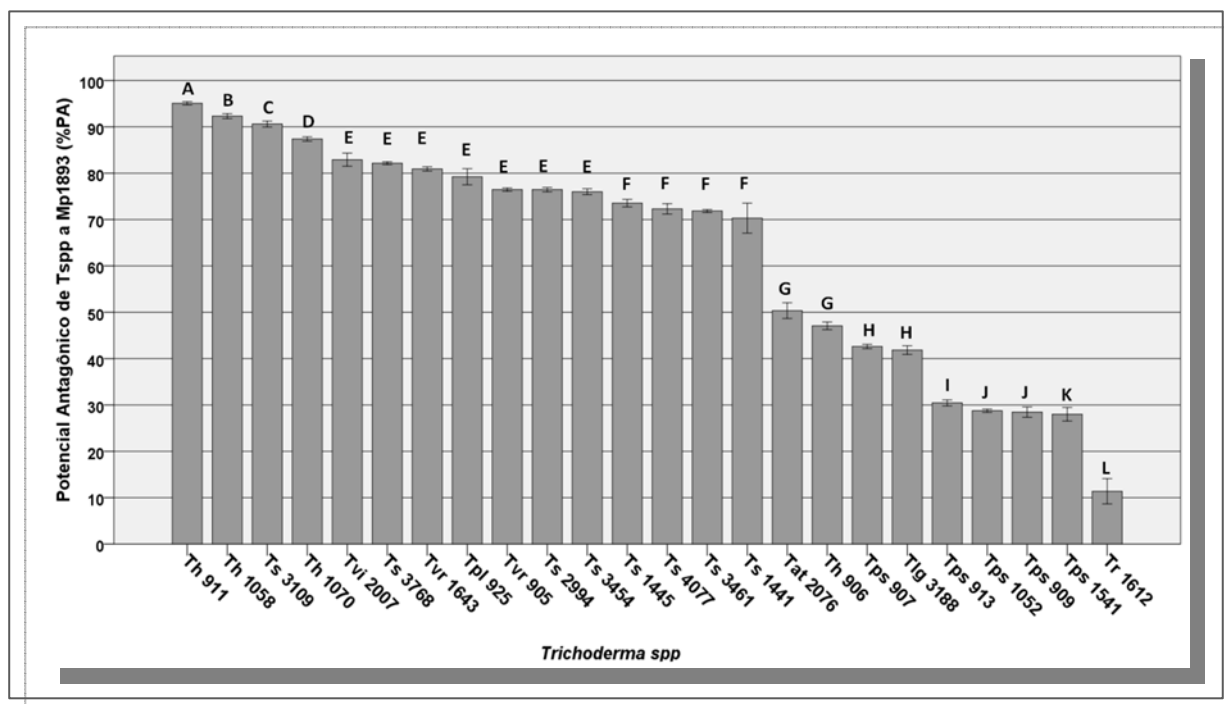
A figura 30 mostra que grande parte dos isolados obtiveram um %PA para Mp1445 entre 90 e 100%, indicando uma boa capacidade antagônica destes isolados para este subgrupo. Destacaram-se Th1058, Th1070, Ts3454, Tvr905, Tpl925 e Ts3109, para os quais as diferenças não foram estatisticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ), sendo o menor %PA apresentado por Tr11612.



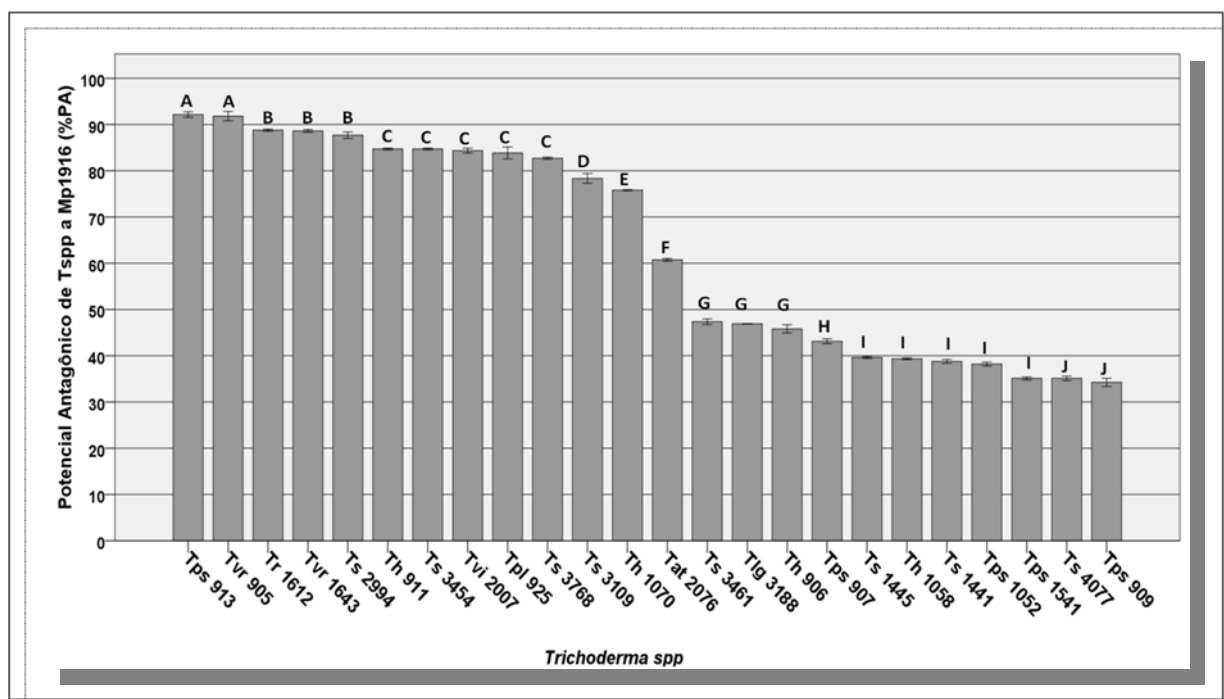
**Figura 30-** Potencial antagônico (%PA) de *Trichoderma* spp a Mp1445 *in vitro*. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas); médias seguidas das mesmas letras não são significantes entre si de acordo com teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Na figura 31 estão os %PAs de Tssp a Mp1893. Verifica-se que um grande número de isolados apresentou %PAs com diferenças estatisticamente significativas entre eles. Th911 se destacou novamente, com um %PA de 95,08%, seguido de Th1058 (92,31%), Ts3109 (90,62%) e Th1070 (87,38%), todos diferentes entre si ( $p \leq 0,05$ ). Os demais apresentaram %PAs entre 70 a 80% e o restante entre 22 (Tr1612) a 50%.

A figura 32 mostra os %PAs de Tssp a Mp1916. Grande parte dos isolados obtiveram %PAs entre 75 a 90% e o restante entre 48 a 35%. Tps913 e Tvr905 foram os que no conjunto de suas qualidades se destacaram, não havendo estatisticamente diferença significativa entre eles ( $p \geq 0,05$ )



**Figura 31-** Potencial antagônico (%PA) de *Trichoderma* spp a Mp1893 *in vitro*. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas); médias seguidas das mesmas letras não são significantes entre si de acordo com teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

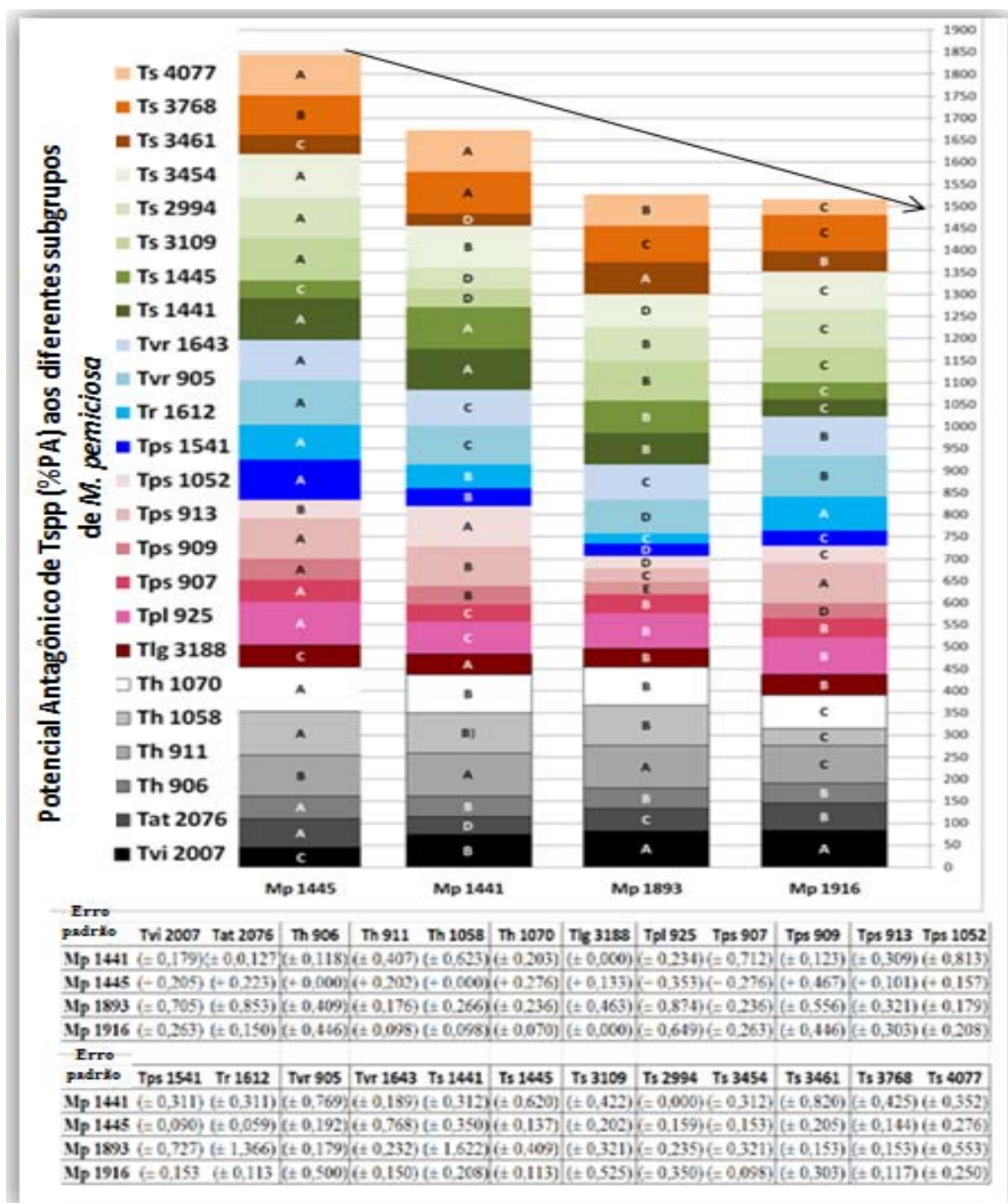


**Figura 32-** Potencial antagônico (%PA) de *Trichoderma* spp a Mp1916 *in vitro*. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas); médias seguidas das mesmas letras não são significantes entre si de acordo com teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Observou-se que isolados com baixo %PC (Figura 20) podem ter obtido %PA alto ou mediano, devido ao fato de terem bons %PAT e/ou %PM, e vice-versa. Por exemplo, Ts3768 que apresentou baixo %PC (Figura 20) devido ao baixo %PE (Figura 17) e %PGe (Figura 18), obteve bom %PA a todos os subgrupos de Mp (Figuras 29, 30, 31 e 32). Por sua vez, Th906 obteve bom %PC (Figura 20), porém, não teve bom %PA a nenhum dos subgrupos de Mp (Figuras 29, 30, 31 e 32). Se um destes isolados fossem escolhidos para produção massal de esporos para o biocontrole de Mp poderiam levar o programa ao fracasso. Ts3768 por que provavelmente iria apresentar problemas na produção de inóculos e germinação de esporos nas vassouras secas e Th906 por provavelmente não antagonizar o patógeno eficientemente na natureza. Percebe-se, portanto, que outros fatores devem ser avaliados para se ter uma boa escolha do isolado a ser utilizado.

Por outro lado, constatou-se que embora um isolado tenha apresentado bom %PC, pode não ter apresentado o mesmo grau de %PA a todos os subgrupos de Mp. Por exemplo, Tvi2007 apresentou %PC elevado (Figura 20) e %PA baixo apenas para Mp1445 (Figura 30). Isto significa que provavelmente este isolado seria eficiente para o biocontrole da doença em ecossistemas cacauzeiros em que Mp1441, 1893 e 1916 estivessem presente, mas não para ecossistemas em que o agente da doença fosse Mp1445. O problema na escolha deste isolado seria maior se fosse ainda considerado que geralmente um ecossistema cacauzeiro pode apresentar mais de um subgrupo de Mp presente (PLOETZ et al., 2005).

A variação dos resultados dos %PAs apresentados entre as espécies de Tspp aos diferentes subgrupos de Mp e por isolados da mesma espécie ao mesmo subgrupo de Mp, pode ser melhor visualizado na figura 33, em que a comparação das médias (significância: 0,05%) representa as diferenças dos resultados de um isolado em relação a cada subgrupo.



**Figura 33-** Variação do %PA de *Trichoderma* spp entre os subgrupos de *M. perniciosa*. Os erros padrão das médias (triplicatas) estão indicados entre parênteses; Médias entre subgrupos seguidas das mesmas letras não são significantes entre si de acordo com teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Pode-se observar que nenhum isolado de T spp apresentou a mesma capacidade antagonística a todos os subgrupos de Mp e ainda que os isolados de T spp avaliados reuniram no conjunto das capacidades de antibiose e micoparasitismo, o melhor desempenho para o biocontrole de Mp1445, que obteve o maior número de scores “A” e “B”. Pode ser que na

interação de Tspp e Mp1445 houve maior especificidade no reconhecimento, aderência e indução de enzimas hidrolíticas por Tspp ou menor capacidade de supressão de Mp1445 aos antagonistas (DEACON e BERRY, 1992).

#### **4.3. Produção de Esporos em Arroz como substrato (PEA), Produtividade de Esporos (PPE) e Potencial de Produtividade de Esporos (%PPE) por isolados de *Trichoderma* spp.**

Outro fator decisivo na seleção de um isolado para produção comercial de esporos para uso em biocontrole é a produtividade no substrato específico (SOARES et al., 2007), uma vez que afeta diretamente os custos, não só na quantidade do produto final como também no tempo de produção.

Segundo Verma et al. (2007), 35 a 40% dos custos de produção depende da produtividade de esporos apresentada. Assim, a produção de esporos por Tspp foi avaliada em arroz como substrato (PEA), estando os resultados apresentados na tabela 9.

O isolado Th911 se destacou com uma produção de  $35,23 \cdot 10^8$  esporos.  $\text{gds}^{-1}$  (grama de substrato seco) ( $p \leq 0,05$ ), seguido por Tps1052 ( $25,29$  esporos.  $10^8$ .  $\text{gds}^{-1}$ ). De modo geral, dos isolados que haviam apresentado boa produção de esporos em placa (%PE- Figura 17), apenas Tvr905, Th911, Tps913 e Th906 mantiveram boa produção em arroz. Vários fatores, entretanto, podem afetar a esporulação de fungos, tais como temperatura, pH, potencial de água, luminosidade, adição de outras fontes de carbono (GAO et al., 2007) e por isso, estes resultados poderiam ser diferentes se fossem pesquisadas condições de esporulação adequadas para cada isolado. As produções de esporos em arroz obtidas por Tspp neste trabalho foram superiores às obtidas no processo de produção massal de esporos desenvolvido pela CEPLAC- Ilhéus (BA) com o produto “Tricovab” que utiliza o isolado GII de *T. stromaticum* ( $1 \cdot 10^7$  esporos.  $\text{gds}^{-1}$ ) (POMELLA et al., 2007), tendo entretanto, os isolados Ts3454, Ts3461 e Ts4077 apresentado produções semelhantes (Tabela 9).

**Tabela 9** - Produção de esporos (PEA) e produtividade de esporos (PPE) em arroz como substrato por isolados de *Trichoderma* spp.

Isolados	PEA	Tempo de colonização	PPE
	(x 10 <sup>8</sup> . gds <sup>-1</sup> )	(d)	(x 10 <sup>8</sup> . gds <sup>-1</sup> . d <sup>-1</sup> )
Th911	35,23 (± 0,088) <sup>A</sup>	3	11,74 <sup>A</sup>
Tps1052	25,29 (± 0,058) <sup>B</sup>	5	5,06 <sup>C</sup>
Tpl925	19,48 (± 0,059) <sup>C</sup>	5	3,90 <sup>D</sup>
Tat2076	17,84 (± 0,029) <sup>D</sup>	5	3,57 <sup>E</sup>
Tvr905	17,34 (± 0,037) <sup>E</sup>	3	5,78 <sup>B</sup>
Th906	15,93 (± 0,020) <sup>F</sup>	6	2,66 <sup>G</sup>
Tlg3188	10,75 (± 0,075) <sup>G</sup>	5	2,11 <sup>H</sup>
Tps913	10,30 (± 0,169) <sup>G</sup>	7	1,47 <sup>I</sup>
Tvr1643	10,14 (± 0,092) <sup>G</sup>	3	3,38 <sup>F</sup>
Tps907	9,37 (± 0,065) <sup>H</sup>	7	1,34 <sup>J</sup>
Tps909	8,73 (± 0,082) <sup>H</sup>	7	1,25 <sup>H</sup>
Tvi2007	8,13 (± 0,021) <sup>I</sup>	4	2,03 <sup>I</sup>
Th1058	7,96 (± 0,120) <sup>I</sup>	5	1,59 <sup>I</sup>
Th1070	7,83 (± 0,032) <sup>I</sup>	5	1,57 <sup>I</sup>
Tps1541	7,76 (± 0,037) <sup>J</sup>	5	1,55 <sup>K</sup>
Ts1441	2,42 (± 0,024) <sup>K</sup>	7	0,35 <sup>L</sup>
Ts1445	1,98 (± 0,058) <sup>L</sup>	7	0,28 <sup>M</sup>
Ts3768	1,48 (± 0,003) <sup>M</sup>	7	0,21 <sup>N</sup>
Ts2994	1,44 (± 0,018) <sup>M</sup>	7	0,21 <sup>N</sup>
Tr1612	1,28 (± 0,008) <sup>N</sup>	7	0,18 <sup>N</sup>
Ts3109	1,08 (± 0,176) <sup>O</sup>	7	0,15 <sup>O</sup>
Ts3454	0,37 (± 0,012) <sup>P</sup>	7	0,05 <sup>P</sup>
Ts3461	0,33 (± 0,008) <sup>P</sup>	7	0,05 <sup>P</sup>
Ts4077	0,13 (± 0,003) <sup>Q</sup>	7	0,02 <sup>Q</sup>

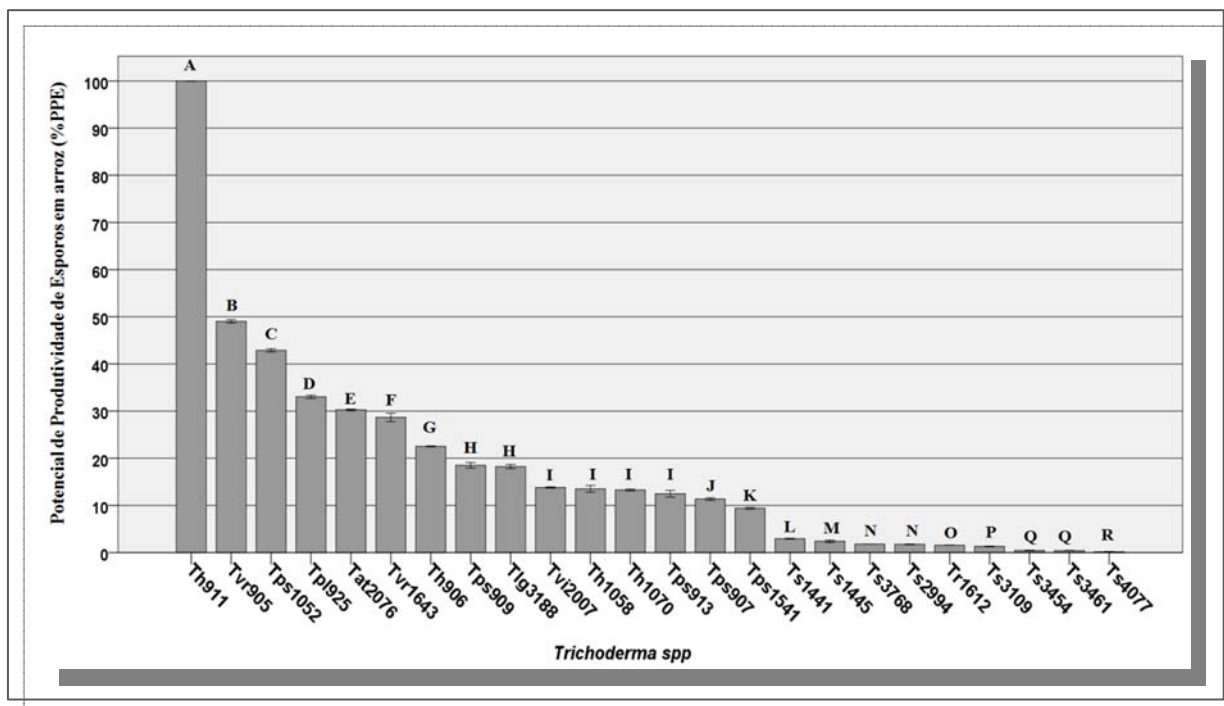
Os resultados representam as médias (triplicatas); médias seguidas da mesma letra não são significantes (p≤0,05) de acordo com o teste Scott-Knott.



Vários trabalhos relataram a produção de esporos por Tsp em substratos específicos, tais como: Hanada et al. (2009) obtiveram produção de  $1,02 \cdot 10^8$  esporos.  $g^{-1}$  por *T. martiale* em arroz suplementado com carbonato de cálcio; Cavalcante et al. (2008) obtiveram em meio de farelo de trigo uma produção de  $28,30 \cdot 10^8$  esporos.  $gds^{-1}$  por *T. harzianum* e  $24,10 \times 10^8$  esporos.  $gds^{-1}$  por *T. viride*; Said (2007) em fermentação líquida obteve uma produção de  $9,2 \cdot 10^7$  esporos.  $mL^{-1}$  por *T. harzianum*; De Souza et al. (2006) com *T. stromaticum* obtiveram uma produção de  $7,8 \text{ Log}_{10}$  esporos.  $g^{-1}$  em arroz e Bettiol et al. (2005) com *T. viride* obtiveram uma produção de  $2,17 \cdot 10^6$  esporos.  $mL^{-1}$ . A comparação destes resultados com os valores obtidos neste estudo mostra que até os isolados considerados não eficientes tiveram uma boa produção.

Os isolados variaram quanto ao tempo de colonização e esporulação no substrato (Tabela 9), sendo a relação tempo/produção de esporos de extrema importância na avaliação desta capacidade entre os isolados de Tsp. A melhor produtividade foi obtida por Th911, que levou 3 d para colonizar totalmente o substrato e esporular. Outros isolados tiveram, porém, sua produção total afetada pelo tempo necessário para colonização e esporulação do arroz. Tps1052, por exemplo, apresentou uma produção total de  $25,29$  esporos.  $10^8$ .  $gds^{-1}$  em 5 d, obtendo uma produtividade de  $11,74$  esporos.  $gds^{-1}$ . d, sendo que, Tvr905 que apresentou uma produção total de  $17,34$  esporos.  $10^8$ .  $gds^{-1}$  (inferior a Tps1052) obteve uma produtividade superior ( $5,78$  esporos.  $10^8$ .  $gds^{-1}$ . d), uma vez que o tempo de colonização e esporulação foi menor (3 d).

Os Potenciais de Produtividade de Esporos (%PPE) de Tsp estão apresentados na figura 34, tendo como referencial de 100% a produtividade de Th911, seguido por Tvr905, sendo significativa a diferença entre eles ( $p \leq 0,05$ ). Observa-se ainda grande decréscimo na produtividade dos isolados, sendo que todos obtiveram um potencial inferior a 50% quando comparados a Th911. Vale ressaltar que muitos isolados de *T. stromaticum* obtiveram ótimos %PAs (Figuras 29, 30, 31 e 32), mas obtiveram, entretanto, %PPEs abaixo de 20% em comparação a Th911. De Souza et al. (2006) ressaltaram que a dificuldade de produção de esporos em arroz por *T. stromaticum* grupo I pode afetar o uso deste isolado para o controle de Mp, embora em campo apresente boa capacidade antagônica, demonstrando a importância deste fator no sistema de produção de um biofungicida. Como em todos os resultados anteriores, continua evidente a variação de resultados intraespecíficas.



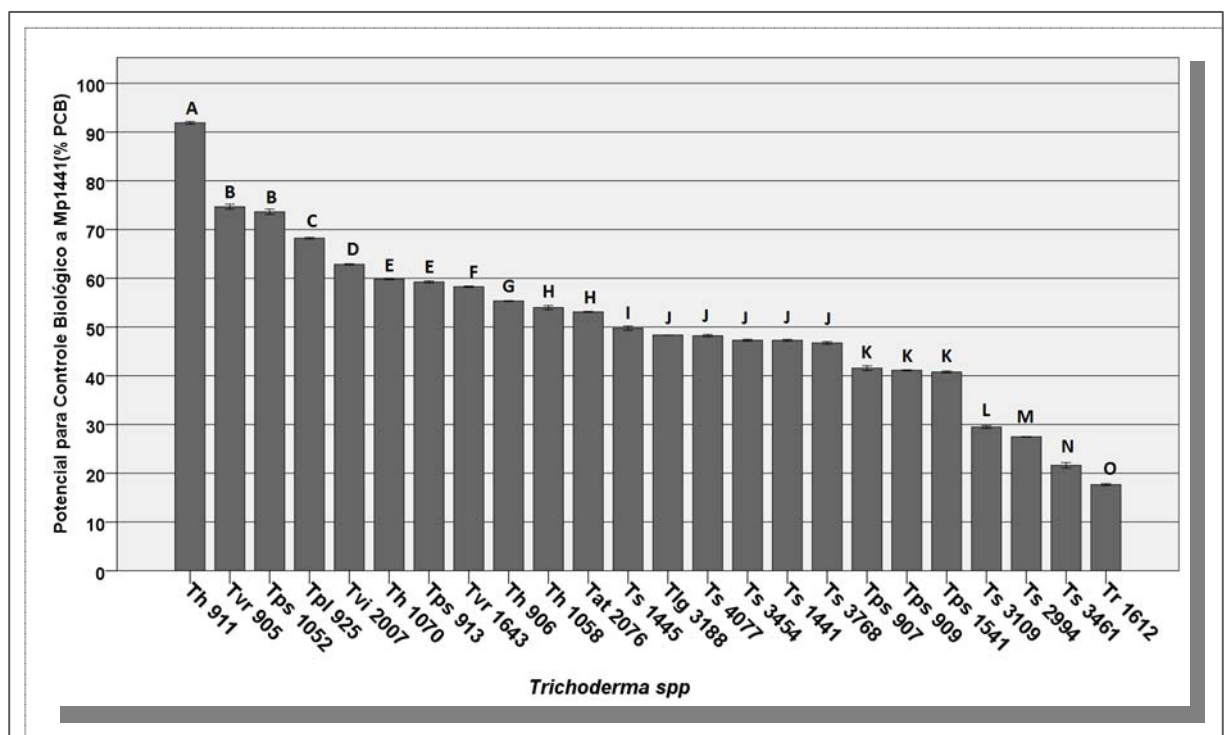
**Figura 34-** Potencial de Produtividade de Esporos (% PPE) por isolados de *Trichoderma* spp em arroz como substrato. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas). Médias seguidas da mesma letra não são significantes ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste Scott-Knott.

#### 4.4. Potencial de isolados de *Trichoderma* spp para uso no Controle Biológico (%PCB) de *M. perniciosa* subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916

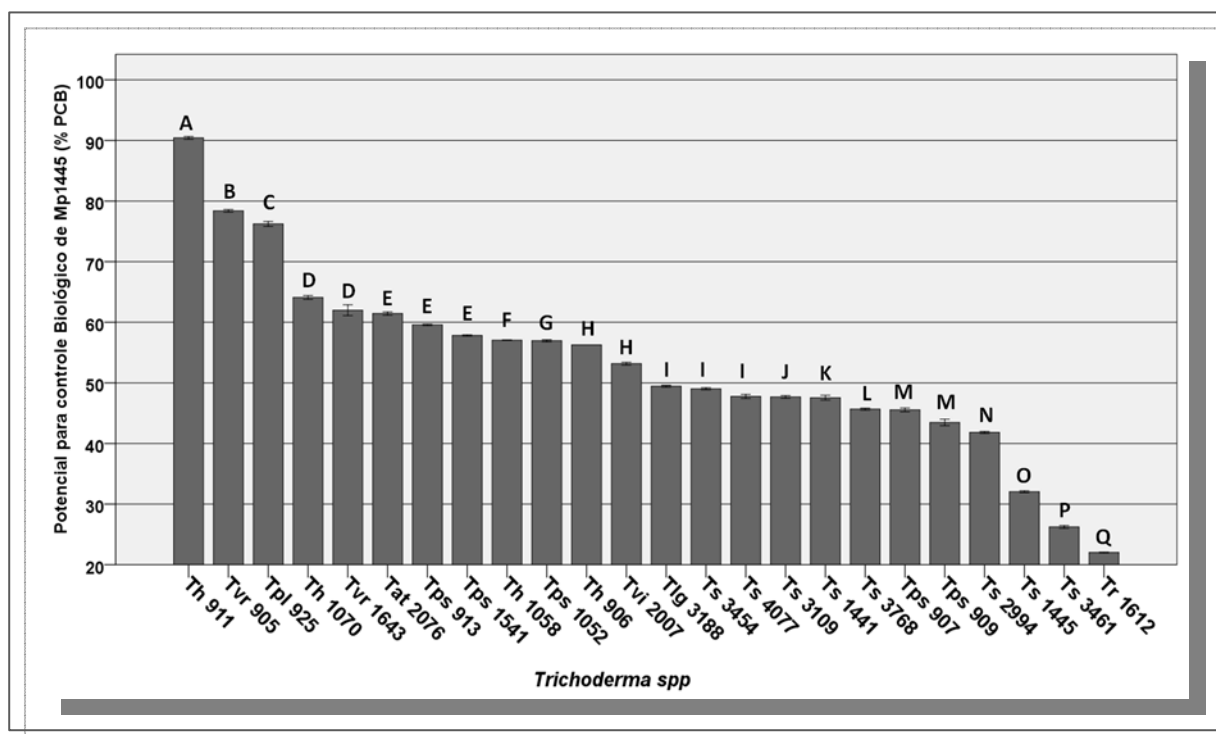
Quando os Potenciais de Crescimento (%PC) e Potenciais de Antagonismo (%PA) foram associados aos Potenciais de Esporulação (%PPE) de cada isolado de T spp, foram obtidos os Potenciais individuais de cada isolado para uso no Controle Biológico de cada subgrupo de Mp (%PCB), estando os resultados apresentados nas figuras 35, 36, 37 e 38.

Observou-se que para Mp1441, o melhor resultado foi obtido com Th911, seguido por Tvr905 e posteriormente por Tps1052 ( $p \leq 0,05$ ). Os outros isolados apresentaram um %PCB inferior a 60%, sendo Tr1612 o que obteve o menor %PCB (16,99%,  $p \leq 0,05$ ) (Figura 35).

O melhor %PCB para Mp1445 foi obtido por Th911 seguido por Tvr905 e posteriormente por Tpl925 ( $p \leq 0,05$ ), sendo o menor %PCB apresentado por Tr1612 (21,32%,  $p \leq 0,05$ ) (Figura 36).

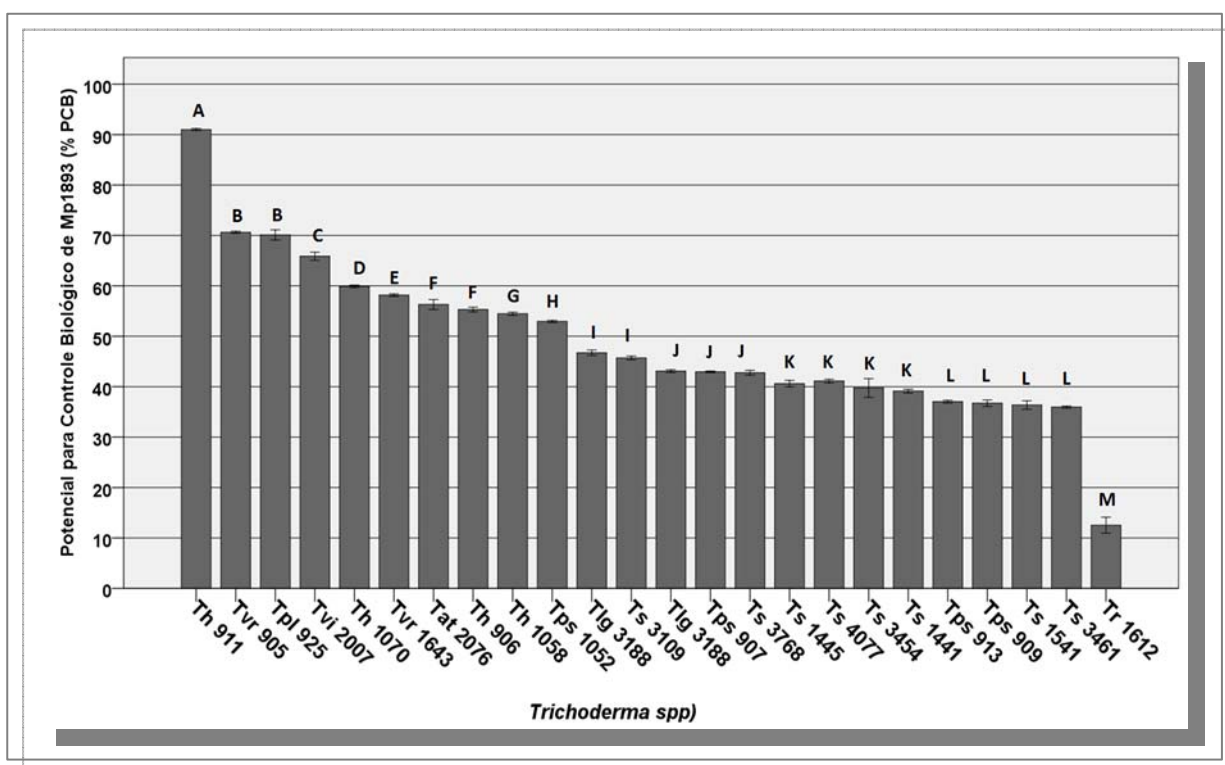


**Figura 35-** Potencial de *Trichoderma* spp para uso no Controle Biológico (%PCB) de Mp1441. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (três replicatas). Médias seguidas da mesma letra não são significantes ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste Scott-Knott.



