



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

Identificação e relações filogenéticas, potencial de uso de isolados de *Trichoderma* no controle do mofo branco e como promotores de crescimento do feijoeiro

Magno Rodrigues de Carvalho Filho

BRASÍLIA/DF

2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

Identificação e relações filogenéticas, potencial de uso de isolados de *Trichoderma* no controle do mofo branco e como promotores de crescimento do feijoeiro

Magno Rodrigues de Carvalho Filho

BRASÍLIA/DF

2013

MAGNO RODRIGUES DE CARVALHO FILHO

RELAÇÕES FILOGENÉTICAS, IDENTIFICAÇÃO E POTENCIAL DE USO DE ISOLADOS DE *TRICHODERMA* NO CONTROLE DO MOFO BRANCO E COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO DO FEJJOEIRO

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Fitopatologia.

Orientação:

Prof. Dra. Sueli Corrêa Marques de Mello, Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN).

BRASÍLIA

DISTRITO FEDERAL – BRASIL

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Carvalho Filho, Magno Rodrigues.

Relações filogenéticas, identificação e potencial de uso de isolados de *Trichoderma* no controle do mofo branco e como promotores de crescimento do feijoeiro

Magno Rodrigues de Carvalho Filho.

Brasília, 2013.

111

Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1. *Sclerotinia sclerotiorum*.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Título.

Tese de Doutorado realizada junto ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília sob orientação da Pesquisadora Dr^a Sueli Corrêa Marque Mello. Apoio institucional da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedicatória

“Dedico este trabalho aos meus queridos pais Magno Rodrigues de Carvalho e Laura Suely Mendes Rodrigues pelos ensinamentos e apoio em tudo em minha vida”

Agradecimentos:

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Brasília, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pela oportunidade de aperfeiçoamento, e aos professores Adalberto C. Café Filho, Carlos H. Uesugi, Cláudio L. Costa, José C. Dianese, Juvenil E. Cares, Luiz Eduardo B. Blum, e Marisa A.S.V. Ferreira, pelos valiosos ensinamentos.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela disponibilidade das instalações e recursos financeiros utilizados na realização deste trabalho.

À Dra. Sueli Corrêa Marques de Mello pela orientação e constante apoio, em todas as fases do meu doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos concedida.

À FAP-DF, pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

Ao Márcio Wandré, pela amizade e ajuda nas extrações de metabólitos realizadas no Laboratório de Semioquímicos.

À Universidade Católica de Brasília, em especial ao Departamento de Pós-Graduação, na pessoa do Dr. Octávio Luiz Franco, pelo acolhimento e liberdade na execução dos ensaios de purificação e identificação de metabólitos.

Ao Ludovico pelo auxílio na espectrometria de massa.

Ao Prof. Dr. Nelson Lima e ao Pesquisador Dr. Cledir Santos, da Universidade do Minho, pelo acolhimento, atenção e ensinamentos no uso da Técnica MALDI-TOF para indentificação de fungos.

Ao Dr. Robert Neil Gerard Miller, pelos ensinamentos em Biologia Molecular.

À estudante de Doutorado em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, Saluana Rocha Craveiro, pela preciosa ajuda no uso de aplicativos e análises genéticas.

Ao Dr. Tales pela grande amizade e conselhos.

À Kátia Medeiros pela confiança e amizade.

À Secretaria do Departamento de Fitopatologia, na pessoa do Sr. Ribamar Frazão, pela constante ajuda e amizade.

Aos amigos Irene Martins, João Batista Tavares e José Eustáquio Menêzes, do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela amizade, mensagens de otimismo e sugestões durante o desenvolvimento da pesquisa..

Aos amigos bolsistas do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Recursos Genéticos Biotecnologia, especialmente ao graduando Carlos Henrique Xavier, à mestranda Marcella Teles dos Reis e ao pós-doctorando Marcello Arrais de Lima, pelo precioso auxílio na execução dos ensaios.

A Msc. Joseane Padilha da Silva pela contribuição e ensinamentos durante as análises estatísticas.

Aos amigos que fiz em Portugal, Mayron Vasconcelos e Mônica Larucci pelo apoio, momentos de diversão, trabalho e grande amizade e, em especial, à Marília Maciel, pelo auxílio nos ensaios de MALDI-TOF.

À Sementes Produtiva em nome de Gustavo Stroschon, Gustavo Strochon e Vera Strochon pelas oportunidades, confiança e amizade; aos funcionários da fazenda Cereal Citrus, especialmente ao Cristiano, João Batista e Leonardo.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da **Professora Sueli Corrêa Marques de Mello**, com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da **Professora Sueli Corrêa Marques de Mello**, com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RELAÇÕES FILOGENÉTICAS, IDENTIFICAÇÃO E POTENCIAL DE USO DE ISOLADOS DE *TRICHODERMA* NO CONTROLE DO MOFO BRANCO E COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO DO FEIJOEIRO

Magno Rodrigues de Carvalho Filho

TESE APROVADA em __/__/____ por:

Prof. Dra. Sueli Corrêa Marques de Mello

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN)

(Orientadora/Presidente da Banca)

Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN)

(Membro da Banca/Examinador Externo)

Prof. Dr. Cirano José Ulhôa

Universidade Federal de Goiás (UFG)

(Membro da Banca/ Examinador Externo)

Prof. Dr. Adalberto Corrêa Café Filho
Universidade de Brasília (UnB)
(Membro da Banca/Examinador Interno)

Prof. Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum
Universidade de Brasília (UnB)
(Membro da Banca/Examinador Interno)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL

BRASIL

2013

ÍNDICE GERAL

RESUMO GERAL.....	01
GENERAL ABSTRACT.....	01
INTRODUÇÃO GERAL.....	03
OBJETIVO GERAL.....	05
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	05
REFERÊNCIAS TEÓRICO	06
REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
CAPÍTULO I – Diversidade, identificação molecular e ação antagônica de espécies de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	
Resumo.....	22
Abstract.....	22
Introdução.....	22
Material e Métodos.....	25
Resultados.....	31
Discussão.....	45
Conclusão.....	50
Referências Bibliográficas.....	50
CAPÍTULO II - Relações filogenéticas, identificação pela técnica MALDI TOF e potencial de isolados de <i>Trichoderma</i> no controle do mofo branco	
Resumo.....	60

Abstract.....	60
Introdução.....	61
Material e Métodos.....	64
Resultados.....	71
Discussão.....	79
Conclusão.....	84
Referências Bibliográficas.....	85

CAPÍTULO III - Purificação de metabolitos secundários de *Trichoderma asperellum* e efeitos inibidores sobre o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*

Resumo.....	89
Abstract.....	89
Introdução.....	90
Material e Métodos.....	91
Resultados.....	94
Discussão.....	105
Conclusão.....	108
Referências Bibliográficas.....	108

Resumo geral

Trichoderma constitui um gênero de microfungos mundialmente distribuído na natureza. Nos solos, estão presentes como microorganismos de vida livre ou colonizando raízes de plantas. Podem também colonizar endofiticamente os tecidos vegetais, como simbioses. Por apresentarem ação antagonista contra fitopatógenos, linhagens de diversas espécies desse gênero vem sendo estudadas como agentes de biocontrole de doenças de plantas, dentre as quais, o mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, em diversas espécies vegetais. A caracterização molecular desse grupo de antagonistas tem grande importância, tanto em estudos de biodiversidade e distribuição das espécies, como na identificação de potenciais agentes de biocontrole, e de possíveis patógenos oportunistas a humanos, a exemplo de *Trichoderma longibrachiatum*. O objetivo desse trabalho foi identificar 148 isolados em nível de espécie, por sequenciamento das regiões ITS do DNA ribossomal e avaliar a biodiversidade desses isolados com referência à origem geográfica. Foi realizada seleção *in vitro* de isolados com potencial de biocontrole, os quais foram avaliados, em casa de vegetação, quanto à capacidade de supressão do mofo branco e como promotores de crescimento do feijoeiro. Os 29 isolados selecionados foram também submetidos à técnica de MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry), para confirmação das espécies, correlacionando esta técnica de identificação com a técnica molecular empregada. Filtrados de culturas do isolado CEN201, com potencial de inibição do crescimento micelial do patógeno supracitado, foram submetidos a técnicas de extração e purificação de metabólitos secundários. A capacidade de inibição do crescimento micelial de *S. Sclerotiorum*, por esses compostos, foi confirmada. No capítulo 1 são relatados resultados desses estudos, mostrando que 17,4% dos isolados apresentaram alto nível de antagonismos em pareamento de culturas e dois grupos apresentaram 83,3 a 88,9% de inibição micelial do patógeno por metabólitos não voláteis. Outro ponto ressaltado nesta pesquisa foi o índice de biodiversidade relativa aos 144 isolados de *Trichoderma* procedentes de sete estados brasileiros, que alcançou 0,076 com 11 espécies. Já o capítulo 2 relata a supressão do mofo branco com 19 dos 29 isolados selecionados *in vitro* no capítulo 1. Observou-se, também, promoção de crescimento de plantas de feijão com 7 isolados estudados. Foram ainda mostrados os resultados obtidos na identificação dos isolados por espectrometria de massa (MALDI-TOF MS). Esses resultados, confrontados com os dados obtidos na identificação molecular verificada no capítulo anterior, indicaram a convergência das duas técnicas, confirmando o potencial de MALDI-TOF MS como método rápido para identificação de espécies de *Trichoderma*. O capítulo 3 está focado nos estudos com metabólitos não voláteis produzidos pelo isolado CEN201 (*T.asperellum*). As técnicas utilizadas, Cromatografia líquida e MALDI-TOF MS possibilitaram, por homologia de massa/carga, inferir a presença de dois compostos com ação antibiótica, Asperelina B e Trichocompactina, no filtrado de culturas estudado.

Palavras chave: Identificação molecular, seleção de agentes de biocontrole *in vitro*, promoção de crescimento, HPLC, purificação de metabólitos secundários, biodiversidade, MALDI-TOF MS, *Trichoderma*

General abstract

Trichoderma composes a genus of microfungi distributed worldwide. In soil, these fungi may be present as free life or colonizing plant roots. Can also to colonize plant tissues endophytically like symbionts. Some species have been studied as biocontrol

agents of plant diseases, among which, white mold caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in several plant species. Their mechanisms of action include the production of secondary metabolites with antibiotic effect, mycoparasitism and competition for space and nutrients. The molecular characterization of this group of antagonists is very important, both in studies of biodiversity and species distribution and for identification of potential biocontrol agents, and possible opportunistic pathogens to humans like *Trichoderma longibrachiatum*. The aim of this study was to identify 148 the isolates of *Trichoderma* on species level by sequencing the ITS region of Ribosomal and to evaluate their biodiversity with reference to geographical origin. Was performed, in vitro, selection of isolates with potential biocontrol, which were evaluated in greenhouse as the ability of white mold suppression and as beans growth promoters. The 29 selected isolates were also subjected to the technique of MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption / ionization-time of flight mass spectrometry) to confirm the species, correlating this technique in identification with molecular technique employed. Culture filtrates of isolate CEN 201, with potential to inhibit the mycelial growth of the pathogen above, were subjected to techniques of extraction and purification of secondary metabolites. The capacity of mycelial growth inhibition of *S. Sclerotiorum* by these compounds was confirmed. In chapter 1, are reported results of these studies showing that 17,4% of the isolates showed a high level of antagonism in pairing cultures and two groups showed 83,3 to 88,9% of inhibition of the pathogen by volatile metabolites. Another point emphasized in this study was the index of biodiversity on 144 *Trichoderma* isolates from seven Brazilian states, which reached 0,076 with 11 species. Already Chapter 2 reports the suppression of white mold with 19 of the 29 isolates selected in vitro in Chapter 1. It was observed, also, promote growth of bean plants with 7 isolates tested. Also shown are the results obtained by identification of the isolated mass spectrometry (MALDI-TOF MS). These results, compared with the data obtained in the molecular identification verified in the previous chapter showed the convergence of the two techniques, confirming the potential of MALDI-TOF MS as a rapid method for identification of *Trichoderma* species. The Chapter 3 is focused on studies of non-volatile metabolites produced by isolated CEN201 (*T.asperellum*). The techniques used, liquid chromatography and MALDI-TOF MS was enable, by homology mass/charge, to infer the presence of two compounds with antibiotic activity, Trichocompactin and Asperelin B in culture filtrates studied.

Key words: Molecular identification, selection of biocontrol agents *in vitro*, Promotion growth, HPLC, Purification of secondary metabolites, Biodiversity MALDI-TOF MS, *Trichoderma*.

Introdução Geral

O feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é, historicamente, um dos principais alimentos consumidos no Brasil e no mundo. Atualmente o consumo *per capita* de feijão vem apresentando leve aumento, e, em 2010 situou-se na ordem de 17,06 kg/habitante/ano. No Brasil, dados do Censo Agropecuário de 2006 atribuem à agricultura familiar quase 70% da produção nacional de feijão, o que reforça sua vocação para produção em pequena escala (IBGE, 2011).

O mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, vem se tornando um problema cada vez mais sério do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) no Brasil, independentemente do sistema de manejo da cultura utilizado, como sucessão cultural, plantio direto, ou mesmo rotação de cultura (Paula Júnior *et al.*, 2008).

Os fungicidas são a forma frequente de controle utilizada em campo, para controle do mofo branco. Em áreas altamente infestadas, podem ser necessárias várias aplicações em volume que supera o utilizado para herbicidas e inseticidas, onerando os custos da produção (Vinale *et al.*, 2008). Por outro lado, tais produtos, em muitos casos, não proporcionam resultados satisfatórios e, ao longo do tempo, contaminam o ambiente com resíduos tóxicos (Naseby *et al.*, 2000).

O desafio para os produtores no controle de doenças tem aumentado cada vez mais com a demanda por produtos livres de resíduos químicos tóxicos e pela percepção do público em geral sobre o impacto negativo das práticas utilizadas no controle de doenças, como o uso de agrotóxicos sobre a saúde dos seres humanos e sobre o meio ambiente. Tais pressões exercidas pela sociedade promoveram estabelecimento de políticas governamentais que restringem a utilização de agrotóxicos (GULLINO; KUIJPERS, 1994; RAGSDALE; SISLER, 1994). Desta forma, agricultores, bem como os pesquisadores começaram a considerar o uso de métodos alternativos no combate a

doenças (PUNJA; UTKHEDE, 2003).

Entre os antagonistas mais utilizados contra patógenos do solo, citam-se fungos do gênero *Trichoderma*, capazes de inibir o desenvolvimento de vários patógenos por mecanismos diversos, tais como competição, parasitismo direto, produção de metabólitos secundários de efeito antibiótico e enzimas líticas (Melo, 1998). Melhoria na absorção de nutrientes, indução de resistência e promoção de crescimento de plantas (Harman 2011) são também efeitos atribuídos aos micro-organismos utilizados no controle de diversas doenças de importantes culturas do mundo (Benitez *et al.*, 1998; Steyaert *et al.*, 2003).

A taxonomia de *Trichoderma* está em plena evolução e pode ser dividida em morfológica, molecular e pela técnica mais atual, espectrometria de massa pela MALDI-TOF MS. A identificação por morfologia é uma técnica morosa que gera muitas dificuldades devido à homoplasia de características morfológicas entre as formas anamórficas de *Trichoderma* (Chaverri e Samuels, 2003; Druzhinina et al, 2006).

A introdução de ferramentas moleculares resultou na expansão do número de espécies reconhecidas de *Trichoderma*. Cento e quatro espécies de *Trichoderma* estão listadas no site da Comissão Internacional sobre a Taxonomia de Fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Hypocrea* (Druzhinina e Kopchinskiy, 2008), e 193 taxa nomeados são representados até agora por seqüências depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=29859).

A técnica MALDI-TOF MS é uma ferramenta importante para fins taxonômicos, que envolve procedimento rápido, onde uma pequena amostra obtida por uma simples raspagem do fungo crescido no meio de cultura apropriado pode ser analisada (KELLER et al., 2008). Essa técnica baseia-se na análise de características fenotípicas,

que variam de acordo com meios de cultura e tempo de incubação (CARBONNELLE et al., 2011; VALENTINE et al., 2005).

Objetivo Geral

Face ao exposto, há necessidade de um controle eficaz do mofo branco na cultura de feijão e, para isso, a identificação de isolados de *Trichoderma* que apresentem potencial de biocontrole. Assim, o objetivo geral desse trabalho foi selecionar isolados de *Trichoderma*, provenientes de diferentes localidades do Brasil, por meio de experimentos *in vitro* e em casa de vegetação contra o patógeno *S. sclerotiorum* em feijoeiro comum. Objetivou-se também estabelecer a taxonomia molecular dos isolados estudados, por seqüenciamento dos genes ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal e comparar essa taxonomia com a taxonomia elaborada por MALDI TOF MS.

Referências Bibliográficas

Benitez T, Limón C, Delgado-Jarana J, Rey M (1998) Glucanolytic and other enzymes and their genes. *In: Trichoderma and Gliocladium – enzymes, biological control and commercial applications* (Harman, G.E.; Kubicek, C.P., eds). London, Taylor & Francis 2:101-27

Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti J, Ferroni A, Gutmann L, Nassif X (2011) MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry* 44:104-109

Chaverri P, Samuels G (2003) *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. *Studies in Mycology* 48:1-116

Druzhinina I S, Kopchinskiy A. Kubicek CP (2006) The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47:55-64

Druzhinina I, Kopchinskiy A. (2008). International Subcommittee on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy. *ISTH*. Available from: <http://isth.info/biodiversity/index.php>

IBGE, (2011) Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. <http://www.sidra.ibge.gov.br>.

Gullino ML, Kuijpers LAM (1994) Social and political implications of managing plant

diseases with restricted fungicides in Europe. *Phytopathology* 32:559-579

Harman GE (2011) Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytologist* 189:647-649

Keller BO, Sui J, Young AB, Whittall RM (2008) Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 627:71-81

Naseby DC, Pascual JA, Lynch JM (2000). Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* population, soil microbial communities and soil enzyme activities. *Journal of Applied Microbiology* 88:161-169

Paula Júnior TJ et al. (2008) Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central brasileira: 2007-2009. EPAMIG-CTZM, Viçosa

Punja ZK, Utkhede RS (2003) Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology* 21:400-407

Ragsdale NN, Sisler HD (1994) Social and political implications of managing plant diseases with decreased availability of fungicides in the United States. *Annual Review of Phytopathology* 32:545-557

Steyaert JM, Ridgway HJ, Elad Y, Stewart A (2003) Genetic basis of mycoparasitism: a mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. *New Zeal J Crop Hortic Sci* 31:281-291

Valentine N, Wunschel S, Wunschel D, Petersen C, Wahl K (2005) Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology* 71:58-64

Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Woo SL, Lorito M (2008) *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40:1-10

Melo IS (1998) Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. (Ed.) Controle biológico. Jaguariúna: Embrapa

REFERENCIAL TEÓRICO

O gênero *Phaseolus* (Fabaceae) é originário das Américas onde a espécie mais importante é representada por *Phaseolus vulgaris* tem grande destaque por ser a mais antiga em cultivo e também por estar presente nos cinco continentes (Yokoyama & Stone, 2000).

O gênero *Phaseolus* contém cerca de uma cinquenta e cinco espécies, mas apenas *P. vulgaris* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* Gray var. *latifolius* Freeman e *P. lunatus* var. *lunatus* são cultivadas comercialmente. Dessas, o feijoeiro comum *P. vulgaris*, é a espécie de maior importância econômica, contribuindo com cerca de 95% da produção mundial de feijão (Mariot, 1989).

O feijoeiro-comum é, historicamente, um dos principais alimentos consumidos no Brasil e no mundo. Atualmente o consumo *per capita* vem apresentando leve aumento, e, em 2010 situou-se na ordem de 17,06 kg/habitante/ano. No Brasil, dados do Censo Agropecuário de 2006 atribuem à agricultura familiar quase 70% da produção nacional do feijoeiro-comum, o que reforça sua vocação para produção em pequena escala (IBGE, 2011). Seu cultivo ocorre em 121 países em todo o mundo, com produção em torno de 20,7 milhões de toneladas, em área de 25,6 milhões de hectares. Na safra 2010/2011, o Brasil produziu 3,8 milhões de toneladas em 3,9 milhões de hectares, com uma produtividade média de 975 kg/ha (IBGE, 2011).

Devido à grande diversidade de ecossistemas utilizados no cultivo do feijoeiro, a planta é exposta a várias doenças, dentre as quais, merecem destaque as causadas por fungos habitantes do solo, tais como *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, entre outras. Essas doenças podem ser responsáveis por até 100% de perdas na produção (Barbosa e Gonzaga 2012).

O mofo branco, causado pelo fungo *S. sclerotiorum* De Bary (Lib.), possui amplo círculo de hospedeiros. No feijoeiro, a doença pode afetar toda parte aérea, causando lesões inicialmente pequenas e aquosas, que rapidamente aumentam de tamanho, tomando todo o órgão afetado. Com o avanço da doença, as partes afetadas perdem a cor, tornando-se amareladas e depois marrons, produzindo uma podridão mole nos

tecidos. Sob condições de umidade, desenvolve-se o micélio branco e cotonoso característico do fungo. A podridão mole provoca morte de ramos. Nesta fase, formam-se os escleródios, inicialmente brancos, tornando-se negros quando maduros. Vagens afetadas podem conter escleródios e as sementes infectadas são descoloridas ou recobertas pelo micélio branco, podendo ser menores que o normal (Boland e Hall 1994, Kimati et al. 2005, Agrios 2005).

O fungo *S. sclerotiorum* pertencente ao Filo Ascomycota, produz apotécios de 2-10 mm de diâmetro, com formato chato a côncavo quando jovens. Os ascos são cilíndricos, medindo 7 a 10 µm de diâmetro por 112 a 156 µm de comprimento. Os ascósporos são elipsoides, hialinos, com dimensões de 4-6 x 9-14 µm. O patógeno forma escleródios pretos irregulares, com 2-15 x 2-30 mm, os quais podem germinar e produzir micélio ou apotécios. O fungo coloniza órgãos da planta or meio de ascósporos e micélio. Os escleródios germinam e produzem apotécios. Temperaturas entre 11-20°C e solo úmido por mais de uma semana são condições propícias para tal. Clima frio e úmido, em lavouras adensadas, promovem condições para que os apotécios permaneçam esporulando por 5-10 dias. Os ascósporos são ejetados, aderindo se a maioria à parte aérea das plantas. Porém, alguns podem ser levados pelo vento a vários metros de distância (Kimati et al. 2005)

A doença desenvolve-se numa faixa de temperatura entre 5-30°C, principalmente ao redor de 25°C. O patógeno penetra pela cutícula do hospedeiro e desenvolve-se inter e intracelularmente, causando podridão mole e aquosa. Os escleródios sobrevivem no solo por 6 a 8 anos. A disseminação do fungo ocorre por transporte aéreo dos ascósporos e transporte dos escleródios pelas sementes e água de irrigação. Sementes infectadas desempenham papel importante na infestação de novas áreas. *S. sclerotiorum*

pode sobreviver, como micélio dormente, por 03 anos em sementes infectadas (Kimati et al. 2005, Agrios 2005)

O controle do mofo branco pode ser realizado pelo manejo cultural, controle químico e controle biológico. Recomenda-se procurar condições que aumentem a aeração da lavoura, facilitando a circulação do ar e a penetração dos raios solares. Assim, espaçamentos maiores, menor densidade de semeadura e cultivares com porte ereto e arquitetura aberta são medidas importantes. O uso de fertilizantes nitrogenados deve ser feito com moderação para evitar crescimento excessivo e entrelaçamento das plantas, o que aumenta a umidade. O controle químico é o método mais usado para o controle do mofo branco. Entretanto, o controle biológico também contribui para minimizar o avanço da doença (Kimati et al. 2005). Recentemente, muito esforço tem sido empreendido para a aplicação de fungos do gênero *Trichoderma* no controle de doenças, diretamente na lavoura ou como tratamento de sementes. *Trichoderma* spp. (Ascomycota, Hypocreales) podem atuar também como promotores de crescimento (Akladios e Abbas, 2012)

O conceito de controle de doenças vem mudando nas últimas décadas vem mudando com a conscientização da sociedade a respeito dos efeitos secundários causados pelo uso intenso dos agrotóxicos, buscando-se a segurança alimentar e a preservação do ambiente e da saúde dos trabalhadores. Esse fato vem favorecendo o controle biológico, juntamente com outras táticas ambientalmente corretas.

Cook e Baker (1983) conceituam controle biológico como redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, pelo uso de um ou mais organismos, realizado naturalmente ou através da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista ou, ainda, pela introdução em massa de um ou mais antagonistas.

Os componentes do controle biológico de plantas são os patógenos, os hospedeiros e os antagonistas, interagindo num sistema biológico, onde todos sofrem isolada ou conjuntamente influências do ambiente (Bettiol 1991). O aspecto mais importante a ser considerado, qualquer seja a estratégia utilizada de controle, é que esses agentes biológicos constituem alternativa viável para diminuir o potencial de inóculo de patógenos habitantes do solo, sem trazer danos ao meio ambiente (Mello et al. 2007).

Espécies do gênero *Trichoderma*, compreendem um grande número de variantes de fungos com importância principalmente como agentes de controle biológico. *Trichoderma* é um habitante natural do solo encontrado em todos os ecossistemas, colonizador de raízes; tem a capacidade de empregar diversos mecanismos que resultam no biocontrole de doenças tais como antibiose, micoparasitismo, competição e indução de resistência. Mais de um desses mecanismos é utilizado para exercer o biocontrole de doenças (Bettiol e Ghini, 1995; Harman et al. 2004; Rosa e Herrera 2009; Viterbo e Horwitz, 2010, Consolo et al. 2012). Além da importância agrônômica, fungos do gênero *Trichoderma* atuam como decompositores primários de matéria orgânica. Eles se destacam pelo rápido crescimento, esporulação profusa, capacidade de crescimento em diferentes substratos e tolerância a compostos nocivos (Kubicek et al. 2003, Howell 2003, Harman et al. 2004).

Os mecanismos utilizados por espécies de *Trichoderma* para reconhecer e controlar os fungos fitopatogênicos são essenciais para a manutenção do controle biológico. Antagonistas desse gênero utilizam basicamente quatro mecanismos de ação no controle de fitopatógenos: micoparasitismo, antibiose, competição e a indução de mecanismos de defesa da planta (Van Driesche & Bellows, 1996).

O micoparasitismo é uma forma comum de associação entre organismos, por meio do qual se estabelecem relações nutricionais favoráveis à existência do micoparasita, que pode ser principalmente: necrotrófica – o micoparasita mata o hospedeiro pelo contato direto, absorvendo seu conteúdo celular como fonte de nutrição; biotrófica – o micoparasita obtém nutrientes das células (Inbar e Chet 1992; Cassiolato 1998). De acordo com Benítez et al. (2004), o micoparasitismo como ação direta de um fungo contra outro fungo compreende um complexo processo que envolve eventos sequenciais, incluindo reconhecimento, ataque e a subsequente penetração, seguida de morte do hospedeiro.

Antibiose é um mecanismo no qual os antagonistas interagem com outros microorganismos e secretam metabólitos voláteis ou não voláteis que podem ser capazes de inibir ou impedir o desenvolvimento de outros organismos de espécies diferentes. A produção desses compostos tóxicos é importante para a sobrevivência de microorganismos por meio da eliminação da concorrência microbiana, acarretando maior disponibilidade de fontes de alimento que geralmente são escassas no solo (Benítez et al. 2004; Velusamy et al., 2006; Amorim et al. 2011). Acredita-se que a antibiose é o mecanismo mais eficaz no controle das doenças de plantas. Embora Weindling e Emerson (1936) tenham isolado substâncias antifúngicas de *Trichoderma virens*, Dennis e Webster (1971) foram os primeiros a descrever as propriedades tóxicas de compostos voláteis e não voláteis capazes de inibir o crescimento micelial fúngico. Desde então vários metabolitos foram identificados e avaliados seus efeitos inibitórios para inúmeras espécies de fungos (Howell 2003; El-hassan et al. 2006; Reino et al. 2008).

Competição é considerada um dos mais eficientes mecanismos de ação utilizados por *Trichoderma*. Baseia-se no fato de que os microorganismos competem uns com os

outros para obter fontes a base de carbono, nitrogênio, oxigênio, ferro e outros micronutrientes. Aqueles mais eficientes em usar os recursos disponíveis se multiplicam e colonizam rapidamente a rizosfera. Provavelmente esse mecanismo seja a forma mais comum no controle biológico (Chet et. al, 1997; Jacobs e Gray, 2003). A competição por espaço ou sítios de infecção poderá ocorrer concomitantemente contribuindo para a atividade de biocontrole (Vinale et. al., 2008).

A indução de resistência é outro mecanismo de controle biológico no qual a planta responde à agressão por patógenos por meio da produção de fitoalexinas, lignina adicional nas células e compostos fenólicos (Horsfall e Cowling, 1980; Bailey, 1985). Tais respostas também podem ocorrer ao contato com outros organismos não patogênicos ou isolados não virulentos do patógeno (Van Driesche & Bellows, 1996).

Além dos conhecidos efeitos de *Trichoderma* spp. no controle de patógenos de plantas, ao longo dos estudos tem sido observado que certas linhagens de *Trichoderma* tem a capacidade de se estabelecerem na rizosfera e estimularem diretamente o crescimento vegetal. Assim, estes fungos vêm se destacando como agentes promotores de crescimento em plantas e aumento da germinação de sementes (Howell *et al.* 2003; Benítez *et al.* 2004; Akladious e Abbas, 2012). Entre outras vantagens, algumas espécies de *Trichoderma* tornaram-se resistentes a fungicidas quando expostos a estes; tais linhagens resistentes, quando antagônicas a um patógeno particular, podem ser empregadas juntamente com fungicidas para controle de doenças (Harman, 2004 e 2006; Kumar et al. 2012) .

Outra característica relevante na aplicação de *Trichoderma* no biocontrole de doenças é seu isolamento como endofíticos (Photita *et al.* 2001; Harman *et al.* 2004; Baylei *et al.* 2006, 2008; Sebastines, 2010; Druzhinina *et al.* 2011). De Jaeger *et al.* (2010) relataram que *Trichoderma* spp. tem a capacidade de utilizar o micélio de fungos

micorrízicos na parte externa de raízes de batata (*Solanum tuberosum*) para penetrarem nas raízes da planta, sugerindo assim que características ligadas à micotrofia facilitaram a evolução do endofitismo.

Plantas normalmente suscetíveis a um determinado patógeno podem desenvolver reações de defesa e exibir maior resistência à infecção como resultado à exposição prévia a stress físico, ou em resposta a tratamentos com diferentes compostos, moléculas elicitoras ou micro-organismos (Montesano et al, 2003, Fontenelle et al. 2011). Esse mecanismo é conhecido como resistência adquirida ou resistência sistêmica induzida. A sinalização de moléculas de ácido salicílico (Clarke et al, 1998, Pieterse et al, 1998), ácido jasmônico e etileno, levando eventualmente a um arsenal de respostas de defesa contra os invasores de plantas (Fontenelle et al. 2011). Assim, isolados de *Trichoderma* também são capazes de proporcionar às plantas a indução de resistência biótica e abiótica. O processo de ativação desse tipo de resistência inicia-se com a colonização das raízes das plantas por este fungo. Isolados de *Trichoderma* capazes de estabelecer tais interações, induzem mudanças no metabolismo do transcriptoma na planta, o que leva à acumulação de compostos antimicrobianos, fornecendo resistência a uma grande variedade de microorganismos patogênicos (Brotman et al., 2010). A colonização radicular por fungos no gênero *Trichoderma* frequentemente aumenta o crescimento e desenvolvimento da raiz, incrementa produtividade das culturas, induz a resistência a estresses abióticos e auxilia na absorção e utilização de nutrientes (Harman et al., 2004).