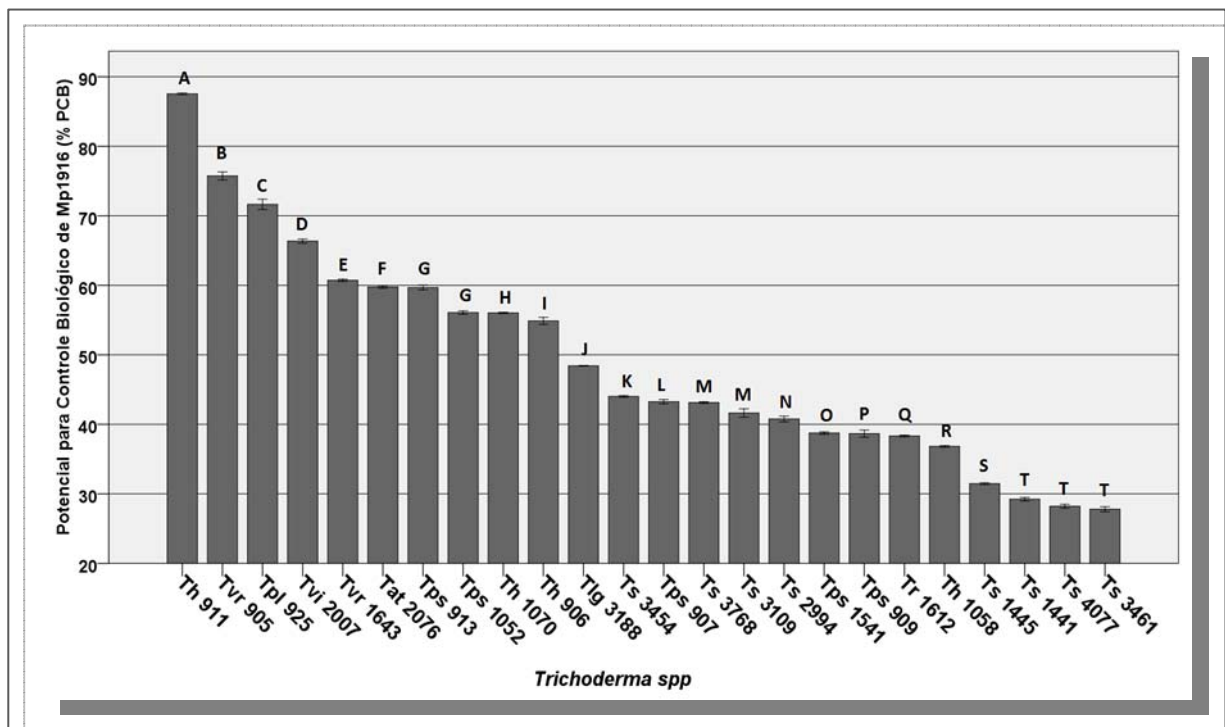
**Figura 36-** Potencial de *Trichoderma* spp para uso no controle biológico (%PCB) de Mp1445. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (três replicatas). Médias seguidas da mesma letra não são significantes ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste Scott-Knott.

A figura 37 apresenta os %PCBs de T spp a Mp1893 e observa-se que Th911 foi seguido por Tvr905 e Tpl925, que não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre eles ( $p \geq 0,05$ ). Os demais apresentaram %PCBs inferiores a 65% e Tr1612 também apresentou o menor %PCB (12,53%,  $p \leq 0,05$ ).



**Figura 37-** Potencial de *Trichoderma* spp para uso no controle biológico (%PCB) de Mp1893. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (três replicatas). Médias seguidas da mesma letra não são significantes ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste Scott-Knott.

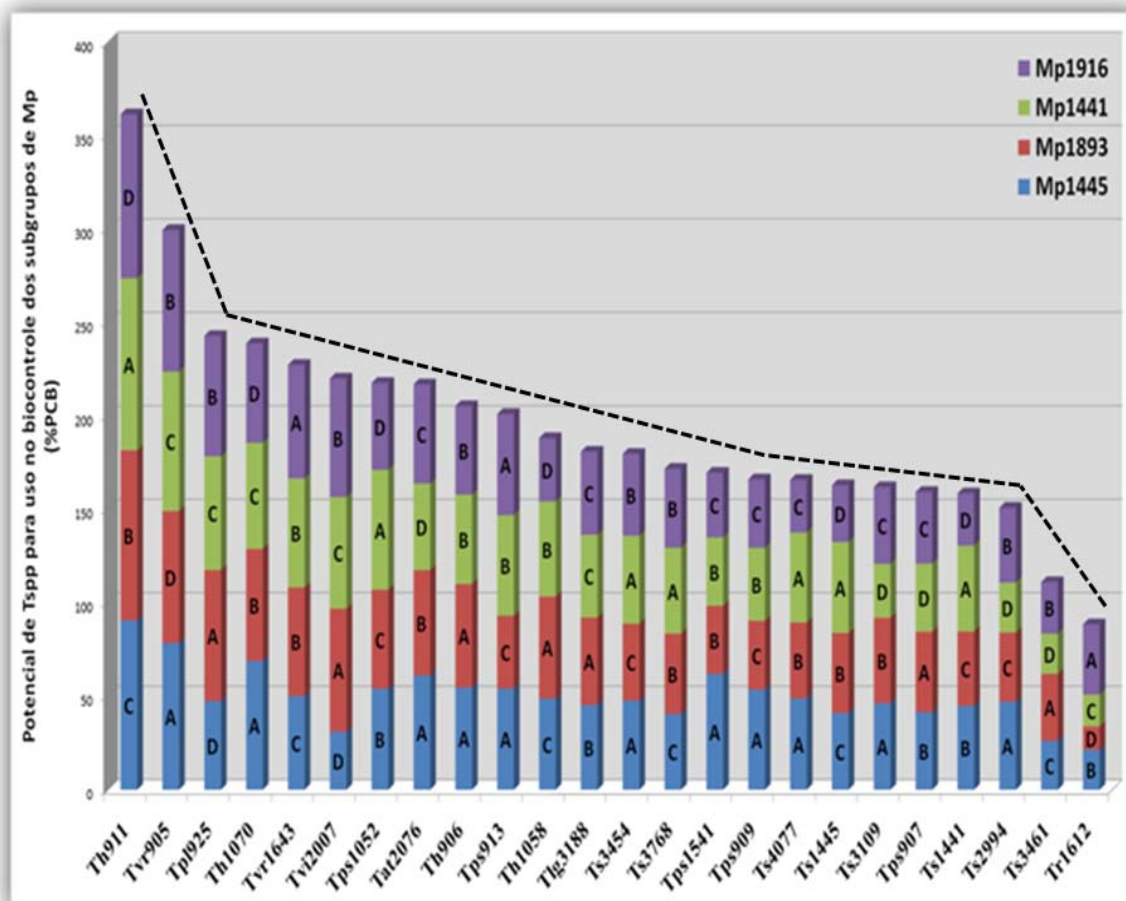
Com Mp1916 (Figura 38), Th911 também foi seguido por Tvr905 e Tpl925 ( $p \leq 0,05$ ), sendo que Ts4077, Ts1441 e Ts3461 apresentaram os menores %PCB ( $p \geq 0,05$ ).



**Figura 38-** Potencial de *Trichoderma* spp para uso no controle biológico (%PCB) de Mp1916. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas). Médias seguidas da mesma letra não são significantes ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste Scott-Knott.

Podemos observar nas figuras 35, 36, 37 e 38 a variação de resultados de isolados da mesma espécie para o mesmo subgrupos de Mp. Todos os isolados de *T. harzianum* obtiveram %PCBs diferentes para todos os subgrupos de Mps ( $p \leq 0,05$ ), o mesmo ocorrendo para *T. viride*. *T. pseudokoningii* apresentou o mesmo resultado ( $p \geq 0,05$ ) para Mp1441 apenas por Tps1541 e Tps907; para Mp1445 por Tps1052, Tps913 e Tps909, para Mp1893 por Tps909 e Tps1541. *T. stromaticum* apresentou o mesmo %PCB ( $p \geq 0,05$ ) para Mp1441 por Ts1445 e Ts4077 e por Ts1441 e Ts3768; para Mp1445 por Ts3454 e Ts2994; para Mp1893 por Ts3768 e Ts1445, por Ts1454, Ts3454 e Ts1441 e para Mp1916 por Ts3109 e Ts2994, por Ts4007, Ts1441 e Ts3461. Constatou-se que a maior variação intraespecífica foi apresentada por *T. harzianum* e *T. viride*, seguidos por *T. pseudokoningii*, sendo que *T. stromaticum* obteve o menor índice de variação intraespecífica.

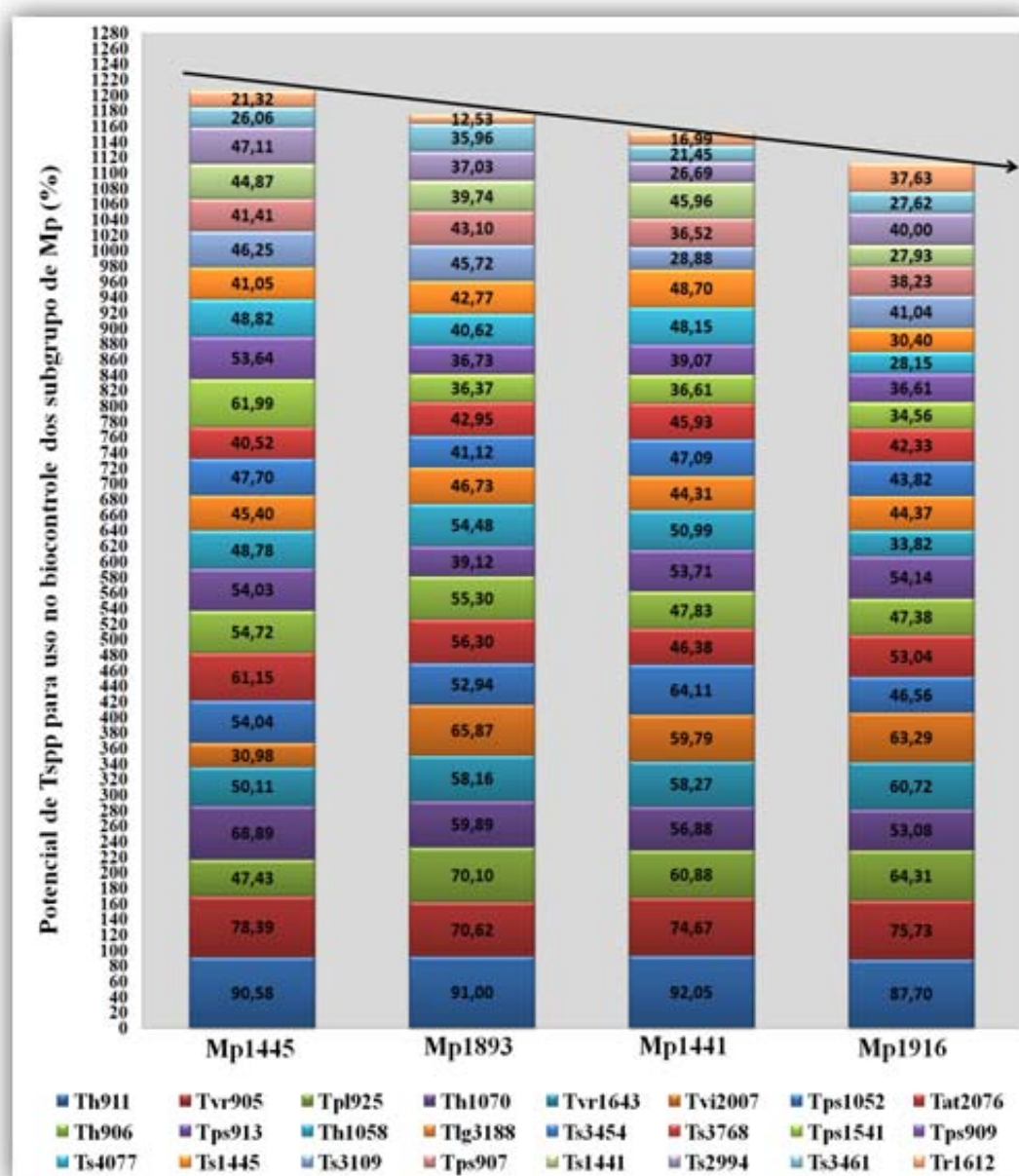
As variações individuais do %PCB de cada isolado para cada subgrupo de Mp podem ser melhor visualizadas pela análise da figura 39, em que as médias dos %PCBs de Tspp são comparadas entre os grupos de Mp.



**Figura 39** - Potencial de isolados de *Trichoderma* spp para uso no biocontrole dos subgrupos de *M. perniciosa* (%PCB). Médias de cada isolado para cada subgrupo seguidas das mesmas letras não são significantes entre si de acordo com teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Observa-se que nenhum isolado de Tspp apresentou o mesmo %PCB a todos os subgrupos de Mp. Os %PCBs de Th911, Tvr905, Tpl925, Th1070, Tvi2007, Tps1052, Tat2076, Th1058, Ts1445, Ts3109, Tps907, Ts1441, Ts2994, Ts3461 e Tr1612 foram significativamente diferentes para os quatro subgrupos de Mp ( $p \leq 0,05$ ). Tvr1643 teve o mesmo %PCB ( $P \geq 0,05$ ) para Mp1893 e Mp1441, Th906 para Mp1445 e Mp1893, Tps913 para Mp1445 e Mp1916, Tls3188 para Mp1441 e Mp1916, Ts3454 para Mp1445 e Mp1916, Ts3768 para Mp1893 e Mp1916, Tps1541 para Mp1893 e Mp1441, Tps909 para Mp1893 e Mp1916 e Ts4077 para Mp1445 e Mp1893.

Pode ser verificado ainda que de modo geral os maiores índices totais de %PCB foram obtidos para Mp1445 (Figura 40), seguido por Mp1893, Mp1441 e Mp1916, o que sugere mais uma vez maior especificidade de T spp a Mp1445 ou menor capacidade de supressão de Mp1445 ao antagonista (DEACON e BERRY, 1992). Constatase ainda, que Th911 foi o único isolado que apresentou %PCB elevado para todos os subgrupos de Mp, seguido por Tvr905, que entretanto teve na média %PCB em torno de 17% menor que Th911.



**Figura 40-** Potenciais para uso no biocontrole por isolados de *Trichoderma* spp (%PCB) acumulados por cada subgrupo de *M. perniciosa*.

#### **4.5. Potencial de antibiose de isolados de *Trichoderma* spp aos diferentes subgrupos de *M. pernicioso* por metabólitos não voláteis e voláteis e antibiose de *M. pernicioso* 1445 a *T. virens* 2007 por metabólitos não voláteis**

Dos isolados de T spp avaliados, todos apresentaram algum grau de antibiose a todos os subgrupos de Mp (Figuras 23, 24, 25 e 26) e como citado anteriormente esta antibiose pode ter ocorrido pela competição por espaço e/ou nutrientes, produção de metabólitos voláteis, não voláteis e ainda pela ação sinérgica de um ou mais destes mecanismos. Assim, os isolados foram avaliados quanto às suas capacidades em produzir metabólitos voláteis e não voláteis com características inibitórias ao crescimento de Mp.

##### **4.5.1. Potencial de antibiose de isolados de *Trichoderma* spp aos diferentes subgrupos de *M. pernicioso* por metabólitos não voláteis (AMNV)**

Os cultivos pareados de T spp e Mp que apresentaram a formação de halo entre as colônias do patógeno e antagonista, foram avaliados quanto à possibilidade da antibiose ter ocorrido pela ação de metabólitos não voláteis produzidos pelo antagonista, em detrimento ao crescimento do patógeno. Os resultados encontrados demonstram que apenas o extrato metabólico de Th906 demonstrou uma atividade antibiótica de 11,66% a Mp1916 por ação de metabólitos não voláteis (Tabela 10).

Todos os outros subgrupos de Mp não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre o crescimento radial apresentado nas placas controle e os obtidos nos cultivos adicionados de extrato metabólico de T spp, resultando portanto, em um %AMNV de 0,00%. Como os resultados foram negativos para praticamente todos os subgrupos, a que pode ser atribuída a formação dos halos?

O grau de antibiose por metabólitos não voláteis pelo método da cultura pareada é determinado pela distância (mm) existente entre as colônias do patógeno e antagonista, e expressa a quantidade ou natureza do(s) metabólito(s) excretado(s). Outros trabalhos relataram diferentes graus de antibiose em cultivos pareados entre *Trichoderma* e outros fitopatógenos (MARTINS-CORDER E MELO, 1998; ETHUR et al., 2001). Como os halos observados nas figuras 22 A, 22 C, 22 E, 22 G-1, 22 H-1, 22 H-2 foram pequenos, embora visíveis, não foram passíveis de mensuração. Assim, supõe-se que a quantidade de metabólitos excretados por T spp nos cultivos pareados tenha sido pequena ou de natureza inibitória baixa. Isto poderia também ter ocorrido nos cultivos líquidos de T spp para produção



dos extratos metabólicos brutos e quando utilizados no meio BDA não afetaram o crescimento dos Mps testados, resultando nos %AMNV nulos (Tabela 10). Outros fatores que poderiam levar à baixa produção de metabólitos nos cultivos submersos seriam as condições de cultivo, uma vez que a produção de metabólitos depende de parâmetros ambientais como pH, temperatura, tipo de substrato (VIZCAÍNO et al., 2005) e o tempo de cultivo (BUSHELL, 1989). Mondego et al. (2008) relatam ainda a capacidade de detoxificação apresentada por *M. pernicioso*, significando que compostos não voláteis podem ter sido produzidos por *Tspp* e degradados por *Mp*.

**Tabela 10** - Potencial de antibiose de isolados de *Trichoderma* spp aos diferentes subgrupos de *M. pernicioso* por metabólitos não voláteis (%AMNV).

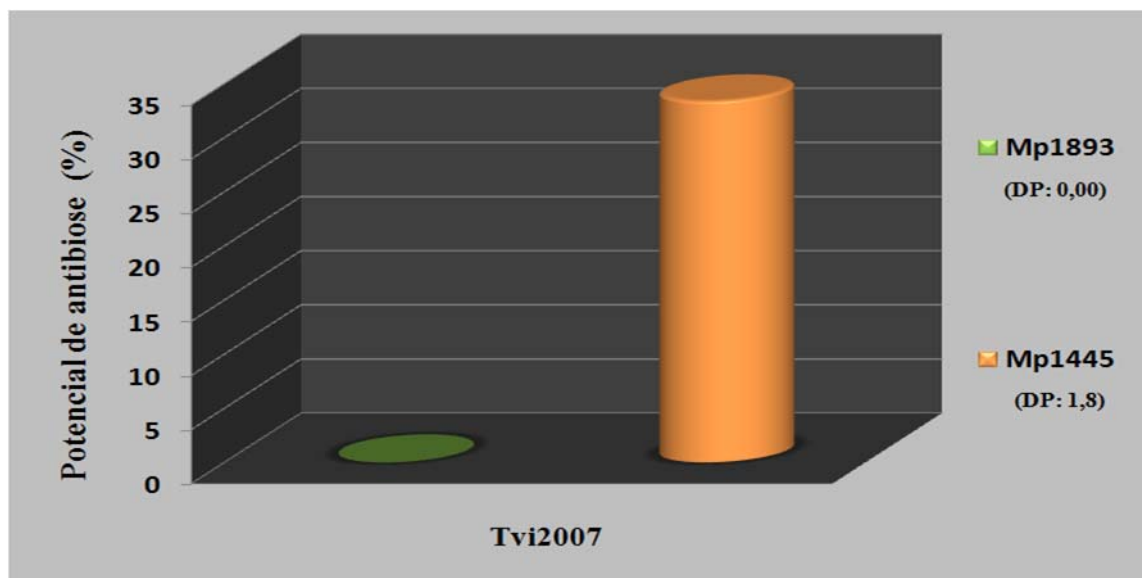
Isolados	AMNV (%)			
	Mp1441	Mp1445	Mp1893	Mp1916
Th906	SH	SH	SH	11,66 ( $\pm 1,08$ )
Tps909	SH	0,00 ( $\pm 0,00$ )	0,00 ( $\pm 0,00$ )	SH
Tps907	SH	0,00 ( $\pm 0,00$ )	0,00 ( $\pm 0,00$ )	0,00 ( $\pm 0,00$ )
Tvi2007	SH	0,00 ( $\pm 0,00$ )	SH	SH
Tlg3188	0,00 ( $\pm 0,00$ )	0,00 ( $\pm 0,00$ )	SH	0,00 ( $\pm 0,00$ )
Tr1612	0,00 ( $\pm 0,00$ )	0,00 ( $\pm 0,00$ )	SH	SH

SH: não avaliados, pois não houve formação de halo em cultura pareada. Os resultados representam as médias das triplicatas estando os erros padrão indicados entre parênteses.

#### 4.5.2. Potencial de antibiose de *M. pernicioso* 1445 a Tvi2007 por metabólitos não voláteis

Como citado anteriormente, o patógeno também poderia estar inibindo o antagonista e em busca desta resposta foi realizado o mesmo experimento, desta vez utilizando líquido metabólico de Mp1445 para avaliar a capacidade de antibiose a Tvi2007. Isto porque, os mesmos apresentaram em cultivo pareado a formação de halo e o crescimento radial de Tvi2007 foi inibido, quando comparado ao crescimento radial apresentado em cultivo individual (RAC) (Tabela 7). Paralelamente também foi realizado o experimento utilizando Mp1893 que em relação a Tvi2007 não formou halo em cultivo pareado, tampouco inibiu seu crescimento. Pelo resultado apresentado na figura 41, observa-se que o extrato metabólico de

Mp1445 inibiu o crescimento radial de Tvi2007, sendo a inibição de 0,0% nos cultivos utilizando extrato metabólico de Mp1893.



**Figura 41-** Potencial de antibiose de *M. perniciosa* 1445 a *T. virens* 2007 por metabólitos não voláteis. Os resultados representam as médias das triplicatas estando os desvios padrão indicados entre parênteses.

Isto sugere, portanto, que halos formados em cultivos pareados entre um patógeno e antagonista podem ser causados por metabólitos não voláteis produzidos pelo patógeno, ou ainda por ambos. Estudos mais aprofundados que avaliem a capacidade de antibiose dos fungos envolvidos na interação antagonista x hospedeiro devem ser realizados para melhor caracterizar os resultados obtidos em cultura pareada, que indevidamente são geralmente atribuídas como sendo uma capacidade apenas do antagonista.

#### **4.5.3. Potencial de antibiose de isolados de *Trichoderma* spp aos diferentes subgrupos de *M. perniciosa* por metabólitos voláteis (AMV)- Técnica da placa invertida.**

Os isolados de T spp que em cultivo pareado inibiram o crescimento de Mp sem a formação de halo entre as colônias, foram avaliados quanto à capacidade de produção de metabólitos voláteis. Os resultados apresentados na tabela 11 demonstram que T spp produziu substâncias voláteis não identificadas que inibiram em diferentes graus o crescimento de todos os isolados de Mp.

**Tabela 11** - Potencial de antibiose de isolados de *Trichoderma* spp aos diferentes subgrupos de *M. perniciosa* por metabólitos voláteis (%AMV).

Isolados	AMV (%)			
	Mp1441	Mp1445	Mp1893	Mp1916
Th911	92,55 ( $\pm$ 7,18) <sup>A</sup>	72,33 ( $\pm$ 5,57) <sup>C</sup>	100 ( $\pm$ 0,00) <sup>A</sup>	43,98 ( $\pm$ 4,01) <sup>D</sup>
Th1070	69,49 ( $\pm$ 2,58) <sup>B</sup>	85,72 ( $\pm$ 4,09) <sup>A</sup>	71,90 ( $\pm$ 2,28) <sup>B</sup>	68,05 ( $\pm$ 2,41) <sup>C</sup>
Tat2076	48,66 ( $\pm$ 2,23) <sup>D</sup>	80,36 ( $\pm$ 7,73) <sup>C</sup>	45,23 ( $\pm$ 2,18) <sup>D</sup>	69,44 ( $\pm$ 1,39) <sup>C</sup>
Tvr905	73,95 ( $\pm$ 2,58) <sup>B</sup>	90,62 ( $\pm$ 1,34) <sup>A</sup>	68,09 ( $\pm$ 1,65) <sup>C</sup>	74,07 ( $\pm$ 0,85) <sup>B</sup>
Tvi2007	63,54 ( $\pm$ 2,41) <sup>C</sup>	97,32 ( $\pm$ 2,32) <sup>A</sup>	63,80 ( $\pm$ 7,19) <sup>C</sup>	61,57 ( $\pm$ 0,83) <sup>C</sup>
Tlg3188	89,58 ( $\pm$ 1,29) <sup>A</sup>	43,32 ( $\pm$ 0,77) <sup>D</sup>	73,80 ( $\pm$ 1,68) <sup>B</sup>	84,72 ( $\pm$ 1,39) <sup>A</sup>
Tps1052	85,86 ( $\pm$ 2,58) <sup>A</sup>	83,04 ( $\pm$ 3,18) <sup>B</sup>	100 ( $\pm$ 0,00) <sup>A</sup>	68,51 ( $\pm$ 2,89) <sup>C</sup>
Tpl925	59,07 ( $\pm$ 1,19) <sup>C</sup>	79,47 ( $\pm$ 3,37) <sup>B</sup>	46,66 ( $\pm$ 0,82) <sup>D</sup>	57,40 ( $\pm$ 2,75) <sup>C</sup>
Tr1612	62,05 ( $\pm$ 5,91) <sup>C</sup>	95,53 ( $\pm$ 4,12) <sup>A</sup>	36,19 ( $\pm$ 1,65) <sup>E</sup>	58,79 ( $\pm$ 0,80) <sup>C</sup>
Ts3454	32,33 ( $\pm$ 2,52) <sup>E</sup>	25,98 ( $\pm$ 3,32) <sup>E</sup>	22,15 ( $\pm$ 3,57) <sup>F</sup>	33,96 ( $\pm$ 2,21) <sup>E</sup>

Os resultados representam as médias das triplicatas estando os desvios padrão indicados entre parênteses. Médias de cada subgrupo para cada isolado seguidas das mesmas letras não são significantes entre si de acordo com teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O maior %AMV a Mp1441 foi demonstrado por Th911, Tlg3188 e Tps1052, não sendo estatisticamente significativa a diferença entre eles ( $p \geq 0,05$ ); o menor %AMV foi apresentado por Ts3454 (32,33%). A Mp1445, o maior %AMV foi apresentado por Th1070, Tvr905, Tvi2007 e Tr1612, não sendo significativa a diferença entre eles ( $p \geq 0,05$ ); o menor %AMV foi apresentado por Ts3454 (25,98%). O maior %AMV a Mp1893 foi demonstrado por Th911 e Tps1052, não sendo significativa a diferença entre eles ( $p \geq 0,05$ ); o menor %AMV foi apresentado Ts3454 (22,15%). A Mp1916 o maior %AMV foi apresentado por Tls3188 ( $p \leq 0,05$ ), tendo mais uma vez Ts3454 apresentado o menor percentual (33,96%). Um fato interessante demonstrado por Tps1052 foi que em cultivos de manutenção efetuados em BDA, sempre foi observada a produção de um metabólito que tornava o meio com uma coloração amarela intensa, sendo que nos experimentos para detecção da produção de metabólitos voláteis (placa invertida) a mesma coloração foi constatada na parte superior da placa (onde se encontrava o patógeno). O fato foi observado com todos os subgrupos de Mp, sugerindo ter este metabólito natureza volátil.

Constatou-se ainda, que os maiores percentuais de AMV% (Tabela 11) dos isolados de *Tspp* avaliados foram com Mp1445, seguidos por Mp1441, Mp1893 e Mp1916, estando de acordo com os percentuais de inibição (%PAT) apresentados na figura 27, demonstrando que Mp1445 é mais sensível à ação antibiótica de *Tspp*.

Metabólitos voláteis têm vantagens sobre aqueles não voláteis (MANGENOT e DIEN, 1979), como a capacidade de difusão em interstícios, assim como na solução do solo, quando solúveis em água. São somente sujeitos à adsorção e biodegradação e seu efeito é somente limitado por diluição. A natureza volátil de certos antibióticos, como as pironas, produzidas por *T. harzianum* (CLAYDON et al., 1987) e por *T. koningii* (SIMON et al., 1988), confere uma vantagem distinta sobre inibidores não voláteis, já que sua ação pode atingir microrganismos fisicamente distantes dos sítios de produção. A permeação por inibidores não voláteis pode ser altamente restrita, especialmente para metabólitos de baixa solubilidade em água.

Para vários autores (HOWELL 2003; VERMA et al., 2007; REINO et al. 2008) a antibiose é considerada como sendo um mecanismo essencial no biocontrole de várias espécies de *Trichoderma* a diversos fitopatógenos e estudos prévios comprovaram a boa capacidade deste gênero em produzir compostos voláteis com capacidade antibiótica a diversos fitopatógenos, conforme demonstra a tabela 12.

**Tabela 12-** Relação de isolados de *Trichoderma* spp produtores de metabólitos voláteis e não voláteis no processo antagônico a fitopatógenos, citados por outros autores.

Isolados	Patógeno	Metabólito	Autores
<i>T. harzianum</i>	<i>Penicillium</i> spp	V	Claydon et al. (1987) Parker et al. (1997)
	<i>Aspergillus fumigatus</i>		
	<i>Candida albicans</i>		
	<i>Cryptococcus neoformans</i>		
<i>T. viride</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	V	Lobo Junior e De Abreu (2000)
<i>T. aureoviride</i>			
<i>T. koningii</i>			
<i>T. pseudokoningii</i>			
<i>T. pseudokoningii</i>	<i>Glomus mosseae</i>	V	Martinez et al. (2004)
	<i>Glomus rósea</i>		
<i>T. harzianum</i>	<i>Glomus graminis</i>	V	Kuçuk e Kivanç (2004)
	<i>Fusarium culmorum</i>		
	<i>Fusarium moniliforme</i>		
<i>Trichoderma</i> sp	<i>Serpula lacrymans</i>	V	Yang et al. (2007)
<i>T. viride</i>	<i>Colletia paradoxa</i>	V	Eziashi et al. (2007)
<i>T. polysporum</i>			
<i>T. hamatum</i>			
<i>T. hamatum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	V	Hajieghrari et al. (2008)
<i>T. harzianum</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>	V	El-Hasan et al. (2008)
<i>T. longibrachiatum</i>	<i>Sclerotium. rolfsii</i>	V	Shaigan et al. (2008)
<i>T. harzianum</i>	<i>Ganoderma boninense</i>	V	Siddiquee et al. (2009)
<i>T. virens</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	V	Hajieghrari et al. (2008)
<i>T. harzianum</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>	NV	El-Hasan et al. (2009)
<i>Trichoderma</i> spp	<i>Verticillium dahliae</i>	V/ NV	Martins-Corder e Melo (1998)
<i>T. harzianum</i>	<i>Botryosphaeria berengeriana</i>	V/ NV	Kexiang et al. (2002)
<i>T. atroviride</i>			
<i>T. harzianum</i>	<i>Eutypa lata</i>	V/ NV	John et al. (2004)
<i>T. viride</i>	<i>Colletotrichum</i> spp	V/ NV	Almeida et al. (2009)
	<i>Colletotrichum musae</i>		
	<i>Asperisporium caricae</i>		
<i>T. viride</i>	<i>Colletia paradoxa</i>	V/ NV	Eziashi et al. (2006)
<i>T. longibrachiatum</i>	<i>Mycena citricolor</i>	NV	Andrade et al. (1992)
<i>T. harzianum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	NV	Bertagnolli et al. (1998)
<i>T. harzianum</i>	<i>Bipolaris oryzae</i>	NV	Abdel-Fattah et al. (2007)

V: metabólitos voláteis; NV: metabólitos não voláteis.

A produção de compostos antifúngicos pode variar entre isolados da mesma espécie e entre isolados de espécies diferentes, como também espécies diferentes pode produzir mesmos compostos da mesma natureza (GHISALBERTI e SIVASITHAMPARAM, 1991). Dennis e Webster (1971a) citaram que a susceptibilidade dos fungos a estes metabólitos também pode variar. Tais afirmações estão de acordo com os resultados apresentados na tabela 11, uma vez que Th1070 e Th911 variaram em seus %AMVs a todos os Mps e também a grande variação da susceptibilidade apresentada pelos subgrupos de Mp aos metabólitos produzidos por um mesmo isolado de Tspp (Tabela 11).

Os resultados demonstraram baixa capacidade de antibiose por Ts3454 a todos os isolados de Mp (Tabela 11). Uma baixa atividade antifúngica, entretanto, pode não significar baixa capacidade de biocontrole, contanto que o isolado apresente outras qualidades favoráveis. Castillejo et al. (2001) relataram a baixa atividade antifúngica de *T. atroviride* NBT 11, apresentando, porém, ótima produção de enzimas hidrolíticas degradadoras da parede celular, o que também foi constatado por Hermosa et al. (2000) e Sanz et al. (2004).

A maioria dos trabalhos de antagonismo ente *T. stromaticum* e Mp não relata a ação do mecanismo de antibiose, embora Degenkolb et al. (2006) constataram a produção de polipeptídios antibióticos não voláteis (trichocompactinas e trichostromaticinas) por *T. stromaticum* e Aneja et al. (2005) comprovaram a produção ácido pelargônico por espécies de *Trichoderma* com ação antifúngica a *M. pernicioso*.

Outro fator que também deve ser avaliado em estudos futuros é a ação de possíveis metabólitos voláteis produzidos por Mp agindo no crescimento de Tspp, pois neste trabalho não foi comparada a média dos raios das colônias de Tspp nos cultivos com Mp pelo método da placa invertida, com as médias dos raios das colônias de Tspp em placas controle.