A taxonomia de *Trichoderma* está em plena evolução e pode ser estabelecida com base em critérios morfológicos, moleculares e, mais recentemente, por espectrometria de massa de células intactas.

Por muitos anos, desde que o gênero *Trichoderma* foi descrito pela primeira vez por Persoon em 1754, o gênero foi frequentemente presumido como uma única espécie, *T. viride*. Rifai (1969) em sua classificação para o gênero, reconheceu nove espécies: *T. viridi* Persoon, *T. aureoviride* Rifai, *T. koningii* Lieckfeldt, *T. harzianum* Rifai, *T. longibrachiatum* Bisset, *T. polysporum* Link e *T. glaucum* Rifai. Ao estudar a discriminação das espécies delimitadas por Rifai, Bisset (1991a,b) propôs o termo “seções” para separar espécies similares dentro das nove espécies originalmente aceitas até então. De acordo com esse sistema taxonômico, os fungos do gênero *Trichoderma* estão distribuídos em cinco seções: *Trichoderma*, *Longibrachiatum*, *Saturnisporum* e *Pachybasium*. Entretanto, esse conceito resultou em identificações de espécies enganosas que são até hoje evidenciadas. A espécie tipo *T. viride* é uma espécie relativamente rara que de modo frequente é citado como agente de controle biológico em outras regiões, embora essa espécie seja relativamente restrita a regiões da Europa e América do Norte (Jacklist et al., 2006). De modo semelhante, o amplo relato de *T. aureoviride* parece ter uma distribuição limitada ao Norte da Europa (Lieckfeldt et al., 2001).

A identificação por morfologia é uma técnica morosa que gera muitas dificuldades devido à homoplasia de características morfológicas entre as formas anamórficas de *Trichoderma* (Chaverri e Samuels, 2003; Druzhinina et al, 2006). Para compensar a falta de caracteres morfológicos, a pesquisa em biodiversidade de *Trichoderma*, ao longo dos últimos 20 anos, tem se concentrado no desenvolvimento de uma variedade de marcadores para diferenciar espécies, incluindo isoenzimas, RAPD, RFLP, AFLP e, mais recentemente, as sequências de nucleotídeos de locos gênicos diferentes (Hoyos-Carvajal e Bisset, 2011).

A introdução de ferramentas moleculares resultou na expansão do número de espécies reconhecidas de *Trichoderma*. Cento e quatro espécies de *Trichoderma* estão listadas no site da Comissão Internacional sobre a Taxonomia de Fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Hypocrea* (Druzhinina e Kopchinskiy, 2008), e 193 taxa nomeados são representados até agora por seqüências depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=29859).

A técnica MALDI-TOF MS é uma ferramenta importante para fins taxonômicos, onde uma pequena amostra obtida por uma simples raspagem do fungo crescido no meio de cultura apropriado pode ser analisada (Keller et al., 2008). Essa técnica baseia-se na análise de características fenotípicas, que variam de acordo com meios de cultura e tempo de incubação (Carbonnelle et al., 2011; VALENTINE et al., 2005). A preparação da amostra também é um fator importante para que haja uma análise de qualidade, onde as colônias utilizadas devem ser jovens, pois com o aumento do tempo de cultivo ocorre a degradação das proteínas ribossomais, levando a uma análise menos eficiente (Wieser et al., 2012). Essa ferramenta vem sendo utilizada na detecção e identificação de proteínas por meio da massa molecular, chegando à identificação de microorganismos (Wittwer et al., 2011; Barbuddhe et al., 2008; Hsieh et al., 2008; Vanlaere et al., 2008). A identificação de microorganismos pela técnica do MALDI-TOF MS é realizada levando em consideração os espectros, que variam entre os microorganismos, e alguns espectros são específicos componentes moleculares para determinados gêneros e espécies. Vários estudos de identificação de fungos têm aplicado esta ferramenta, considerada rápida, sensível e de pequenos custos de reagentes, onde uma boa discriminação tem sido obtida na maioria dos casos, embora ocorram custos elevados na instrumentação. (Bille et al., 2012; De Carolis et al., 2012;

Alanio et al., 2010; De Respinis et al., 2010; Marinach-Patrice et al., 2010; Tonolla et al., 2010).

A espectrometria de massa teve origem com os trabalhos realizados por J. J Thomson e F. W. Aston (Griffiths et al., 2001). O espectrômetro de massas possui alto grau de precisão e sensibilidade na determinação da massa molecular de compostos biológicos e químicos (Poland et al., 2001). É no espectrômetro de massas que ocorre a ionização da molécula, passagem por um analisador de massas, onde ocorrerá a separação dos íons formados de acordo com a razão massa-carga (m/z) e registros da abundância relativa de cada um dos íons para obtenção de um espectro de massa (Graham et al., 2007; Bonner et al., 2002).

Referências Bibliográficas

Agrios GN (2005) Plant pathology. Academic Press, New York

Akladios AS, Abbas SM, (2012) Application of *Trichoderma harziunum* T22 as a biofertilizer supporting maize growth. African Journal of Biotechnology 11:8672-8683

Alanio A, Beretti JL, Dauphin B, Mellado E, Quesne G, Lacroix C, Amara A, Berche P, Nassif X, Bougnoux ME (2011) Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. Clinical Microbiology and Infection 17:750-755

Amorin L, Rezende J A M, Bergamin Filho A. (2011) Manual de Fitopatologia. v. I, 4. Ed, p. 383-387, Piracicaba: Agronômica Ceres

IBGE, 2011. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola.
<http://www.sidra.ibge.gov.br>.

Bailey JA (1985). Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions. Springer-Verlag, Berlin, German

Barbuddhe SB, Maier T, Schwarz G, Kostrzewa M, Hof H, Domann E, Chakraborty T, Hain T (2008) Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Applied and Environmental Microbiology 74:5402-5407

Barbosa FB, Gonzaga ACO (2012) Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014. Embrapa Arroz e Feijão, Documentos 272

Bettiol W (1991) Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol, W. (Org.) Controle Biológico de Doenças de Plantas. Jaguariúna. Embrapa - CNPMA.

Bettiol W, Ghini R (1995) Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. Ceres. 3 ed. São Paulo.

Bille E, Dauphin B, Leto J, Bougnoux ME, Beretti JL, Lotz A, Suarez S, Meyer J, Join-Lambert O, Descamps P, Grall N, Mory F, Dubreuil L, Berche P, Nassif X, Ferroni A (2012) MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, *Aspergillus* spp. and positive blood cultures. *Clinical Microbiology and Infection* 18:1117-1125

Bisset J (1991a) A revision of the genus *Trichoderma* II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany* 68:2357-2372

Bisset J (1991b) A revision of the genus *Trichoderma* III. Section *Pachybasium* sect. nov. *Canadian Journal of Botany* 69:2373-2417

Bolland GJ, Hall R (1994) Index of plants of hostes *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal Plant Pathology* 16:93-108

Bonner PLR, Lill JR, Hill S, Creaser CS (2002) Ress, R. C. Electrospray mass spectrometry for the identification of MHC class I-associated peptides expressed on cancer cells. *Journal of Immunological Methods* 262:5-19

Brotman Y, Gupta JK, Viterbo A, (2010) *Trichoderma*. *Curr. Biol.* 20:390-391

Cassiolato AMR (1998) Ecologia de fungos fitopatogênicos formadores de escleródios. In: Melo IS, Azevedo JL. *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna. Embrapa – CNPDA

Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti J, Ferroni A, Gutmann L, Nassif X (2011) MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry* 44:104-109

Chaverri P, Samuels G (2003) *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. *Studies in Mycology* 48:11-16

Chet I., Inbar J., Hadar I. (1997). Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow DT, Soderstrom B (eds) *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. Springer-Verlag, Berlin

Clarke JD, Liu Y, Klessig DF, Dong X (1998) Uncoupling PR gene expression from NPR1 and bacterial resistance: characterization of the dominant *Arabidopsis* cpr6-1 mutant. *The Plant Cell* 10:557-569

Cook RJ, Baker KF (1983) The nature and practice of biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Society. Minnesota. U.S.A.

Consolo VF, Monaco CI, Cordo CA, Salerno GL (2012) Characterization of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28:1389-1398

De Carolis E, Posteraro B, Lass-Flörl C, Vella A, Florio AR, Torelli R, Girmenia C, Colozza C, Tortorano AM, Sanguinetti M, Fadda G (2012) Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection* 18:475-484

De Respini S, Vogel G, Benagli C, Tonolla M, Petrini O, Samuels GJ (2010) MALDI-TOF MS of *Trichoderma*: a model system for the identification of microfungi. *Mycological Progress* 9:79-100

De Jaeger N, Declerck S, De la Providencia IE (2010). Mycoparasitism of arbuscular mycorrhizal fungi: a pathway for the entry of saprotrophic fungi into roots. *FEMS Microbiology Ecology* 73:312-322

Dennis C, Webster J (1971) Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. *Transactions British Mycological Society* 57:363-369

Druzhinina I S, Kopchinskiy A. Kubicek CP (2006) The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47:55-64

Druzhinina I, Kopchinskiy A. (2008). International Subcommittee on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy. *ISTH*. Available from: <http://isth.info/biodiversity/index.php>

Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, *et al.* (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews – Microbiology* 9:749-759

El-Hasan A, Walker F, Schöne J, Buchenauer H (2006) Antagonistic effect of 6-pentyl- α -pyrone produced by *Trichoderma harzianum* toward *Fusarium moniliforme*. *Journal of Plant Diseases and Protection* 114:62-68

Fontenelle ADB, Guzzo SD, Lucon CMM, Harakava R (2011) Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. *Crop Protection* 30:1492-1500

Graham RLJ, Graham C, McMullan G (2007) Microbial proteomics: a mass spectrometry primer for biologists. *Microbial Cell Factories* 6:26-40

Griffiths WJ, Jonsson AP, Liu S, Rai DK, Wang Y (2001) Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochemical Journal* 355:545-561

Grigoletti Junior A, Santos AF, Auer CG (200) Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. *Revista Floresta* 30:155-165

Hsieh SY, Tseng CL, Lee YS, Kuo AJ, Sun CF, Lin YH, Chen JK (2008) Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS. *Molecular and Cellular Proteomics* 7:448-456

Keller, BO, Sui j, Young AB, Whittall R M (2008) Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 627:71-81

Kimati H, Amorim L, Bergamin filho A, Camargo LEA, Rezende JAM (2005) Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas. Ceres, São Paulo

Kubicek CP, Bissett J, Druzhinina I, Kullnig-Gradinger C, Szakacs G (2003) Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South East Asian isolates. *Fungal Genetics Biology* 98:310-319

Kumar DP, Thenmozhi R, Anupama PD, Nagasathya A, Thajuddin N, Paneerselvam A (2012) Selection of potential antagonistic *Bacillus* and *Trichoderma* isolates from tomato rhizospheric soil against *Fusarium oxysporum* F. sp. *Lycoperscisi*. *J. Microbiol. Biotech Res* 2:78-89

Harman GE (2004) *Trichoderma* – not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica* 39:103-108

Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E (2012) Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its Genes. *Microbiology* 158:17-25

Horsfall JG, Cowling EB (1980). *Plant Disease: An Advanced Treatise. Vol. 2. How Diseases Develop in Populations.* Academic Press, New York

Hoyos-Carvajal L, Bissett J. (2011) Biodiversity of *Trichoderma* in Neotropics, The Dynamical Processes of Biodiversity - Case Studies of Evolution and Spatial distribution. ISBN:978-953-307-772-7

Howell CR (2003) Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts, *Plant Disease* Vol. 87 No. 1

Inbar J, Chet L. (1992). Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon fibers. *J Bacteriol* 74:1055-1059

Jacobs H., Gray S.N. (2003). Crump DH Interactions between nematophagous fungi and consequences for their potential as biological agents for the control of potato cyst nematodes. *Mycol Res* 107:47-56

Jaklitsch W, Samuels G, Dodd S, Lu B, Druzhinina I. (2006) *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Studies in Mycology*. 56:135-177

Lieckfeldt E, Kullnig C, Kubicek C, Samuels G. (2001). *Trichoderma aureoviride*: phylogenetic position and characterization. *Mycological Research* 105:313-322

Marinach-Patrice C, Lethuillier A, Marly A, Brossas JY, Gené J, Symoens F, Datry A, Guarro J, Mazier D, Hennequin C (2009) Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. *Clinical Microbiology and Infection* 15:634-642

Mello SCM, Ávila ZR, Braúna LM, Pádua RR, Gomes D (2007) Cepas de *Trichoderma* spp., para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* SACC. *Fitosanidad* 11:3-9

Mariot, EJ (1989) Ecofisiologia do Feijoeiro. In: IAPAR, ed. O feijão no Paraná. Londrina: IAPAR, IAPAR. Circular, 63

Montesano M, Brader G, Palva ET (2003) Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Mol. Plant Pathol* 4:73-79

Photita W, Lumyong S, Lumyong P, Hyde K (2001) Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. *Mycological Research* 12:1508-1513

Pieterse CMJ, Wees SCM, Pelt JA, Knoester M, Laan R, Gerrits H, Weisbeek PJ, Loon LC (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10:1571-1580

Poland GA, Ovsyannikova IG, Johnson KL, Naylor S (2001) The role of mass spectrometry in vaccine development. *Vaccine* 19:17-19

Reino JL, Guerrero RF, Hernández-Gala R, Collado IG (2008) Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews* 7:89-123

Rifai MA (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*.

Rosa DR, Herrera CJL (2009) Evaluation of *Trichoderma* sp. as biocontrol agents against avocado root rot. *Biological Control* 51:66-71

Sebastines FLS (2010) Diversidade genética e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de maguezaís do estado de São Paulo. Tese de doutorado em Ciências, concentração Genética e Melhoramento de Plantas pela ESALQ, Piracicaba, SP, Brasil

Tonolla M, Benagli, C, Rossi V, Fragoso C, Petrini O (2010) MALDI-TOF MS: a new laboratory option for the diagnosis of clinical infections. *Pipette*.

Van Driesche RG, Bellows JR, (1996) *Biological Control*. Ed. Chapman & Hall, London.

Valentine N, Wunschel S, Wunschel D, Petersen C, Wahl K (2005) Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology* 71:5-64

Velusamy P, Immanuel JE, Gnanamanickam SS, Thomashow L. (2006). Biological control of rice bacterial blight by plant-associated bacteria producing 2,4-diacetylphloroglucinol. *Can J Microbiol* 52:56-65

Vanlaere, E, Sergeant K, Dawyndt P, Kallow W, Erhard M, Sutton H, Dare D, Samyn B, Devreese B, Vandamme P (2008) Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of intact cells allows rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex species. *Journal of Microbiological Methods*, 75:279-286

Viterbo A, Horwitz BA (2010) Mycoparasitism. *In: Borkovich K, Ebbole D (ed.) Cellular and molecular biology of filamentous fungi*. ASM Press, Washington, DC

Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Woo SL, Lorito M (2008) *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40:1-10

Yokoyama, LP, Stone, FL (2000) *Cultura do Feijoeiro no Brasil: Características de Produção*. 1ª Ed. Vol. Único. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA

Yokoyama LP (2003) *Cultivo do Feijoeiro Comum: Importância Econômica*. <http://migre.me/7oqbv>

Weindling R, Emerson OH (1936) The isolation of a toxic substance from the culture filtrate of *Trichoderma*. *Phytopathology* 26:1068-1070

Wieser A, Schneider, L, Jung J, Schubert S (2012) MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology* 93:965-974

Wittwer M, Heim J, Schär M, Dewarrat G, Schürch N (2011) Tapping the potential of intact cell mass spectrometry with a combined data analytical approach applied to *Yersinia* spp.: Detection, differentiation and identification of *Y. pestis*. *Systematic and Applied Microbiology* 34:12-19

Capítulo I

Identificação com base no perfil molecular, ação antagonística e diversidade de *Trichoderma* spp. contra *Sclerotinia sclerotiorum*

Resumo: O gênero *Trichoderma* compreende um grande número de espécies e linhagens fúngicas que podem ser utilizadas como agentes de biocontrole contra *Sclerotinia sclerotiorum* por diversos tipos de mecanismos, tais como: metabólitos não voláteis, micoparasitismo e competição por espaço e nutrientes. A caracterização molecular desse grupo de antagonistas tem grande importância para a condução de estudos na área da biodiversidade e para identificação de possíveis isolados patogênicos à humanos como é o caso do *Trichoderma longibrachiatum*. Nesse estudo, observou-se o antagonismo de 148 isolados de *Trichoderma* por metabólitos não voláteis e pelo pareamento de culturas contra *Sclerotinia sclerotiorum*. Assim, verificou-se que 17,4% dos isolados apresentaram alto nível de antagonismos em pareamento de culturas e dois grupos apresentaram 83,3 a 88,9% de inibição micelial do patógeno por metabólitos não voláteis. Outro ponto verificado nesse estudo foi o índice de biodiversidade de 144 isolados de *Trichoderma* isolados de sete estados brasileiros que alcançou 0,076 com 11 espécies, entre elas, a espécie *Trichoderma longibrachiatum*, relatada como possível patógeno humano.

Palavras chave: Identificação, perfil molecular, Análise filogenética, *Trichoderma*, seleção de agentes de biocontrole *in vitro*.

Abstract

The genus *Trichoderma* comprises a large number of species and isolates to act as biocontrol agents against *Sclerotinia sclerotiorum* by various types of mechanisms, including non-volatile metabolites, mycoparasitism and competition for space and nutrients. The molecular characterization of this group of antagonists is of great importance for conducting studies in biodiversity and to identify potential pathogenic isolates to humans, as is the case of *Trichoderma longibrachiatum*. In this study, we observed antagonism of 148 isolates of *Trichoderma* by non-volatile metabolites and dual cultures against *Sclerotinia sclerotiorum*. Thus, was showing that 17,4% of the isolates showed a high level of antagonism in dual cultures and two groups showed 83,3 to 88,9% of mycelial inhibition of the pathogen by non-volatile metabolites. Another point observed during the research was the biodiversity index of 144 *Trichoderma* isolates from 7 Brazilian states which reached 0,076 with 11 species, including *T. longibrachiatum*, eventually reported as pathogenic to humans with depressed immune systems.

Palavras chave: Identification, molecular profile, phylogenetic analysis, *Trichoderma*, selection of biocontrol agents *in vitro*.

Introdução

Espécies pertencentes ao gênero *Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales) compreendem um grande número de variantes economicamente importantes, principalmente como agentes de controle biológico. Esses microorganismos podem

habitar a rizosfera ou comportar como endofíticos em plantas devido à sua habilidade de se beneficiar e ao mesmo tempo proporcionar benefícios às plantas em interações diretas com estas. *Trichoderma* é um habitante natural do solo encontrado em todos os ecossistemas, alguns sendo eficientes colonizadores de raízes, além de possuírem a capacidade de empregar diversos mecanismos que resultam no biocontrole de doenças. Esses mecanismos podem ser exemplificados como antibiose, micoparasitismo, competição e indução de resistência. Mais de um desses mecanismos podem simultaneamente, estar envolvido no biocontrole de agentes fitopatogênicos (Bettiol e Ghini, 1995; Harman et al. 2004; Rosa e Herrera 2009; Viterbo e Horwitz, 2010, Consolo et al. 2012). Entretanto, o aspecto mais importante a ser considerado, qualquer seja a estratégia utilizada, é que esses agentes biológicos constituem uma alternativa viável para diminuir o potencial de inóculo de patógenos habitantes do solo, sem trazer danos ao meio ambiente (Mello et al. 2007). Desse modo, fungos do gênero *Trichoderma* são conhecidos por seus importantes benefícios para a agricultura, na medida em que protegem as culturas contra doenças e aumentam o rendimento das culturas em condições de campo (Harman et al. 2004).

Inúmeras espécies de *Trichoderma* têm sido descritas como potenciais biocontroladores de fitopatógenos habitantes do solo (Chet, 1987), dentre os quais, *Sclerotinia sclerotiorum* de Bary (lib.), conforme indicado por vários autores (Lobo Junior e Abreu, 2000; Louzada et al., 2009; Figueiredo et al., 2010; Haggag e Mohamed, 2011). Esse fungo é o agente causador do mofo branco, uma das principais doenças do feijoeiro. Os sintomas evidenciam-se por lesões inicialmente pequenas e aquosas, que rapidamente aumentam de tamanho, tomando todo o órgão afetado. Com o desenvolvimento da doença, as partes afetadas tornam-se amareladas e depois marrons, produzindo uma podridão mole nos tecidos (Kimati et al. 2005; Agrios 2005).

O aproveitamento adequado dos benefícios advindos dos agentes de biocontrole depende em grande parte do conhecimento sobre o comportamento desses organismos e da caracterização precisa dos seus variantes em nível específico (Consolo et al, 2012).

Devido à multiplicidade de aplicação de *Trichoderma* em diferentes finalidades, tanto agrônômicas (Harman et al,2004), como industriais (Mach e Zeilingere, 2003) e, ainda, a suas implicações, em alguns casos, como patógeno pulmonares de humanos (Druzhinina et al. 2012 e 2008), existe uma grande necessidade de se estabelecer uma identificação acurada das espécies utilizadas. No entanto, a identificação por morfologia é uma técnica morosa que gera muitas dificuldades devido à homoplasia de características morfológicas entre as formas anamórficas de *Trichoderma* (Chaverri e Samuels, 2003; Druzhinina et al, 2006). Por esse fato, a taxonomia baseada em ferramentas moleculares está sendo cada vez mais usada para designar as espécies de *Trichoderma*, principalmente às espécies morfologicamente crípticas, que só podem ser distinguidas com o uso de marcadores moleculares (Atanasova et al. 2010; Samuels et al. 2010.).

Até recentemente, poucas pesquisas sobre a diversidade de *Trichoderma* foram sendo realizadas no Brasil. A maioria dos trabalhos com esse fungo foram desenvolvidos no sentido da aplicação em controle biológico e elucidação dos seus mecanismos de ação (Figueirêdo et al. 2010; Fontenelle et al. 2011; Gava e Menezes, 2012; Lopes et al., 2012) ou produção/quantificação de compostos capazes de atuar na degradação de moléculas (Resende et al. 2002; Delabona et al. 2012; Lopes et al., 2012). Entretanto, a importância ecológica desse fungo já justifica em grande parte um estudo de sua diversidade (Sun 2012).

O objetivo desse trabalho foi identificar e estabelecer as relações filogenéticas entre 148 isolados brasileiros de *Trichoderma* e estudar o potencial antagonista desses isolados contra *S. sclerotiorum*.

Material e Métodos

Microorganismose condições de cultura

Cento e quarenta e oito isolados de *Trichoderma* pertencentes à Coleção de Fungos para Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa foram utilizados neste trabalho. As culturas, mantidas em nitrogênio líquido, foram recuperadas em placas de Petri contendo o meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA, confeccionado com caldo de 200 g de batata e 20 g de dextrose em 1 L de água). As culturas foram incubadas a 25°C. Nos ensaios em que *Trichoderma* spp. foram desafiados como agentes de biocontrole, empregou-se um isolado do fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum* de Bary (CEN217) oriundo de feijoeiro, o qual foi cedido pela Embrapa Cerrados.

Culturas Monospóricas

Culturas monospóricas dos isolados de *Trichoderma* foram obtidas em meio de Martin (1 g - Fosfato de Potássio (KH₂PO₄); 0,5 g - Sulfato de Magnésio (MgSO₄7H₂O); 5 g - Peptona; 10 g - Dextrose; 15 g - Agar; 0,03 g - Rosa de Bengala; 0,250 g - Cloramphenicol e 1.000 mL - Água destilada) em placas de Petri, a partir do plaqueamento de diluições de esporos e repicagem de esporos germinados, individualmente, para a superfície do meio BDA em placas de Petri.

Extração do rDNA

Três discos de ágar (5 mm Ø) colonizado com o fungo para frascos Erlenmeyer de 225 mL de capacidade, contendo 75 mL de meio líquido à base de batata e dextrose (200 g de batata e 20 g de dextrose em 1 L de água). Após três dias de incubação a

25°C em agitador orbital (Lab line Instruments, Inc., modelo 60160 a 150 rpm), a massa fúngica foi coletada por filtração à vácuo e macerada em nitrogênio líquido utilizando pistilo e almofariz de porcelana. O DNA genômico total foi extraído pelo método fenol-clorofórmio (Raeder e Broda, 1985). Para a remoção das impurezas do DNA, o precipitado foi lavado duas vezes com 200 µl de etanol (Vetec) 70% a 4°C, centrifugado por 1 minuto e novamente o sobrenadante foi descartado. A secagem do precipitado de DNA foi realizada em *speedvacuum* (Eppendorf Concentrator 5301) por 10 a 15 minutos e em seguida ressuspendido em 50 µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 e 1 mM EDTA). O DNA assim purificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) 1% (5V/cm), corado em solução de brometo de etídio e fotografado sob luz UV. A quantificação do DNA genômico total foi realizada por meio de comparação com marcador 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Amplificação por PCR e sequenciamento

O agrupamento do gene do rRNA nuclear contendo espaçadores transcritos ITS1-5.8S-ITS2 do rRNA foi amplificado utilizando a combinação de iniciadores ITS1 (5'TTC CGT AGG TGA ACC TGC GG 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') conforme White et al. (1990). A reação totalizou 25 µL contendo 4 µl com a concentração de 5 ng/µl de DNA, 2,5 de tampão 10x na concentração final de 1x, 0,5 µl de dNTP 10 mM (0,2 nM de cada), 0,75µl de MgCl₂ 50 mM, oligonucleotídeos iniciadores 10 mM ITS1 e ITS4 (0,5 mM cada), 0,125 µl de Taq DNA polimerase (0,5 U/ µl) e água ultrapura para completar o volume final da reação. As reações foram realizadas em termociclador MJ Research, INC. PTC – 100MT, sob as seguintes condições térmicas: 94 °C por 4 minutos, 39 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 72°C por 8 minutos. Ao final da reação, o produto foi mantido a 4 °C. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese 5V/cm

em gel de agarose 1,0%, em tampão TBE 0,5X, posteriormente submetidos à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) 1% (5V/cm), corados em solução de brometo de etídio e foto documentados em luz UV. Os produtos obtidos pela PCR foram purificados e sequenciados pela empresa Macrogen Inc. (Seoul, Coreia do Sul). Os iniciadores utilizados para a reação de sequenciamento foram os mesmos descritos anteriormente para as reações da PCR.

Os eletrofenogramas resultantes do sequenciamento automático foram analisados e as sequências contíguas, montadas com o auxílio do programa *DNA Sequence Assembly BASER Software 2.93* (<http://www.dnabaser.com/index.html>). Pesquisas para a verificação da autenticidade de todas as sequências nucleotídicas foram realizadas utilizando-se dois bancos de dados genéticos, como a seguir: 1) análise comparativa no banco de dados *basic local alignment search tool* (BLAST) do NCBI, (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Este utiliza o método heurístico para encontrar o melhor escore de alinhamentos locais entre a sequência submetida e o banco de dados; 2) busca na base de dados TrichoKEY, específica para taxonomia de *Trichoderma* e seu teleomorfo *Hypocrea* (ISTH, <http://www.isth.info/>). Esta permite o diagnóstico de sequências nucleotídicas com ferramentas de busca por similaridade (*DNA oligonucleotide barcode*) e cobre a maioria das espécies geneticamente caracterizadas das espécies de *Trichoderma/Hypocrea*.

Análise filogenética

As sequências dos ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA foram analisadas pelos métodos da máxima parsimônia (MP), ponderada (reponderação progressiva) e não ponderada, e da inferência filogenética Bayesiana (IB) para a caracterização taxonômica e o estabelecimento das relações filogenéticas entre os isolados de *Trichoderma* analisados. As sequências ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA de 144 isolados de *Trichoderma* foram

alinhas utilizando o programa MUSCLE - Multiple Sequence Alignment v3.5 (Edgar, 2004) e o alinhamento obtido foi corrigido manualmente utilizando BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.8.0, 1997-2007 (Hall, 1999). Os *gaps* presentes no alinhamento original foram preservados e codificados separadamente utilizando o programa FastGap v1.2 (Borchsenius, 2009). A análise MP foi realizada utilizando o programa PAUP* v4.0b10, 2001 (Swofford, 2003). A busca heurística consistiu de 1.000 repetições utilizando a adição randômica dos táxons (Stepwise Addition). A troca de ramos foi realizada pelo algoritmo TBR (Tree bisection and reconnection) salvando as primeiras 1.000 árvores mais parsimoniosas. Na análise MP os indels foram tratados como *newstate*. A IB foi realizada utilizando o programa MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001). O modelo de substituição nucleotídica mais apropriados ao alinhamento das sequências ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA foi o modelo GTR (*General Time Reversible*). O algoritmo Monte Carlo via Cadeia de Markov (MCMC) foi iniciado a partir de uma árvore aleatória e seis Cadeias de Markov processadas para 1.000.000 gerações com amostras coletadas a cada 100 gerações. Nas análises, foram descartadas 25% das amostras iniciais (*burn-in*) e o restante utilizado para determinar as distribuições dos valores de probabilidade posterior. Os *indels* foram excluídos da análise. As árvores MP e IB foram editadas com o auxílio do programa Fig Tree – Tree figure drawing toll v1.3.1 (Raumbaut, 2009) e Adobe Illustrator Cs5 v15.0.0.0. O *outgroup* utilizado para o enraizamento da árvore foi o isolado CEN1067 da espécie *T. longibrachiatum*.

Pareamento de culturas

O antagonismo dos 148 isolados de *Trichoderma* (Tabela 1) contra *S. sclerotiorum* foi avaliado em confronto direto, utilizando o método de pareamento de culturas em placas de Petri, de acordo com Dennis e Webster (1971a). A multiplicação

inicial, tanto dos isolados de *Trichoderma* quanto do patógeno, foi realizada em placas contendo o meio BDA, acondicionadas em incubadora (Fanen, mod. 347), a 25°C com fotoperíodo de 12 horas, durante 5 dias. Discos (5 mm Ø) retirados das culturas puras do patógeno e do antagonista foram depositados diametralmente opostos em placas contendo o mesmo meio e incubados nas mesmas condições descritas acima. Foram estabelecidas três repetições por tratamento (isolado do antagonista) e o experimento, conduzido duas vezes com delineamento inteiramente casualizado.

Para as avaliações, aos cinco dias de cultivo, foram atribuídas notas de acordo com escala estabelecida por Bell *et al.* (1982):

Nota 1-sobreposição de *Trichoderma*, que colonizou toda a superfície do meio.

Nota 2-sobreposição de *Trichoderma*, que colonizou pelo menos 2/3 da superfície do meio.