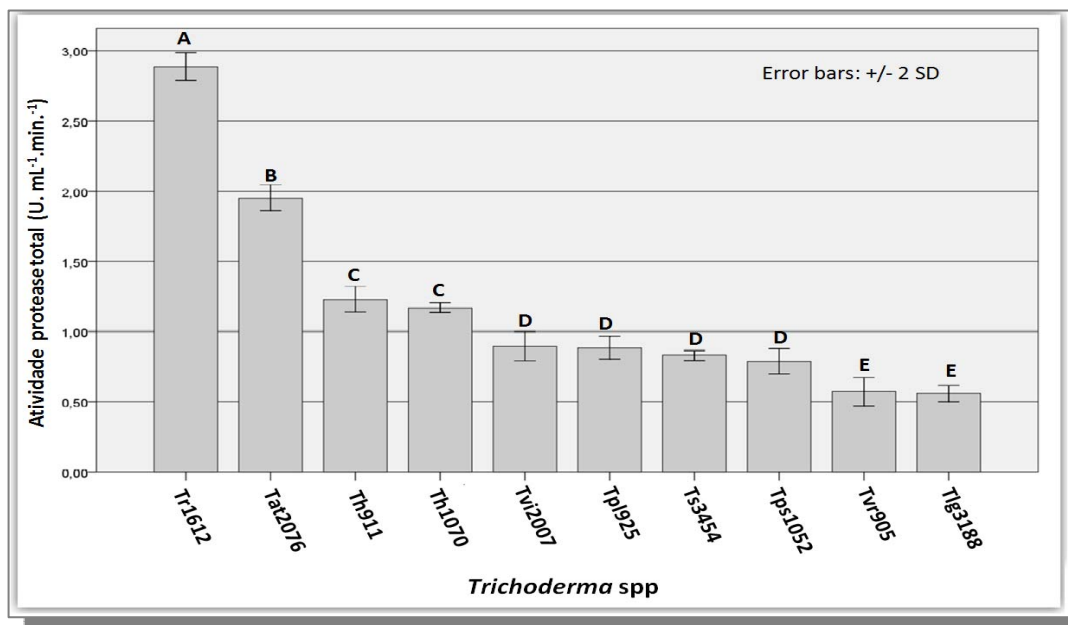
#### **4.6. Caracterização do mecanismo antagônico de *Trichoderma* spp aos diferentes subgrupos de *M. pernicioso* por enzimas hidrolíticas**

##### **4.6.1. Enzimas hidrolíticas produzidas por isolados de *Trichoderma* spp em substratos específicos**

O passo inicial para se determinar a capacidade de micoparasitismo de Tspp a Mp, foi avaliar se a presença de substratos específicos induziria a produção de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação da parede celular fúngica, uma vez que estudos de outros autores

demonstram sua importância no entendimento do mecanismo responsável pela ação antagônica deste micoparasita sobre o fitopatógeno *M. pernicioso* (SAMUELS et al., 2000; DE MARCO et al., 2003; CARVALHO, 2006; HANADA et al., 2008).

A produção da enzima protease (Ptase) por Tssp estão apresentadas na figura 42.



**Figura 42-** Produção da enzima protease no extrato enzimático bruto de *Trichoderma* spp cultivado em substrato específico. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas). Médias seguidas da mesma letra não são significantes ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

Verificou-se que todos os isolados de Tssp avaliados provavelmente possuem genes que expressaram a produção da enzima protease em meio contendo caseína como única fonte de carbono, demonstrando, portanto o caráter indutivo desta enzima. A melhor atividade produtora foi apresentada por Tr1612 ( $2,89 \text{ U. mL}^{-1} \cdot \text{min.}^{-1}$  -  $p \leq 0,05$ ) seguido por Tat2076 que apresentou produção 32% menor que Tr1612.

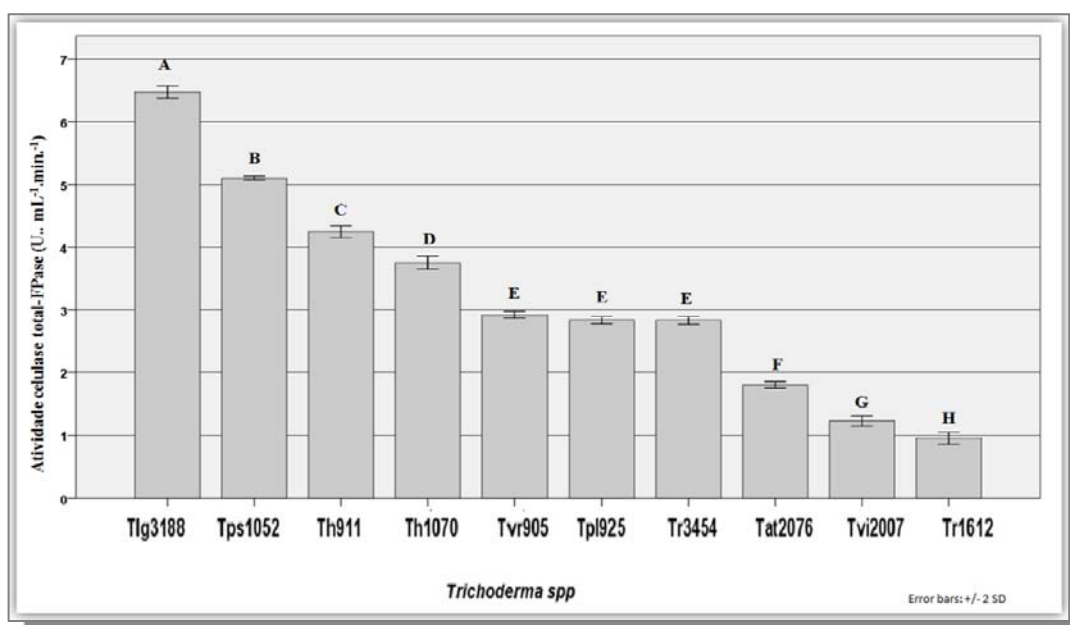
A produção foi decrescente para os outros isolados, sendo que Tr3188 foi o que apresentou a menor produção ( $0,56 \text{ U. mL}^{-1} \cdot \text{min.}^{-1}$  -  $p \leq 0,05$ ), sendo 78% menor que Tr1612. *T. reesei* não é usualmente a espécie mais citada como produtora de proteases, entretanto alguns trabalhos relataram atividade proteolítica por esta espécie (HAGSPIEL et al., 1989; HAAB et al., 1990; MANTYLA et al., 1994).

Muitos trabalhos já avaliaram a atividade proteolítica de *T. harzianum*, apresentando resultados bastante diversos, fato esperado uma vez que o isolado utilizado e as condições culturais afetam a atividade enzimática: De Marco et al. (2003) obtiveram com um isolado de *T. harzianum* uma atividade de  $1,9 \text{ U. mL}^{-1} \cdot \text{min.}^{-1}$  semelhante ao valor apresentado neste

estudo por Th911 (1,23 U. mL<sup>-1</sup>. min.<sup>-1</sup>), Pádua et al. (2007) obtiveram com dois isolados de *T. harzianum* (CEN201 e CEN241), 0,3 e 0,07 U. mL<sup>-1</sup>, respectivamente e Elad e Kapat (1999) com *T. harzianum* obtiveram 0,35 U. mL<sup>-1</sup>.

Todos os isolados também foram capazes de expressar a produção da enzima exo-β-1,4 glucanase (FPase) em meio contendo papel de filtro como fonte de carbono, e que representa a atividade total da celulase (Figura 43).

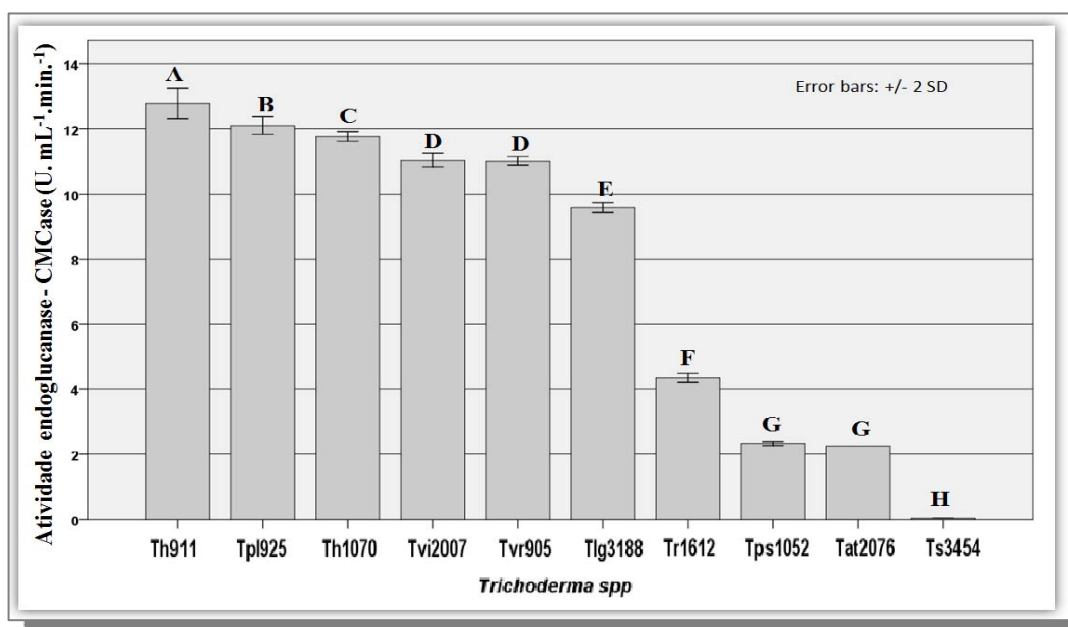
Tlg3188 apresentou a maior atividade (6,47 U. mL<sup>-1</sup>. min.<sup>-1</sup> - p≤0,05), sendo maior que a encontrada por Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) com a mesma espécie (0,018 U. mL<sup>-1</sup>. min.<sup>-1</sup>). Outros trabalhos que avaliaram a produção da enzima usando papel de filtro como substrato apresentam também resultados bastante diversos para outras espécies de *Trichoderma*: Jun et al. (2009) obtiveram com *T. reesei* 2,6 U. mL<sup>-1</sup>, Rezende et al. (2002) obtiveram atividade máxima por *T. harzianum* de 4,0 U. mL<sup>-1</sup>, Lopes (2008) obtiveram com *Trichoderma* sp 0,04 U. mL<sup>-1</sup>. min.<sup>-1</sup>, Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) com *T. inhamatum*, *T. pseudokoningii* e *T. viride* obtiveram produção máxima de 0,19 - 0,015 e 0,017 U. mL<sup>-1</sup>. min.<sup>-1</sup>, respectivamente, Juhász et al. (2005) com *T. reesei* obtiveram a atividade de 1,15 U. mL<sup>-1</sup>. min.<sup>-1</sup> e Kocher (2008) com *T. harzianum* obteve 0,08 U. mL<sup>-1</sup> e com *T. reesei* 0,06 U. mL<sup>-1</sup>.



**Figura 43-** Produção da enzima celulase total (FPase) por *Trichoderma* spp cultivado em substrato específico. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas). Médias seguidas da mesma letra não são significantes (p≤0,05) de acordo com o teste de Tukey.



As atividades da enzima endo- $\beta$ -1,4 glucanase (CMCase) por T spp (Figura 44) nos mostra que Th911 apresentou a melhor produção ( $12,79 \text{ U. mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  -  $p \leq 0,05$ ) e embora os outros isolados tenham apresentado atividades significativamente diferentes a Th911, também revelaram ser bons produtores de CMCase, tais como Tpl925, Th1070, Tvi2007, Tvr905 e Tlg3188, que apresentaram uma produção de 12,11- 11,77- 11,04- 11,02 e  $9,59 \text{ U. mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , respectivamente. A produção de Th911 foi pequena quando comparada a encontrada por De Marco et al. (2003), que obtiveram uma produção em torno de  $100 \text{ U. mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  por *T. harzianum*. Entretanto, foi grande quando comparada a encontrada por outros autores com *T. harzianum*: Rezende et al. (2002) de  $4,0 \text{ U. mL}^{-1}$ , Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004) de  $1,64 \text{ U. mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  e Kocher (2008) de  $0,12 \text{ U. mL}^{-1}$ .



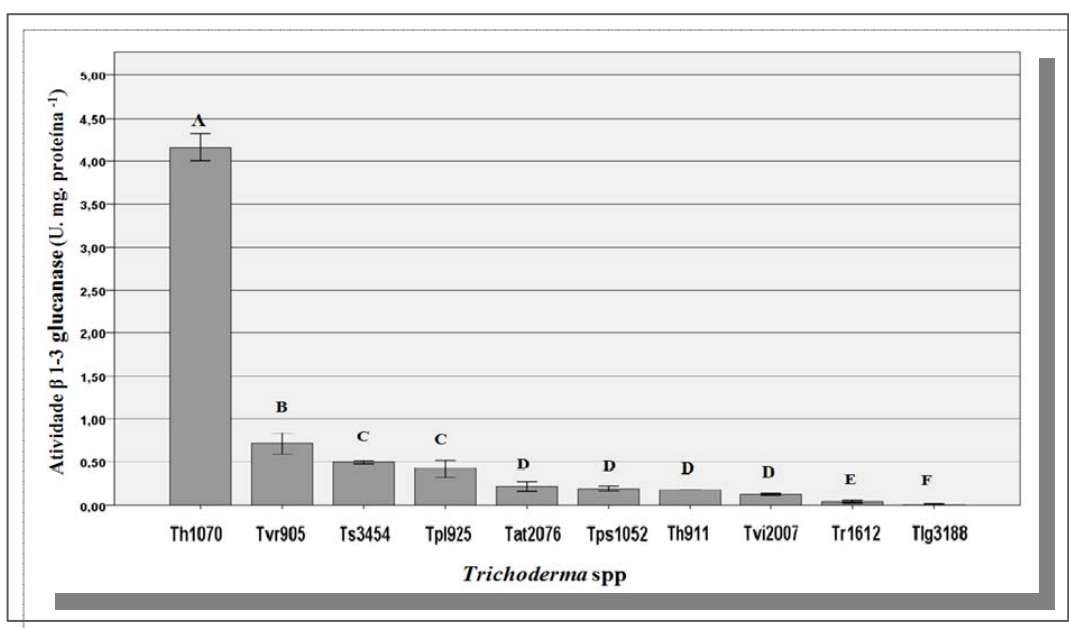
**Figura 44-** Produção da enzima endoglucanase (CMCase) por *Trichoderma* spp cultivado em substrato específico. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas). Médias seguidas da mesma letra não são significantes ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

A produção da enzima  $\beta$ -1,3 glucanase por T spp foi induzida na presença de laminarina por todos os isolados de T spp (Figura 45), sendo que Th1070 se destacou com uma produção de  $4,16 \text{ U. mg proteína. mL}^{-1}$  ( $p \leq 0,05$ ), tendo os outros isolados apresentado produções bastante inferiores.

A produção apresentada por Th1070 é menor quando comparada a obtida por Menendez e Godea (1998) com *T. harzianum* BAFC 742 ( $14,00 \text{ U. mg. proteína. mL}^{-1}$ ), sendo

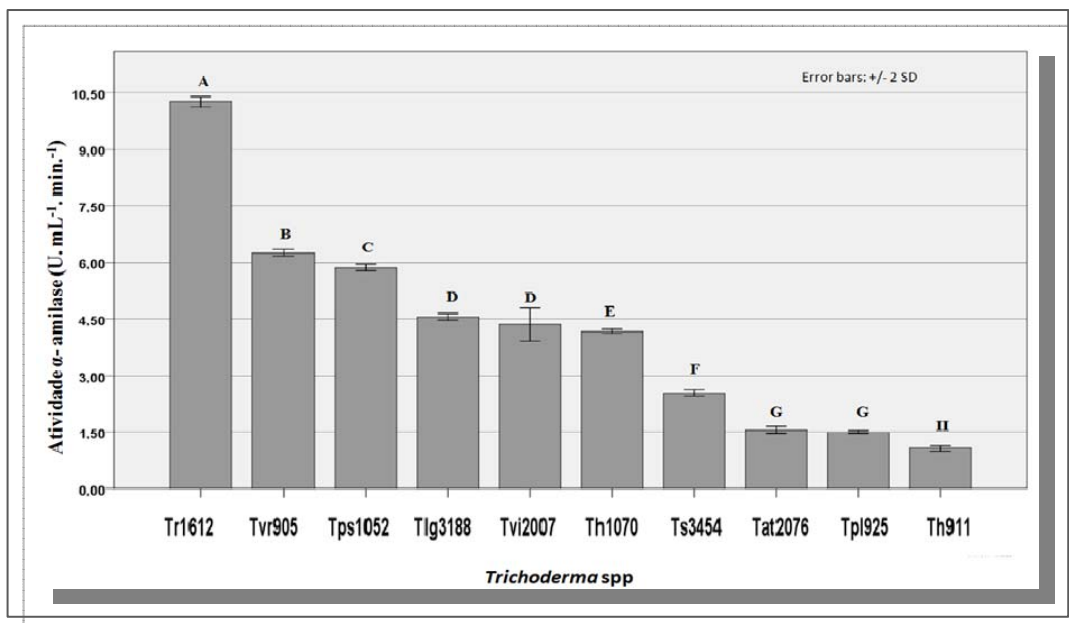
entretanto maior que a obtida por Kuçuk e Kivanç (2008) com *T. harzianum* T15 (0,451 U. mg. proteína<sup>-1</sup>).

A produção de  $\beta$ -1,3 glucanase também são citadas para outras espécies, tais como *T. reesei* (SILVA, 2008), *T. viride* (CHAKRABORTY e CHATTERJEE, 2008), *Trichoderma sp.* (HATVANI et al., 2002), *T. atroviride* (KAUR et al., 2005), *T. koningii* (MONTEIRO e ULHOA, 2006) e *T. longibrachiatum* (SANCHEZ et al., 2007).

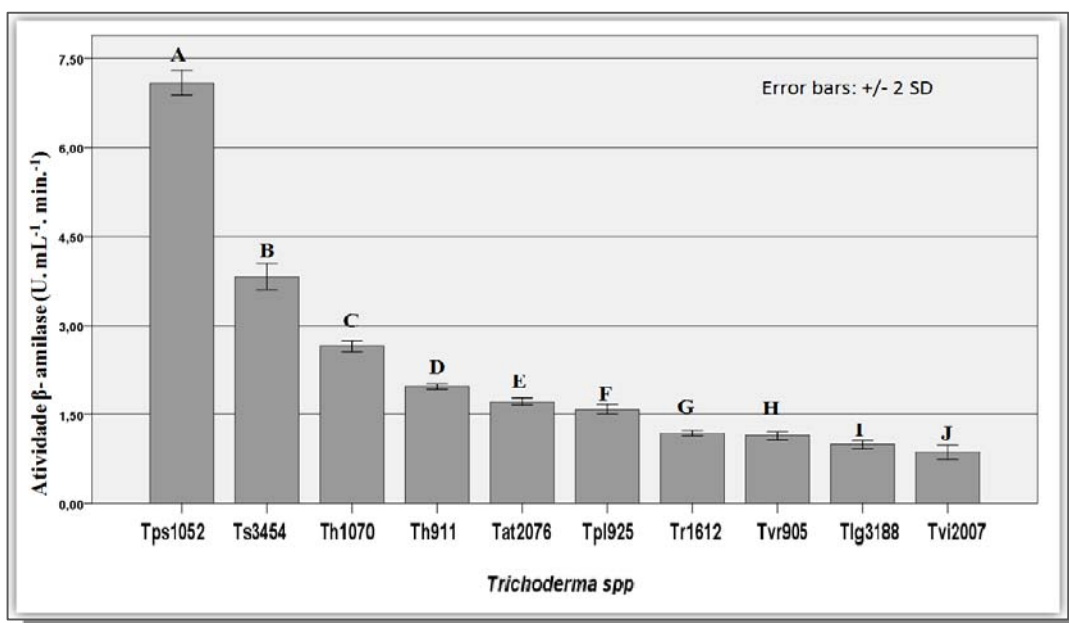


**Figura 45-** Produção da enzima  $\beta$ -1-3-glucanase por *Trichoderma* spp cultivado em substrato específico. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas). Médias seguidas da mesma letra não são significantes ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

Os isolados de T spp avaliados apresentaram capacidade de produzir as enzimas  $\alpha$ -amilase (Figura 46) e  $\beta$ -amilase (Figura 47), quando cultivados em meio contendo amido como única fonte de carbono.



**Figura 46-** Produção da enzima amilase dextrinizante ( $\alpha$ -amilase) por *Trichoderma* spp cultivado em substrato específico. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas). Médias seguidas da mesma letra não são significantes ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey

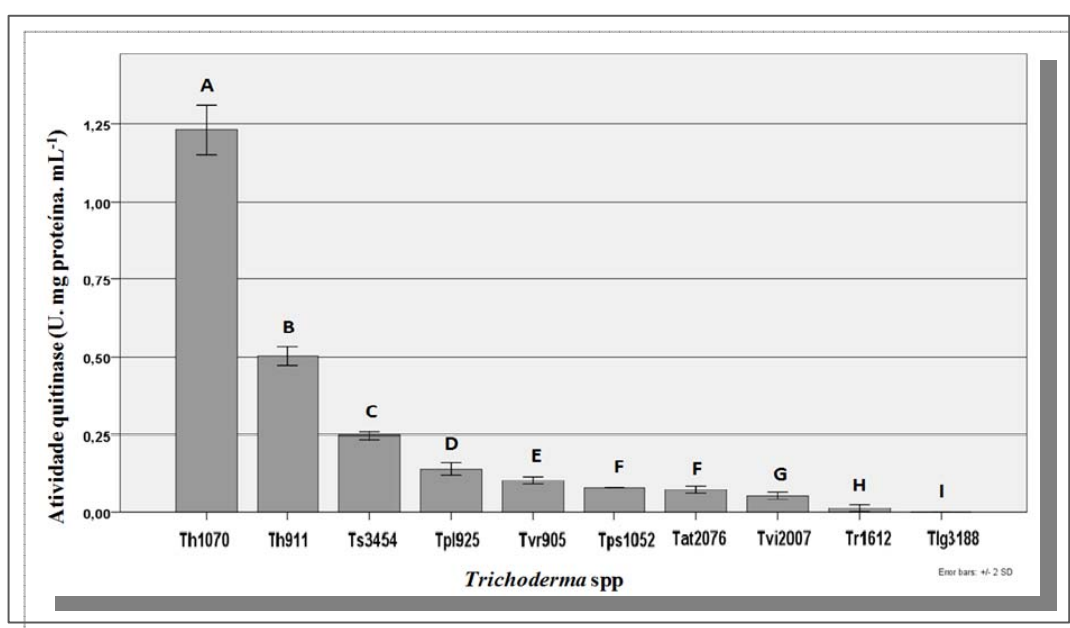


**Figura 47-** Produção da enzima amilase sacarificante ( $\beta$ -amilase) por *Trichoderma* spp cultivado em substrato específico. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas). Médias seguidas da mesma letra não são significantes ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

De acordo com Pandey et al. (2005) as enzimas amilolíticas são produzidas principalmente por fungos filamentosos, sendo *T. harzianum* a espécie mais estudada, embora os isolados de *T. harzianum* avaliados neste trabalho não tenham sido os melhores produtores de amilases. Th1070 apresentou, no entanto, atividade de  $\alpha$ -amilase de 4,48 U. mL<sup>-1</sup> (Figura

46) e de  $\beta$ -amilase de  $2,65 \text{ U. mL}^{-1}$  (Figura 47), compatível com as atividades obtidas por Kim et al. (2005) com *T. harzianum* de  $5,6 \text{ U. mL}^{-1}$  e  $3,1 \text{ U. mL}^{-1}$ , respectivamente e por De Marco et al. (2003), que obtiveram uma atividade de  $\alpha$ -amilase por *T. harzianum* 1051 em torno de  $2,0 \text{ U. mL}^{-1}$ . Apesar de *T. reesei* e *T. longibrachiatum* não serem descritos como bons produtores de amilases apresentaram as melhores atividades de  $\alpha$ -amilase ( $10,26 \text{ U. mL}^{-1}$  -  $p \leq 0,05$ , Figura 46) e  $\beta$ -amilase ( $7,09 \text{ U. mL}^{-1}$  -  $p \leq 0,05$ , Figura 47), respectivamente. Sahoo et al. (1986) obtiveram, entretanto, boa produção de  $\alpha$ -amilase por *T. reesei* ( $7,0 \text{ U. mL}^{-1}$ ) utilizando glicose como fonte de carbono indutora. A atividade amilolítica de *T. reesei* também é descrita por Nagai e Aiba (1976) e por Sethi et al. (1999). Harrer et al. (1983) relatam baixa produção de amilase por *T. pseudokoningii*. Barbosa et al. (2001), que obtiveram atividade amilolítica com *T. inhamatum*, *T. harzianum*, *T. koningii* e *T. viride*, acreditam que a atividade apresentada por estas espécies pode ser responsável pelo seu ótimo crescimento em meio BDA.

A quitina como única fonte de carbono induziu a atividade da enzima quitinase por todos os isolados, com exceção de Tlg3188 (Figura 48).



**Figura 48-** Produção da enzima quitinase por *Trichoderma* spp cultivado em substrato específico. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas). Médias seguidas da mesma letra não são significantes ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey.

Th1070 apresentou a atividade máxima de  $1,23 \text{ U. mg de proteína. mL}^{-1}$  ( $p \leq 0,05$ ), seguido por Th911 com  $0,50 \text{ U. mg de proteína. mL}^{-1}$ , sendo que os demais isolados

apresentaram atividades bem abaixo. A atividade quitinolítica de *T. harzianum* foi relatada em diversos outros trabalhos utilizando quitina como fonte indutora: Pádua et al. (2007) obtiveram com os isolados de *T. harzianum* CEN 201 e CEN 241 uma atividade de 0,115 e 0,436 U. mL<sup>-1</sup> e De Marco et al. (2003) obtiveram com *T. harzianum* 1051, 0,38 U. mL<sup>-1</sup>. Tondje et al. (2007) utilizando meio mínimo suplementado com glicerol obtiveram uma atividade de 0.021 U. mL<sup>-1</sup> demonstrando que esta enzima é induzida por outras fontes de carbono como também por depleção de nutrientes e stress metabólico (MACH et al., 1999). Tlg3188 não apresentou atividade quitinolítica, estando este resultado de acordo com o obtido por Sanchez et al. (2007) que obtiveram com *T. longibrachiatum* uma atividade bastante baixa (0,0003 U. mL<sup>-1</sup>) em comparação a *T. harzianum* T39.

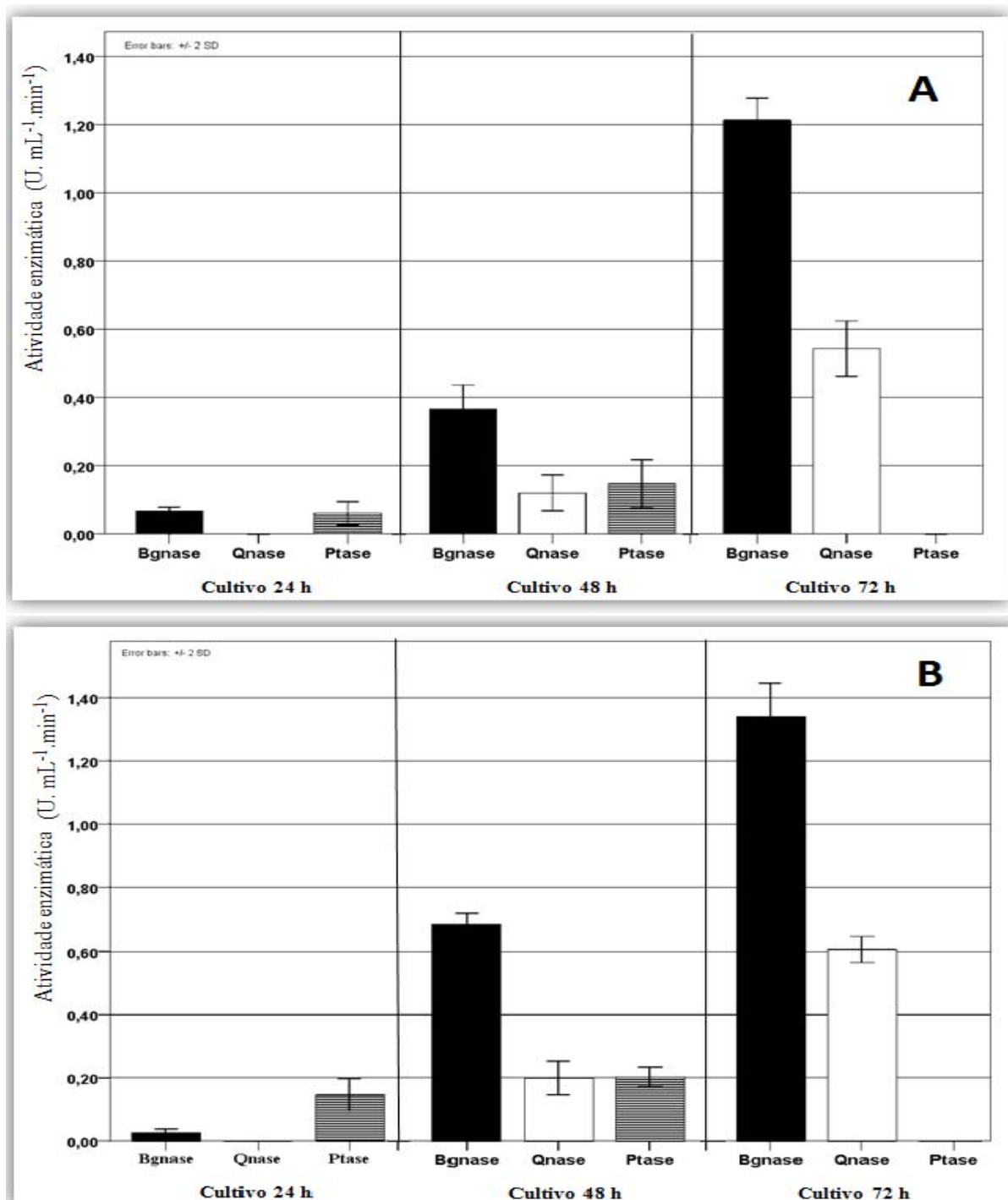
#### **4.6.2. Enzimas hidrolíticas produzidas por isolados de *Trichoderma* spp em substratos contendo micélio seco dos diferentes subgrupos de *M. pernicioso* como única fonte de carbono**

A produção das enzimas hidrolíticas por Tspp, como mostrado nos resultados anteriores, foi induzida pela presença de substratos específicos. Assim, foi avaliada também a capacidade dos componentes da parede celular dos subgrupos de Mp1441, 1145, 1893 e 1916 em induzir a produção de  $\beta$ -1-3-glucanase (Bgnase), quitinase (Qnase) e protease (Ptase) por Tspp.

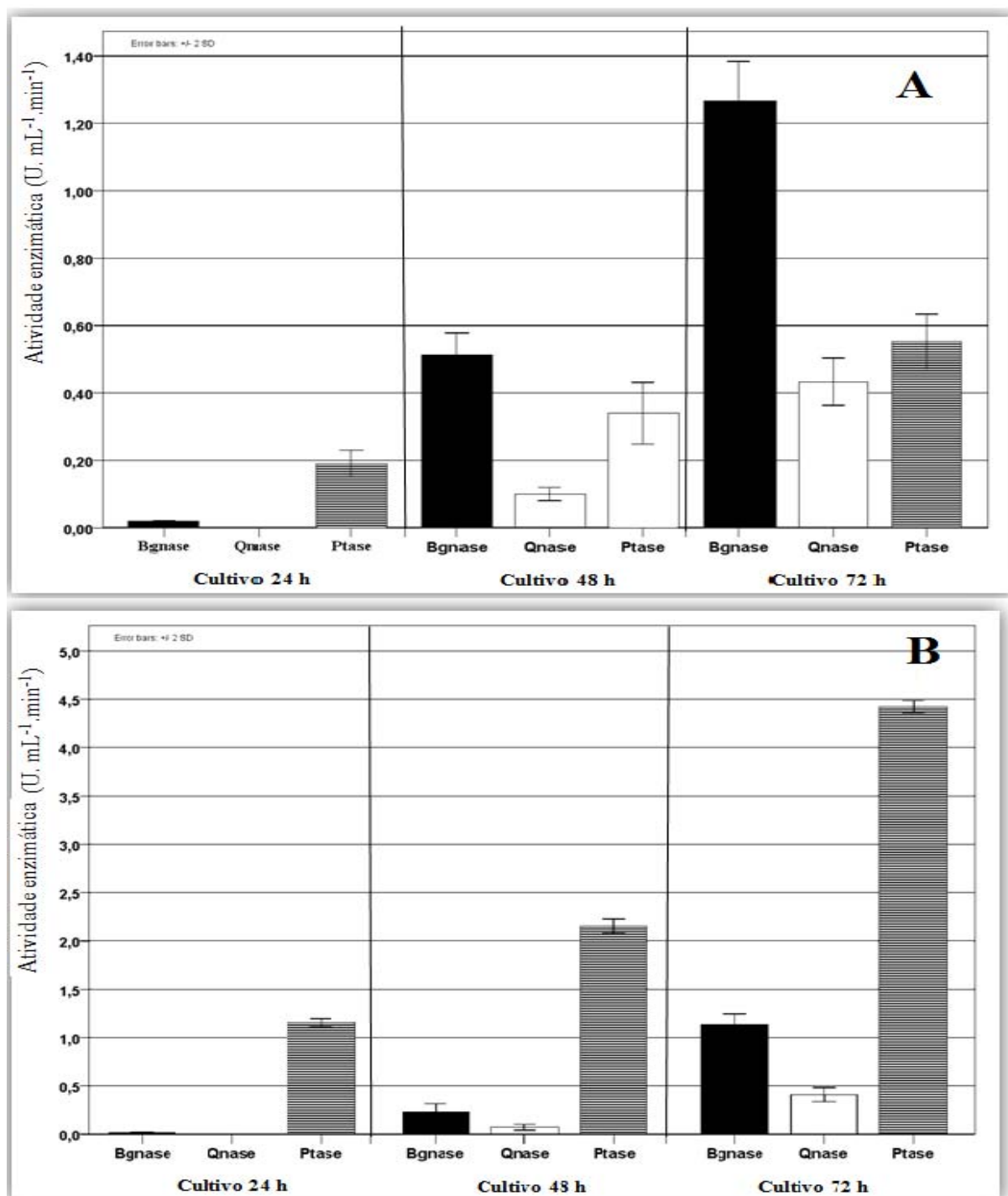
Os resultados das produções destas enzimas por Th911 estão apresentados nas figuras 49 e 50, onde se observa que as estruturas fúngicas de todos os subgrupos de Mp induziram a produção de Bgnase, Qnase e Ptase por Th911, todavia, em diferentes tempos de cultivo e em diferentes intensidades quando comparados aos resultados obtidos nos cultivos com substrato específico. A produção de Bgnase por Th911 se iniciou com todos os subgrupos de Mp com 24 h de cultivo, aumentando com 48 h e atingindo atividade máxima com 72 h (Figuras 49 e 50). A produção de quitinase se iniciou com 48 h de cultivo com todos os subgrupos de Mp atingindo produção máxima com 72 h (Figuras 49 e 50), sendo, entretanto inferior às produções de Bgnase. A produção de Ptase se iniciou com todos os subgrupos de Mp com 24 h de cultivo, aumentando com 48 h (Figuras 49 e 50); com Mp1893 e Mp1916 a atividade máxima foi obtida com 72 h (Figura 50), sendo que com Mp 1441 e Mp1445 a atividade de Ptase com 72 h foi nula (Figura 49).