Nota 3-*Trichoderma* e patógeno colonizaram mais que 1/3 e menos que 2/3 da superfície do meio.

Nota 4-patógeno colonizou ao menos 2/3 da superfície do meio, sem sobreposição por *Trichoderma*.

Nota 5-sobreposição do patógeno que colonizou toda a superfície do meio.

Inibição do crescimento micelial do patógeno por metabólitos não voláteis

A inibição do crescimento micelial do patógeno por metabólitos não voláteis foi estudada em meio enriquecido com filtrado de culturas de *Trichoderma* spp., segundo o método descrito por Agrawal *et al.* (1977), com modificações. Os isolados foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 500 mL de capacidade, contendo 250 mL de meio líquido à base de batata-dextrose. Cada frasco recebeu cinco discos de Agar colonizado (5 mm Ø), retirados de culturas de *Trichoderma* com cinco dias de idade. A incubação ocorreu em agitador orbital conforme mencionado anteriormente. A parte líquida foi

coletada por filtração a vácuo e, após passagem por membrana estéril de celulose (0,45 µm), foi incorporada ao meio BDA previamente autoclavado, na proporção de 25% (v/v). Um disco (5 mm Ø) de cultura do patógeno foi depositado no centro das placas de Petri contendo o meio BDA suplementado com filtrado de cultura. Foram preparadas três placas com o filtrado de cultura de cada antagonista e o experimento foi repetido duas vezes com delineamento inteiramente casualizado. Como testemunha, prepararam-se placas com meio BDA sem filtrado de cultura. As medições do crescimento micelial foram tomadas quando toda a superfície do meio nas placas testemunhas se apresentou colonizada pelo patógeno.

Análises estatísticas:

Para estudar os agrupamentos dos isolados de *Trichoderma* contra o patógeno utilizou-se o algoritmo geral PAM (Partitioning Around Medoids), uma versão mais robusta que o K-means. De acordo com os K-clusters formados calculou-se as informações da silhueta. O uso da Técnica de Validação da Silhueta (Rousseeuw, 1987) partiu do princípio de que calcula-se a largura da silhueta para cada amostra, a largura média da silhueta para cada cluster e a média global da silhueta média para o conjunto de dados total. Usando esta aproximação, cada cluster pode ser representado pela chamada silhueta, baseado na comparação da sua estreiteza e separação. O comprimento médio da silhueta foi aplicado para validação de cluster e também para decidir o número ideal de clusters.

A construção da silhueta $S(i)$ é dada como:

$$S(i) = \frac{(b(i) - a(i))}{\max\{a(i), b(i)\}},$$

em que $a(i)$ é dissimilaridade média do objeto i em relação a todos os outros objetos do mesmo cluster; $b(i)$ é dissimilaridade média mínima do objeto i em relação a todos os outros cluster (no cluster mais próximo).

Ela é seguida da fórmula $-1 \leq S(i) \leq 1$. Se o valor da silhueta é próximo de 1, significa que amostra está bem clusterizada e foi designado a um cluster apropriado. Se o valor da silhoueta é próximo de zero, significa que a amostra poderia ser designada em outro cluster mais próximo, e a amostra encontra-se igualmente distante de ambos os cluster. Se o valor da silhueta é -1, significa que a amostra foi erroneamente classificada. O comprimento médio da silhueta para todos os objetos é simplesmente a média de $S(i)$.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa R, versão 2.15.1 utilizando-se os testes de Silhueta (<http://www.r-project.org/>).

Resultados:

Identificação das espécies

A região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA de 144 de *Trichoderma* procedentes de sete estados brasileiros e do Distrito Federal foram sequenciados, identificados e relacionados de acordo com suas descrições taxonômicas (Tabela 1).

As sequências amplificadas pelas reações de PCR geraram produtos de 630 pares de bases (figura 1). Após o sequenciamento e montagem das sequências contíguas, foram observados produtos variando de 435 a 1243 pares de bases. Para alguns isolados (CEN203, CEN259, CEN725 e CEN829), não foi possível obter a sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 do rRNA. Utilizando as bases de dados NCBI (BLAST – Basic Local Alignment Search Tool (Austschul et al. 1997) e TrichoKEY 144 sequências, distinguiram-se 11 espécies diferentes: *T. asperellum* Samuels, Liechfeldt & Nirenberg (16 isolados), *T. tomentosum* Bisset (6) , *T. harzianum* Rifai (84), *T. koningiopsis*

Samuels C. Suárez & H.C. Evans (14), *T. brevicompactum* G.F. Kraus, C.P. Kubicek & W. Gams (4), *T. erinaceum* Bissett, C.P. Kubicek & Szakács (2), *T. ghanense* Yoshim Doi, Y. Abe & Sugiy (1), *T. hamatum* Bainier (4), *T. longibrachiatum* Rifai (4), *T. spirale* Bisset (5) e *T. virens* Arx (4). Exemplos de cada espécie foram observados quanto às características de colônia em meio BDA a 25°C por 7 dias em ambiente de laboratório e fotografadas (Figura 2). Os dados de identificação, origem, substrato e número de acesso do NCBI Genebank dos isolados estão listados na Tabela 1.

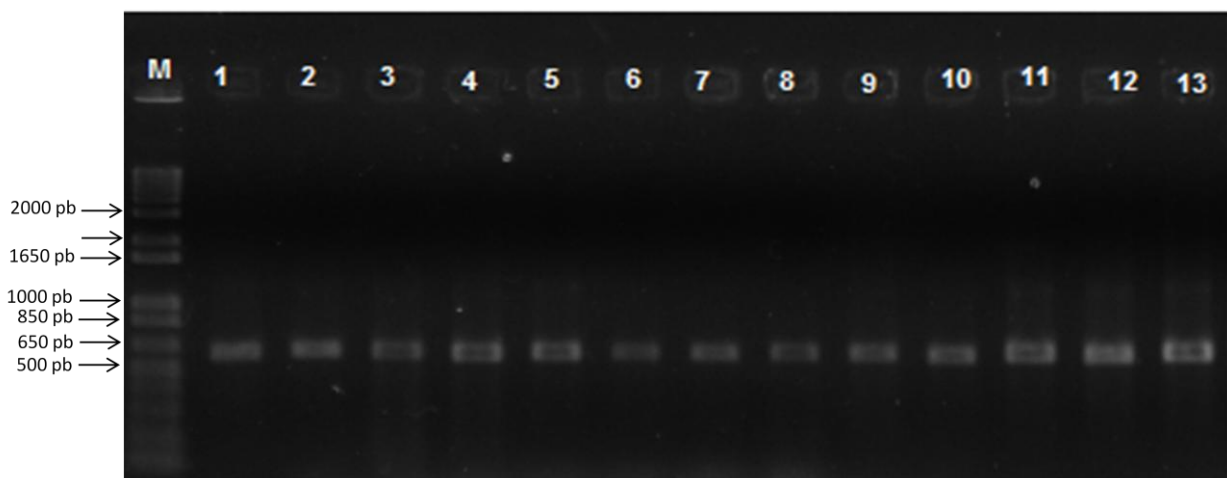


Figura 1: Gel de agarose 1% com produtos de PCR da região do rDNA M: Marcador molecular de número de bases nitrogenadas (1 Kb Plus Ladder, Invitrogen); 1 a 13: amostras do gene ITS1-5.8S-ITS2 amplificadas, utilizando-se iniciadores ITS1 e ITS4 com aproximadamente 630 pares de bases.

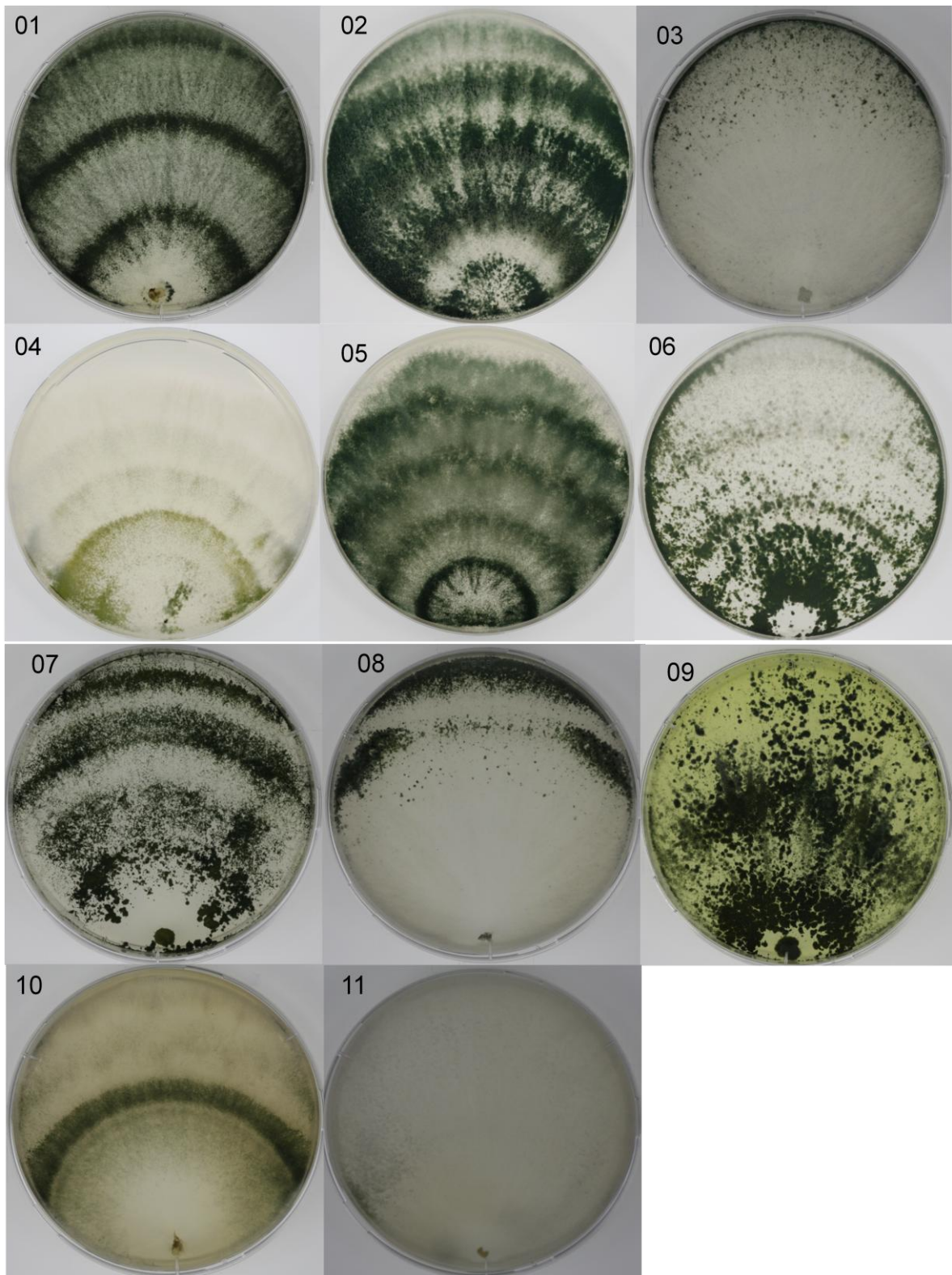


Figura 2: Culturas de *Trichoderma* obtidas em meio BDA após sete dias de incubação a 25°C. Placa 01: *T. harzianum* (CEN197); Placa 02: *T. asperellum* (CEN162); Placa 03: *T. koningiopsis* (CEN203); Placa 04: *T. brevicompactum* (CEN511); Placa 05: *T. virens* (CEN860); Placa 06: *T. erinaceum* (CEN521); Placa 07: *T. ghanense* (CEN555); Placa 08: *T. hamatum* (CEN828); Placa 09: *T. longibrachiatum* (CEN1067); Placa 10: *T. spirale* (CEN206); Placa 11: *T. tomentosum* (CEN252).

Análise da diversidade genética

Em 148 isolados de *Trichoderma* caracterizados pela técnica molecular, observou-se a presença de 11 espécies distintas, o que representa um índice de diversidade total de 0,076, sendo que não foi possível caracterizar 4 isolados de *Trichoderma* por apresentarem alta quantidade de ruídos nos eletrofenogramas..

A análise filogenética baseada nas sequências gênicas da região ITS1-5.8S-ITS2 dos 144 isolados de *Trichoderma*, origens de coleta, identificação e seus respectivos números de acesso do NCBI Genbank são apresentados no Anexo 1 e na Figura 3 e 4.

Em relação às distâncias das áreas de coleta, colocando-se o Distrito Federal como ponto de Central do Brasil, no estado de Pernambuco, onde ocorreu o isolamento de *Trichoderma*, situa-se mais ou menos a 1600 do D.F.; no estado da Bahia, estima-se uma distância entorno de 1000 km do D.F.; no estado de Goiás, estima-se uma distância de 200 km do D.F.; no estado de Mato Grosso estima-se a distância de 1200 km do D.F.; no estado de São Paulo estima-se 1100 km do D.F; e o estado do Rio Grande do Sul estima-se uma distância de 2200 km do D.F.

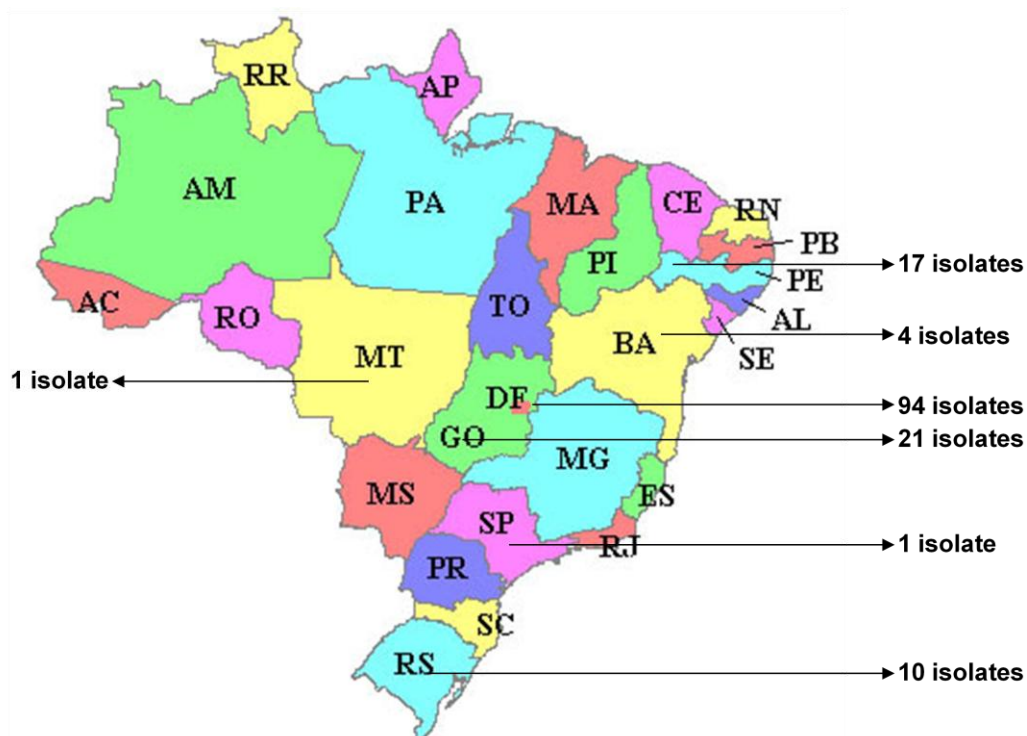


Figura 3: Localização geográfica no mapa do Brasil dos locais de isolamento dos isolados de *Trichoderma* indicados pelas setas.

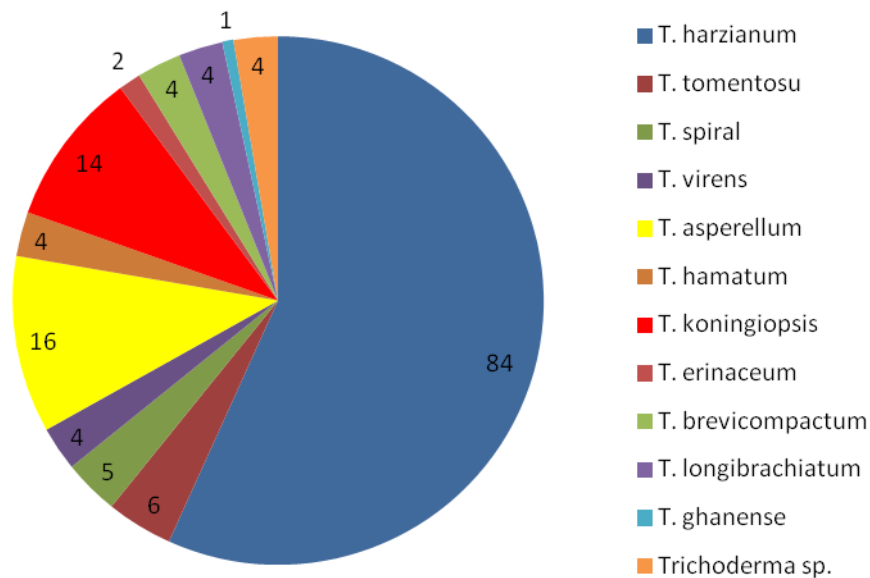


Figura 4: Número total de espécies de *Trichoderma* e 4 gêneros identificados apenas por morfologia.

O maior número de exemplares de *Trichoderma* examinados (94 isolados) foi procedente do Distrito Federal, com oito espécies e índice de diversidade de 0,085. Dentre estes, relatam-se 52 isolados de *T. harzianum*, 13 isolados de *T. koningiopsis*, 7 isolados de *T. asperellum*, 6 isolados de *T. tomentosum*, 5 isolados de *T. spirale*, 4 isolados de *T. hamatum*, 2 isolados de *T. virens*, 1 isolado de *T. longibrachiatum* e outros 4 isolados identificados apenas em nível de gênero, com base nas características morfológicas (Figura 5).

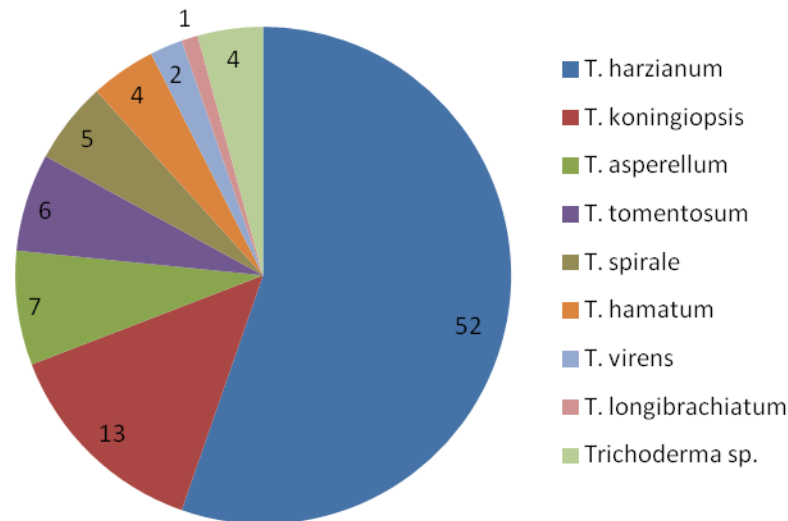


Figura 5: Número total de espécies de *Trichoderma* e 4 gêneros identificados apenas por morfologia provenientes do estado do Distrito Federal.

As amostras do Distrito Federal foram agrupadas em três com maiores números de isolados e outras quatro, com menores números de isolados.

As amostras de maiores números de isolados foram provenientes de solo de cultivo de algodão, com 57 isolados das espécies *T. harzianum* (44 isolados), *T. tomentosum* (6 isolados), *T. koningiopsis* (2 isolados), *T. spirale* (3 isolados) e *Trichoderma* sp.(2 isolados) (Figura 6).

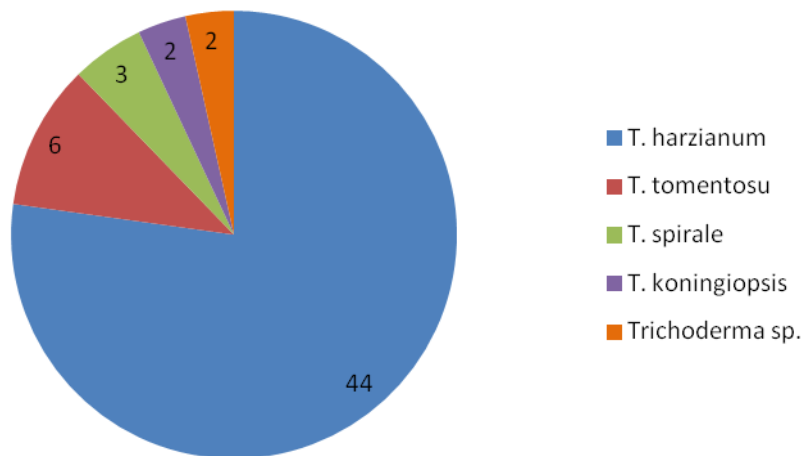


Figura 6: Número total de espécies de *Trichoderma* e 2 gêneros identificados apenas por morfologia provenientes do estado do Distrito Federal em solo de cultivo de algodão.

Nas amostras de solo de cultivo de morangueiro foram encontrados 21 isolados, dentre elas, as espécies *T. koningiopsis* (9 isolados), *T. asperellum* (5 isolados), *T.*

harzianum (4 isolados), *T. spirale* (1 isolado), *T. hamatum* (1 isolado) e *Trichoderma* sp. (1). Em outro grupo de amostras foram encontradas 10 isolados, sendo *T. hamatum* (3 isolados), *T. virens* (2 isolados), *T. harzianum* (3 isolados), *T. spirale* (1 isolado) e *Trichoderma* sp. (1 isolado) (Figura 7).

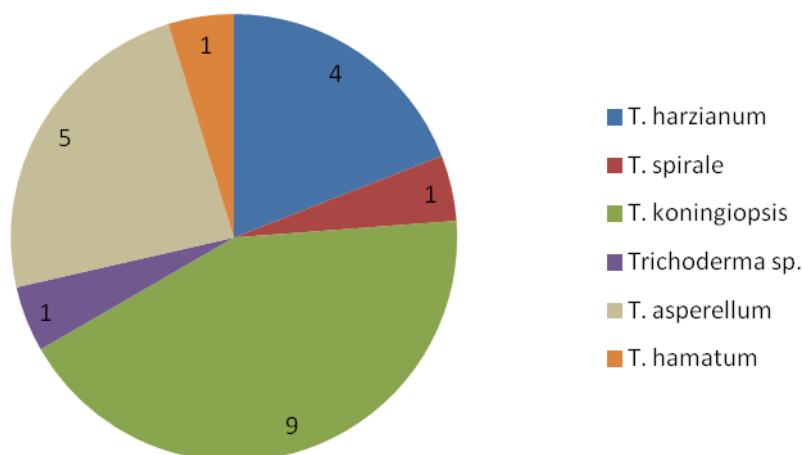


Figura 7: Número total de espécies de *Trichoderma* e 1 gênero identificados apenas por morfologia provenientes do estado do Distrito Federal em solo de cultivo de morangueiro.

Amostras coletadas isoladamente apresentaram quatro espécies, ou seja, *T. asperellum* e *T. harzianum* (1 isolado cada), e *T. koningiopsis* (2 isolados) e *T. longibrachiatum* (1 isolado).

Entre os isolados procedentes do estado de Goiás, as amostras de solos cultivados (21 isolados) distinguiram-se apenas 2 espécies com índice de diversidade de 0,095: *T. harzianum* (20 isolados) e *T. brevicompactum* (1 isolado). Solos de vegetação nativa do cerrado foram representados por 7 isolados de *Trichoderma*, sendo 6 de *T. harzianum* e 1 de *T. brevicompactum*. Já áreas de solo, cultivo de soja, milho, arroz, sorgo, goiabeira, e café orgânico de Goiás, encontraram-se 14 espécies de *T. harzianum*.

Os isolados oriundos de amostras de solo do Estado de Pernambuco, cultivado com goiabeira, apresentaram 17 exemplares de *Trichoderma* com uma diversidade de 6 espécies, o que equivale a um índice de diversidade de 0,35, a saber: *T. asperellum* (7

isolados), *T. brevicompactum* (3 isolados), *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* e *T. erinaceum* (2 isolados cada) e *T. virens* (1 isolado) (Figura 8).

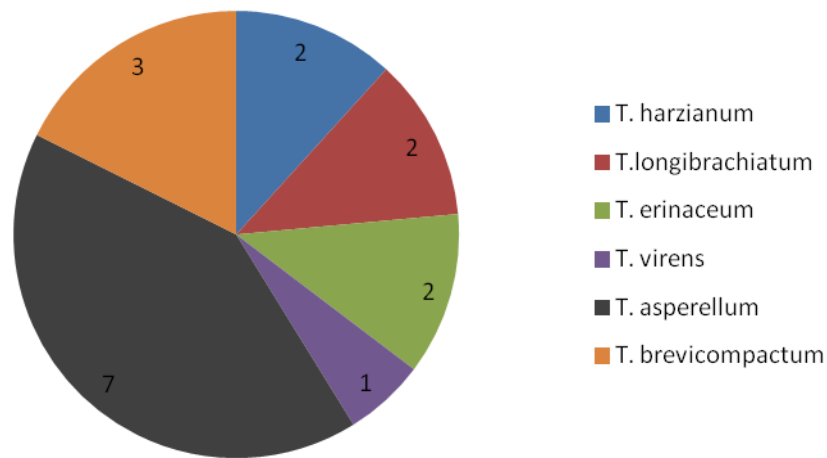


Figura 8: Número total de espécies de *Trichoderma* provenientes do estado de Pernambuco solo de cultivo de goiabeira.

Em amostras procedentes do Estado do Rio Grande do Sul (10 isolados de *Trichoderma*) foram identificadas 4 espécies, com índice de diversidade de 0,4. Em solos de vegetação nativa, *T. harzianum* (4 isolados), *T. koningiopsis*, *T. virens* e *T. asperellum* (1 isolado cada); em solos cultivados, *T. harzianum* (3 isolados).

Do Estado da Bahia, foram analisados 4 isolados de *Trichoderma*, identificando-se 2 espécies e diversidade de 0,5. Assim os exemplares provenientes de *Moniliophthora perniciosa* compreenderam a espécie de *T. harzianum* (3 isolados); o outro isolado proveniente de amostra de solo foi identificado como pertencente à espécie *T. ghanense*.

Finalmente, foram identificados um isolado procedente de amostras do Estado de Mato Grosso e outro de São Paulo, como pertencentes às espécies *T. asperellum* *T. longibrachiatum*, respectivamente.

Caracterização taxonômica

A árvore filogenética gerada a partir do sequenciamento do gene ITS 1-5.8S- ITS 2 do rDNA (Figura 04) mostrou a existência de sete clados bem definidos e fortemente

suportados com probabilidade posterior acima de 0,8 e *bootstrap* acima de 89%. Os cladogramas foram: Harzianum, Spirale, Virens, Hamatum, Viride, Brevicomcompactum e Longibrachiatum.

O clado Harzianum foi composto por 84 isolados de *T. harzianum* e 6 isolados de *T. tomentosum*. Todos os isolados da espécie *T. tomentosum* foram provenientes de solo de campo de algodão do Distrito Federal e formaram um grupo monofilético conservado e fortemente sustentado por probabilidade posterior de 0,86 e *bootstrap* de 97%. Assim pode-se inferir uma alta similaridade entre os isolados de *T. tomentosum*.

O clado Spirale foi composto por 5 isolados de *T. spirale* que formaram um grupo fortemente suportado com probabilidade posterior de 1 e *bootstrap* 87%.

O clado Virens constituiu-se de 4 isolados de *T. virens* que formaram um grupo bem determinado e fortemente suportado com probabilidade posterior de 1 e *bootstrap* de 95%.

No clado Hamatum, agruparam-se 16 isolados de *T. asperellum* e 04 isolados de *T. hamatum*. Observou-se a formação de um grupo bem determinado e fortemente suportados com probabilidade posterior de 1 e *bootstrap* de 97%. Esse grupo caracteriza-se por comportar isolados da espécie *T. hamatum*. Embora os isolados tenham sido coletados em diferentes áreas do Distrito Federal - três isolados (CEN827, CEN828 e CEN839), coletados em solo de cerrado e um isolado (CEN698) em solo de cultivo de morango- foi observada uma alta similaridade entre os isolados desse grupo.

O clado Viride formou-se por 14 isolados de *T. koningiopsis* e 2 isolados de *T. erinaceum*.

O clado Brevicomcompactum compôs-se de quatro isolados de *T. brevicomcompactum*. Apesar do isolado CEN516 ter sido coletado em solo de cerrado em Goiás, diferente dos outros isolados de *T. brevicomcompactum* coletados em solo de pomar de goiabeira em

Pernambuco, todos eles formaram um grupo conservado e fortemente suportados com probabilidade posterior de 1 e *bootstrap* de 100% demonstrando alta similaridade entre os isolados desse grupo.

O clado *longibrachiatum* formou-se de 4 isolados de *T. longibrachiatum* e 1 de *T. ghanense*. Todos os isolados de *T. longibrachiatum* agruparam-se com o “outgroup” e o isolado *T. ghanense* agrupou-se fora desse “outgroup”

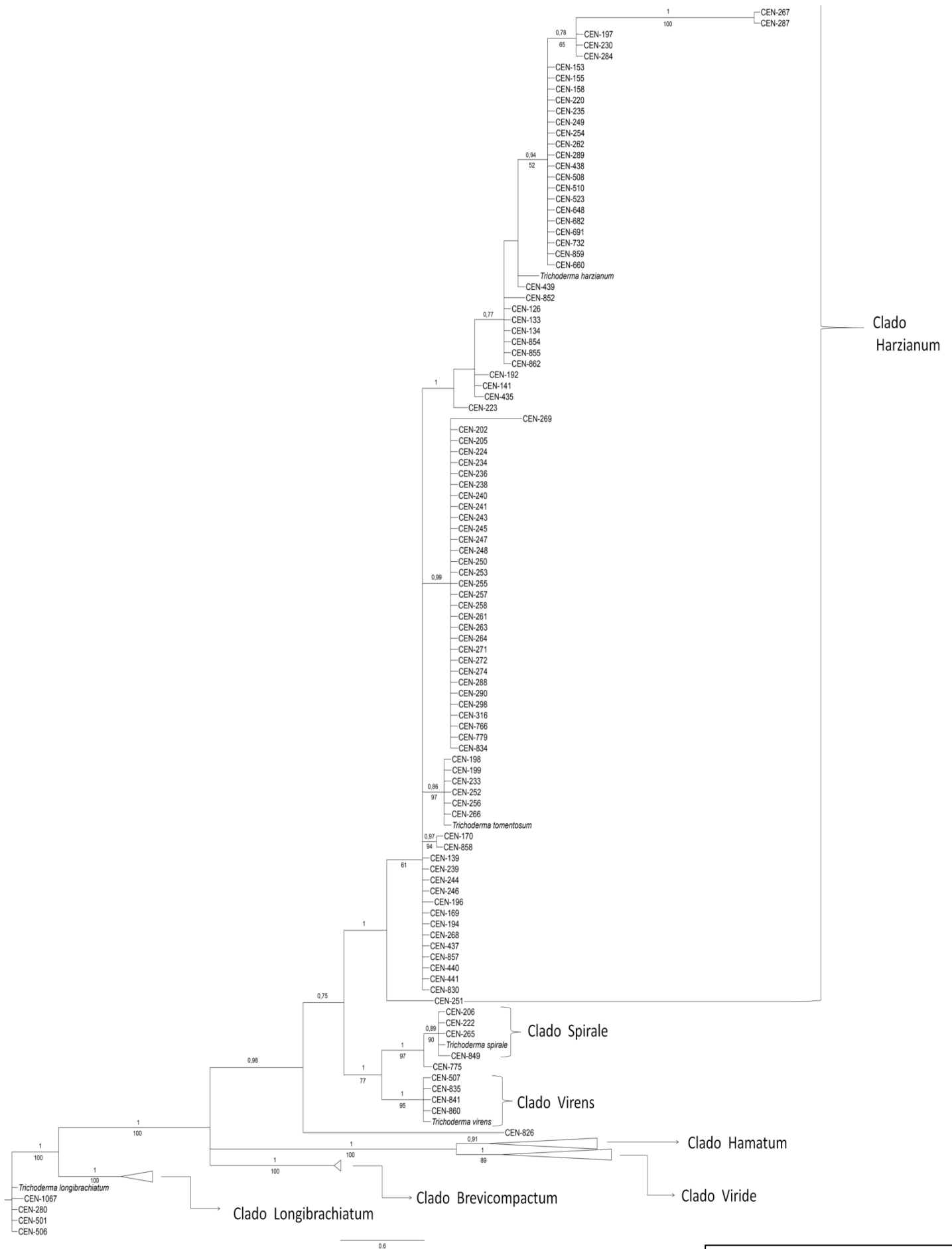


Figura 04. Continua...