As atividades máximas totais de Bgnase e Qnase por Th911 com micélio seco de Mp como fonte de carbono (Figuras 49 e 50), foram menores que as obtidas com substratos

específicos (Figuras 45 e 48, respectivamente), sendo que apenas com Mp1916 a atividade de Ptase total com caseína como fonte indutora, foi menor que as atividades obtidas com micélio de Mp (Figura 50 B).



**Figura 49** - Atividades das enzimas  $\beta$ -1,3-glicanase (Bgnase), quitinase (Qnase) e protease (Ptase) por *Trichoderma harzianum* 911 cultivado em meio com micélio seco de Mp1441 (A) e de Mp1445 (B) como única fonte de carbono. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas).



**Figura 50-** Atividades das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase (Bgnase), quitinase (Qnase) e protease (Ptase) por *Trichoderma harzianum* 911 cultivado em meio com micélio seco de Mp1893 (A) e de Mp1916 (B) como única fonte de carbono. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas).

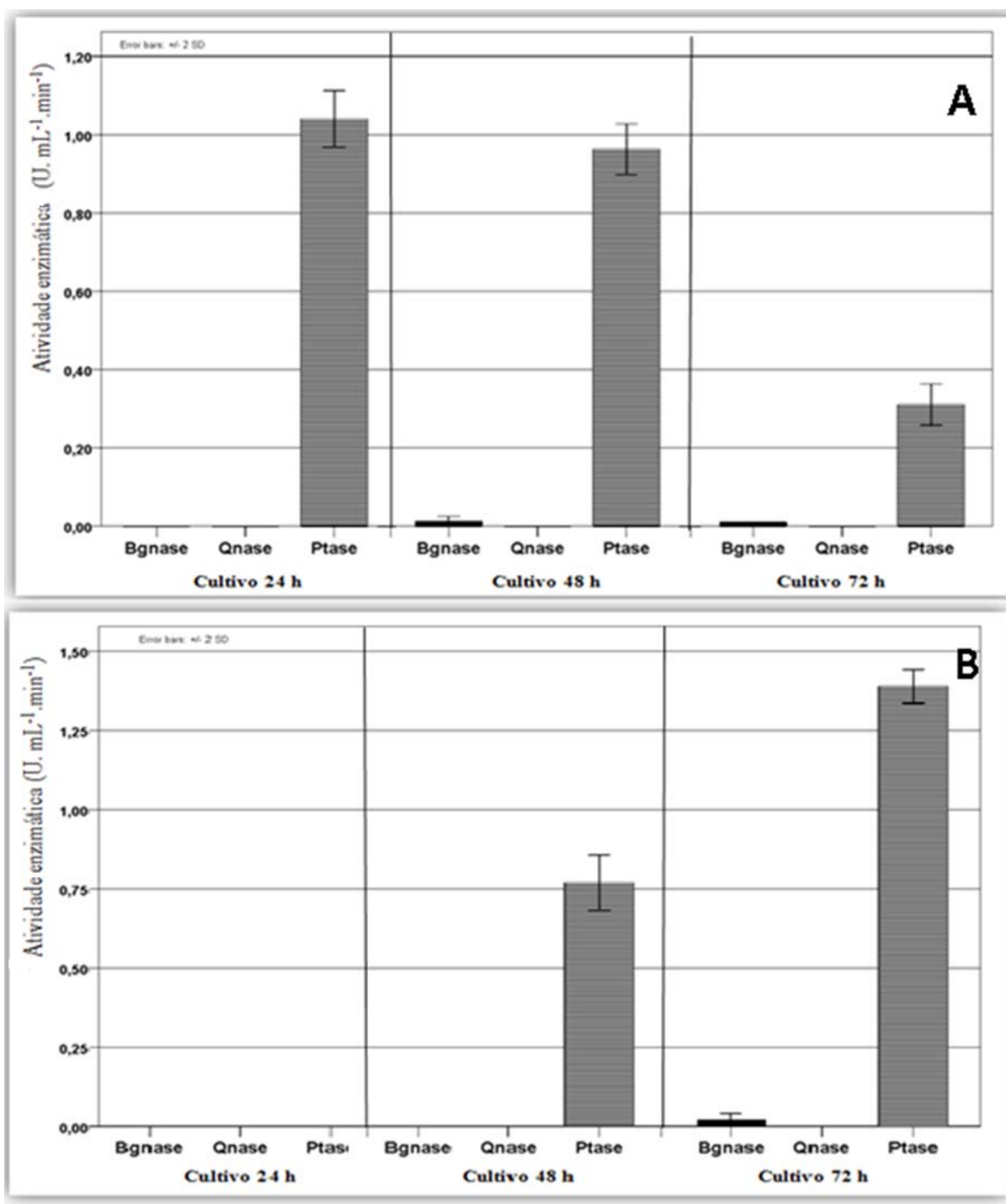
As atividades das enzimas Bgnase, Qnase e Ptase por Tlg3188 em meio contendo Mp1441, Mp1445 e Mp1893 e Mp1916 estão apresentadas nas figuras 51 e 52, respectivamente, nas quais se verifica que nenhum subgrupo de Mp induziu a produção de Qnase por Tlg3188.

Os substratos específicos induziram fracamente a produção de Bgnase, Qnase e Ptase por Tlg3188 (Figuras 45, 48 e 42, respectivamente), sendo que com Mp1441 e Mp1893 como substrato (Figuras 51 A e 52 A, respectivamente), houve uma fraca atividade de Bgnase com 48 h de cultivo, permanecendo a mesma com 72 h. Com Mp1445 e Mp1916 (Figuras 51 B e 52 B, respectivamente), Tlg3188 apresentou fraca atividade de Bgnase apenas com 72 h de cultivo. A produção de Ptase por Tlg3188 variou com os subgrupos de Mp, sendo iniciada com Mp1441 com 24 h, decrescendo até 72 h de cultivo (Figura 51 A); com Mp1916 iniciada com 24 h, crescendo até 72 h de cultivo (Figura 52 B) e com Mp1445 e Mp1893 iniciada com 48 h, crescendo até 72 h (Figuras 51 B e 52 A, respectivamente). A atividade de Bgnase por Tlg3188 com Mp como fonte indutora foram semelhantes às atividades obtidas com laminarina (Figura 45), tendo sido nula as atividades de Qnase tanto com substratos específicos (Figura 48) quanto com Mp como fonte de carbono (Figuras 51 e 52). Verificou-se que a atividade total da Ptase com caseína como fonte indutora (Figura 42) foi maior apenas pela apresentada com Mp1441 como fonte de carbono (Figuras 51 A), tendo os demais subgrupos induzido atividades maiores que a caseína.

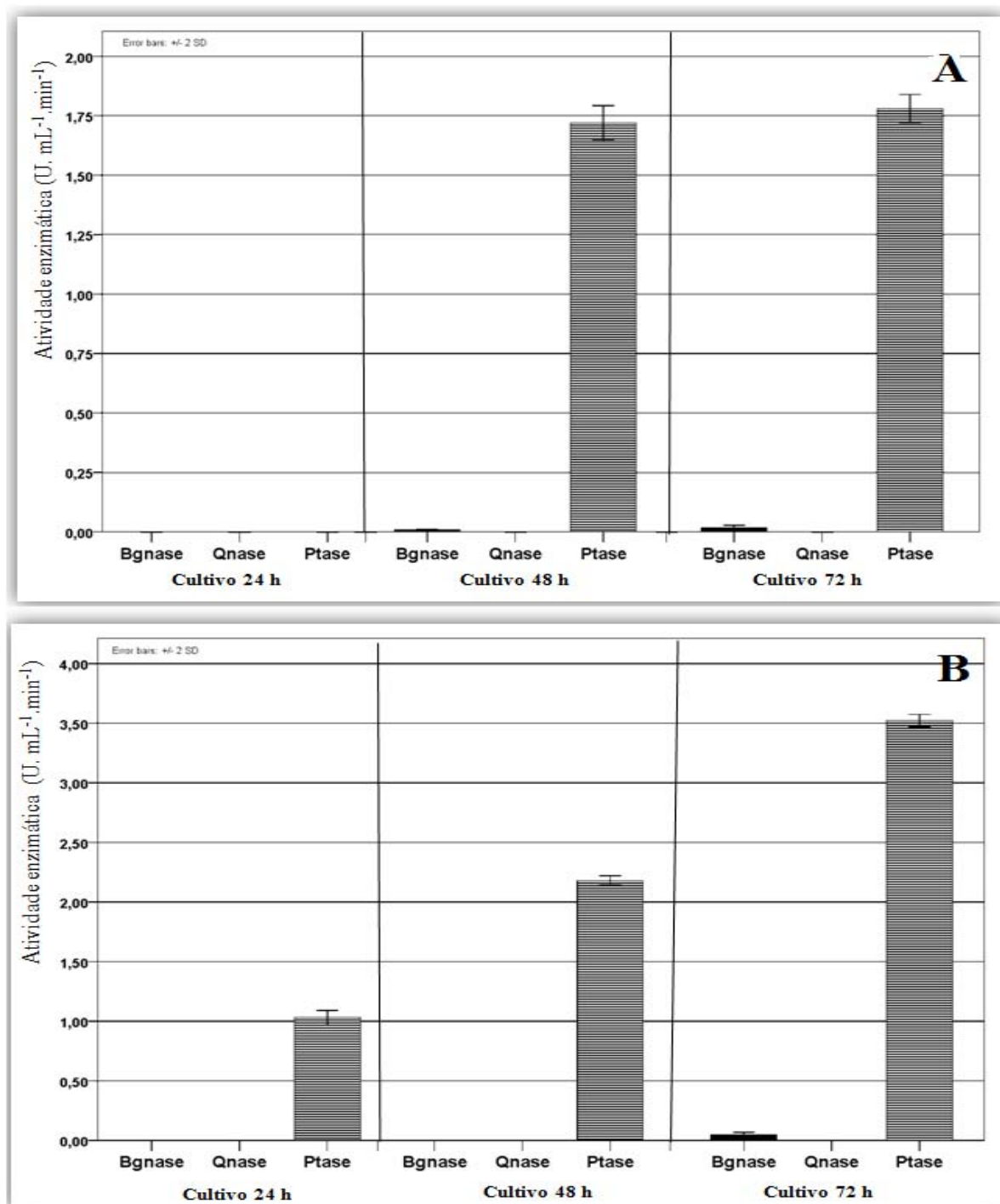
As atividades das enzimas Bgnase, Qnase e Ptase por Tps1052 em meio contendo Mp1441, Mp1445 e Mp1893 e Mp1916 como fonte indutora estão apresentadas nas figuras 53 e 54, respectivamente.

Os substratos específicos induziram a produção de Bgnase, Qnase e Ptase por Tps1052 (Figuras 45, 48 e 42, respectivamente), sendo que apenas Mp1441 induziu a atividade de Bgnase por Tlg3188 (Figura 53 A), tendo a atividade iniciado com 24 h, sendo crescente até 72 h de cultivo. A atividade de Qnase de Tps1052 foi induzida por Mp1441 e Mp1916 com 48 h de cultivo, aumentando com 72 h (Figuras 53 A e 54 B, respectivamente). Com Mp1445 e Mp1893 foi iniciada apenas com 72 h (Figura 53 B e 54 A, respectivamente). A atividade de Ptase de Tps1052 foi iniciada com Mp1441 e Mp1445 com 72 h (Figura 53 A e B, respectivamente), com Mp1893 com 24 h e aumentando até 72 h (Figura 54 A) e com Mp1916 com 24 h, decrescendo até 72 h (Figura 54 B). Observou-se que apenas em relação a Mp1441 (Figura 53 A) a atividade da Bgnase foi ligeiramente maior do que a obtida com laminarina (Figura 45), sendo as atividades da Qnase e Ptase com micélio de Mp menores que com quitina e caseína como fonte indutoras (Figuras 47 e 42, respectivamente).

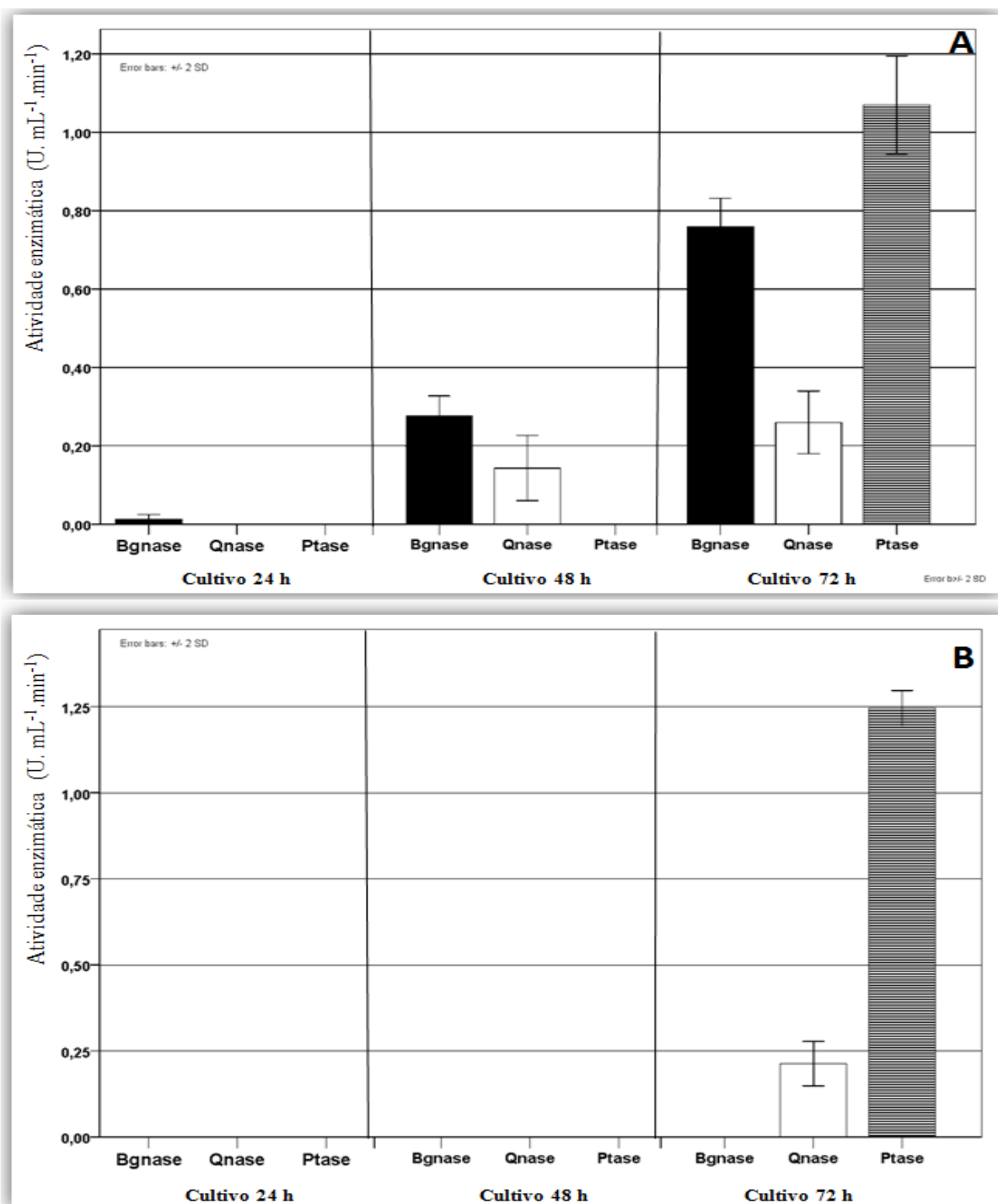




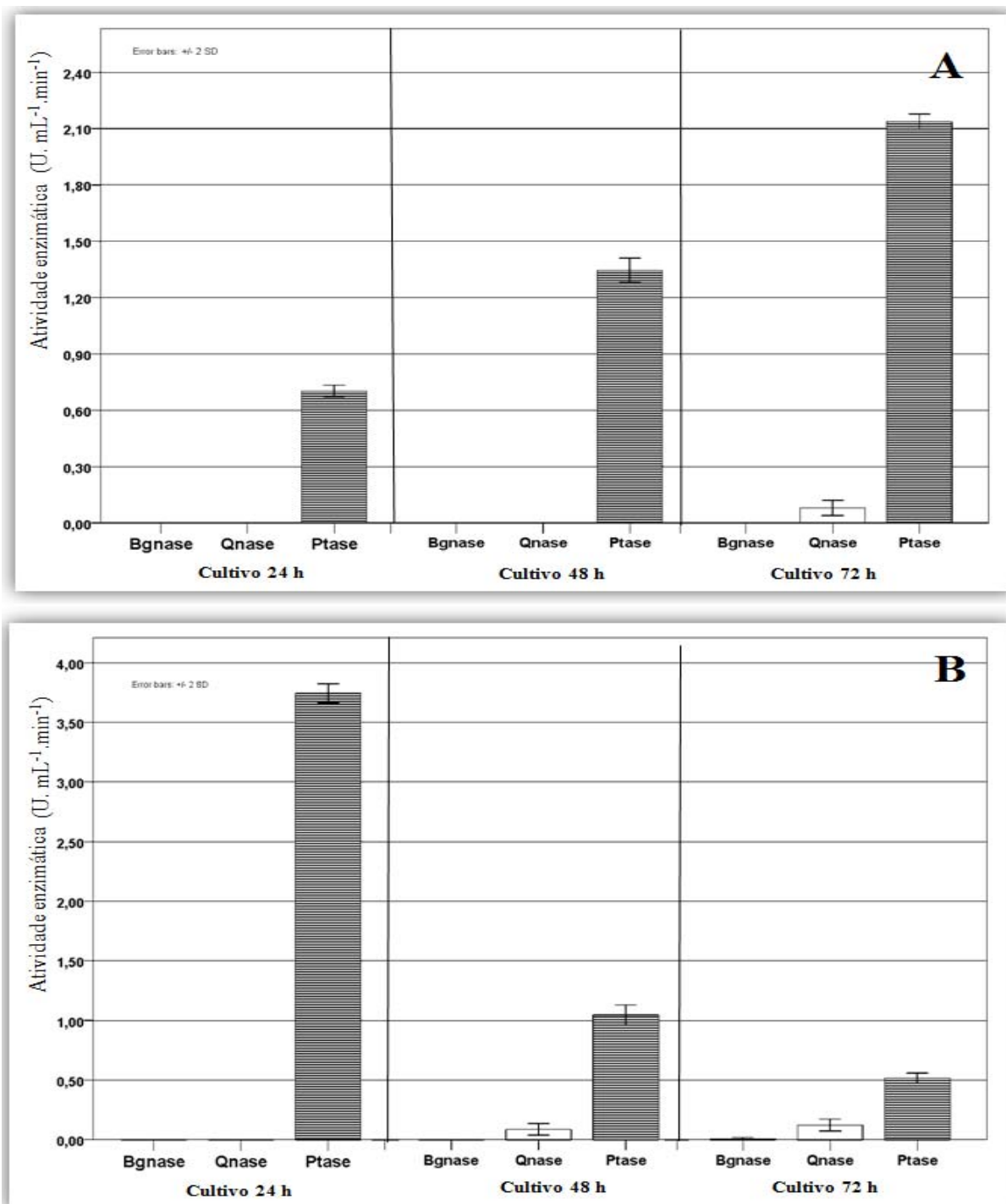
**Figura 51-** Atividades das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase (Bgnase), quitinase (Qnase) e protease (Ptase) por *Trichoderma longibrachiatum* 3188 cultivado em meio com micélio seco de Mp1441 (A) e de Mp1445 (B) como única fonte de carbono. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas).



**Figura 52-** Atividades das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase (Bgnase), quitinase (Qnase) e protease (Ptase) por *Trichoderma longibrachiatum* 3188 cultivado em meio com micélio seco de Mp1893 (A) e Mp1916 (B) como única fonte de carbono. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas).

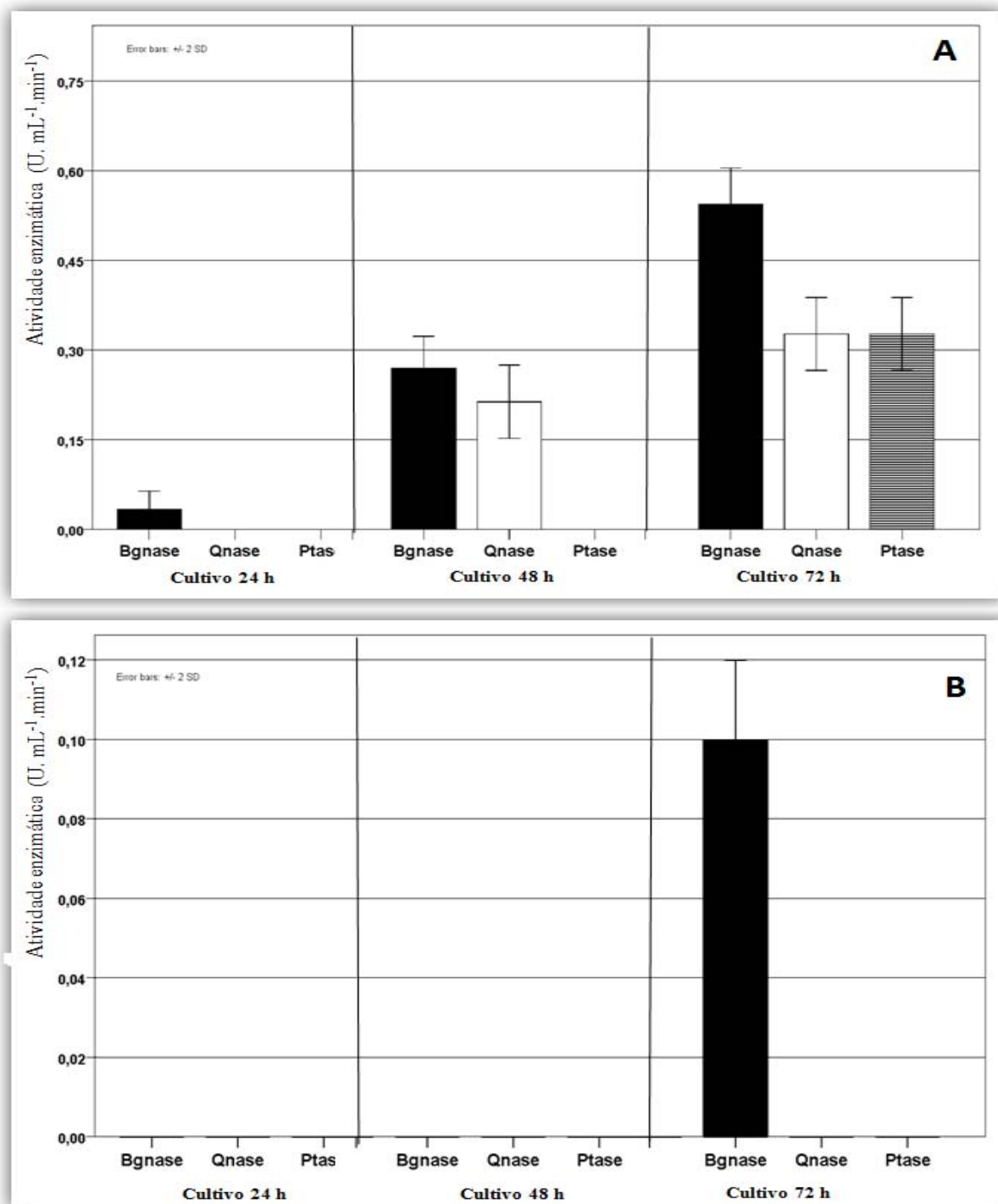


**Figura 53-** Atividades das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase (Bgnase), quitinase (Qnase) e protease (Ptase) por *Trichoderma pseudokoningii* 1052 cultivado em meio com micélio seco de Mp1441 (A) e de Mp1445 (B) como única fonte de carbono. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas).

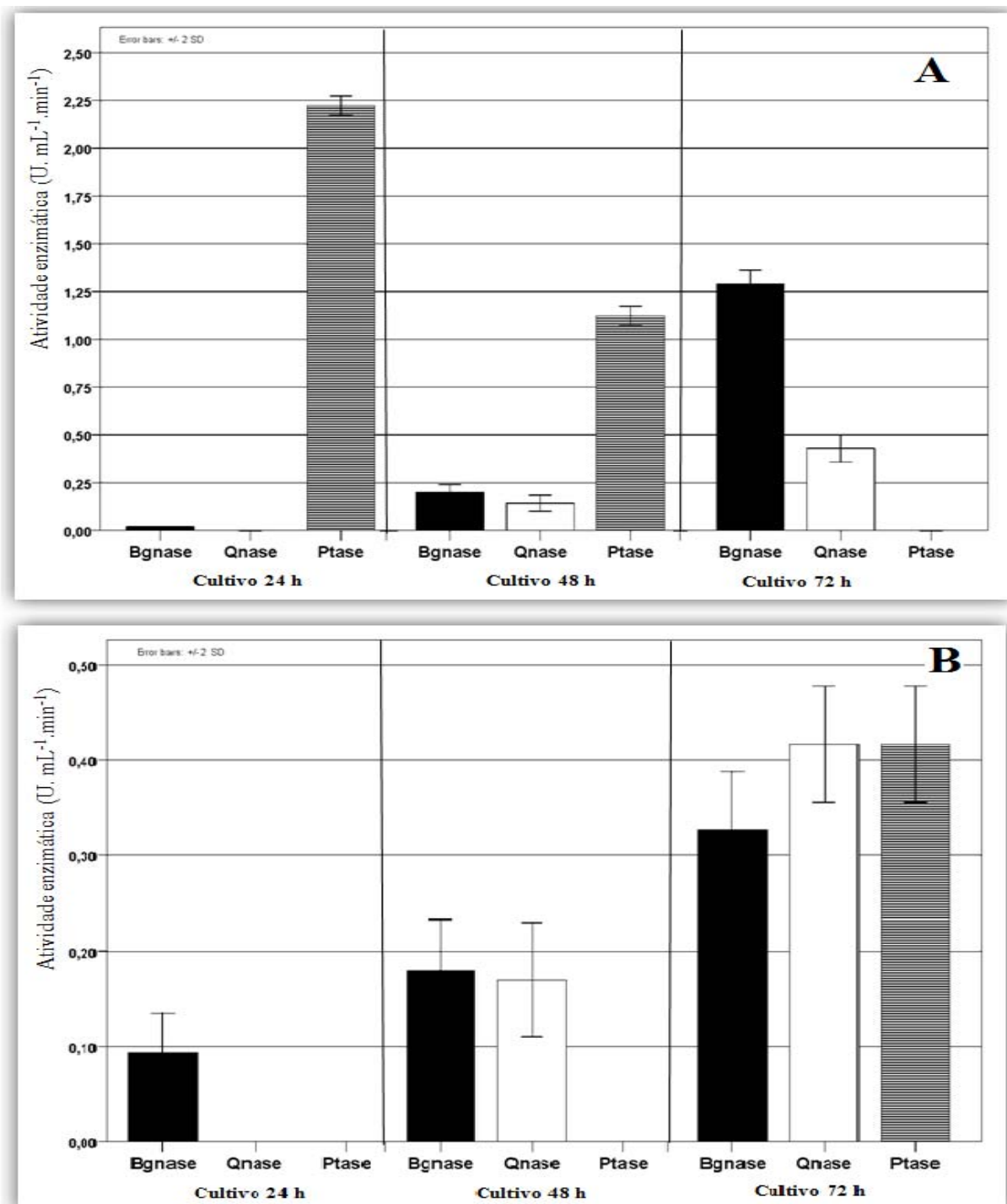


**Figura 54-** Atividades das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase (Bgnase), quitinase (Qnase) e protease (Ptase) por *Trichoderma pseudokoningii* cultivado em meio com micélio seco de Mp1893 (A) e de Mp1916 (B) como única fonte de carbono. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas).

As atividades das enzimas Bgnase, Qnase e Ptase por *Tvi2007* em meio contendo Mp1441, Mp1445, Mp1893 e Mp1916 como fonte indutora estão apresentadas nas figuras 55 e 56, respectivamente.



**Figura 55-** Atividades das enzimas  $\beta$ -1,3-glicanase (Bgnase), quitinase (Qnase) e protease (Ptase) por *Trichoderma virens* 2007 cultivado em meio com micélio seco de Mp1441 (A) e Mp1445 (B) como única fonte de carbono. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas).



**Figura 56-** Atividades das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase (Bgnase), quitinase (Qnase) e protease (Ptase) por *Trichoderma virens* 2007 cultivado em meio com micélio seco de Mp1893 (A) e Mp1916 (B) como única fonte de carbono. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas).

Os substratos específicos induziram a produção de Bgnase, Qnase e Ptase por Tvi2007 (Figuras 45, 48 e 42, respectivamente), sendo que com Mp1441, Mp1893 e Mp1916 as atividades de Bgnase foram iniciadas com 24 h, aumentando até 72 h (Figuras 55 A, 56 A e B, respectivamente) e com Mp1445 iniciou apenas com 72 h (Figura 55 B). Com Mp1441,

Mp1893 e Mp1916 as atividades de Qnase iniciaram com 48 h, sendo crescente até 72 h (Figuras 55 A e 56 A e B, respectivamente) e com Mp1445 foi nula (Figura 55 B). As atividades de Ptase se iniciaram com Mp1441 e Mp1916 com 72 h (Figuras 55 A e 56 B, respectivamente), com Mp1893 com 24 h, decrescendo com 48 h e nula com 72h (Figura 56 A) e com Mp1445 foi nula (Figura 55 B). Observou-se que as atividades da Bgnase, Qnase e Ptase com Mp como fonte indutora também foram menores que as atividades obtidas com os substratos específicos (Figuras 45, 47 e 42, respectivamente).

O entendimento destes resultados visa esclarecer alguns questionamentos:

1. As atividades enzimáticas de T spp em substratos utilizando Mp como fonte são semelhantes às obtidas nos substratos específicos?
2. As atividades enzimáticas de T spp em substratos utilizando Mp como fonte de carbono evidenciam a natureza da parede celular de Mp?
3. As atividades enzimáticas de T spp em substratos utilizando Mp como fonte de carbono comprovam sua capacidade de micoparasitismo a Mp? E se comprovam, quais as enzimas envolvidas?
4. Os isolados de T spp avaliados possuem a capacidade de hidrolisar a parede celular de todos os subgrupos de Mp utilizados ou existe especificidade entre os antagonistas e os subgrupos de Mp?
5. Existindo a capacidade do antagonista em hidrolisar a parede celular do patógeno, qual é o padrão enzimático envolvido no processo?

Quanto ao 1º questionamento, acreditamos que os resultados obtidos com substratos específicos são em sua maioria semelhantes aos obtidos com Mp como fonte de carbono, uma vez que os isolados que apresentaram atividade baixa ou nula de uma enzima em substrato específico também apresentaram em sua maioria atividade baixa ou nula em cultivos que utilizaram micélio seco de Mp como fonte de carbono. Todos os que tiveram atividade enzimática nos substratos específicos, também tiveram nos cultivos com Mp como fonte de carbono, todavia menos intensas. O fato das atividades em meio contendo Mp como fonte de carbono ter sido na maioria dos casos menores do que as obtidas nos cultivos com substratos específicos podem ser devido a uma concentração mais baixa de glucanas, quitina e proteínas na parede celular dos subgrupos de Mp avaliados. O mecanismo de repressão catabólica também pode ter atuado nos cultivos de T spp com Mp como fonte de carbono, diminuindo a atividade enzimática, principalmente da Qnase, uma vez que tendo sido a produção de Bgnase sempre anterior a de Qnase. Isto pode ter acarretado um acúmulo de pequenos

oligossacarídeos e glicose resultantes da hidrólise das glucanas, que atuaram reprimindo a atividade de Qnase, segundo a literatura (PITSON et al., 1993).

Os resultados apresentados não revelaram um único tipo de padrão quando resultados obtidos em cultivos com substratos específicos foram comparados com os encontrados utilizando micélio de fitopatógenos. Vazquez-Garciduenaz et al. (1998), De Marco et al. (2004), Monteiro e Ulhoa (2006) e Kuçuk e Kivanç (2008) obtiveram produção de  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase por espécies de *Trichoderma* maiores em meio com micélio do fitopatógenos do que em meio com fontes de carbono específicas, sendo os mesmos resultados obtidos em cultivos de diversos isolados de *T. stromaticum* com micélio de *M. pernicioso* (CARVALHO, 2006). Outros autores, entretanto, obtiveram maiores atividades de quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase por *T. harzianum* em cultivos com meios específicos em relação às atividades obtidas com micélios de fitopatógenos (KUÇUK e KIVANÇ, 2004), como também menor atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase e maior de quitinase (MENENDEZ e GODEAS, 1998; EL-KATATNY et al., 2000).

Quanto ao 2º questionamento, a produção de enzimas obtida por T spp, induzida pela parede celular de Mp, sugere que quitina,  $\beta$ -1,3-glucanas e proteínas são os principais componentes da parede celular das células de Mp, estando envolvidas na destruição do fitopatógeno. A relação entre a atividade enzimática e a constituição da parede celular foi documentada por Bara et al. (2003) em seus estudos com *T. asperellum* e o fitopatógeno *R. solani*, em que a secreção de uma  $\beta$ -1,3-glucanase constitutiva pelo antagonista degrada as  $\beta$ -1,3-glucanas da parede celular do patógeno e os produtos da hidrólise induzem a secreção de altos níveis de  $\beta$ -1,3-glucanase e outras enzimas pelo antagonista, sendo portanto a atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase dependente da concentração de  $\beta$ - glucanas na parede celular do patógeno. A produção de enzimas hidrolíticas por T spp induzidas pela parede celular de fitopatógenos também é bem documentada na literatura. Por exemplo: Bgnase e Qnase por *T. stromaticum* em cultivos com *M. pernicioso* (CARVALHO, 2006); por *T. harzianum* em cultivos com *F. solani*, *D. sorokiniana*, *F. culmarum* e *S. rolfsii* (KUÇUK e KIVANÇ, 2008); por *T. harzianum* em cultivos com *F. culmorum*, *F. moniliforme* e *G. graminis* (KUÇUK e KIVANÇ, 2004) e por *T. hamatum*, *T. harzianum* e *T. reesei* em cultivos com *B. cinerea*, *F. culmorum* e *F. oxysporum* (WITKOWSKA e MAJ, 2002); Bgnase por *T. koningii* em cultivos com *R. solani* (MONTEIRO e ULHOA, 2006) e por *T. asperellum* em cultivos com *P. capsici* (TONDJE et al., 2007); Ptase, Bgnase e Qnase por *T. harzianum* em cultivos com *R. nigricans* (ZNIDARSIC et al., 1995) e por *T. reesei* e *T. harzianum* em cultivos com *P. ultimum* (SILVA et al., 2009).



Para a análise dos demais questionamentos, deve ser ressaltado que os isolados Th911, Tlg3188, Tps1052 e Tvi2007 foram escolhidos para este estudo por terem apresentado nos cultivos pareados diferentes capacidades de micoparasitismo aos subgrupos de Mp (Figura 22G-2, Figura 22 C, Figura 22 H-4 e Figura 22 E, respectivamente) e devido às suas diferentes capacidades em produzirem enzimas hidrolíticas na presença de substratos específicos como fonte de carbono (Figuras 42 a 48).

A tabela 13 apresenta de forma resumida, as capacidades de micoparasitismo de Tssp a Mp (apresentadas nos cultivos pareados) e as atividades enzimáticas (apresentadas pelos mesmos isolados quando cultivados em meio contendo apenas Mp como fonte de carbono), com o objetivo de se estabelecer uma possível relação entre estas capacidades. Observamos que em todos os casos quando os isolados apresentaram capacidade de micoparasitismo, houve atividades das enzimas Bgnase, Qnase e Ptase. Nos casos em que não houve micoparasitismo, houve a ausência das atividades de Bgnase ou de Qnase, ou ambas, o que sugere que estas enzimas estão envolvidas no processo e a Ptase pode ou não estar.

**Tabela 13-** Resumo esquemático das atividades enzimáticas e capacidades de micoparasitismo de *Trichoderma* spp aos diferentes subgrupos de *M. perniciososa*.

Isolados	Th911				Tlg3188				Tps1052				Tvi2007						
	C		AE		C		AE		C		AE		C		AE				
	M	(h)	M	(h)	M	(h)	M	(h)	M	(h)	M	(h)	M	(h)	M	(h)			
	B	Q	P	B	Q	P	B	Q	P	B	Q	P	B	Q	P	B	Q	P	
Mp1441	(+)	24	48	24	(-)	48	N	24	(+)	24	48	72	(+)	24	48	72			
Mp1445	(+)	24	48	24	(-)	72	N	48	(-)	N	48	72	(-)	72	N	N			
Mp1893	(+)	24	48	24	(-)	48	N	48	(-)	N	72	24	(+)	24	48	24			
Mp1916	(+)	24	48	24	(-)	72	N	24	(-)	N	48	24	(+)	24	48	72			

AE: atividades enzimáticas (h)

CM: capacidade de micoparasitismo de Tssp a Mp em cultura pareada, o sinal (+) indica a capacidade de micoparasitismo presente e (-) capacidade de micoparasitismo ausente.

B:  $\beta$ -1,3 glucanase

Q: quitinase

P: protease

N: produção enzimática nula

Dos isolados avaliados (Tabela 13), todos que apresentaram capacidade de micoparasitismo a um subgrupo de Mp em cultura pareada, apresentaram produção de Bgnase, Qnase e Ptase quando cultivados em meio com micélio seco do mesmo subgrupo,

fato que ocorreu com Th911 em relação a todos os subgrupos, com Tps1052 em relação a Mp1441 e Tvi2007 em relação a Mp1441, Mp1893 e Mp1916. Entretanto, Tlg3188 que não apresentou capacidade de micoparasitismo a nenhum subgrupo de Mp em cultura pareada, não apresentou atividade de Qnase quando cultivado com micélios dos mesmos subgrupos, embora a de Bgnase e Ptase estivessem presente. Por sua vez, Tps1052 que não micoparasitou Mp1445, 1893 e 1916, não teve atividade de Bgnase e Ptase nos cultivos com micélios destes subgrupos, e Tvi2007 que não micoparasitou Mp1445 não apresentou atividade de Qnase e Ptase com este subgrupo.

Assim, em resposta ao 3º questionamento, os resultados sugerem que a atividade da Ptase pode não estar relacionada à capacidade de micoparasitismo, pois Tlg3188 apresentou atividade desta enzima com todos os subgrupos de Mp, embora não tenha micoparasitado nenhum deles em cultivo pareado. Por outro lado, nos casos em que não houve capacidade de micoparasitismo, a atividade da Qnase e/ou da Bgnase esteve ausente, supondo-se, portanto, que estejam envolvidas no processo de micoparasitismo e que isoladamente não sejam capazes de degradar a parede celular do patógeno, devendo atuar sinergisticamente para que esta capacidade de concretize. A necessidade da ação sinérgica das  $\beta$ -1,3-glucanases e Qnases, principalmente, para que ocorra o micoparasitismo é relatada por um considerável número de trabalhos que estudaram os sistemas das Bgnases e Qnases de *Trichoderma sp.* (EL-KATATNY et al., 2000; DE MARCO et al., 2002; KIM et al., 2002; INNOCENTI et al., 2003; BENITEZ et al., 2004; SANZ et al. 2004; ALMEIDA et al., 2007; ALMEIDA et al., 2007).

Deve-se, entretanto, levar em consideração que quando as atividades enzimáticas apresentadas por um isolado foram baixas, não se pode afirmar que sua produção tenha ocorrido pela indução dos componentes da parede celular de Mp, nem tampouco que represente capacidade de micoparasitismo, uma vez que já foram descritas Bgnases de origem constitutiva (ZNIDARSIC et al., 1995; RAMOT et al., 2000; DJONOVIC et al., 2007; VINALE et al., 2008), como também de Qnases (HARAN et al., 1996; EL-KATATNY et al., 2000; VITERBO et al., 2002). Isto pode ter ocorrido, por exemplo, com Tlg3188 que apresentou uma atividade de Bgnase pequena com todos os subgrupos de Mp (Figuras 51 e 52) e Tps1052 com Mp1441 e 1916 (Figuras 53 A e 54 B).

Entretanto, devido ao fato de um isolado de Tspp ter apresentado atividade enzimática e de micoparasitismo a um subgrupo de Mp e não ter apresentado as mesmas capacidades em relação a outro subgrupo, sugere-se que exista uma especificidade na relação patógeno x hospedeiro (questionamento nº 4), a qual foi afetada por mudanças na constituição da parede

celular dos subgrupos de Mp e conseqüente interferência nos processos de reconhecimento, adesão e produção de enzimas hidrolíticas. Isto pode ser constatado pelos resultados obtidos com Tps1052 que apresentou capacidade de micoparasitismo e atividade de Bgnase e Qnase apenas para MP1441 e Tvi2007 apenas para Mp1441, Mp1893 e Mp1916 (Tabela 13).

A variabilidade intraespecífica de *Trichoderma* e de *M. perniciosa* tem sido constatada em todos os resultados obtidos neste estudo. Isto é de muita importância no controle biológico da vassoura de bruxa do cacau, pois a variabilidade genética de *Trichoderma* como também a alta capacidade de adaptação do fungo *M. perniciosa* a diferentes ecossistemas, tornam-se características que dificultam o controle da vassoura-de-bruxa. Isto, não apenas ao que se refere ao controle biológico, mas também a introdução de clones de cacau resistentes, uma vez que com o tempo o patógeno evolui e ocorre quebra de resistência. Outro problema refere-se aos problemas burocráticos e financeiros para o cumprimento das exigências legais visando o registro de um biofungicida, pois após terem sido cumpridos, o programa de biocontrole e/ou introdução de variedades resistentes podem falhar devido à alta variabilidade do patógeno e do antagonista (CEPLAC, 2009).

Vários são os estudos em que é demonstrada a variação da atividade de antibiose de *Trichoderma* spp devida à grande diversidade genética, provavelmente por habitarem diferentes ecossistemas, com diferentes tipos de solo, clima e dinâmica de uso. Martins et al. (2007) obtiveram variação da atividade inibitória de *Trichoderma* spp a *Colletotrichum gloeosporioides* o mesmo ocorrendo com os resultados encontrados por Corabi-Adell et al. (2002) com *Pythium aphanidermatum*. De Souza et al. (2006) isolaram 91 isolados de Mp, na maioria de fazendas em Espírito Santo e Bahia, que não haviam sido pulverizadas com esporos de *Trichoderma* spp, encontrando dois grupos distintos de *T. stromaticum* denominados I e II, com diferenças genéticas e biológicas evidentes. Segundo Costa et al. (2006), a alta diversidade morfológica e genética dos isolados de *Trichoderma* spp justificam novos investimentos em pesquisa para o biocontrole de *M. perniciosa* na Bahia, especialmente em busca de novos antagonistas do patógeno na própria região, portanto, adaptados às condições locais. Carvalho (2006) também encontrou alta variação na habilidade antagônica entre isolados de *Trichoderma* e grande diferença entre as interações do fungo *Trichoderma* com fitopatógenos, indicando que um isolado pode ser efetivo contra um determinado isolado de um patógeno, mas pode não ter efeito nenhum com outros isolados da mesma espécie.

Por sua vez, a variabilidade entre isolados de *M. perniciosa* tem sido amplamente estudada. Moreira (2006) descreve a variabilidade genética entre as populações de *M.*

*perniciosa* do Brasil, Equador, Trinidad e Peru, sendo evidenciada dentro de populações, indicando a presença de subpopulações, embora alguns autores (YAMADA et al., 1998; GOMES et al., 2000) afirmaram que isolados coletados na mesma região tendem a ser geneticamente semelhantes. Lana (2004), também constatou em Lomanto Jr (Bahia) a existência de 5 linhagens de *M. perniciosa* do grupo I e 6 linhagens do grupo II. Fato interessante em seu estudo foi a comprovação de que linhagens geneticamente diferentes podem colonizar o mesmo tecido da planta hospedeira. Os mesmos resultados foram encontrados por outros autores (GRAMACHO et al., 2002; GRAMACHO et al., 2005; PLOETZ et al., 2005; MOREIRA, 2006), que constata também diferenças biológicas e genéticas em isolados de Mp obtidos de diferentes países, de regiões dentro de países, de municípios dentro da região cacauzeira da Bahia, de fazendas de um mesmo município, de partes de uma mesma planta (frutos, almofadas, gemas vegetativas) e ainda diferenças genéticas entre isolados de um mesmo grupo de plantas coletados em anos diferentes.

Quanto à resposta ao 5º questionamento feito anteriormente, ou seja, se existe ou não padrão enzimático envolvido no processo de micoparasitismo a Mp, deve-se observar os tempos em que as enzimas micolíticas foram produzidas (Tabela 13) e resgatar novamente a estrutura de uma célula fúngica. Observa-se na tabela 13, que em todos os casos quando os isolados apresentaram capacidade de micoparasitismo, a atividade da Bgnase ocorreu com 24 h de cultivo e a de Qnase com 48 h, sugerindo que no processo de micoparasitismo a Bgnase ocupa uma ação primária à Qnase. Vários fatores podem justificar a produção de Bgnase anterior à de Qnase: primeiramente pelo fato das glucanas se encontrarem na porção externa da parede celular e a quitina concentrada próximo à membrana plasmática, segundo pelo fato da concentração de glucanas ser maior que a de quitina (WEBSTER e WEBER, 2007) e terceiro pelo fato das atividades enzimáticas em geral serem proporcionais à concentração do composto indutor (BARA et al., 2003). Assim, no processo de micoparasitismo, após a hidrólise da camada externa de glucanas pelas Bgnases, a quitina fica disponível para a hidrólise pelas quitinases, sendo que estas observações também foram constatadas por outros autores (MARTIN et al., 2007; ZEILINGER e OMANN, 2007). Outro fator a ser considerado é o mecanismo de repressão catabólica, uma vez que a produção de Bgnase anterior a de Qnase pode ter acarretado um acúmulo de pequenos oligossacarídeos e glicose resultantes da hidrólise das glucanas, que atuaram reprimindo a atividade de Qnase (PITSON et al., 1993).

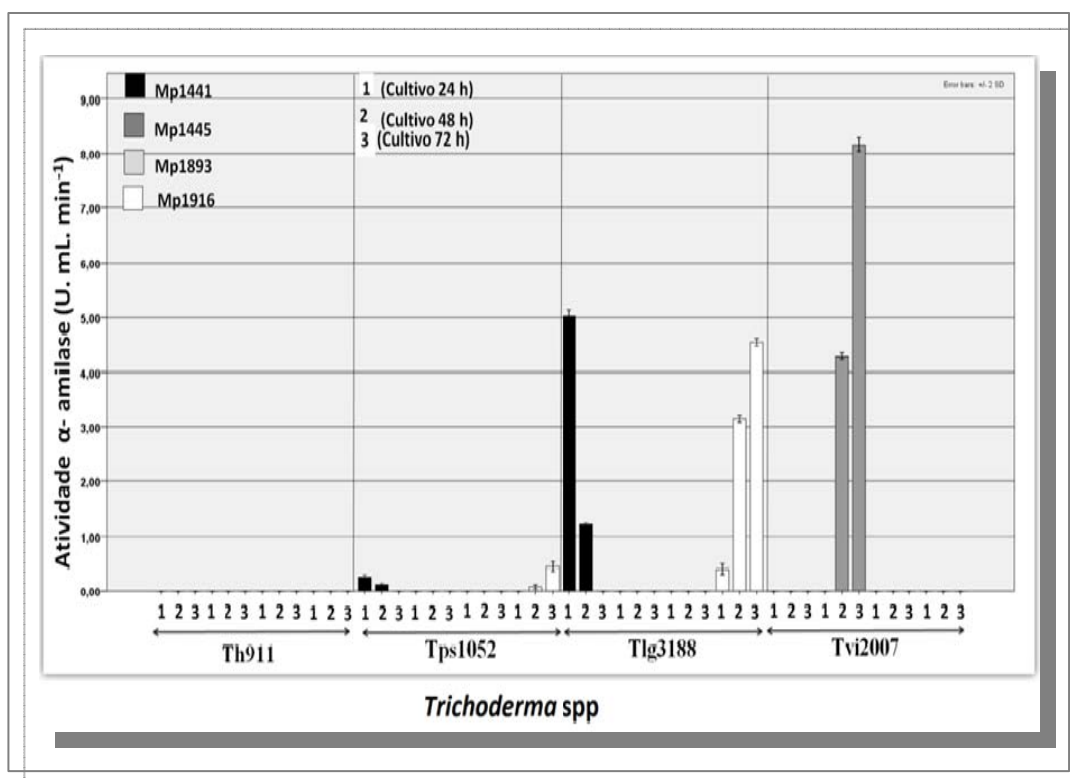
Já o tempo de produção de Ptase variou entre os isolados: Th911 produziu Ptase com todos os subgrupos de Mp com 24 h, Tps1052 com Mp1441 produziu Ptase com 72 h, Tvi2007 com Mp1441 e Mp1916 produziu Ptase com 72 h e com Mp1893 com 24 h.

Embora não tenha sido caracterizada a função da Ptase neste trabalho, De Marco e Felix (2002) demonstraram a capacidade de uma Ptase purificada produzida por *T. harzianum* em hidrolisar a parede celular de *M. perniciosus*, podendo, portanto, estar envolvida no processo antagônico entre os dois fungos.

Não foi realizada comparação entre os valores das atividades enzimáticas obtidas às de outros autores, porque não foi o objetivo deste trabalho a produção enzimática em si, mas os mecanismos envolvidos no processo. Outro motivo, porém, foi a grande divergência na literatura quanto à forma de expressão das atividades enzimáticas, o que tornou difícil a interpretação e posterior comparação com os resultados aqui apresentados. Resultados interessantes de outros estudos e que seriam de grande valor para análise dos resultados aqui obtidos, não puderam ser utilizados, pois adotaram unidades enzimáticas próprias. Deve-se salientar a importância da utilização de Unidades Internacionais mais atuais, para permitir a comparação de diferentes resultados citados na literatura. A União Internacional de Bioquímica (1964) adotou a definição de 1 unidade de atividade enzimática como sendo aquela que catalisa a transformação de 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto por mL nas condições de ensaio ( $\mu\text{mol. mL}^{-1} \text{ min.}^{-1}$ ), sendo expressa em U.  $\text{mL}^{-1}$ . Na 21ª Conferência Geral de Pesos e Medidas (Amsterdã, 1999), através da Resolução 12, entretanto, foi adotada como unidade enzimática internacional a unidade catalítica, ou seja, o Katal (Kat), que representa a transformação de 1 mol de substrato por segundo por litro (Resolutions of the CGPM, <http://www.bipm.org/en/convention/resolutions.html>). Como o mol representa uma medida de valor grande, utiliza-se o microkat ( $\mu\text{Kat}$ ) que equivale a  $10^{-6}$  kat ou o nanokat (nkat) que equivale a  $10^{-9}$  kat, sendo que 1 Unidade internacional (U.  $\text{L}^{-1}$ ) equivalente a 16,67 nKat, 1 nKat equivalente a 0,06 U.  $\text{L}^{-1}$  e 1 Unidade Internacional (U.  $\text{mL}^{-1}$ ) equivalente a 0,016 nKat.

Como citado anteriormente, a capacidade de um isolado em produzir amilases e celulases traz muitas vantagens para o biocontrole da vassoura de bruxa por Tsp: o amido é uma fonte de carbono amplamente encontrado na natureza e se o antagonista puder utilizá-lo terá vantagens sobre outros fungos, e por sua vez a celulose é o componente estrutural da madeira e, portanto presente nas vassouras secas que devem ser colonizadas pelos esporos do antagonista. Assim as atividades destas enzimas foram avaliadas, estando os resultados obtidos dos cultivos utilizando Mp como única fonte de carbono, apresentados nas figuras 57 e 58, respectivamente.

Observa-se na figura 57 que nenhum subgrupo de Mp induziu a produção de  $\alpha$ -amilase por Th911, fato que confirma a baixa atividade apresentada por este isolado quando cultivado em meio contendo amido (Figura 46).



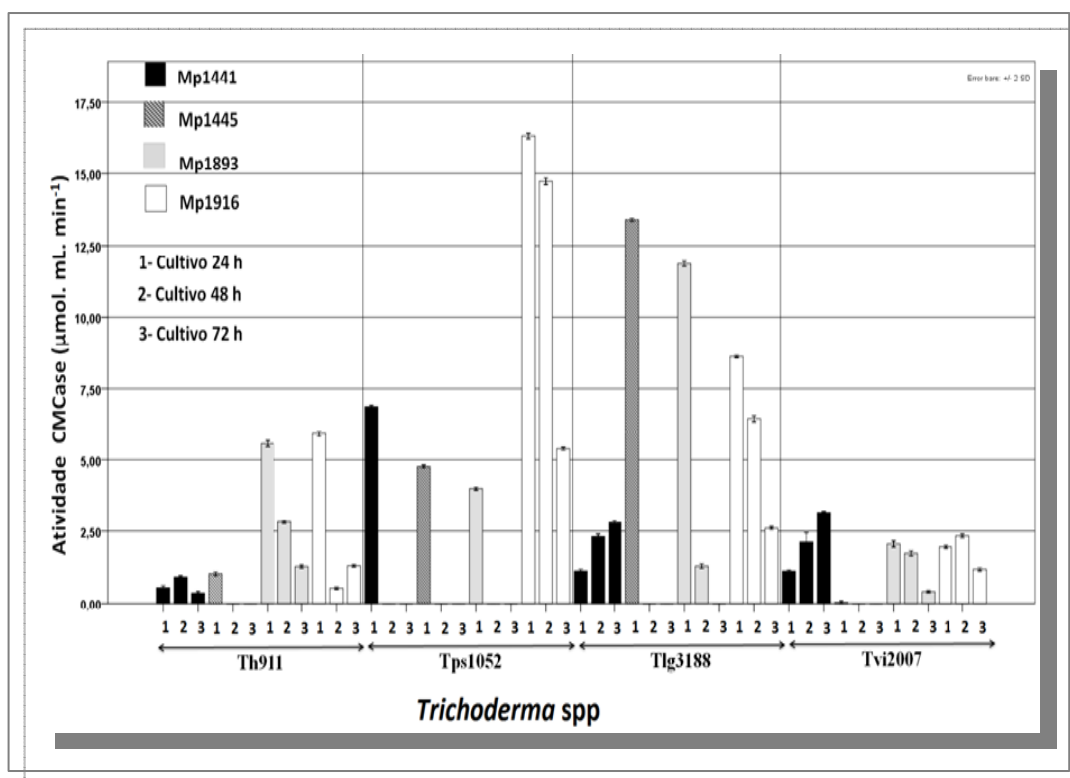
**Figura 57-** Produção da enzima amilase dextrinizante ( $\alpha$ -amilase) por isolados de *Trichoderma* spp cultivado em meio com micélio seco de isolados de *M. pernicioso* como única fonte de carbono. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas).

Todos os outros isolados de Tssp que apresentaram atividade significativa em substrato específico (Figura 46), variaram quanto às atividades de  $\alpha$ -amilase quando Mp foi a fonte indutora. Tps1052 apresentou uma discreta atividade com 24 h de cultivo com Mp1441, decrescendo com 48 h e nula com 72 h, tendo com Mp1916 também iniciado com 24 h e crescendo até 72 h (Figura 57). Mp1441 induziu uma atividade mais intensa por Tlg3188 com 24 h de cultivo, sendo a atividade menor com 48 h e nula com 72 h. Com Mp1916 a atividade foi iniciada também com 24 h sendo, entretanto, crescente até 72 h de cultivo. Já com Tvi2007 a atividade de  $\alpha$ -amilase ocorreu apenas nos cultivos com Mp1445, iniciando com 48 h e crescendo até 72 h.

Não existem relatos da presença de amido na parede celular de *M. pernicioso* (BARTINICKI-GARCIA, 1968) que pudesse justificar a indução da atividade amilolítica apresentada por Tssp. Kaplan e Guy (2004), porém, obtiveram atividade de  $\alpha$ -amilase por microrganismos em meios onde o amido estava ausente, e os autores supõem que possa ser uma resposta às condições de stress ambiental. Azevedo et al. (2000) por sua vez, constataram

através de estudos por microscopia eletrônica, não haver ação da amilase produzida por *T. harzianum* sobre a parede celular de *M. pernicioso*.

Todos os isolados de T spp que haviam apresentado atividade celulolítica em meio com CMC como fonte indutora, tiveram a atividade induzida por todos os subgrupos de Mp (Figura 58), sendo entretanto, variados os tempos em que as atividades ocorreram. Embora na parede celular dos Basidiomicetos não seja descrita a presença de  $\beta$ -1,4-glucanas, trabalhos de Travassos (1985) e Fontaine et al. (2000) relataram a presença deste polímero na parede celular de *Sporothrix schenckii* e *Aspergillus fumigatus*, respectivamente, indicando que sua síntese na parede celular fúngica pode existir. Especificamente a Mp, entretanto, não existem relatos quanto a presença de celulose na parede celular que possa induzir a produção de CMCase por T spp. A atividade de CMCase na presença de estruturas fúngicas de fitopatógenos, todavia foi também relatada por outros autores, usando *T. harzianum* em cultivos com *Rhizopus nigricans* (ZNIDARSIC et al., 1995) e com *Trichoderma asperellum* em cultivos com *Phytophthora capsici* (TONDJE et al., 2007).



**Figura 58-** Produção da enzima endoglucanase (CMCase) por isolados de *Trichoderma* spp cultivado em meio com micélio seco de isopaldos de *M. pernicioso* como única fonte de carbono. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (triplicatas).

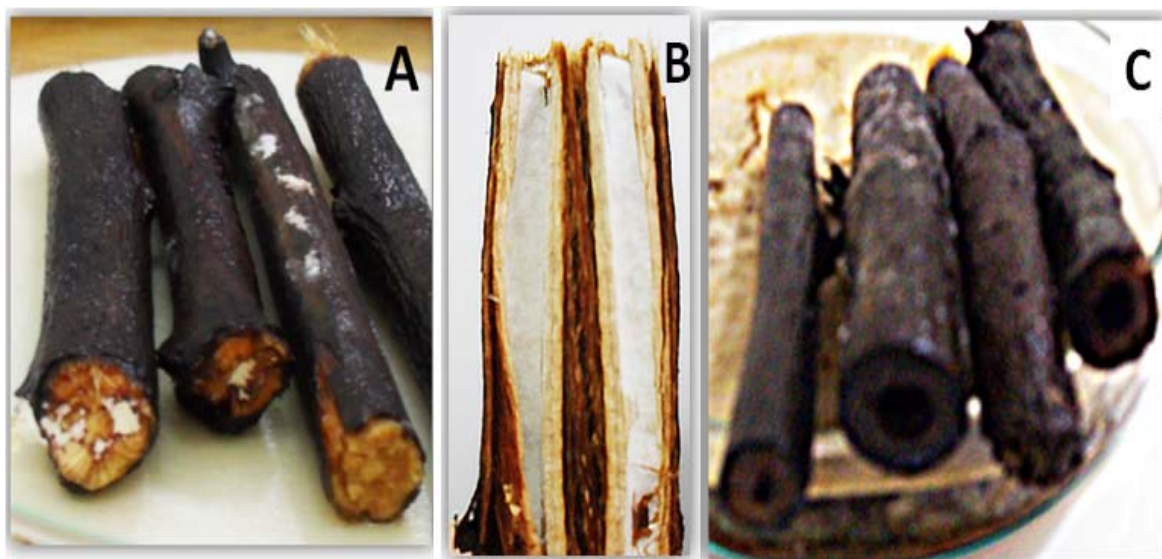
Apesar de a glicose reprimir a atividade de  $\alpha$ -amilase e de CMCase (via repressão catabólica), estudos demonstram que em baixa concentração (em torno de 2%), a glicose, sacarose, maltose e lactose, podem induzir a atividade de  $\alpha$ -amilase (PEIXOTO et al., 2003; RAMACHANDRAN et al., 2004). Assim, pode ser que  $\beta$ -1,3-glucanases, por exemplo, produzidas constitutivamente por T spp (BULL e CHESTER, 1966; EL-KATATNY et al., 2000; KUBICEK et al., 2001) promovam a hidrólise de glucanas presentes na parede celular de Mp e a conseqüente liberação de monômeros de glicose promovam a atividade de  $\alpha$ -amilase e de CMCase.

#### **4.7. Crescimento e esporulação de isolados de *Trichoderma* spp sobre vassouras de bruxa esterilizadas e vassouras de bruxa infectadas por diferentes isolados de *M. pernicioso***

Os trabalhos sobre controle biológico encontrados na literatura envolvendo *Trichoderma* spp e *M. pernicioso* (COSTA e BEZERRA, 2000; BASTOS, 2000; SAMUELS et al., 2000; AZEVEDO et al., 2000; SANOGO et al., 2002; DE MARCO et al., 2003, CARVALHO et al., 2006; DE SOUZA et al., 2006; PEREIRA et al., 2007; POMELLA et al., 2007; BAILEY et al., 2008; LOQUERCIO et al., 2009, entre outros), quer tenham utilizado isolados de *T. viride*, *T. harzianum* ou *T. stromaticum* como antagonistas, não avaliaram suas atividades frente a diferentes subgrupos de *M. pernicioso*, o que foi objetivo deste presente estudo. Desta forma, foi necessária a esterilização e infecção *in vitro* de vassouras contaminadas por Mp de grupo desconhecido (MpSD) para a realização dos experimentos com T spp frente cada subgrupo genético de Mp (Mp1441, 1445, 1893 e 1916).

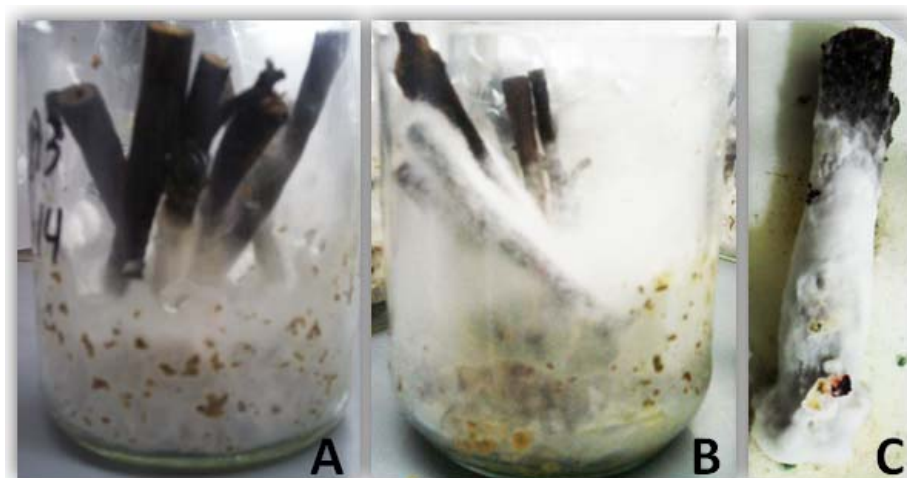
Pode ser constatado na figura 59, que as vassouras originalmente infectadas por MpSD (A e B) e esterilizadas por 3 d consecutivos, não apresentaram mais micélio branco em suas extremidades após 20 d de incubação em câmara úmida (C), o que foi utilizado como indicativo da sua esterilidade e da eficiência da metodologia utilizada (SANOGO et al., 2002).





**Figura 59-** Teste de esterilização de vassouras infectadas por *M. pernicioso*. A: vassouras infectadas por *M. pernicioso* de origem desconhecida (MpSD); B: vassoura infectada por *M. pernicioso* de origem desconhecida aberta; C: vassouras esterilizadas.

Foi também eficiente a metodologia de infecção de vassouras esterilizadas e posteriormente infectadas pelos subgrupos de Mp cultivados em MFT (Figura 60 A, B e C) (NIELLA, 2000), tendo sido grande a diferença dos tempos de colonização entre os subgrupos de Mp (dados não apresentados), evidenciando os diferentes graus de agressividade de cada subgrupo. As vassouras infectadas pelos diferentes subgrupos de Mp que apresentaram a extremidade distal livre de infecção (Figura 60 C), foram escolhidas para utilização nos testes de colonização por Tspp, sendo que este procedimento foi adotado por vários motivos.



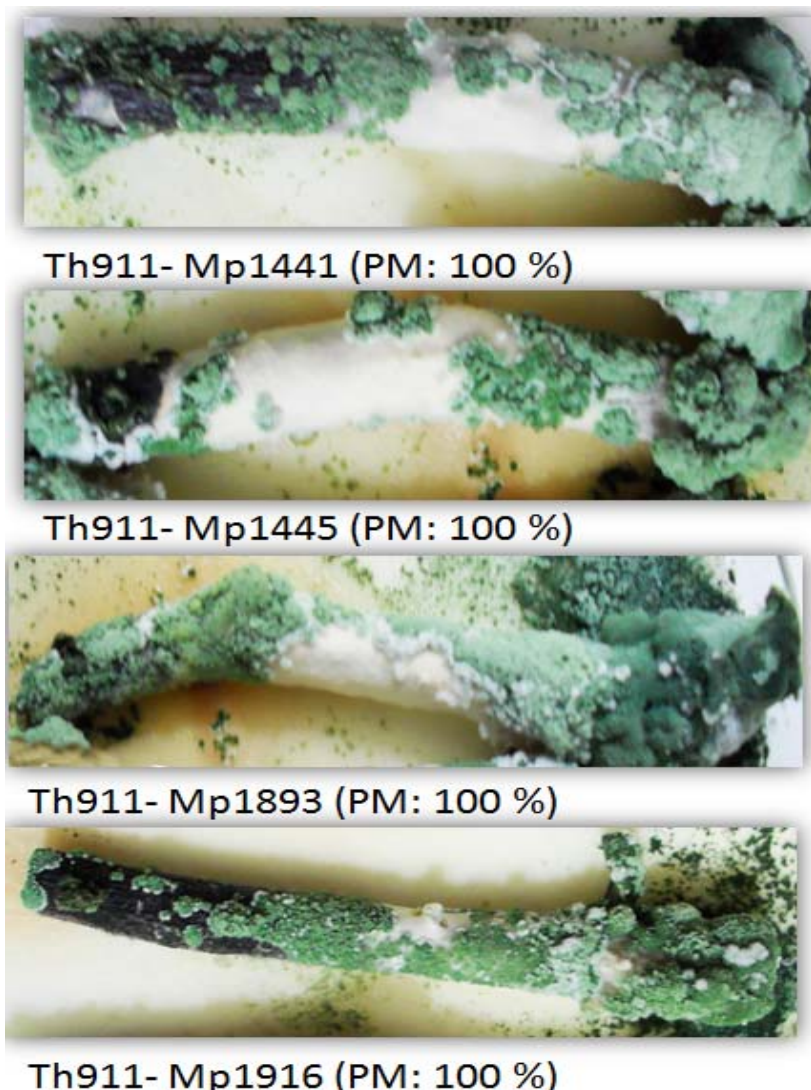
**Figura 60-** Infecção de vassouras esterilizadas por *M. pernicioso* em MFT. A: cultivo de 10 d; B: cultivo de 25 d; C: vassoura infectada por *M. pernicioso*, pronta para testes de colonização por *Trichoderma* spp.