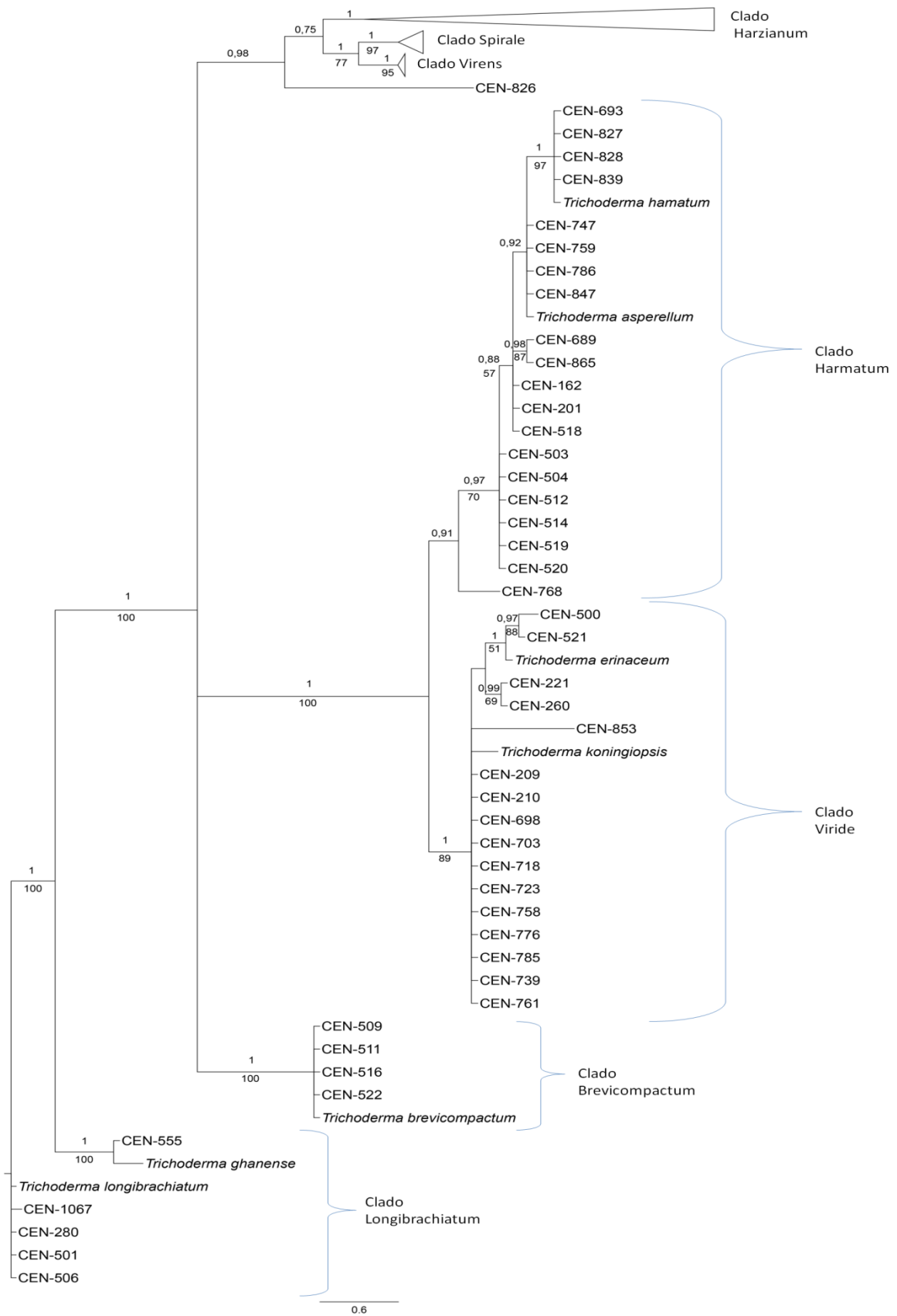


Figura 4. Árvore filogenética baseada na região ITS1 e ITS2 do rDNA dos 144 isolados de *Trichoderma* pertencentes à Coleção de Fungos para Controle Biológico de

fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa. A topologia da árvore foi obtida da IB e os valores de suporte da IB e MP estão presentes acima (probabilidade posterior > 0,8) e abaixo (bootstrap > 50%) dos ramos, respectivamente. Os isolados *T. harzianum* (JN179079), *T. tomentosum* (HQ857116), *T. spirale* (JF439515), *T. virens* (GU365897), *T. hamatum* (EF488142), *T. asperellum* (JN004182), *T. erinaceum* (JQ040340), *T. koningiopsis* (HQ857120), *T. brevicompactum* (JQ040334), *T. ghanense* (HQ857117) são referências externas retiradas do GenBank. A referência *Trichoderma longibrachiatum* (JF694937) foi utilizada como *outgroup*. A escala em barra representa o número de substituições nucleotídica para cada base

Avaliação do antagonismo de *Trichoderma* spp. ao patógeno *S. sclerotiorum* em pareamento de culturas

A análise dos resultados obtidos no pareamento de culturas permitiu a formação de quatro grupos distintos entre os isolados do antagonista conforme escala proposta por Bell *et al.* (1982), a qual delimita os graus de inibição do crescimento do patógeno em relação ao antagonista conforme a tabela 1. O melhor resultado de inibição ficou com o grupo que apresentou nota 1 (17,4% dos isolados), seguido do grupo onde estão alocados os isolados com nota 2 (42,9% dos isolados), grupo com notas 3 (37,5%) e do grupo com notas 4 (2%).

Tabela 1: Classificação dos isolados de *Trichoderma* spp. quanto ao antagonismo exercido sobre dois isolados de *S. sclerotiorum*, no teste de pareamento de culturas.

Escala de Bell et al., 1982	n	% de isolados	Código dos isolados (CEN)
Nota 1	26	17,56	439, 841, 860, 194, 435, 437, 438, 500, 555, 222, 508, 785, 162, 504, 512, 514, 518, 519, 520, 747, 507, 506, 209, 511, 718, 759
Nota 2	64	43,24	197, 280, 501, 648, 739, 758, 126, 134, 158, 192, 202, 205, 268, 316, 440, 441, 521, 523, 693, 826, 827, 830, 849, 852, 857, 859, 267, 139, 153, 235, 257, 689, 775, 201, 210, 234, 289, 503, 509, 510, 522, 698, 761, 786, 847, 854, 170, 198, 732, 839, 862, 284, 682, 855, 256, 252, 287, 776, 865, 239, 250, 725, 768, 1067
Nota 3	56	37,83	660, 133, 141, 155, 221, 203, 236, 244, 245, 246, 247, 272, 274, 288, 298, 691, 766, 828, 834, 835, 169, 220, 223, 230, 233, 238, 243, 253, 260, 261, 262, 271, 779, 829, 241, 516, 199, 248, 254, 258, 259, 266, 853, 196, 251, 263, 265, 269, 206, 249, 703, 264, 224, 723, 240, 255
Nota 4	2	1,35	290, 858

*n: Número de isolados para cada nota.

Avaliação do efeito inibidor de metabólitos não voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. contra *S. sclerotiorum*

A Tabela 2 mostra que os maiores valores médios de inibição micelial foram representados pelos isolados do grupo 4, seguido pelo grupo 7. A porcentagem média de inibição contra o patógeno do grupo 4 foi 88,6 e para o grupo 7, a porcentagem foi 85,4. Os isolados presentes no grupo 2 não diferenciaram da testemunha inoculada apenas com o patógeno, com variação de 0 a 7,41% de inibição micelial. Já os grupos um, três, cinco, seis e oito, mantiveram níveis intermediários de inibição micelial do patógeno.

Tabela 2: Grupos sugeridos pela análise de silhueta em relação ao diâmetro médio das colônias de *S. sclerotiorum* inoculadas em metabólitos não voláteis de *Trichoderma*, porcentagem de inibição. Média Geral da Silhueta: 0.72

Grupo	n	% de isolados	Cód. Dos isolados (CEN)	% média de inibição ± desvio padrão	Média da Silhueta
1	11	7,4	197, 280, 439, 501,648, 660, 739, 758, 841, 860, 1067	61,28 ± 0,10	0,62
2	45	30,2	126, 133, 134, 141, 155,158, 192, 194, 202, 205, 221, 236, 244, 245, 246, 247, 268, 272, 274, 288, 298, 316, 435, 437, 438, 440, 441, 500, 521, 523, 555, 691, 693, 766, 826, 827, 828, 830, 834, 835, 849, 852, 857, 859,SS	5,9 ± 0,02	0,92
3	25	16,7	267, 139, 153, 169, 220, 222, 223, 230, 233, 235, 238, 243, 253, 257, 260, 261, 262, 271, 508, 689, 775, 779, 785, 829, 858	16,5 ± 0,1	0,54
4	23	15,4	162, 201, 210, 234, 241, 289, 503, 504, 509, 510, 512, 514, 516, 518, 519, 520, 522, 698, 747, 761, 786, 847, 854	88,6 ± 0,01	0,86
5	13	8,7	170, 198, 199, 248, 254, 258, 259, 266, 507, 732, 839, 853, 862	29,9 ± 0,09	0,57
6	10	6,7	196, 224, 251, 263, 265, 269, 290, 506, 682, 855	44,1 ± 0,11	0,55
7	13	8,7	203, 206, 209, 249, 250, 252, 264, 284, 287, 511, 723, 776, 865	85,4 ± 0,06	0,55
8	9	6,04	239, 240, 255, 256, 703, 718, 725, 759, 768	78,06 ± 0,14	0,60

*n: Número de isolados para cada grupo.

*SS: Placa inoculada apenas com o *S. sclerotiorum*

É possível observar na tabela 3 as respectivas notas (Escala de Bell et al. 1982) dos grupo 4 e 7 dos isolados que promoveram as maiores taxas de inibição micelial do patógeno. No grupo 4, verifica-se que nove isolados apresentaram nota 1, doze apresentaram notas 2 e dois isolados com nota 3. Já no grupo 7, verifica-se que apenas três isolados apresentaram nota 1, cinco isolados nota 2 e outros cinco apresentaram

nota 3. Nos grupos 4 e 7, observou-se que 29 isolados apresentaram nota 1 (41,4%) ou 2 (58,6) de acordo com a escala de Bell.

Tabela 3: Grupos 4 e 7 sugeridos pela análise de silhueta em relação ao diâmetro médio das colônias de *S. sclerotiorum* inoculadas em metabólitos não voláteis de *Trichoderma* e as respectivas notas da escala de Bell et al., (1982) dos isolados de cada grupo.

	Nota 1	Nota 2	Nota 3
Grupo 4	162, 201, 504, 512, 514, 518, 519, 520, 747,	210, 234, 289, 503, 509, 510, 522, 698, 761, 786, 847, 854	241, 516
Grupo 7	209, 511	250, 252, 284, 287, 776, 865	203, 206, 249, 264, 723

Discussão

Espécies de *Trichoderma* podem atuar como agentes de controle biológico por meio de mecanismos que funcionam sinergicamente. No entanto, é difícil prever o grau de sinergismo e o comportamento desses fungos num patossistema natural. Considerando que as condições ambientais são importantes, a seleção correta dos agentes de biocontrole, que começa na caracterização correta dos isolados, é igualmente importante quanto à ação dos antagonistas no controle de doenças e promoção de crescimento de plantas, pois a identificação exata das amostras de *Trichoderma* em nível de espécie é inerente para o entendimento e aplicação desse fungo em pesquisas e geração de produtos para a agricultura e bioindústria (Billard et al., 2012; Kamala e Devi, 2012; Callow e Ju, 2012; Hermosa et al., 2000).

No pareamento de culturas, observou-se a uma variação de notas entre 1 e 4 em relação à escala de Bell et. al. (1982), conforme Tabela02. Os isolados com notas 1 e 2 caracterizam-se pela sobreposição do crescimento micelial de *Trichoderma*, ocupando toda a superfície do meio e reduzindo o tamanho das colônias do patógeno (nota 1) e pela sobreposição de *Trichoderma*, ocupando pelo menos 2/3 da superfície do meio (nota 2). Tais fatos corroboram resultados obtidos por Amim et al. (2010), ao

observarem que isolados de *T. viride* e *T. harzianum* foram capazes de inibir o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, *S. sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* em culturas pareadas, com notas (escala de Bell et al. 1982) variando entre 2 e 3. Também Figueiredo et. al. (2010) obtiveram resultados demonstrando a eficiência de nove isolados de *Trichoderma* na inibição micelial de *S. sclerotiorum*. Nesse trabalho, três isolados do agente de biocontrole apresentaram nota 1 e os demais isolados, nota 2 na escala de Bell et. al. (1982). Os autores deram a nota 2 como “leve potencial antagônico”.

Pelo cultivo pareado é possível observar importantes mecanismos de controle biológico. Um deles é o micoparasitismo, descrito no trabalho clássico de Weindling (1932) que descreveu em detalhes o enrolamento de hifas, penetração e subsequente dissolução do citoplasma de *Rhizoctonia solani* pelo antagonista *T. lignorum*. O autor afirma que esse fenômeno ocorreu independentemente do fornecimento de nutrientes para o antagonista e o patógeno, assim considerou-se o micoparasitismo como o principal mecanismo de controle do patógeno.