Quando é realizada a poda fitossanitária das vassouras secas do cacaueteiro, as mesmas são amontoadas, consistindo o alvo da pulverização de esporos de *Tsp* visando o biocontrole. Inicialmente o patógeno encontra-se ocupando os tecidos internos das vassouras (Figura 59 B) e em condições adequadas de temperatura e umidade (períodos de chuva), o micélio infectivo emerge para a superfície, iniciando o ciclo sexuado, o que significa que esporos de *Tsp* podem ser depositados sobre vassouras cujo patógeno ainda se encontra em seus tecidos internos, ou seja, sobre a madeira.

Após a germinação dos esporos, nutrientes devem estar disponíveis para garantia do crescimento micelial de *Tsp* e seu estabelecimento sobre as vassouras, fase primordial no processo de colonização e, para isto, os esporos devem ser provenientes de isolados de *Tsp* hábeis em produzir enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, uma vez que a celulose e hemicelulose são os principais componentes da madeira. Por outro lado, esporos de *Tsp* que forem depositados em vassouras ou segmentos de vassouras que apresentam o patógeno cobrindo sua superfície (ciclo sexuado), além de produzir enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, devem produzir enzimas específicas que garantam seu estabelecimento e crescimento sobre o micélio do patógeno, ou seja, Bgnases, Qnases e Ptases, principalmente.

Desta forma, utilizando-se vassouras que apresentem uma extremidade distal colonizada superficialmente por *Mp* e outra não colonizada e inoculando-se esporos de *Tsp* em ambas as extremidades, pode ser observada não só a capacidade de micoparasitismo de *Tsp* a *Mp*, mas também um possível papel das enzimas degradadoras da madeira no processo de colonização por *Tsp*.

A figura 61 apresenta os resultados obtidos da colonização de Th911 sobre vassouras infectadas pelos diferentes subgrupos de *Mp*



**Figura 61-** Capacidade de micoparasitismo de *T. harzianum* 911 a *M. pernicioso* em vassouras infectadas *in vitro* por *M. pernicioso* subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916. Extremidade das vassouras livre de infecção por *M. pernicioso* localiza-se à esquerda.

Observa-se que Th911 demonstrou apresentou atividades celulolítica e hemicelulolítica, uma vez que colonizou a extremidade livre de infecção por Mp, como também atividades das enzimas degradadoras da parede celular de Mp, pois também colonizou a extremidade infectada por todos os subgrupos de Mp. Estes resultados estão de acordo com os obtidos nas culturas pareadas com Mp (Figura 22 G-2), onde Th911 cresceu sobre a colônia de todos os subgrupos de Mp, tendo um Potencial de micoparasitismo (%PM) de 100% (Figura 28). Estão de acordo também com as atividades enzimáticas apresentadas nas figuras 49 e 50, nas quais se constata que produziram nos cultivos com todos os subgrupos de Mp como única fonte de carbono, as enzimas Bgnase, Qnase e Ptase. Os

resultados apresentados por Th911 quanto à sua atividade celulolítica e hemicelulolítica foram comprovados quando vassouras esterilizadas foram inoculadas com esporos de Th911 (Figura 65), onde se pode verificar a colonização total da vassoura, demonstrando a ótima atividade destas enzimas.

Os resultados obtidos da colonização de Tvi2007 sobre vassouras infectadas pelos diferentes subgrupos de Mp se encontram demonstrados na figura 62, onde se observa que Tvi2007 colonizou as extremidades livres de infecção por Mp de todas as vassouras, demonstrando portanto, atividades celulolítica e hemicelulolítica.

Quanto à colonização das extremidades infectadas por Mp, não houve habilidade em colonizar as vassouras infectadas por Mp1445, colonizando aquelas infectadas pelos demais subgrupos (Mp1441, 1893 e 1916). Os mesmos resultados foram obtidos nos cultivos pareados, em que Tvi2007 não colonizou a colônia de Mp1445, colonizando as dos demais subgrupos (Figura 22 E), resultando em um %PM= 0,0% para Mp1445 e %PM=100 para os demais subgrupos (Figura 28).

Constata-se que Tvi2007 apresentou atividade das enzimas Bgnase e Qnase com Mp1441 como fonte de carbono (Figura 55 A), com Mp1893 (Figura 56 A) e com Mp1916 (Figura 56 B), mas com Mp1445 (Figura 55 B) não apresentou atividade da enzima Qnase, o que provavelmente seja a causa da incapacidade de micoparasitismo demonstrada nos cultivos pareados (Figura 22 E) e na colonização das vassouras (Figura 62), comprovando que sem a ação sinérgica da Bgnase e Qnase o micoparasitismo não ocorre (KIM et al. 2002; SANZ et al. 2004; ALMEIDA et al., 2007). Pode-se supor que condições de cultivo possam ter afetado a expressão gênica da Qnase por Tvi2007 com micélio seco de Mp1445 e dentre elas a principal pode ser representada pela fonte de carbono indutora, ou seja, mudanças existentes nos componentes estruturais da parede celular de Mp1445. Por exemplo, o teor de quitina presente (EL-KATATYNE et al., 2000) ou por repressão catabólica exercida por monômeros de glicose e/ou outros açúcares resultantes da hidrólise das glucanas, como já discutido anteriormente, ou ainda a falta de reconhecimento entre as estruturas de parede de Tvi200 e Mp1445, pois como citado anteriormente consiste em uma das etapas do processo de colonização (INBAR e CHET, 1995) .



Tvi2007- Mp1441 (PM: 100 %)



Tvi2007- Mp1445 (PM: 0,0 %)



Tvi2007- Mp1893 (PM: 100 %)



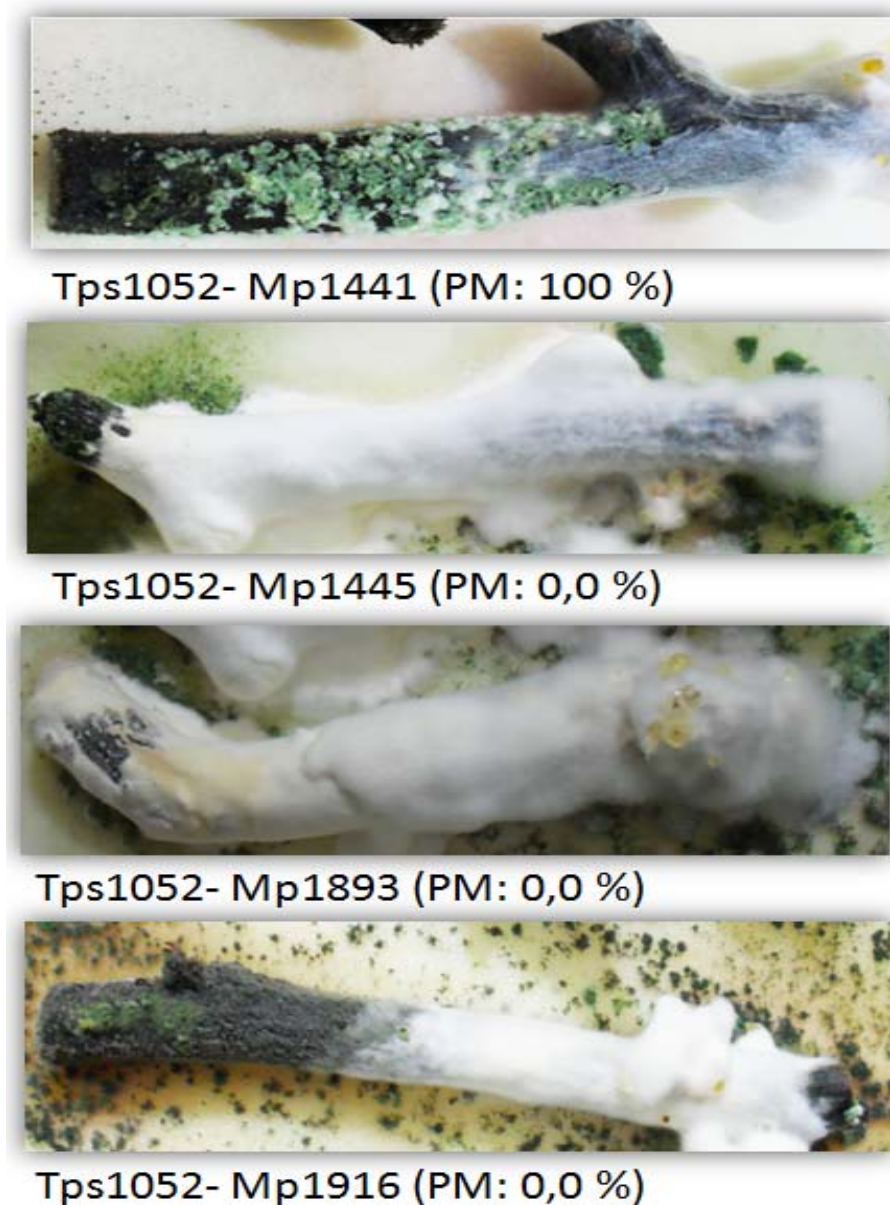
Tvi2007- Mp1916 (PM: 100 %)

**Figura 62-** Capacidade de micoparasitismo de *T. virens* 2007 a *M. pernicioso* em vassouras infectadas *in vitro* por *M. pernicioso* subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916. Extremidade das vassouras livre de infecção por *M. pernicioso* localiza-se à esquerda.

Se for comparada a intensidade de esporulação de Th911 e Tvi2007 sobre as vassouras infectadas por Mp (Figuras 61 e 62, respectivamente), verifica-se uma esporulação mais intensa nas vassouras colonizadas por Tvi2007, estando de acordo com os testes de esporulação em placa (Tabela 8) e com os Potenciais de Crescimento (%PG) apresentados na figura 20, na qual se constata que Tvi2007 apresentou o maior %PG entre todos os isolados de T spp avaliados. Os resultados apresentados por Tvi2007 quanto à sua atividade celulolítica e hemicelulolítica foram comprovados quando vassouras esterilizadas foram inoculadas com

esporos de Tvi2007 (Figura 65), onde ocorreu a colonização total da vassoura, demonstrando a ótima atividade destas enzimas.

Os resultados da colonização por Tps1052 de vassouras infectadas por Mp estão apresentados na figura 63.



**Figura 63-** Capacidade de micoparasitismo de *T. pseudokoningii* 1052 a *M. pernicioso* em vassouras infectadas *in vitro* por *M. pernicioso* subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916. Extremidade das vassouras livre de infecção por *M. pernicioso* localiza-se à esquerda.

Não houve crescimento de Tps1052 nas extremidades livres de infecção por Mp nas vassouras infectadas por Mp1445 e Mp1893, havendo um discreto crescimento na vassoura

infectada por Mp1916. Por sua vez, observou-se que nas vassouras infectadas por Mp1441, apesar de haver crescimento na extremidade livre de infecção, a colonização foi muito mais intensa sobre o micélio de Mp1441. Supõe-se, portanto, que este isolado de Tps1052 não seja um bom produtor de celulase e hemicelulase.

As capacidades de micoparasitismo de Tps1052 apresentadas nas figuras 22 H-4 e figura 28 confirmam os resultados obtidos na colonização de vassouras infectadas por Mp, uma vez que nos cultivos pareados, Tps1052 cresceu apenas sobre a colônia de Mp1441 e colonizou apenas as vassouras infectadas por Mp1441. Se forem avaliadas as atividades enzimáticas de Tps1052 verifica-se que apenas nos cultivos com micélio de Mp1441 como fonte de carbono houve a atividade de Bgnase e Qnase (Figura 53 A), sendo a atividade de Bgnase nula com Mp1445 e Mp1893 (Figura 53 B e 54 A) e muito baixa com Mp1916 (Figura 54 B), apesar da atividade da enzima Qnase ter sido demonstrada em todos os casos. Isto comprova mais uma vez a necessidade de sinergismo entre estas enzimas no processo de micoparasitismo.

Na figura 64 estão apresentados os resultados de colonização de vassouras infectadas por Tlg3188.

Verifica-se que Tlg3188 colonizou discretamente a extremidade distal das vassouras livres de infecção por Mp, nas vassouras infectadas por Mp1441, Mp1445 e Mp1893, apesar de não ter crescido na vassoura infectada por Mp1916. Estes resultados demonstram nos primeiros casos uma discreta atividade de celulase e hemicelulase e nula no segundo caso. Além disso, estes resultados não estão de acordo com as atividades celulolíticas apresentadas por este isolado, conforme demonstrado na figura 43, na qual se observa que Tlg3188 apresentou a maior atividade de celulase total (FPase). Assim, Tlg3188 foi avaliado quanto às suas atividades celulolítica e hemicelulolítica em vassouras esterilizadas (Figura 65), onde se verifica a colonização total da vassoura, demonstrando a ótima atividade destas enzimas. Este resultado difere dos apresentados na colonização das extremidades das vassouras não infectadas, uma vez que Tlg3188 apresentou discreta atividade celulolítica (Figura 64)



Tlg3188- Mp1441 (PM: 0,0 %)



Tlg3188- Mp1445 (PM: 0,0 %)



Tlg3188- Mp1893 (PM: 0,0 %)

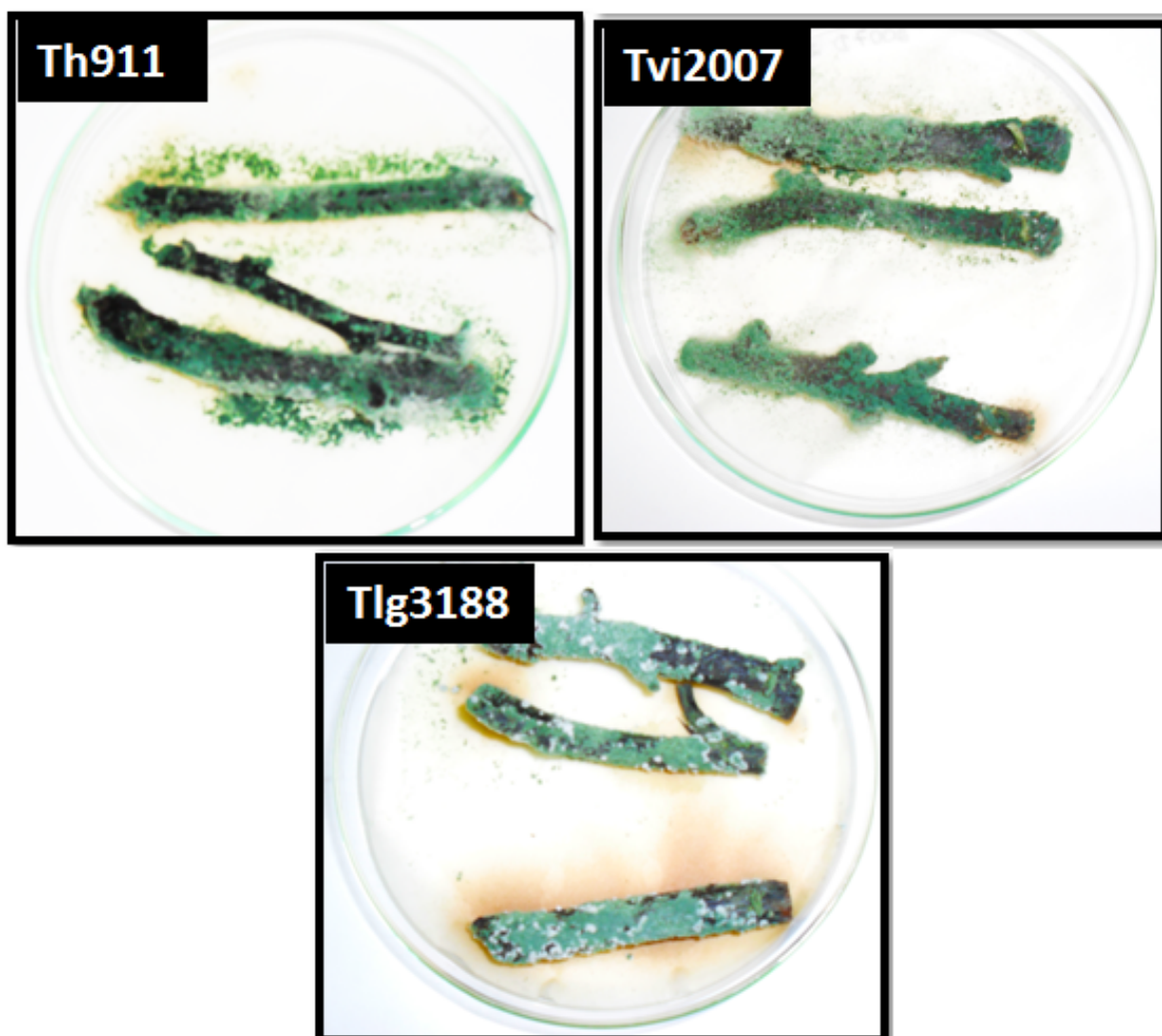


Tlg3188- Mp1916 (PM: 0,0 %)

**Figura 64-** Capacidade de micoparasitismo de *T. longibrachiatum* 3188 a *M. perniciosa* em vassouras infectadas *in vitro* por *M. perniciosa* subgrupos 1441, 1445, 1893 e 1916. Extremidade das vassouras livre de infecção por *M. perniciosa* localiza-se à esquerda.

Tlg3188 também não colonizou as extremidades infectadas das vassouras por nenhum subgrupo de Mp (Figura 64), sugerindo a ausência de atividade das enzimas degradadoras da parede celular do patógeno. Realmente, nas figuras 51 e 52 observa-se que nenhum subgrupo de Mp induziu a produção de Qnase por Tlg3188, embora em alguns casos a produção de Bgnase tenha sido elevada, sugerindo mais uma vez a necessidade da atividade sinérgica da Bgnase e Qnase para que ocorra o micoparasitismo.





**Figura 65-** Capacidade de *Trichoderma* spp em colonizar vassouras esterilizadas.

Várias espécies de *Trichoderma* são relatadas na literatura como produtoras de xilanase (GOYAL et al., 2008; SIMÕES, 2006). Entretanto, *T. reesei* que é a espécie mais citada como superprodutora de enzimas degradadoras da madeira (JUN et al., 2009; RAHMAN et al., 2009), não apresentou neste estudo boas características de crescimento e antagônicas a Mp. Todavia, a importância das celulases e xilanases, como coadjuvantes das Bgnases e Qnases no biocontrole da vassoura de bruxa, não é relatada na literatura. Entretanto, Tseng et al. (2008) obtiveram a produção de xilanase por *Trichoderma harzianum* ETS 323 em cultivos com o fitopatógeno *R. solani* como fonte de carbono e Gailite et al. (2005) relataram a indução da biossíntese de etileno pela planta, induzida por xilanases e celulases produzidas por *T. harzianum*, com possível papel no controle do fitopatógeno *Pseudomonas syringae*. Infelizmente as atividades totais de xilanase por Tspp não foram avaliadas neste presente estudo, mas constituem alvo de trabalhos futuros.

Os estudos encontrados na literatura sobre colonização de vassouras de cacauzeiros utilizam em sua maioria isolados de *T. stromaticum* e vassouras infectadas por um subgrupo específico de Mp. Segundo Hjorth et al. (2003) vassouras colonizadas por *T. stromaticum*, parasitam o micélio de *M. pernicioso*, causando a aceleração e decomposição das vassouras e levando à redução da produção de basidiocarpos e conseqüentemente da emissão de basidiósporos. Sanogo et al. (2002) relata ainda existir uma especificidade entre *T. stromaticum* e o hospedeiro, colonizando e produzindo esporos apenas na superfície das vassouras e outros segmentos contendo *M. pernicioso*. Os mesmos autores obtiveram uma eficiente colonização de vassouras infectadas por *T. stromaticum*, o mesmo sendo obtido por De Souza et al. (2008) com vassouras infectadas pelo isolado ALF 42 de *M. pernicioso*, coletadas em Itajuípe (BA) e colonizadas por isolados de *T. stromaticum* do grupo I (AM13, BA17 e BA47) que foram mais eficientes que os do grupo II (AM7 e BA66).

Entretanto, outros autores avaliaram também a colonização de vassouras por outras espécies de *Trichoderma*. Bailey et al. (2008) avaliaram a colonização de segmentos de vassouras por T spp, sendo as colonizações mais eficientes obtidas com isolados de *T. harzianum*, *T. hamatum* e *T. asperellum*; *T. ovalisporum* apresentou uma colonização moderada e *T. spirale*, *T. stromaticum* e *C. gloeosporioides* os menores índices de colonização. Mejía et al., (2008) avaliaram o potencial de colonização de vassouras por endófitos do cacauzeiro, sendo que *Colletotrichum gloeosporioides* demonstrou maior capacidade de colonização mais elevada quando comparada aos resultados obtidos por *Clonostachys rosea* e *Botryosphaeria ribis*.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados indicam, segundo as condições de ensaio utilizadas, que:

1. Existe variabilidade genética entre diferentes espécies e isolados da mesma espécie de *Trichoderma* quanto às suas capacidades de crescimento micelial, produção de esporos em placa e em arroz e percentuais de germinação de esporos.
2. Existe variabilidade genética entre diferentes espécies e isolados da mesma espécie de *Trichoderma* quanto às suas capacidades de antibiose e micoparasitismo a diferentes subgrupos genéticos de *M. pernicioso*.
3. Existe variabilidade genética entre os diferentes subgrupos genéticos de *M. pernicioso* quanto às suas características de crescimento micelial e capacidade de supressão a diferentes espécies e isolados da mesma espécie de *Trichoderma*.
4. As enzimas  $\beta$ -1,3 glucanase e quitinase estão envolvidas no processo de micoparasitismo de *Trichoderma* spp aos subgrupos de *M. pernicioso* avaliados.
5. No processo de micoparasitismo de *Trichoderma* spp aos subgrupos de *M. pernicioso* avaliados, a produção da enzima  $\beta$ -1,3 glucanase é anterior e maior que a de quitinase.
6. A metodologia utilizada para avaliação dos melhores candidatos de *Trichoderma* spp para biocontrole de *M. pernicioso* (%PCB) através da determinação de índices de

crescimento, antibiose, micoparasitismo e produtividade de esporos foi eficiente e compatível com os resultados apresentados quanto às suas capacidades de produção de enzimas e colonização de vassouras secas infectadas pelos subgrupos específicos do patógeno.

## 6. PERSPECTIVAS

Devido à ausência de métodos de estudos da interação entre fungos hiperparasitas e seus hospedeiros na natureza, métodos *in vitro* devem ser aprimorados para o entendimento da natureza supressora de *Trichoderma* spp e buscar isolados estáveis e eficientes ao biocontrole de diferentes subgrupos genéticos de *M. pernicioso*, devido à grande variabilidade que tanto o antagonista quanto o patógeno apresentam na natureza.

Estudos mais profundos sobre os metabólitos secundários produzidos por *Trichoderma* spp, como antibióticos e enzimas hidrolíticas também são essenciais não só ao processo de seleção como também podem ser promissores para o desenvolvimento de produtos com ação supressora do patógeno.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a capacidade de biocontrole do gênero *Trichoderma* à *M. pernicioso*, causador da vassoura de bruxa do cacauero, quer seja pelo mecanismo de competição, antibiose ou micoparasitismo. Mas demonstram ainda, a importância do método de seleção a ser utilizado, uma vez que isolados de *Trichoderma* podem apresentar capacidades favoráveis e desfavoráveis. Assim, espera-se que estudos futuros aprimorem o método proposto neste trabalho, em que todas as características desejáveis de um agente biocontrolador sejam consideradas.

## 7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-FATTAH, G. M.; SHABANA, Y. M.; ISMAIL, A. E.; RASHAD, Y. M. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent against *Bipolaris oryzae*. **Mycopathologia**, n. 164, n. 2, p. 81 – 89, 2007.

AGUSTINHO, D. P. Produção de hidrolases pelo fungo *Dicyma pulvinata*, e purificação de uma  $\beta$ -glucanase do isolado CEN62. 2007. 93 F. **Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular)**, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Brasília.

AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of *Marasmiaceae*. **Mycologia**, n. 97, n. 5, p. 1012 – 1022, 2005.

ALBUQUERQUE, P. S. B.; MOTTA, J. W. S.; ANDERBRHAN, T. Poda fitossanitária na recuperação de roças de cacau (*Theobroma cacao*) com alta incidência de vassoura de bruxa (*Crinipellis perniciososa*) em Rondônia: aspectos técnicos e econômicos. **Agrotrópica**, n. 7, n. 2, p. 43 – 48, 1995.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL. *Introductory Mycology*. 4. Ed. New York: John Wiley and Sons, 1996. 868 p.

ALMEIDA, L. C; ANDEBRHAN, T. Recuperation of cacao plantations with a high incidence of witches' broom disease in Brazilian. **Amazonia Agrotrópica**, v. 1, n. 2, p. 133 – 136, 1989.

ALMEIDA, L. C. C.; NIELLA, G. R.; BEZERRA, J. L. Efeito de remoções de partes doentes do cacauero associadas a intervalos de aplicação de óxido cuproso no controle da vassoura-de-bruxa na Bahia. **Agrotropica**, n. 15, v. 2, p. 95 – 102, 1998.

ALMEIDA, W. K. D. da S. Antagonismo de *Trichoderma viride* sobre fungos fitopatogênicos, *Colletotrichum* spp, *Cercospora musae* e *Asperisporium caricae* em fruteiras tropicais. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, 2009.

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 enzyme production. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 8, p. 1189 – 1193, 2007.

ALVARENGA, D. O.; QUEIROZ, P. R.; DE ALMEIDA, A. M.; DE MELLO, S. C. M. Aspectos relacionados ao controle biológico do mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, **Boletim de pesquisa e desenvolvimento** / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, v. 168, 24 p., p. 1676 – 1340, 2007.

ALVES, S. A. M. Epidemiologia da vassoura de bruxa (*Crinipellis pernicioso*) em cacaueros enxertados em Uruçuca/Ba. 2002. Não paginada. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Área de concentração em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

ALVIM, P. T.; KOZLOWSKY, T. T. *Cacao*. In: Ecophysiology of tropical crops. Academic Press, ALVIM, P. T. & KOZLOWSKY, T. T (eds.), New York, p. 279 – 313. 1977.

ANDEBRHAN, T. Relação entre a idade do fruto do cacauero e susceptibilidade a *Crinipellis pernicioso*. Belém, CEPLAC/CEPEC, Informe Técnico, p. 315 – 317, 1981.

ANDEBRHAN, T. Studies on the epidemiology and control of witches' broom disease of cocoa in the Brazilian Amazon. In: 9th **International Cocoa Research Conference**. Lome, Togo, 12-18 February, p. 395 – 402, 1984.

ANDEBRHAN, T.; ALMEIDA, L. C.; NAKAYAMA, L. H. I. Resistência de *Theobroma cacao* L. a *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer: a experiência da Amazônia Brasileira. **Agrotropica**, v. 10, n. 2, p. 49 – 60, 1998.

ANDERSON, J. B.; KOHN, L. M. Genotyping, gene genealogies and genomics bring fungal population genetics above ground. **Trends in Ecology and Evolution**, n. 13, v. 11, p. 444 – 449, 1998.

ANDRADE, R.; AYER, W. A.; MEBE, P. P. The metabolites of *Trichoderma longibrachiatum*. Part 1. Isolation of the metabolites and the structure of trichodimerol. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 70, p. 2536 – 2535, 1992.

- ANEJA, M.; GIANFAGNA, T. J.; HEBBAR, P. K. *Trichoderma harzianum* produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 67, n. 6, p. 304 – 307, 2005.
- ANTAL, Z.; MANCZINGER, L.; SZAKACS, G.; TENGERDY, R. P.; FERENCZY, L. Colony growth, in vitro antagonism and secretion of extracellular enzymes in cold-tolerant strains of *Trichoderma* species. **Mycological Research**, v. 104, n. 5, p. 545 – 549, 2000.
- ARORA, D. K.; ELANDER R. P.; MUKERJI, K. G. (eds) Handbook of applied mycology. Fungal Biotechnology, v. 4, Marcel Dekker, New York, 1992.
- ARRIETA-ESCOBAR, A.; BELIN, J. M. Effects of polyphenolic compounds on the growth and cellulolytic activity of a strain of *Trichoderma*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, n. 4, p. 983 – 989, 1982.
- ARST Jr, H. N.; PEÑALVA, M. A. pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. **Trends in Genetic**, n. 19, n. 4, p. 224 – 231, 2003.
- AZEVEDO, A. M .C.; DE MARCO, J. L.; FELIX, C. R. Characterization of an amylase produced by a *Trichoderma harzianum* isolate with antagonistic activity against *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom of cocoa. **FEMS Microbiology Letters**, v. 188, n. 2, p. 171 – 175, 2000.
- BAILEY, B. A.; BAE, H.; STREM, M. D.; CROZIER, J.; THOMAS, S. E.; SAMUELS, G. J.; VINYARD, B.T.; HOLMES, K. A. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. **Biological Control**, v. 46, n. 1, p. 24 – 35, 2008.
- BAKER, R. E. D.; CROWDY, S. H. Studies in the witches' broom disease of cocoa caused by *Marasmius pernicius* Stahel: Introduction, symptoms and etiology. Party of Spain: ICTA, 1943, 28 p.
- BAKER, R. E. D.; GRIFFIN, G. J. Novel approaches to integrated pest management. In: R. Reuveni (ED.). Molecular strategies for biological control of fungal plant pathogens, Boca Raton, Flórida: CRC Press, p. 153 – 182, 383p, 1995.
- BAPTISTA, J. C. Análise funcional de genes de degradação de celulose de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. 2006. 110p. Tese (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Unicamp, Campinas, 2006.
- BARA, M. T.; LIMA, A. L.; ULHOA, C. J. Purification and characterization of an exo-beta-1,3- glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 219, n. 1, p. 81 – 85, 2003.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. Illustrated genera of imperfect fungi. 4. ed. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1999. 218p.



- BASTOS, C. N. Resultados preliminares sobre a eficácia de *Trichoderma viride* no controle da vassoura de bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, v. 13, n. 4, p. 340 – 342, 1988a.
- BASTOS, C. N. Translocação e eficiência do antibiótico de *Cladobotryum amazonense* no controle da vassoura de bruxa do cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, n. 13, n. 4, p. 102, 1988b.
- BASTOS, C. N. Avaliação de fungicidas sistêmicos no controle da vassoura-de-bruxa do cacauero. *Agrotrópica*, v. 1, n. 2, p. 128-132, 1989.
- BASTOS, C. N. Potencial de *Trichoderma viride* no controle da vassoura de bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, n. 21, n. 4, p. 509 – 512, 1996a.
- BASTOS, C. N. Mycoparasitic nature of the antagonism between *Trichoderma viride* and *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, n. 21, n. 1, p. 50 – 54, 1996b.
- BASTOS, C. N. Effect of water potential on growth and viability of conidia of *Trichoderma viride* and *Crinipellis pernicioso*. **Summa Phytopathologyca**, n. 22, p. 258 – 261, 1996c.
- BASTOS, C. N. *Trichoderma stromaticum* sp. nov. na produção de basidiomas e infecções de ramos e almofadas florais do cacauero por *Crinipellis pernicioso*. **Agrotrópica**, n. 12, n. 1, p. 59 – 62, 2000.
- BASTOS, C. N. Method for preservation of viability and antagonic activity of *Trichoderma stromaticum*, biocontrol agent of witches' broom disease of cocoa. **Summa Phytopathologyca**, v. 34, n. 3, p. 265 – 266, 2008.
- BASTOS, C. N., EVANS, H. C.; SAMSON, R. A. A new hyperparasitic fungus, *Cladobotryum amazonense*, with potential for the control of fungal pathogens of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, n. 77, n. 2, p. 273 – 278, 1981.
- BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. A new pathotype of *Crinipellis pernicioso* (Witches' broom disease) on solanaceous host. **Plant Pathology**, v. 34, n. 2, p. 306 – 312, 1985.
- BASTOS, C. N.; ANDEBRHAN, T. Urucum (*Bixa orellana*): nova espécie hospedeira da vassoura de bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, n. 4, p. 963 – 965, 1986.
- BASTOS, C. N.; DIAS, C. J. Redução na produção de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso* por *Trichoderma viride*. **Summa Phytopathologyca**, n. 18: 235 – 238, 1992.
- BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Witches' broom disease assessment for resistance in cocoa clones using phloem sap. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 556 – 558, 2000.
- BASTOS, E. Cacau: a riqueza agrícola da América. São Paulo: **Ícone**, 1987, 130 p.

- BARBOSA, M. A. G.; REHN, K. G.; MENEZES, M.; MARIANO, R. DE L. R. Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 98 – 104, 2001.
- BARBOSA, C. C.; MONTEIRO, A. C.; CORREIA, A. DO C. B.; PEREIRA, G. T. Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes condições nutricionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 6, 2002.
- BARTINICKI-GARCIA, S.; REYES, E. Chemical composition of sporangiophore walls of *Mucor rouxii*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 165, n. 1, p. 32 – 42, 1968.
- 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.
- BENITEZ, T.; DELGADO-JARANA, J.; RINCON, A.; REY, M.; LIMON, C. Biofungicides: *Trichoderma* as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi. **Recent Research Development Microbiology**, v. 2, p. 129 – 150, 1998.
- BENITEZ, T.; RINCÓN, A. M. M.; LIMÓN, C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249 – 260, 2004.
- BENNETT, J. W. Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications, **Mycology series**- New York, 2004, 475 p.
- BERTAGNOLLI, B. L.; DALY, S.; SINCLAIR, J. B. J. Antimycotic compounds from the plant pathogen *Rhizoctonia solani* and its antagonist *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v. 146, n. 2-3, p. 131 – 135, 1998.
- BETTIOL, W.; KUPPER, K. C.; DE GOES, A.; MORETTO, C.; CORREA, E. B. Alguns métodos alternativos para o controle de doenças de plantas disponíveis no Brasil. **Summa phytopatológica**, v. 31, n. 3, p. 276 – 278, 2005.
- BEZERRA, J. L.; COSTA, J. C. B.; BASTOS, C. N.; FALEIRO, F. G. *Hypocrea stromatica* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma stromaticum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 4, 2003.
- BHARAT, R.; SINGH, V. N.; SINGH, D. B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. **Plant and Soil**, v. 57, n. 1, p. 131 – 135, 1980.
- BOSWELL, G. P.; JACOBS, H.; DAVIDSON, F. A.; GADD, G. M.; RITZ, K. Growth and function of fungal mycelia in heterogeneous environments. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 65, n. 3, p. 447 – 477, 2003.
- BOWMANN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, n. 8, p. 799 – 808, 2006.

BREWER, D.; MASON, F. G.; TAYLOR, A. The production of alamethicins by *Trichoderma* spp. **Canadian Journal of Microbiology**, n. 33, n. 7, p. 619 – 625, 1987.

BRITO, F. S. Detecção e avaliação in vitro do crescimento de *Trichoderma* spp isolados de composto frente à fitopatógenos. 2009. **Dissertação**. 68 f. (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Santa Catarina, Centro De Ciências Agrárias, Programa De Pós-Graduação em Agroecossistemas, Florianópolis.

BUENO, C. J.; AMBRÓSIO, M. M. DE Q.; DE SOUZA, N. L. Produção e avaliação da sobrevivência de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. *Summa Phytopathologyca*, v. 33, n. 1, p. 47-55, 2007.

BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, n. 2, p. 85 – 112, 1998.

BULL, A. T.; CHESTER, C. G. C. The biochemistry of laminarin and the nature of laminarinase. **Advanced Enzymology**, v. 28, p. 325, 1966.

BURMEISTER, L. The antagonistic mechanisms employed by *Trichoderma harzianum* and their impact on the control of the bean rust fungus *Uromyces appendiculatus*. 2008. 152 f. **Dissertation**: Hannover, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.

BUSHELL, N., 1989. Biowars in the bioreactors. **New Scientists**, v.7, p. 24 – 7, 1989.

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

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

CARVALHO, W. R. Caracterização bioquímica da endoxilanase recombinante (HXYN2r) do fungo termofílico *Humicola grisea* VAR. *thermoidea* e sua aplicação na sacarificação de resíduos agrícolas. 2008. 122 f. **Tese** (Doutorado em Medicina Tropical). Universidade Federal de Goiás, Goiás.

CASAS- FLORES, S.; RIOS-MOMBERG, M.; BIBBINS, M.; PONCE-NOVOLA, P.; HERRERA-ESTRELLA, A. BLR-1 and BRL-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. **Microbiology**, v. 150, n. 11, p. 3561 – 3569, 2004.

CASSIOLATO, A. M. R.; MELO, I. S. Filtration enrichment method for isolation of auxotrophic mutants of *Trichoderma harzianum* rifai. **Revista de Microbiologia**., v. 30, n. 1, p. 43 – 46, 1999.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, p. 181 – 184, 1967.

CASTILLEJO, M. A.; SANTORUM, P.; LLOBELL, A.; MONTE, E.; ROIG, G. M. Chitinase production by *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma inhamatum* on different substrates. In: **Chitin Enzimology**, 2001 (R. A. A. Muzzarelli, ed.), pp. 233 – 240. Atec, Ancona, Italy.

CAVALCANTE, R. S.; LIMA, H. L. S.; PINTO, G. A. S.; GAVA, C. A. T.; RODRIGUES, S.. Effect of moisture on *Trichoderma* conidia production on corn and wheat bran by solid state fermentation. **Food and Bioprocess Technology**. v. 1, n. 1, p. 100 – 104, 2008.

CEPEC-CEPLAC- Centro de Pesquisas do Ceplac- Comissão executiva do plano da lavoura cacauera. Características gerais do cacau. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/radar/cacau.htm>. Acessado em: 21 de outubro de 2009.

CEPLAC-Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacauera. Programa de Recuperação da Lavoura Cacauera – 3ª e 4ª Etapas. A crise da lavoura cacauera, condicionantes, ação governamental, análise e recomendações. Nota técnica. 2009, 33p.

CHAKRABORTY, M. R.; CHATTERJEE, N. C. Control of fusarium wilt of *Solanum melongena* by *Trichoderma* spp. **Biologia Plantarum**, v. 52, n. 3, p. 582 – 586, 2008.

CHAUD, S. G.; SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais (tecnológicas) da parede celular de leveduras da fermentação alcoólica e das frações glicana, manana e glicoproteína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 369 – 379, 2006.

CHEAH, L. H.; HORLOCK, C. M. Field-applied fungicides and postharvest treatments to control asparagus diseases posing biosecurity threats to New Zealand. **Plant Pathology**, v. 60, p. 94 – 98, 2007.

CHEESMAN, E. E. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cacao populations. **Tropical Agriculture**, n. 21, p. 144 – 159, 1944.

CHET, I. *Trichoderma* - application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: Chet, I., (Ed.) **Innovative approaches to plant disease control**. New York: John Wiley & Sons, 1987.

CHET, I. Biological control of soil-borne plant pathogens with fungal antagonists in combination with soil treatments. In: **Biological control of soil-borne plant pathogens**. D. Hornby (Ed.). C.A.B. International, Wallingford, UK. P. 15 – 26, 1990.

CHET, I.; INBAR, J.; HADAR, Y. Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow, D. T., Söderström, B. (Eds.) **The Mycota IV. Environmental and microbial relationships**, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, p. 165–184, 1997.

CHET, I.; BENHAMOU, N.; HARAN, S. Mycoparasitism and lytic enzymes. In: ***Trichoderma and Gliocladium*** – enzymes, biological control and commercial applications (HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P., eds). London, Taylor & Francis, v. 2, p. 153 – 72. 1998.

CHET, I.; VITERBO, A.; BROTMAN, Y. Plant Biocontrol by *Trichoderma* spp. Disponível em: [http://www.weizmann.ac.il/Biological\\_Chemistry/scientist/Chet/Chet.html](http://www.weizmann.ac.il/Biological_Chemistry/scientist/Chet/Chet.html). Acessado em: 29/01/2008.

CHITIN RESEARCH. Disponível em: <http://www.ceoe.udel.edu/horseshoecrab/research/chitin.html>. Acessado em: 13/09/2007.

CLAYDON, N.; ALLAN, M.; HANSON, J. R. Antifungal alkyl - pyrones produced by *Trichoderma harzianum*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 88, n. 4, p. 503 – 513, 1987.

COLAUTO, N. B.; AIZONO, P. M.; DE CARVALHO, L. R. M.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; LINDE, G. A. Condições de temperatura e pH para o crescimento micelial de *Agaricus brasiliensis* em cultivo axênico. **Ciências Agrárias**, v. 29, n. 2, p. 307– 312, 2008.

COLLINGE, D. B.; KRAGH, K. M.; MIKKELSEN, J. D.; NIELSEN, K. K.; RASMUSSEN, U.; VAD, K. Plant chitinases. **Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 31 – 40, 1993.

COMPANHIA DAS DOCAS DO ESTADO DA BAHIA, 2002. Estatísticas dos principais produtos movimentados. Disponível em: <<http://www.codeba.com.br/portoilheus>>. Acesso em: 15 nov. 2007).

COOK, R. J.; BAKER, K. F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul: **The American Phytopathology Society**, 1983. 539p.

COONEY, J. M.; LAUREN, D. R. *Trichoderma*/pathogen interactions: measurement of antagonistic chemicals produced at the antagonist/pathogen interface using a tubular bioassay. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, n. 5, p. 283 – 286, 1998.

CORABI-ADELL, C.; LUCON, C. M. M.; KOIKE, C. M. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* no Estado de São Paulo – aspectos enzimáticos e potencial biocontrolador. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 69, p. 188 – 191, 2002.

COSTA, J. C. B.; BEZERRA, J. L.; CAZORLA, I. M. Controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauero na Bahia com *Trichoderma polysporum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, p. 397, 1996.

COSTA, J. C. B.; BEZERRA, J. L.; VELOSO, J. L. M.; NIELLA, G. R.; BASTOS, C. N. 2006. Controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauero. In: EPAMIG (Venzon, M; PAULA JR, T.J.; PALLINI, A.). (Org.). **Tecnologias alternativas para o controle de pragas e doenças** (capítulo 2). Visconde do Rio Branco-MG: Suprema Gráfica e Editora Ltda. 1: 25 – 48.

CRONSHAW, D. K. Fungicide application together with cultural practices to control cocoa diseases in Ecuador. **Tropical Agriculture**, v. 56, p. 155 – 170, 1979.

CROP PROTECTION COMPENDIUM: CPC. Wallingford: CAB International, CD Room. Base de dados CAB Abstracts International, 2002.

CUATRECASAS, J. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Contribution from the United States National Herbarium**, n. 35, p. 379 – 614, 1964.

DA CRUZ, F. A.; PRESTES, A. M. Esporulação e crescimento vegetativo de *Pyricularia grisea* em diferentes meios de cultura. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, p. 1562 – 1564, 2009.

DANIELSON, R. M.; DAVEY, C. B. Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 5, n. 5, p. 495 – 504, 1973.

DE BOER, W.; GUNNEWIEK, P. J. A. K.; LAFEBER, P.; JANSE, J. D.; SPIT, B. E.; WOLDENDORP, J. W. Anti-fungal properties of chitinolytic dune soil bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n.2, p. 193 – 203, 1998.

DE LA CRUZ, J.; PINTOR-TORO, J. A.; BENITEZ, T.; LLOBELL, A. A novel endo-beta-1,3- glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. **Journal of Bacteriology**, n. 177, n. 23, p. 1864 – 1871, 1995.

DE LA CRUZ, J.; LLOBELL, A. Purification and properties of a basic endo-beta-1,6- glucanase (BGN16.1) from the antagonistic fungus *Trichoderma harzianum*. **European Journal of Biochemistry**, v. 265, n.1, p.145–151, 1999.

DE MARCO, J. L.; LIMA, L. H. C.; SOUSA, M .V.; FELIX, C. R. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroy the cell wall of phytopathogen *Crinipellis pernicioso* the casual agent of witches' broom disease of cocoa. **World Journal of Microbiology and Technology**, v. 16, n. 4, p. 383 – 386, 2000.

DE MARCO, J. L.; FELIX, C. R. Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease. **BioMedCentral Biochemistry**, v. 3, n. 3, p. 1 – 7, 2002.

DE MARCO, J. L.; VALADARES-INGLIS, M. C.; FELIX, C. R. Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom of cocoa. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 33 – 38, 2003.

DE MARCO, J. L.; VALADARES-INGLIS, M. C.; FELIX, C. R. Purification and characterization of an N-acetylglucosaminidase produced by a *Trichoderma harzianum* strain which controls *Crinipellis pernicioso*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n.1, p. 70 – 75, 2004.

- DE MARCO, J. L.; FELIX, C. R. Purification and characterization of a  $\beta$ -Glucanase Produced by *Trichoderma harzianum* showing biocontrol potential. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 21 – 29, 2007.
- DE SOUZA, J. T.; POMELLA, A. W. V.; BOWERS, J.; PIROVANI, C. P.; LOGUERCIO, L. L.; HEBBAR, P. Genetic and biological diversity of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the cacao witches' broom pathogen. **Phytopathology**, v. 96, n. 1, p. 61 – 67, 2006.
- DE SOUZA, J. T.; BAILEY, B. A.; POMELLA, A.W.V.; ERBE, E. F.; MURPHY, C. A.; BAE, H.; HEBBAR, P. K. Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches' broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance. **Biological Control**, v. 46, n. 1, p. 36 – 45, 2008.
- DEACON, J. W.; BERRY, L. A. Modes of action of mycoparasites in relation to biocontrol of soilborne plant pathogens. In: TJAMOS, E. S.; PAPAIVIZAS, G. C.; COOK, R. J. (eds) **Biological Control of Plant Diseases** (pp 157–165) Plenum Press, New York, 1992.
- DEACON, J. W. **Modern Mycology**. 3rd ed. Blackwell Science, London, England, 1997, 303 p.
- DEGENKOLB, T.; GRAFENHAN, T.; BERG, A.; NIRENBERG, H. I.; GAMS, W.; BRÜCKNER, H. Peptaibiotics: screening for polypeptide antibiotics (peptaibiotics) from plant-protective *Trichoderma* species. **Chemistry and Biodiversity**, v. 3, n. 6, p. 593 – 610, 2006.
- DELGADO-JARANA, J.; PINTOR-TORO, J. A., BENÍTEZ, T. Overproduction of  $\beta$ -1, 6-glucanase in *Trichoderma harzianum* is controlled by extracellular acidic proteases and pH. **Biochimica and Biophysica Acta**, n. 1481, n. 2, p. 289 – 296, 2000.
- DELGADO-JARANA, J; MORENO-MATEOS, M. A.; BENÍTEZ, T. Glucose uptake in *Trichoderma harzianum*: role of gtt1. **Eukaryotic Cell**, n. 2, n. 4, p. 708 – 717, 2003.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I - Production of non-volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, n. 1, p. 25 – 39, 1971a.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II - Production of volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, n. 1, p. 41 – 48, 1971b.
- DJONOVIC, S.; VITTONI, G.; MENDOZA-HERRERA, A.; KENERLEY, C. M. Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma virens* transformants constitutively coexpressing b-1,3- and b-1,6-glucanase genes. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 4, p. 469 – 480, 2007.

DOCTOR FUNGUS. Fungal Cell Structure and Targets. Disponível em: [http://www.doctorfungus.org/thedrugs/antif\\_pharm.htm](http://www.doctorfungus.org/thedrugs/antif_pharm.htm). Acessado em: 01/07/2008.

DURAN, A.; NOMBELA, C. Fungal cell wall biogenesis: building a dynamic interface with the environment. **Microbiology**, v. 150, n. 10, p. 3099 – 3103, 2004.

EDINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, v. 61, p. 42 – 44, 1971.

EL-HASAN, A.; WALKER, F.; WALKER, F. *Trichoderma harzianum* and its metabolite 6-pentyl-alpha-pyrone suppress fusaric acid produced by *Fusarium moniliforme*. **Journal of Phytopathology**, v. 156, n. 2, p. 79 – 87, 2008.

EL-HASAN, A.; WALKER, F.; SCHÖNE, J.; BUCHENAUER, H. Detection of viridiofungin A and other antifungal metabolites excreted by *Trichoderma harzianum* active against different plant pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, v. 124, n. 3, p. 457 – 470, 2009.

EL-KATATNY, M. H.; SOMITSCH, W.; ROBRA, K.H.; EL-KATATNY, M. S.; GÜBITZ, G. M. Production of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase by *T. harzianum*, **Food Technology and Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 173 – 180, 2000.

ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology**, n. 28, n. 7, p. 719 – 725, 1982.

ELAD, Y.; BARAK, R.; CHET, I. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 16, n. 4, p. 381 – 386, 1984.

ELAD, Y. Reasons for the delay in development of biological control of foliar pathogens. **Phytoparasitica**, v. 18, n. 2, p. 99 – 105, 1990.

ELAD, Y.; KAPAT, A. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, n. 2, p. 177 – 189, 1999.

ELAD, Y. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. **Crop Protection**, n. 19, n. 8-10, p. 709 – 714, 2000.

ETHUR, L. Z.; CEMBRANEL, C. Z.; DA SILVA, A. C. F. Selection of *Trichoderma* spp. seeking the control of *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, Santa Maria, 2001.

EVANS, H. C. Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicioso*) in Ecuador. I. The fungus. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v. 89, n. 2, p.185 – 192, 1978.

EVANS, H. C. "Pleomorphism in *Crinipellis pernicioso*, Causal Agent of Witches' Broom Disease of Cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 74, n. 3, p. 515 – 523, 1980.



- EVANS, H. C. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora roreri*. London, UK: Commonwealth Mycological Institute. **Phytopathological Papers**, n. 24, p. 44, 1981.
- EVANS, H. C.; BARRETO, R. W. *Crinipellis pernicioso*: a much investigated but little understood fungus. **Mycologist**, v. 10, n. 2, p. 58 – 61, 1996.
- EZIASHI, E. I.; UMA, N. U.; ADEKUNLE, A. A.; AIREDE, C. E. Effect of metabolites produced by *Trichoderma* species against *Ceratocystis paradoxa* in culture medium. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 9, p. 703 – 706, 2006.
- EZIASHI, E. I.; OMAMOR, I. B.; ODIGIE, E. E. Antagonism of *Trichoderma viride* and effects of extracted water soluble compounds from *Trichoderma* species and benlate solution on *Ceratocystis paradoxa*. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 388 – 392, 2007.
- FLORES, A.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by overexpression of the proteinase-encoding gene *prb1*. **Current Genetics**, v. 31, p. 30 – 37, 1997.
- FONTAINE, T.; SIMENEL, C.; DUBREUCQ, G.; ADAM, O.; DELEPIERRE, M.; LEMOINE, J.; VORGIAS, C. E.; DIAQUIN, M.; LATGE, J. P. Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 27594–27607, 2000.
- FRANKEN, P.; KHUN, G.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Development and molecular biology of arbuscular mycorrhizal fungi. In: Osiewacz HD (ed) **Molecular biology of fungal development**. Marcel Dekker, New York, pp 325–348, 2002.
- FRAVEL, D. R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, n. 1, p. 337 – 359, 2005.
- FREITAS, M. V.; MENDES, M. A. S. Espécies de fungos exóticas para a Cultura do cacau. **Comunicado Técnico 124**, 2005.
- FRIEDL, M. A.; KUBICEK, C. P.; DRUZHININA, I. S. Carbon source dependence and photostimulation of conidiation in *Hypocrea atriviridis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 245 – 250, 2008.
- FUNDAG- Biodiversidade oferece oportunidade para o controle biológico de pragas Fonte: Informativo - mar/abr 2004. Disponível em: [www.fundag.br](http://www.fundag.br). Acesso em: 25/07/2009.
- FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **The journal of Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 583 – 603, 1954.
- GACHOMO, E. W.; KOTCHONI, S. O. The use of *Trichoderma harzianum* and *T. viride* as potential biocontrol against peanut microflora and their effectiveness in reducing aflatoxin contamination of infected kernels. **Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 439 –447, 2008.

- GAILITE, A.; SAMSONE, I.; IEVINSH, G. Ethylene is involved in *Trichoderma*-induced resistance of bean plants against *Pseudomonas syringae*. **Acta Universitatis Latviensis**, v. 691, p. 59 –70, 2005.
- GALLETTI, S.; PIER, L. B.; CERATO, C.; MARINELLO, S.; SALA, E. *Trichoderma* as a potential biocontrol agent for *Cercospora* leaf spot of sugar beet. **Biocontrol**, n. 53, n. 6, p. 917 – 930, 2008.
- GAO, L.; SUN, M. H.; LIU, X. Z.; CHE, Y. S. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. **Mycological Research**, v. 111, n. 1, p. 87 – 92, 2007.
- GHISALBERTI, E. L.; SIVASITHAMPARAM, K. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 23, n. 11, p. 1011 – 1020, 1991.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257 – 268, 1986.
- GOLDMAN, G. H.; HAYES, C.; HARMAN, G. E. Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. **Trends Biotechnology**, n. 12, p. 478 – 482, 1994.
- GOMES, L. M. C., MELO, G. R. P., FALEIRO, F. G., SILVA, S. D. M., ARAÚJO, I. S., BAHIA, R. C., VALLE, R. R., MORAES, M. G.; AHNERT, D. Diversidade genética de *Crinipellis pernicioso* na região sul da Bahia utilizando marcadores moleculares RAPD. Proceedings, vol .1, 13th International Cocoa Research Conference, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia. 2000. pp. 605-612.
- GÓMEZ-ALARCÓN, G.; DE LA TORRE, M. A. Mecanismos de corrosión microbiana sobre los materiales pétreos. **Microbiología**, v. 10, n. 1-2, p. 111 – 120, 1994.
- GOODAY, G. W. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. **Biodegradation**, v. 1, n. 2–3, p. 177 – 190. 1990.
- GOYAL, M.; KALRA, K. L; SAREEN, V. K; SONI, G. Xylanase production with xylan rich lignocellulosic wastes by a local soil isolate of *Trichoderma viride*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 535 – 541, 2008
- GRAMACHO, K. P.; LOPES, U. V.; OLIVEIRA, M. L. de.; PIRES, J. L.; NIELLA, G. R.; FALEIRO, F. G. Estrutura genética de isolados de *Crinipellis pernicioso* em diferentes órgãos de um cacaueteiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, p.289, 2002. Suplemento.
- GRAMACHO, K. P.; LOPES, U. V.; PIRES, J. L.; LOPES, J. R. M.; BAHIA, R. C.; MAHE, L. Phylogeography of the witches' broom pathogen in Bahia. **Agrotropica**, v. 17, p. 65 – 72, 2005.
- GRIFFIN, D. H. Fungal Physiology (2nd Ed.). Wiley-Liss. New York. 1993, 425 p.

- GRIFFITH, G.W.; BRAVO-VELASQUEZ, E.; WILSON, F.J.; LEWIS, D. M.; HEDGER, J. N. Autoecology and evolution of the witches' broom pathogen (*Crinipellis perniciosus*) of cocoa. In: Blakeman JP, Williamson B, eds. **Ecology of Plant Pathogens**. Wallingford, UK: CAB International, n. 2, 1994.
- GRIFFITH, G. W.; HEDGER J. N. The breeding biology of biotypes of the witches broom pathogen of cocoa, *Crinipellis perniciosus*. **Heredity**, n. 72, 278 – 289, 1994.
- GRIFFITH, G. W. Witches- brooms and frosty pods. **Biologist**, n. 51, n. 2, p. 71 – 75, 2004.
- GRIGOLETTI, A. Jr.; SANTOS, A. F.; AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Floresta**, v. 30, n. 1– 2, p. 155 – 165, 2000.
- HAAB, D.; HAGSPIEL, K.; SZAKMARY, K.; KUBICEK, C. P. Formation of the extracellular proteases from *Trichoderma reesei* QM 9414 involved in cellulase degradation. **Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 3 – 4, p. 187 – 198, 1990.
- HAGGAG, W. M.; KANSOH, A. L.; ALY, A. M. Proteases From *Talaromyces flavus* and *Trichoderma harzianum*: Purification, characterization and antifungal activity against brown spot disease on faba bean. **Plant Pathology Bulletin**, v. 15, p. 31– 239, 2006
- HAGSPIEL, K.; HAAB, D.; KUBICEK, C. P. Protease activity and proteolytic modification of cellulases from a *Trichoderma reesei* QM 9414 selectant. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 61 – 67, 1989.
- HAIJEGHRARI, B.; TORABI-GIGLOU, M.; MOHAMMADI, M. R.; DAVARI, M. Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 8, p. 967 – 972, 2008.
- HANADA, R. E.; DE SOUZA, J. T.; POMELLA, A. W. V.; HEBBAR, K. P.; PEREIRA, J. O.; ISMAIEL, A.; SAMUELS, G. J. *Trichoderma martiale* sp. nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control. **Mycological Research**, v. 112, n. 11, p. 1335 – 1343, 2008.
- HANADA, R. E.; POMELLA, A. W. V.; SOBERANIS, W.; LOGUERCIO, L. L.; PEREIRA, J. O. E Biocontrol potential of *Trichoderma martiale* against the black-pod disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao. **Biological Control**, v. 50, n. 2, p. 143 – 149, 2009.
- HARAN, S.; SCHICKLER, H.; CHET, I. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. **Microbiology**, v. 142, p. 2321 – 2331, 1996.
- HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; LORITO, M.; BROADWAY, R. M.; DI PIETRO, A.; PETERBAUER, C.; TRONSMO, A. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. **Phytopathology**, v. 83, p. 313 – 318, 1993.

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

HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, n. 96, n. 2, p. 190 – 94, 2006.

HAMMERSCHMIDT, R.; SMITH-BECKER, J. A. The role of salicylic acid in disease resistance. In: AGRAWAL, A.A; TUZUN, S.; BENT, E. (Ed) **Induced plant defenses against pathogens and herbivores-biochemistry, ecology and agriculture**. Saint Paul: APS Press, p. 37 – 53, 1999.

HARRER, W.; KUBICEK, C. P.; MÖHR, M.; WURTH, W.; MARIHART, J. The effect of carboxymethyl-cellulose addition on extracellular enzyme formation in *Trichoderma pseudokoningii*, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.17, n. 6, p. 339 – 343, 1983

HATVANI, N.; KREDICS, L.; ANTAL, Z.; MÉCS, I. Changes in activity of extracellular enzymes in dual cultures of *Lentinula edodes* and mycoparasitic *Trichoderma* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 3, p. 415 – 423, 2002.

HERMOSA, M. R.; GRONDONA, I.; ITURRIAGA, E. A.; DIAZ-MINGUEZ, J. M.; CASTRO, C.; MONTE, E.; GARCIA-ACHA, I. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 1890 – 1898, 2000.

HJELJORD, L.; TRONSMO, A. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: **Trichoderma and Gliocladium – enzymes, biological control and commercial applications** (HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P., eds). London, Taylor & Francis, v. 2, p. 131 – 51, 1998.

HJORTH, S.; POMELLA, A. W. V.; HOCKENHULL; HEBBAR, P. K. Biological Control of Witches' Broom Disease, (*Crinipellis pernicios*), with the co-evolved fungus, *Trichoderma stromaticum*: testing different delivery regimes. **XIV International Cocoa Research Conference**, Accra, Ghana, VOL. II, p. 691 – 697, 2003.

HOLMES, K. A.; SCHROERS, H.; THOMAS, S. E.; EVANS, H. C.; SAMUELS, G. J. Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin of South America. **Mycological Progress**, n. 3, n. 2, p. 199 – 210, 2004.

HONG, T. Y.; MENG, M. Biochemical characterization and antifungal activity of an endo-1,3- $\beta$ -glucanase of *Paenibacillus* sp. isolated from garden soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 5-6, p. 472 – 478, 2003.

HOWELL, C. R. The role of antibiosis in biocontrol. In: Harman GE, Kubicek CP (eds) **Trichoderma & Gliocladium**, Taylor & Francis, Padstow, n. 2, p. 173 – 184, 1998.

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

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de recuperação automática, SIDRA: banco de dados agregados. Rio de Janeiro, 2005. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/>. Acesso em: 20/03/2009.

IKOTUN, T.; ADEKUNLE, F. Inhibition of growth of some plant pathogenic fungi by some antagonistic microorganisms isolated from soil. **Journal of Basic Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 95 – 98, 2007.

INBAR, J.; CHET, I. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. **Microbiology**, n. 141, p. 2823 –2829, 1995.

INNOCENTI, G.; ROBERTI, R.; MONTANARI, M.; ZAKRISSON, E. Efficacy of microorganisms antagonistic to *Rhizoctonia rezealis* and their cell wall degrading enzymatic activities. **Mycological Research**, v. 107, n. 4, p. 421 – 427, 2003.

JACKISCH - MATSUURA, A. B.; MENEZES, M. Effect of *Trichoderma* spp. In the control of *Pythium aphanidermatum* in tobacco (*Nicotiana tabacum*). **Summa Phytopathologica**, v. 25, n. 2, p. 161 – 164, 1999.

JACKSON, A. M.; LYNCH, J. M.; BAZIN, M. J. Effects of some carbon and nitrogen sources on spore germination, production of biomass and antifungal metabolites by species of *Trichoderma* and *Gliocladium virens* antagonistic to *Sclerotium cepivorum*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 43 – 51, 1991.

JENSEN, D. F.; WOLFFHECHEL, H. Biological control: Benefits and risks (Series: Plant and Microbial biotechnology research. In: M.T.H. Heikki y J.M., Lynch (Eds). **The use of fungi, particulary *Trichoderma* spp and *Gliocadium* spp. To control root rot and damping off disease**, p. 177–189, Cambridge University Press, 1995.

JOHN, S.; SCOTT, E. S.; WICKS, T. J.; HUNT, J. S. Interactions between *Eutypa lata* and *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology Mediterranean**, v. 43, n. 1, p. 95 – 104, 2004.

JUHÁSZ, T.; EGYHÁZI, A.; RÉCZEY, K.  $\beta$ -Glucosidase Production by *Trichoderma reesei*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, n. 124, p. 243 – 254, 2005.

JUN, H.; BING, Y.; KEYING, Z.; XUEMEI, D.; DAIWEN, C. Strain improvement of *Trichoderma reesei* Rut C-30 for increased cellulase production. **Indian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 188 –195, 2009.

KAPAT, A.; ZIMAND, G.; ELAD, Y. Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* on the activity of hydrolytic enzymes produced by *Botrytis cinerea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 52, n. 2, p. 127 – 137, 1998.

- KAPLAN, F.; GUY, C. L.  $\beta$ -Amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. **Plant Physiology**, v. 135, n. 3, p. 1674 – 1684, 2004.
- KARNATAKA, J. Effect of manures on growth, sporulation and antifungal activity of *Trichoderma viride*, **Scientia Agricola**, v. 20, n. 4, p. 861 – 863, 2007.
- KAUR, J.; MUNSHI, G. D.; SINGH, R. S.; KOCH, E. Effect of carbon source on production of lytic enzymes by the sclerotial parasites *Trichoderma atroviride* and *Coniothyrium minitans*. **Journal of Phytopathology**, v. 153, n. 5, p. 274 – 279, 2005.
- KEXIANG, G.; XIAO GUANG, L.; YONGHONG, L.; TIANBO, Z.; SHULIANG, J. W. Potential of *Trichoderma harzianum* and *T. atroviride* to Control *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. piricola, the cause of apple ring rot. **Phytopathology**, v. 150, n. 4-5, p. 27 – 276, 2002.
- KILARU, A.; BAILEY, B. A.; HASENSTEIN, K. H. *Moniliophthora perniciosa* produces hormones and alters endogenous auxinand salicylic acid in infected cocoa leaves. **FEMS Microbiology Letters**, v. 274, n. 2, p. 238–244, 2007.
- KIM, D. J.; BAEK, J. M.; URIBE, P.; KENERLEY, C. M.; COOK, D. R. Cloning and characterisation of multiple glycosyl hydrolase genes from *Trichoderma virens*. **Current Genetic**, v. 40, n. 6, p. 374 – 384, 2002.
- KIM, S. W.; XU, C. P.; HWANG, H. J.; CHOI, J. W.; KIM, C. W.; YUN, J.W. Production and characterization of exopolyasaccharides from an entomopathogenic fungus *Cordyceps militaris* Ng3. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 2, p. 428 – 435, 2003.
- KIM, K. C.; KIM, S. W.; KIM, M. J.; KIM, S. J. Saccharification of foodwastes using cellulolytic and amylolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* FJ1 and its kinetics. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 10, n. 1, p. 52 – 59, 2005.
- KOCHER, G.; KALRA, K.; BANTA, G. Optimization of cellulase production by submerged fermentation of rice straw by *Trichoderma harzianum* Rut\_C- 8230. **The Internet Journal of Microbiology**, v. 5, n. 2, 2008.
- KOHL, J.; FOKKEMA, N. J. Strategies for biological control of necrotrophic fungal foliar pathogens. In: Boland GJ, Kuykendall LD (eds) **Plant-microbe interaction and biological control**. Marcel Dekker Inc, New York, p. 49 – 88, 1998.
- KRAUSS, U.; SOBERANIS, W. Biological control of frosty pod (*Moniliophthora roreri*) and other pod pathogens in Peru. Paper presented at 13th Int. **Cocoa Research Conference**, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia, p. 9 – 14, 2000.
- KRAUSS, U.; SOBERANIS, W. Biocontrol of cocoa pod diseases with mycoparasite mixtures. **Biological Control**, n. 22, n. 2, p. 149 – 158, 2001.

KRUGNER, T. L.; BACCHI, L. M. A. A. Fungus. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMAT, H.; AMORIM, L. (Eds). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**, 3 ed. São Paulo: Agrônômica Ceres, v. 1, p. 46 – 96, 1995.

KUBICEK, C. P. The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*, structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. **Advances in Biochemical and Engineering and Biotechnology**, v. 45, p. 1 – 27, 1992.

KUBICEK, C. P.; MACH, R. L.; PETERBAUER, C. K.; E LORITO, M. *Trichoderma*: From genes to biocontrol. **Journal of Plant Pathology**, v. 83, n. 2, p. 11 – 23, 2001.

KUÇUK, K.; KIVANÇ, M. In vitro antifungal activity of strains of *Trichoderma harzianum*. **Turkish Journal of Biology**, v. 28, p. 111 – 115, 2004.

KUÇUK, K.; KIVANÇ, M. Effect of carbon source on production of lytic enzymes by *Trichoderma harzianum*. **Journal of Applied Biological Sciences**, v. 2, n. 2, p. 23 – 26, 2008.

KÜES, U; LIU, K. Fruiting body production in Basidiomicetos. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n.2, p. 141-152, 2000.

LANA, T. G. Caracterização genética e fisiológica de *Crinipellis pernicioso*. 2004. 91 f. Tese (Doutorado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil.

LAYNE, E. Spectrophotometric and turbidimetric methods of measuring proteins. In: COLOWICK, S.P. e KAPLAN, N.O. eds. **Methods in Enzymology**, New York, Academic Press, v. 3, 447 – 454, 1957.

LISBOA, B. B.; BOCHESSE, C. C.; VARGAS, L. K.; SILVEIRA, J. R. P.; RADIN, B.; OLIVEIRA, A. M. R. 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, p.1255-1260, 2007.

LOBO JUNIOR, M.; DE ABREU, M. S. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. **Ciência Agrotécnica**, v. 24, n. 2, p. 521 – 526, 2000.

LOCKWOOD, J. L. Evolution of concepts associated with soilborne plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p. 93 – 121, 1988.

LOPES, D. O. Produção de celulase por *Trichoderma SP*. T676 por fermentação em estado sólido com bagaço de cana de açúcar. Anais do III Encontro de Bolsistas do Programa de Apoio a Ações Afirmativas para Inclusão Social, Londrina (PR), 2008.

LOPEZ-OTIN, C.; OVERALL, C. M. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. **Molecular Cell Biology**, v. 3, p. 509 – 519, 2002.

LOGUERCIO-LEITE, C.; ESPOSITO, E. Fungos: estrutura e ultra-estrutura. In: Educs (Ed.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004.

LOQUERCIO, L. L.; SANTOS, L. S.; NIELLA, G. R.; MIRANDA, R. A. C.; DE SOUZA, J. T.; COLLINS, R. T.; POMELLA, A. W. V. Canopy-microclimate effects on the antagonism between *Trichoderma stromaticum* and *Moniliophthora perniciosa* in shaded cacao. **Plant Pathology**, v. 58, n. 6, p. 1104 – 1115, 2009.

LORITO, M.; HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; BRODWAY, R. M.; WOO, S. L.; DI PIETRO, A. Chitinolytic enzymes produced by *T. harzianum*. Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. **Phytopathology**, v. 83, p. 302 – 307, 1993.

LORITO, M.; HAYES, C. K.; DI PIETRO, A.; WOO, S. L.; HARMAN, G. E. Purification, characterization and synergistic activity of a glucan  $\beta$ -1,3-glucosidase and an N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v. 84, n. 4, p. 398 – 405, 1994.

LORITO, M.; WOO, S. L.; AMBROSIO, M. D.; HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; KUBICEK, C. P.; SCALA, F. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 9, p. 206 – 213, 1996.

LORITO, M.; WOO, S. L.; GARCÍA FERNÁNDEZ, I.; COLUCCI, G.; HARMAN, G. E.; PINTOR-TORO, J. A.; FILIPPONE, E.; MUCCIFORA, S.; LAWRENCE, C. B.; ZOINA, A.; TUZUN, S.; SCALA, F. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 95, n. 14, p. 7860 – 7865, 1998.

LOUZADA, G. A. DE S.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M.; MARTINS, I.; BRAÚNA, L. M. Potencial antagônico de *Trichoderma* spp originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. *Biota Neotropica*, v. 9, n. 3, p. 145-149, 2009.

LUZ, E. D. M. N.; MACHADO, R. C. R.; ALMEIDA, H. A. Períodos de incubação, secamento de vassouras, produção de basidiomas e atividades de *Crinipellis perniciosa* em ramos e frutos de cacauzeiros na Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 3, p. 41, 1994.

LUZ, E. D. M. N.; BEZERRA, J. L.; RESENDE, M. L. V.; OLIVEIRA, M. L. Cacau (*Theobroma cacao* L.) Controle de doenças. In: Ribeiro do Vale, F.X. & Zambolim, L. (Eds.). **Controle de doenças de plantas grandes culturas**. Viçosa, UFV, v. 2, p. 617 – 622, 1997.

MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R. DA S.; POMELLA, A. W. V.; DE SOUZA, J. T. Production of lytic enzymes and siderophores, and inhibition of germination of basidiospores of *Moniliophthora* (ex *Crinipellis*) *perniciosa* by phylloplane actinomycetes. **Biological Control**, v. 47, n. 3, p. 309 – 314, 2008.



- MACH, R. L.; PETERBAUER, C. K.; PAYER, K.; JAKSITS, S.; WOO, S. L.; ZEILINGER, S.; KULLNIG, C. M.; LORITO, M.; KUBICEK, C. P. Expression of two major chitinase genes of *T. atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 5, p. 1858 – 1863, 1999.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Brock's Biology of Microorganisms. 10ª Ed., Ed, Prentice Hall (Hardcover), 2008, 624p.
- MAGNELLI, P. E.; CIPOLLO, J. F.; ROBBINS, P. W. A glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Schizosaccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. **Analytical Biochemistry**, v. 336, n. 2, p. 202 – 212, 2005.
- MAKI, C. S. Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.). 2006, 128 f. Tese Doutorado em Agronomia. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Piracicaba.
- MANGENOT, F.; DIEM, H. G. Fundamentals of biological control. In: KRUPA, S.V.; DOMMERGUES, Y. R. (eds.). **Ecology of Root Pathogens**, Amstenolam: Elsevier, p. 207–265, 1979.
- MANTYLA, A.; SAARELAINEN, R.; FAGERSTRO\$ M, R.; SUOMINEN, P.; NEVALAINEN, H. Cloning of the aspartic protease gene of *Trichoderma reesei*. In: **Abstracts of the 2nd European Conference on Fungal Genetics**; Lunteren, The Netherlands, abstract B52. Lunteren, The Netherlands: Dept. Genetics, Wageningen. 1994.
- MARIANO, R. DE R. Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas. In: Revisão anual de patologia de plantas. LUZ, W.C. (Ed.) Passo Fundo, RS, Gráfica Editora Pe. Berthier, 1993. 416 p
- MARQUES, R. P.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações de óleo de Nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, p. 1675 – 1680, 2004.
- MARTIN, K.; MCDUGALL, B. M.; MCILROY, S.; JAYUS, C. J.; SEVIOUR, R. J. Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal  $\beta$ -(1,3)- and  $\beta$ -(1,6)-glucanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, p. 168 – 192, 2007.
- MARTINEZ, A.; OBERTELLO, M.; PARDO, A.; OCAMPO, J. A.; GODEAS, A. Interactions between *Trichoderma pseudokoningii* strains and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rósea*. **Mycorrhiza**, v. 14, p. 79 – 84, 2004.
- MARTINS, I.; PEIXOTO, J. R.; MENÊZES, J. E.; MELLO, S. C. M. Avaliação *in vitro* do antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, n. 193, 2007. 12 p.

- MARTINS-CORDER, M. P.; DE MELO, I. S. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* KLEB. **Scientia Agricola**, v. 55, n. 1, p. 1 – 7, 1998.
- MARQUARDT, R. R.; BRENES, A.; ZHIQUN, Z.; BOROS, D. Use of enzymes to improve nutrient availability in poultry feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 60, p. 321 – 330, 1996.
- MCINTYRE, M.; NIELSEN, J.; ARNAU, J.; VAN DER BRINK, H.; HANSEN, K. MADRID S (eds) **Proceedings of the 7th European Conference on Fungal Genetics**. Copenhagen, Denmark, 2004.
- MEJÍA, L. C.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; BAEL, S. V.; ARNOLD, A. E.; HEBBAR, P. K.; SAMUELS, G. J.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. **Biological Control**, v. 46, p. 4 – 14, 2008.
- MELO, I. S. Feasibility of classical biological control of plant diseases. In: International plant protection congress, 1991, Rio de Janeiro, RJ. Plenary lectures and symposia. Symposium NBR 10 “**Classical approaches of biological control**”. Rio de Janeiro. 1991.
- MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, n. 4, p. 261 – 295, 1996.
- MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Controle biológico**. v. 1, Jaguariúna: EMBRAPA, p.17 –68. 1998.
- MENENDEZ, A. B.; GODEAS, A. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* attacking soybean plants. Degradation of the cell walls of this pathogen by *Trichoderma harzianum* (BAFC 742). **Mycopathologia**, v. 142, p. 153 – 160, 1998.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426 – 428, 1959.
- MOINO JR, A.; ALVES, S. B. Efeito antagonístico de *Trichoderma* sp. no desenvolvimento de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Scientia Agricola**, v. 56, n.1, 1999.
- MOLANO, J.; DURAM, A.; CABIB, E. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. **Analytical Biochemistry**, v. 83, p. 648 – 656, 1977.
- MONDEGO, J. M. C.; CARAZZOLLE, M. F.; COSTA, G. G. L.; FORMIGHIERI, E. F.; PARIZZI, L. S. P.; RINCONES, J.; COTOMACCI, C.; CARRARO, D. M.; CUNHA, A. F.; CARRER, H.; VIDAL, R. A. O.; ESTRELA, R. C.; GARCÍA, O.; THOMAZELLA, D. P. T.; DE OLIVEIRA, B. V.; PIRES, A. B. L.; RIO, M. C. S.; ARAÚJO, M. R. R.; MORAES, M. H.; CASTRO, L. A. B.; GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, M. S.; MOURA NETO, J. P.; GÓES NETO, A.; BARBOSA, L. V.; GUILTINAN, M. J.; BAILEY, B. A.; MEINHARDT, L. W.; CASCARDO, J. C. M.; PEREIRA, G. A. G. A genome survey of *Moniliophthora*

*perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. *BMC Genomics*, v. 9, p. 548, 2008.

MONTE, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology*, n. 4, p. 1 – 4, 2001.

MONTEIRO, A. C.; BARBOSA, C. C.; CORREIA, A. C. B.; PEREIRA, G. T. Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes fatores ambientais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 6, p. 561 – 565, 2004.

MONTERO, M.; SANZ, L.; REY, M.; MONTE, E.; LLOBELL, A. BGN16.3, a novel acidic beta- 1,6-glucanase from mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413. **Febs Journal**, v. 272, n.13, p. 3441 – 3448, 2005.

MONTEIRO, V. N.; ULHOA, C. J. Biochemical characterization of a  $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma koningii* induced by cell wall of *Rhizoctonia solani*. **Current Microbiology**, v. 52, p. 92 – 96, 2006.

MOTA, M. DE A.; CAMPOSI, A. K.; ARAÚJO, J. V. Sporulation, radial growth and biomass production of *A. robusta* and *M. thaumasium* submitted to different methods of preservation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, n. 2, 2003.

MOREIRA, R. F. C. M. Estrutura genética de populações de *Crinipellis perniciosa* e *Moniliophthora roreri* utilizando marcadores RAPD e SSR. 2006. 117 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

MRSA, V.; TANNER, W. Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Yeast**, v. 15, p. 813 – 820, 1999.

NAGAI, M. O.; AIBA, S. Kinetics of extracellular cellulase and amylase production from *Trichoderma sp.* **European Journal of Applied Microbiology**, v. 3, p. 9 – 18, 1976.

NAHAR, P. B. Development of biocontrol agents for the control of pests in agriculture using chitin Metabolism as target. 2004. 159 f. Thesis, University Of Pune for the degree of Doctor of Philosophy in Microbiology. Division of Biochemical Sciences National Chemical Laboratory, Índia.

NASCIMENTO, K. L.; MENEZES, R. E.; BRIOTO, E. S.; MOTA, E. F.; GAVA, C. A. T. Effect of oil based formulations and surfactants on the conidial germination of *Trichoderma harzianum* LCB 47. Annual Meeting in New Orleans, Louisiana, 12–16, 2000. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/CPATSA/36738/1/OPB1566.pdf>. Acesso em: 21/12/2009.

NIELLA, G. R. Esporulação de *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer em frutos de cacau (*Theobroma cacao*) no Sudoeste da Bahia e sensibilidade *in vitro* a quatro compostos

sulfurados. 1997. 60 f. **Dissertação**, Mestrado em Fitopatologia, Universidade federal de Lavras-Lavras.

NIELLA, G. R. Frutificação *in vitro*, caracterização molecular e patogênica de *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer em *Theobroma cacao* L. 2000. 75 f. **Tese**, Doutorado em Fitopatologia. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

NIELLA, G. R.; RESENDE, M. L. V.; CASTRO, H. A. de; FIGUEIRA, A. R.; SILVA, S. D. M.; ARAÚJO, I. S.; GOMES, L. M. C.; FALEIRO, F. G. Diversidade genética de isolados monospóricos de *Crinipellis perniciosa* provenientes de diferentes estados do Brasil utilizando marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 400, 2000.

NIELLA, G. R. Controle biológico da vassoura de bruxa do cacauero. **Semana do Fazendeiro**, 27a, Uruçuca, 2005. Agenda. Uruçuca, CEPLAC/CENEX/EMARC. 332p.

NIELLA, G. R. Produção massal de *Trichoderma stromaticum* para o controle biológico da vassoura de bruxa do cacauero. Nai, IX. **Simpósio de Controle Biológico**. Recife, 2005, p. 45.

NORONHA, E. F.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; ULHOA, C. J. Regulation of 36-kDa beta-1,3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, v.188, n.1, p.19 – 22, 2000.

OKOLO, B. N.; EZEUGU, L. I.; MBA, C. I. Production of raw starch digesting amylase by *Aspergillus niger* grown on native starch sources. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 69, p. 109 – 115, 1995.

OLIVEIRA, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.). 1991. 111 f. Dissertação Mestrado em Fitossanidade, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. Identificação e manejo das principais doenças do cacauero no Brasil. 1ª Ed. Ilhéus. CEPLAC/CEPEC/SEFIT. 2005

ORCHARD, J.; COLLIN, H. A.; HARDWICK, K.; ISAAC, S. Changes in morphology and measurement of cytokinin during the development of witches' broom on cocoa. **Plant Pathology**, v. 43, n. 1, p. 65 – 72, 1994.

ORDENTLICH, A.; ELAD, Y.; CHET, I. The Role of Chitinase of *Serratia marcescens* in Biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, v. 78, n. 1, p. 84 – 88, 1988.

ORTIZ, A., ORDUZ, S. In vitro evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalote*. **Mycopathologia**, v. 150, p. 53 – 60, 2000.

OSIEWACZ, H. D. **Molecular and Biology Fungal Development**, Marcel Dekker, New York, 2002, 608 p.

PÁDUA, R. R.; ALVARENGA, D. O.; QUEIROZ, P. R.; MELLO, S. C. M. Avaliação e caracterização de potenciais antagonistas de *Sclerotium rolfsii* pertencentes ao gênero *Trichoderma*. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento** / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007, 23 p.

PANDEY, R. K.; GOSWAMI, B. K.; SINGH, S. Management of root *Knot* nematode and *Fusarium* wilt disease complex by fungal bioagents, neem oilseed cake and/or VA-Mycorrhiza on Chickpea. **International Chickpea and Pigeonpea Newsletter**, v. 12, p. 32 – 34, 2005.

PAPAVIZAS, G. C.; LEWIS, J. A.; BD-ELMOITY, T. H. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to Benomyl and enhanced biocontrol capabilities. **Phytopathology**, n. 72, p. 126 – 132, 1982.

PARKER, R. S.; CUTLER, H. G.; JACYNO, J. M.; HILL, R. A. Biological activity of 6-pentyl-2H-pyran-2-one and its analogs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2774–2776, 1997.

PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Review: chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 26, p. 473 – 483, 2000.

PAULIN, D.; ESKES, A. B. Le cacaoyer: strategies de selection. **Plantations, Recherche, Developpement**, n. 2, p. 5 – 18, 1995.

PEDRESCHI, F.; AGUILERA, J. M. Viability of dry *Trichoderma harzianum* spores under storage. **Bioprocess Engineering**, v. 17, p. 177 – 183, 1997.

PEIXOTO, S. C.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, T. M. *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: A thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. **International Microbiology**, 6: 269-273. 2003.

PEREIRA, L. S.; COLLINS, R. T. B.; LOGUERCIO, L. Efeito integrado de fatores meteorológicos na esporulação de *Trichoderma stromaticum*, micoparasita do agente causal da doença vassoura-de-bruxa do cacauero. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, Caxambu, MG, 2007.

PEREIRA, J. L.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J. M.; ALMEIDA, L. C. C. First occurrence of witches' broom in the principal cocoa producing region of Brazil. **Tropical Agriculture**, v. 67, n. 2, p. 188 – 189, 1990.

PEREIRA, J. L.; ALMEIDA, L. C. C.; SANTOS, S. M. Witches' broom disease of cocoa in Bahia: attempts at eradication and containment, **Crop Protection**, n. 15, p. 743 – 752, 1996.

PERES, E.; MELO, I. S. Variabilidade entre isolados de *Trichoderma harzianum*. I – Aspectos citológicos. **Scientia Agricola**, v. 52, n. 1, p. 56 – 59, 1995.

- PITARCH, A.; SÁNCHEZ, M.; NOMBELA, C.; GIL, C. Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. **Molecular and Cellular Proteomics**, v.1, n. 12, p. 967 – 982, 2002.
- PITSON, S. M.; SEVIOUR, R. J.; MCDUGALL, B. M. Noncellulolytic fungal  $\beta$ -glucanases: their physiology and regulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 5, p. 178 – 192, 1993.
- PLOETZ, R. C.; SCHNELL, R. J.; YING, Z.; ZHENG, Q.; OLANO, C. T.; MOTAMAYOR, J. C.; JOHNSON, E. S. Analysis of molecular diversity in *Crinipellis pernicioso* with AFLP markers. **European Journal of Plant Pathology**, v. 111, n. 4, p. 317 – 326, 2005.
- POMELLA, A. W. V.; DE SOUZA, J. T.; NIELLA, G. R.; BATEMAN, R. P.; HEBBAR, P. K.; LOGUERCIO, L. L.; LUMSDEN, R. D. The use of *Trichoderma stromaticum* in the management of witches' broom disease of cacao in Bahia State, Brazil. p. 210 – 217. In: Vincent, C., Goettel, M., Lazarovits, G. (Eds.) **Biological Control: A Global Perspective – Case Studies from Around the World**. CABI Publishing, Wallingford-UK, 2007.
- PRIA, M. D.; CAMARGO, L. E. A. Doenças do cacauero. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo, SP: Editora Agronômica Ceres, 1997.
- PURDY, L. H. Basidiocarp Development on Mycelial, Mats of *Crinipellis pernicioso*. **Plant Disease**, v. 74, n. 7, p. 493 – 496, 1990.
- QUARTERLY BULLETIN OF COCOA STATISTICS. London: ICCO, v. 31, n. 3, p.3. 2004/05. Disponível em: <http://www.icco.org/statistics/qbcs.aspx>. Acesso em: 14/06/2007.
- RAHMAN, Z.; SHIDA, Y.; FURUKAWA, T.; SUZUKI, Y.; OKADA, H.; OGASAWARA, W.; MORIKAWA, Y. Evaluation and characterization of *Trichoderma reesei* cellulase and xylanase promoters. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 899 – 908, 2009.
- RAMACHANDRAN, S.; PATEL, A. K.; NAMPOOTHIRI, K. M.; CHANDRAN, S.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.. Alpha amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 2, p. 309-317, 2004.
- RAMOT, O.; COHEN-KUPIEC, R.; CHET, I. Regulation of  $\beta$ -1, 3-glucanase by carbon starvation in the mycoparasite *Trichoderma harzianum*. **Mycological Research**, v. 104, n. 4, p. 415 – 420, 2000.
- REINO, J. L.; GUERRERO, R. F.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R.; COLLADO, I. G. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 89 – 123, 2008.

REMUSKA, A. C.; PRIA, M. D. Effect of *Bacillus thuringiensis* and *Trichoderma* sp. on the growth pathogenic fungi. **Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, v. 13, n. 3, p. 31 – 36, 2007.

RESENDE, M. L. V.; GUTEMBERG, B. A. N.; SILVA, L. H. C. P.; NIELLA, G. R.; CARVALHO, G. A.; SANTIAGO, D. V. R.; BEZERRA, J. L. *Crinipellis perniciosa* proveniente de um novo hospedeiro *Heteropterys acutifolia* é patogênico ao cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, n. 10, p. 88 – 91, 2000.

REY, M.; DELGADO-JARANA, J.; BENITEZ, T. Improved antifungal activity of a mutant of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 which produces more extracellular proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 604 – 608, 2001.

REZENDE, M. I.; BARBOSA, A. DE M.; VASCONCELOS, A. F. D.; ENDO, A. S. Xylanase production by *Trichoderma harzianum* rifai by solid state fermentation on sugarcane bagasse. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 67 – 72, 2002.

RINI, C. R.; SULOCHANA, K. K. Usefulness of *Trichoderma* and *Pseudomonas* against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* infecting tomato. *Journal of Tropical Agriculture*, v. 45, n. 1-2, p. 21–28, 2007.

ROCHA, H. M.; WHEELER, B. E. J. Factors influencing the production of basidiocarps and the deposition and germination of basidiospores of *Crinipellis perniciosa*, the causal fungus of witches' broom on cocoa (*Theobroma cacao*). **Plant Pathology**, n. 34, p. 319 – 328, 1985.

ROCHA, R.; DA LUZ, D. E.; ENGELS, C.; PILEGGI, S. A. V.; JACCOUD FILHO, D. DE S.; MATIELLO, R. R.; PILEGGI, M. Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* L.) for in vitro biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 73 – 78, 2009.

ROUSSOS, S. Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: Physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse Doctorat d'Etat, Université de Provence, Marseille, France, 193 p. 1985.

RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; Dos SANTOS, D. R.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 24 – 33, 2005.

RUDGARD, S. A. Witches' broom disease on cacao in Rondonia, Brazil. Basidiocarp production on detached brooms in the field. **Plant Pathology**, v. 35, p. 434 – 442, 1986.

RUDGARD, S. A.; MADDISON, A. C.; ANDEBRHAN, T. **Disease Management in Cocoa: comparative epidemiology of witches' broom**. Cambridge, GB: University Press. 1993.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Cellulase activity of fungi isolated from soil of the Ecological Station of Juréia-Itatins, São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 205 – 211, 2004.

SAHAI, A. S.; MANOCHA, M. S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 11, p. 317 – 338, 1993.

SAHOO, D. K.; MISHRA, S.; BISARIA, D. V. S. Influence of L-sorbose on growth and enzyme synthesis of *Trichoderma reesei* C-5. **Journal of General Microbiology**, v. 132, p. 2761 – 2766, 1986.

SAID, S. D. Spore production by biocontrol agent *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation: Effect of agitation and aeration **Journal Rekayasa Kimia dan Lingkungan**, V. 6, n. 2, p. 71 – 76, 2007.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: A review of biology and systematic of the fungus. **Mycological Research**, n. 100, p. 923 – 925, 1996.

SAMUELS, G. J., PARDO-SCHULTHEISS, K. P., HEBBAR, K. P., LUMSDEN, R. D., BASTOS, C. N., COSTA, J. C.; BEZERRA, J. L. *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. **Mycological Research**, v. 104, p. 760 – 764, 2000.

SANCHEZ, V.; REBOLLEDO, O.; PICASO, R. M.; CARDENAS, E.; CORDOVA, J.; GONZALEZ, O.; SAMUELS, G. J. In vitro antagonism of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*, **Mycopathologia**, v. 163, p. 49 – 58, 2007.

SANOGO, S.; POMELLA, A.; HEBBAR, P. K.; BAILEY, B.; COSTA, J. C. B.; SAMUELS, G. J.; LUMSDEN, R. D. Production and Germination of Conidia of *Trichoderma stromaticum*, a Mycoparasite of *Crinipellis perniciosus* on Cacao. **Phytopathology**, v. 92, p.1032 – 1037, 2002.

SANZ, L.; MONTERO, M.; GRONDONA, I.; VIZCAÍNO, J. A.; LLOBELL, A.; HERMOSA, R.; MONTE, E. Cell wall-degrading isoenzyme profiles of *Trichoderma* biocontrol strains show correlation with rDNA taxonomic species. **Current Genetic**, v. 46, n. 5, p. 277 – 286, 2004.

SEAGRI. SECRETARIA DA AGRICULTURA, IRRIGAÇÃO E REFORMA AGRÁRIA. Agronegócio Agronegócio: balanço 2005: Salvador, 2005. Disponível em: <<http://www.seagri.ba.gov.br>>. Acesso em: 09/03/09.

SETHI, B.; MISHRA, S.; BISARÍA, V. S. Sorbose mediated enhancement of cellulase biosynthesis in *Trichoderma reesei*. **Biotechnology Bioprocess Engineering**, v. 4, p. 189 – 194, 1999.



- SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, p. 507–512, Sept. 1974.
- SHAIGAN, S., SERAJI, A.; MOGHADDAM, S. A. M. Identification and investigation on antagonistic effect of *Trichoderma* spp. on tea seedlings white foot and root rot (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) in vitro condition. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 11, p. 2346 – 2350, 2008.
- SIDDIQUEE, S.; YUSUF, U. K.; HOSSAIN, K.; JAHAN, S. In vitro studies on the potential *Trichoderma harzianum* for antagonistic properties against *Ganoderma boninense*. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v.7n. 3 – 4, p. 970 – 976, 2009.
- SILVA, R. N. Estudos de sinalização celular em *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) durante a expressão dos genes de celulase (cbh1 e cbh2) em presença de celulose e soforose e durante o antagonismo contra *Pythium ultimum*. 2008. 129 f. Tese, Doutorado em Biologia Molecular-Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
- SILVA, R. N.; STEINDORFF, A. S.; ULHOA, C. J.; FÉLIX, C. R. Involvement of G-alpha protein GNA3 in production of cell wall-degrading enzymes by *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) during mycoparasitism against *Pythium ultimum*. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 531 – 536, 2009.
- SILVA, L. F. Missão técnica à Malásia e outros países. CEPLAC/DEPEA, Ilhéus (**Boletim Técnico Avulso**), 1985.
- SILVA NETO, P. J. Sistema de produção de cacau para a Amazônia Brasileira. Belém: CEPLAC, 2001. 125p.
- SIMÕES, M. L. G. Produção de xilanase por fungos filamentosos isolados de solo de área de caatinga. 2006. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho, UNESP, Rio Claro, SP, 2006.
- SIMON, A.; DUNLOP, R. W.; GHISALBERTI, E. L. *Trichoderma koningii* produces a pyrone compound with antibiotic properties. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, n. 21, p. 263 – 264, 1988.
- SIMON, A.; IVASITHAMPARAM, V. Pathogen-suppression: A case study in biological suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, p. 263 – 64, 1989.
- SINGER, R. A monographic study of the genera *Crinipellis* and *Chaetocalathus*. *Lilloa*, v. 8, p. 441–534, 1942.
- SIVAN, A.; CHET, I. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. **Phytopathology**, n. 79, p. 198 – 203, 1989a.

- SIVAN, A.; CHET, I. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. **Journal of General Microbiology**, n. 135, p. 675–682, 1989b.
- SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: **Trichoderma and Gliocladium**, vol. 1 ed. Harman, G.E. and Kubicek, C.P. pp. 139–191. London: Taylor and Francis Ltd, 1998.
- SOARES, A. C. F.; SOUSA, C. da S.; GARRIDO, M. da S.; PEREZ, J.O. Production of *Streptomyces inoculum* in sterilized rice. **Sciencia Agrícola**, v. 64, n. 6, p. 641-644, 2007.
- SOBOWALE, A. A.; CARDWELL, K. F.; ODEBODE, A. C.; BANDYOPADHYAY, R.; JONATHAN, S. G. Growth inhibition of *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg by isolates of *Trichoderma pseudokoningii* strains from maize plant parts and its rhizosphere. **Journal of Plant Protection Research**, v. 45, p. 249 – 265, 2005.
- SOSA-GÓMEZ, D. R.; ALVES, S. B. Temperature and relative humidity requirements for conidiogenesis of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: *Moniliaceae*). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, p. 515-521, 2000.
- SOUNIGO, O.; COULIBALY, N.; BRUN, L.; N'GORAN, J.; CILAS, C.; ESKES, A. B. Evaluation of resistance of *Theobroma cacao* L. to mirids in Côte d'Ivoire: results of comparative progeny trials. **Crop Protection**, v. 22, n. 4, p. 615 – 621, 2003.
- SOUZA, C. A. S.; DIAS, L. A. S. Melhoramento ambiental e sócio-economia. In.: DIAS, L.A.S. (Ed.) **Melhoramento genético do cacauero**. Viçosa, FUNAPE, UFG, 2001. p. 1 – 47.
- SPIEGEL, Y.; CHET, I. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. **Integrated Pest Management Reviews**, v. 3, p. 169 – 175, 1998.
- SPIER, M. R. Produção de enzimas amilolíticas fúngicas  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido. 2005. 157 f. Dissertação, Mestrado em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.
- STEFANOVA, M.; LEIVA, A.; LARRIGANAGA, L.; CORONADO, M. F. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. **Revista Facultad de Agronomía**, v. 16, p. 509 – 516, 1999.
- STEYAERT, J. M.; WELD, R. J.; STEWART, A. Isolate-specific conidiation in *Trichoderma* in response to different nitrogen sources. **Fungal Biology**, v. 114, n. 2 – 3, p. 179 – 188, 2010a.
- STEYAERT, J. M.; WELD, R. J.; STEWART, A. Ambient pH intrinsically influences *Trichoderma* conidiation and colony morphology. **Fungal Biology**, v. 114, n. 2 – 3, p. 198 – 208, 2010b.

SUFRAMA, Superintendência da Zona Franca de Manaus. Potencialidades Regionais e Estudo da viabilidade econômica do cacau. Sumário Executivo, 2005. Disponível em: [http://www.suframa.gov.br/publicacoes/proj\\_pot\\_regionais/sumario/cacau.pdf](http://www.suframa.gov.br/publicacoes/proj_pot_regionais/sumario/cacau.pdf). Acesso em: 13/12/2008.

SZEKERES, A.; LADAY, M.; KREDICS, L.; VARGA, J.; ANTAL, Z.; HATVANI, L.; MANCZINGER, L.; VAGVOLGYI, C.; NAGY, E. Rapid identification of clinical *Trichoderma longibrachiatum* isolates by cellulose-acetate electrophoresis-mediated isoenzyme analysis. **The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, n. 12, p. 369 – 375, 2006.

THORNTON, C. R.; PITT, D.; WAKLEY, G. E.; TALBOT, N. J. Production of a monoclonal antibody specific to the genus *Trichoderma* and closely related fungi, and its use to detect *Trichoderma* spp. in naturally infested composts. **Microbiology**, v. 148, p. 1263 – 1279, 2002.

TIANHUI, Z.; DEXUN, Q. Antagonism of *Trichoderma harzianum* to *Rhizoctonia solani*. **Journal of Sichuan Agricultural University**. 12, 11–11, 1994.

TIMMIS, K. N. Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes. **Annual Review of Microbiology**, v. 48, p. 525 – 557, 1994.

TONDJE, P. R.; ROBERTS, D. P.; BON, M. C.; WIDMER, T.; SAMUELS, G. J.; ISMAIEL, A.; BEGOUDE, A. D.; TCHANA, T.; NYEMB-TSHOMB, E.; NDOUMBE-NKENG, M.; BATEMAN, R.; FONTEM, D.; HEBBAR, K. P. Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. **Biological Control**, v. 43, p. 202 – 212, 2007.

TOVAR, G. Contribución al estudio de la variabilidad de *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, agente causante de la Escoba del Bruja del cacao. **Agronomía Colombiana**, v. 8, n.1, p. 83 – 93, 1991.

TRAVASSOS, L. R. *Sporothrix schenckii*. In: SZANISZLO PJ (Ed), Dimorphism, with emphasis on fungi pathogenic for humans, New York: **Plenum Press**, p. 121-163, 1985.

TREVIZAN, S. D. P. Mudanças no sul da Bahia associadas à vassoura-de-bruxa do cacau. **Proceedings, 8ª Conferência Internacional de Pesquisas em Cacau**, Salvador, BA. p. 1109 – 1116, 1996.

TSENG, S. C.; LIU, S. G.; YANG, H. H.; LO, C. T.; PENG, K. C. Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ETS 323 in response to *Rhizoctonia solani*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 16, p. 6914 – 6922, 2008.

TYE, R. J.; WILLETS, A. J. Fungal growth on methanol. **Journal of General Microbiology**, n. 77, p. 1 – 2, 1973.

- VAZQUEZ-GARCIDUENAZ, S.; LEAL-MORALES, C. A.; HERRERA- ESTRELLA, M. Analysis of the  $\beta$ -1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1442 – 446, 1998.
- VELLO, F.; GARCIA, J. R. Características das principais variedades de cacau cultivadas na Bahia. **Revista Theobroma**, v. 1, n. 2, p. 3 – 10, 1971.
- VERMA, M.; BRAR, K. S.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y.; VALERO, J. R. *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, p. 1 – 20, 2007.
- VEY, A.; HOAGLAND, R. E.; BUTT, T. M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson C, Magan N (eds) **Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential**. CAB International, Bristol, p. 311 – 346, 2001.
- VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; MARRA, R.; WOO, S. L.; LORITO, M. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, n. 40, p 1 – 10, 2008.
- 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.
- VITERBO, A.; HAREL, M.; HORWITZ, B. A.; CHET, I.; MUKHERJEE, P. K. *Trichoderma* mitogen-activated protein kinase signaling is involved in induction of plant systemic resistance. **Applied Environmental Microbiology**, n. 71, p. 6241 – 6246, 2005.
- VITERBO, A.; CHET, I. Isolation and characterization of HYD1, a new hydrophobin-like gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum* involved in plant root colonization. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 4, p. 249 – 258, 2006.
- VIZCAÍNO, J. A.; SANZ, L.; BASILIO, A.; VICENTE, F.; GUTIERREZ, S.; HERMOSA, M. R.; MONTE, E. Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolates representing three *Trichoderma* sections. **Mycological Research**, v. 109, n. 12, p. 1397 – 1406, 2005.
- WEBSTER, J.; WEBER, R. Introduction to Fungi. Physiology of the growing hypha. Cambridge University Press (3 ed), Cambridge, New York, p. 5, 2007, 875p.
- WEINDLING, R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. **Phytopathology**, n. 22, p. 837 – 845, 1932.
- WELLER, D. M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p. 379 – 407, 1988.
- WESSELS, J. G. H. Wall Growth, Protein Excretion and Morphogenesis in Fungi. **New Phytologist**, v.123, n. 3, p. 397 – 413. 1993.

- WHEELER, B. E. J.; MEPSTED, R. Pathogenic variability amongst isolates of *Crinipellis perniciososa* from cocoa (*Theobroma cacao*), **Plant Pathology**, v. 37, n. 4, p. 475 – 488, 1988.
- WHIPPS, J. M. Effect of media on growth and interaction between a range of soilborne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. **New Phytologist**, n. 107, p. 127–142, 1987.
- WHITAKER, J. R. Principles of enzymology for the food sciences; 2° ed, New York: Marcel Dekker, Cap.: **Introduction to the hydrolases**, p. 387 – 389, 1994.
- WIDDEN, P. Competition and the fungal community. In: Environmental and Microbial Relationships. **The Mycota IV** (D.T. Wicklow, B. Söderström, ed.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, p. 135 – 147, 1997.
- WILLIAMS, S. T.; VICKERS, J. C. The ecology of antibiotic production. **Microbial Ecology**, New York, v. 12, p. 43 – 52, 1986.
- WILLIAMS, D. L. Overview of (1→3)-β-D-Glucan immunobiology. **Mediators of Inflammation**, v. 6, n. 4, p. 247 – 250, 1997.
- WITKOWSKA, D.; MAJ, A. Production of lytic enzymes by *Trichoderma* spp. and their effect on the growth of phytopathogenic fungi. **Folia Microbiológica**, v. 47, n. 3, p. 279 – 282, 2002.
- WORTHINGTON ENZYME MANUAL. **Enzyme, enzyme reagents, related, biochemicals**. Freshold: Worthington Biochemical Corporation 1982. 215p.
- YAMADA, M. M.; ANDERBRAHN, T.; FURTEK, D. B. Genetic variability among isolates of *Crinipellis perniciososa* from solanaceous hosts and their relationship to isolates from *Theobroma cacao*. **Agrotrópica**, v. 10, p. 123 – 126, 1998.
- YANG, D. K.; WAN, H.; WANG, X. M.; LIU, Z. M. Use of fungal metabolites to protect wood-based panels against mould infection. **Biocontrol**, v. 52, p. 427 – 436, 2007.
- ZEILINGER, S.; OMANN, M. *Trichoderma* biocontrol: signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. **Gene Regulation and Systems Biology**, v. 1, p. 227 – 234, 2007.
- ZNIDARSIC, P.; PAVKO, A.; KOMEL, R. The growth form of the inducing microorganism and chitin addition affect mycolytic enzyme production by *Trichoderma harzianum*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 15, p. 397 – 400, 1995.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)