Em relação à inibição do patógeno *S. sclerotiorum* pelos isolados de *Trichoderma* por metabólitos não voláteis presentes em filtrados de cultura, observou-se que 36 isolados dos grupos 4 e 7 na da Tabela 1 foram capazes de suprimir o crescimento micelial do patógeno com percentuais superiores a 80%. No trabalho pioneiro de Weindling (1934) foi relatado que um isolado de *T. lignorum* produzia um “princípio letal” que foi exsudado para o meio de cultura e foi capaz de formar um halo de inibição entre o antagonista e o patógeno. Trabalhos posteriores (Weindling, 1941) mostraram que nesse “princípio letal” estava presente o composto tóxico chamado Gliotoxina, capaz de inibir o crescimento micelial de *Sclerotinia americana* e *R. solani*. Mais tarde, esse isolado identificado como pertencente à espécie *T. lignorum* foi reidentificado

como *T. virens* (Webster e Lomas, 1964). Castillo et al. (2011) observaram que diferentes isolados de *Trichoderma* apresentaram alternância de níveis de inibição micelial de *S. sclerotiorum* e *S. cepivorum* por metabólitos não voláteis, em testes de pareamento de culturas, por isolados das espécies *T. ghanense*, *T. longibrachiatum*, *T. asperellum*, *T. inhamatum* e *T. atroviride*. Entretanto, Fontenelle et al. (2011) testaram 28 isolados de *Trichoderma* das espécies *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. strigosum*, *T. longibrachiatum*, *T. koningiopsis* e *T. ovalisporum* contra *Alternaria solani* e não constataram a redução do crescimento micelial desse patógeno. Neste estudo também foi observado que a atividade antagônica dos isolados de *Trichoderma* não é exclusiva de uma ou outra espécie, pois os trinta e cinco isolados pertencentes a espécies diferentes (*T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. koningiopsis*, *T. tomentosum* e *T. brevicompactum*) apresentaram maiores porcentagens de inibição micelial do patógeno por metabólitos não voláteis e também no pareamento de culturas. Assim, sugere-se que esses mecanismos não podem ser atribuídos a espécie, e sim a isolado de *Trichoderma*, dentro de uma mesma espécie.

A capacidade de isolados de *Trichoderma* em inibir o crescimento de *S. sclerotiorum* *in vitro* demonstrada tanto nos testes de pareamento de culturas como produção de metabólitos não voláteis foi possível selecionar potenciais agentes de biocontrole contra o patógeno. Observando-se os isolados dos grupos 4 e 7 (tabela 3), foi possível identificar 29 isolados com taxas de inibição superiores a 80% para os metabólitos voláteis e com notas 1 e 2 de acordo com a escala de Bell et al. (1982). A princípio, esses isolados demonstram ter grande potencial para o controle do patógeno *in vitro*, entretanto é necessário testes em casa de vegetação e campo para afirmar esse potencial de controle.

Baseado nos dados aqui apresentados, a diversidade geral de *Trichoderma* encontrada foi relativamente baixa (ID = 0,076), com identificação de 11 espécies distintas em 144 isolados analisados, se comparada a um estudo desenvolvido por Druzhinina *et al.* (2005) com isolados coletados em diversas regiões da América do Sul, cujo ID foi igual a 0,20 (10 espécies em 53 isolados analisados). Entretanto esse é o primeiro estudo de diversidade de *Trichoderma* utilizando marcadores moleculares em cinco estados brasileiros (os estados de São Paulo e Mato Grosso não entraram no estudo de diversidade por contar com apenas um isolado de *Trichoderma* cada um). Esse índice tende a aumentar à medida que forem analisados um número maior de isolados da coleção, abrangendo maior amplitude geográfica dentro do país.

O índice de biodiversidade relativa a espécies de *Trichoderma* já foi relatado em várias outras regiões do globo terrestre: Sardenia na Itália (15 espécies /482 isolados com ID= 0,03 (Migheli *et al.*, 2009); Sudoeste da Ásia (14 espécies/96 isolados), com ID = 0,15 (Kubicek *et al.*, 2003); China (13 espécies/135 isolados), com ID = 0,096 (Zhang *et al.*, 2005) e (23 espécies/1910) ID = 0,012 em outro estudo (Sun *et al.*,2012); Austria (7 espécies/46 isolados) com ID = 0,15 (Wuczkowski *et al.*, 2003) e Tunísia (5 espécies/53 isolados), com ID = 0,094 (Sadfi-Zouaoui *et al.*, 2009).

Estudos sobre a biodiversidade nos neotrópicos conduzidos por Hoyos-Carvajal *et al.* (2009) indicaram a predominância da espécie *T. asperellum*, seguida pelo *T. harzianum*, enquanto neste trabalho, *T. asperellum*, embora também apareça com alta frequência, não superou *T. harzianum* em número de isolados. A prevalência das espécies *T. harzianum* e *T. asperellum* pode ser explicada pela alta variabilidade genética intraespecífica e capacidade de colonizar e manter níveis altos de esporulação em diferentes substratos e fontes de carbono (Hoyos-Carvajal *et al.* 2009) . Entretanto, os métodos de isolamento rotineiramente utilizados para obtenção de culturas a partir de

amostras de solo e raiz podem ser seletivos para essas duas espécies com taxas de crescimento micelial e esporulação mais elevadas, em detrimento das demais (Hoyos-Carvajal et al. 2009).

Verificou-se que a espécie *T. harzianum*, espécie de maior ocorrência não só no presente estudo, é também em todos os outros sobre biodiversidade supracitados, demonstrando alta capacidade adaptativa à maioria dos ecossistemas e nichos ecológicos do mundo. Isolados desta espécie foram isolados tanto de ambientes extremamente secos como no Estado de Pernambuco, porém estavam em solo de pomar de goibaira irrigado, como em regiões temperadas Rio Grande do Sul e outras que alternam entre o clima quente/frio e seco/úmido como nos estados de Goiás, Distrito Federal, Bahia, embora as amostras de solo não tenham sido analisadas quanto a suas propriedades físico-químicas, é razoável acreditar que grandes variações ocorrem também nesse aspecto. As espécies de *T. harzianum* apresentam um grande predomínio no Distrito Federal e Goiás, entretanto, em pomar de moranguiro do Distrito Federal houve o predomínio de espécies de *T. koningiopsis* e *T. asperellum*. Já em Pernambuco, houve um predomínio das espécies de *T. brevicompactum* em campo de goibeira. Tais fatos revelam certa seleção natural para determinadas espécies de *Trichoderma* nesses ambientes ou plantas e necessitam de mais estudos sobre essas “especificidades”, dada a escassez de estudos para essa área.

A utilização de ferramentas moleculares para a identificação de espécies baseadas nas sequências do DNA vem mostrando que as espécies de *Trichoderma* estruturadas em conceitos clássicos são, na verdade, compostas de duas ou mais espécies filogenéticas (espécies agregadas), as quais podem exibir nichos ecológicos específicos ou globais. Por exemplo, *T. viride* é uma espécie que foi relatada praticamente em todo o mundo e hoje, com base nos novos conceitos de espécie, sua distribuição restringe-se

ao hemisfério norte. Fatos dessa natureza geram confusão, quando se utilizam apenas critérios morfológicos para identificação (Jaklisch et al., 2006). Também *T. brevicompactum*, que pode ser confundida com *T. harzianum* quando utilizada a taxonomia clássica, pode ser facilmente distinguida pela análise filogenética, alocando-se em clado distinto, como demonstrado neste trabalho e em outros desenvolvidos por Kraus et al. (2004) e Degenkolb et al. (2008). *T. pseudokoningii*, até o momento restrita à Austrália, *T. konilangbra*, ao Leste da África e *T. effusum* ao Himalaia (Kubicek et al. 2008) são outros casos que demonstram a vantagem do uso da taxonomia molecular para designar espécies de *Trichoderma*. Já *T. harzianum* vem sendo reconhecida como espécie global, colonizando os mais diversos substratos e nichos ecológicos, conforme mencionado anteriormente (Kubicek et al. 2008).

O resultado deste estudo deverá auxiliar no entendimento da biodiversidade de *Trichoderma* nas áreas de coleta apresentadas e deverá ser estendido para um maior número de isolados e regiões geográficas do país. Isso auxiliará na seleção de isolados com elevado potencial de biocontrole e mais adaptados a cada região.

Conclusão

Foram sequenciados 144 isolados de *Trichoderma* com índice de diversidade total de 0,076. A árvore filogenética não apresentou politonia entre os isolados e nem entre os 7 clados onde os valores de bootstrap e probabilidade posterior mantiveram fortemente suportados. Foram selecionados 29 isolados de *Trichoderma* em experimentos *in vitro* com alta taxa de inibição micelial do patógeno *S. sclerotiorum*.

Referências bibliográficas

Agrawal SC, Khare MN, Agrawal PS (1977) Biological control of *Sclerotium rolfsii* causing collar rot of lentil. Indian Phytopathology 30-176:179

Agrios GN (2005) Plant pathology. Academic Press, New York

Amin F, Razdan VK, Mohiddin FA, Bhat KA, Banday S (2010) Potential of *Trichoderma* species as biocontrol agents of soil borne fungal propagules. *Journal of Phytology* 2:38-41

Atanasova L, Jaklitsch WM, Komoń-Zelazowska M, Kubicek CP, Druzhinina IS (2010) Clonal species *Trichoderma parareesei* sp. nov. likely resembles the ancestor of the cellulase producer *Hypocrea jecorina*/*T. reesei*. *Applied and Environmental Microbiology* 76:7259-7267

Bell DK, Wells HD, Markham CR (1982) *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72:379-382

Bettiol W, Ghini R (1995) *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos*. Ceres. 3 ed. São Paulo.

Billard H, Faraj A, Ferreira NL, Menir S, Heiss-Blanquet S (2012) Optimization of a synthetic mixture composed of major *Trichoderma reesei* enzymes for the hydrolysis of steam-exploded wheat straw. *Biotechnology for Biofuels* 1:5-9

Borchsenius F (2007) FastGap 1.0.8. Software distributed by the author (http://192.38.46.42/aubot/fb/FastGap_home.htm)

Callow NV, Ju LK (2012) Promoting pellet growth of *Trichoderma reesei* Rut C30 by surfactants for easy separation and enhanced cellulase production. *Enzyme and Microbial Technology* 50:311-317

Castillo FDH, Padilla AMB, Morales GG, Siller MC, Herrera RR, Gonzales CNA, Reyes FC (2011) *In Vitro* Antagonist Action of *Trichoderma* Strains Against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 6:410-417

Chaverri P, Samuels G (2003) *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. *Studies in Mycology* 48:11-16

Chet I, Baker R. (1987) Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 71:286-290

Consolo VF, Monaco CI, Cordo CA, Salerno GL (2012) Characterization of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28:1389-1398

De Respini S, Vogel C, Benagli C, Tonolla M, Petrini O, Samuels GJ (2010) MALDI-TOF MS of *Trichoderma*: a model system for the identification of microfungi. *Mycological Progress* 9:79-100

Degenkolb T, Dieckmann R, Nielsen KF, Gräfenhan T, Theis C, Zafari D, Chaverri P, Ismaiel A, Brückner H, von Döhren H, Thrane U, Petrini O, Samuels GJ (2008) The

Trichoderma brevicompactum clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. *Mycological Progress* 7:177-219

Delabona PS, Farinas CS, Silva MR, Azzoni SF, Pradella JGC (2012) Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. *Bioresource Technology* 107:517-521

Dennis C, Webster J (1971) Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. *Transactions British Mycological Society* 57:363-369

Druzhinina IS, Kopchinskiy AG, Komon M, Bissett J, Szakacs G, Kubicek CP (2005) An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology* 42:813-828

Druzhinina I S, Kopchinskiy A. Kubicek CP (2006) The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47:55-64

Druzhinina IS, Komon-Zelazowska M, Kredics L, Hatvani L, Antal Z, Belayneh T, Kubicek CP (2008) Alternative reproductive strategies of *Hypocrea orientalis* and genetically close but clonal *Trichoderma longibrachiatum*, both capable of causing invasive mycoses of humans. *Microbiology* 154:3447-3459

Druzhinina IS, Komon-Zelazowska M, Ismaiel A, Jaklitsch W, Mullaw T, Samuels GJ, Kubicek CP (2012) Molecular phylogeny and species delimitation in the section *Longibrachiatum* of *Trichoderma*. *Fungal Genetics and Biology* 49:358-368

Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792-1797

Figueirêdo GS, Figueirêdo LC, Cavalcanti FCN, Santos AC, Costa AF, Oliveira NT (2010) Biological and Chemical Control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma* spp. and *Ulocladium atrum* and Pathogenicity to Bean Plants. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53:1-9

Fontenelle ADB, Guzzo SD, Lucon CMM, Harakava R (2011) Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. *Crop Protection* 30:1492-1500

Friedl MA, Druzhinina IS (2012) Taxon-specific metagenomics of *Trichoderma* reveals a narrow community of opportunistic species that regulate each other's development *Microbiology* 158:69-83

Gava CAT, Menezes MEL (2012) Eficiência de isolados de *Trichoderma* spp no controle de patógenos de solo em meloeiro amarelo. *Revista Ciência Agronômica* 43:633-640

Haggag WM, Mohamed MES (2011) Biodiversity, Biological and Molecular Investigations of Biocontrol by the Genus *Hypocrea/Trichoderma* spp. European Journal of Scientific Research, 65:281-292

Hall TA (1999) Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
Harman GE (2004) *Trichoderma* – not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica* 39:103-108

Hermosa MR, Grondona I, Monte E, Iturriaga EA, Diaz-Minguez JM, Castro C, Monte E, Garcia-Acha JM (2000) Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied Environmental Microbiology* 66:1890-1898

Hoyos-Carvajal, L, Orduz S, Bissett J (2009) Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological Control* 51:409-416

Huelsenbeck,JP, Ronquist F (2001) Bayesian inference of phylogenetic tree. *Bioinformatics Application Note* 17:754-755

Jaklitsch WM, Samuels GJ, Dodd SL, Lu BS, Druzhinina IS (2006) *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Studies in Mycology* 56:135-177

Kamala TH, Devi SI (2012) Biocontrol properties of indigenous *Trichoderma* isolates from North-east India against *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*. *African Journal of Biotechnology* 34:8491-8499

Kimati H, Amorim L, Bergamin filho A, Camargo LEA, Rezende JAM (2005) Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas. Ceres, São Paulo

Kraus GF, Druzhinina I, Gams W, Bissett J, Zafari D, Szakacs G, Koptchinski A, Prillinger H, Zare R, Kubicek CP (2004) *Trichoderma brevicompactum* sp. nov. *Mycologia* 96:1059-1073

Kubicek CP, Bissett J, Druzhinina I, Kullnig-Gradinger C, Szakacs G (2003) Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South East Asian isolates. *Fungal Genetics Biology* 98:310-319

Lobo Júnior M, Abreu MS (2000) Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonista em diferentes temperaturas e pH's. *Ciência Agrotecnologia* 24:521-526

Lopes FAC, Steindorff AS, Geraldine AM, Brandão RS, Monteiro VN, Lobo Junior M, Coelho ASG, Ulhoa CJ, Silva RN (2012) Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal biology* 116:815-824

Louzada GAS, Carvalho DDC, Mmello SCM, Lobo Júnior M, Martins I, Braúna LM (2009) Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes

agroecosistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. *Biota Neotropica* 9:145-149

Mach RL, Zeilinger S (2003) Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60:515-522

Mello SCM, Ávila ZR, Braúna LM, Pádua RR, Gomes D (2007) Cepas de *Trichoderma* spp. para El control biológico de *Sclerotium rolfsii* SACC. *Fitosanidad* 11:1-11

Migheli Q, Balmas V, Komoñ-Zelazowska M, Scherm B, Fiori S, Kopchinskiy AG, Kubicek CP, Druzhinina IS (2009) Soils of a Mediterranean hot spot of biodiversity and endemism (Sardinia, Tyrrhenian Islands) are inhabited by pan-European, invasive species of *Hypocrea/Trichoderma*. *Environmental Microbiology* 11:35-46

Huelsenbeck,JP, Ronquist F (2001) Bayesian inference of phylogenetic tree. *Bioinformatics Application Note* 17:754-755

Raeder U, Broda P (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1:17-20

Rambaut A (2009) FigTree v1.3.1. [<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>] website Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom

Rezende MI, Barbosa AM, Vasconcelos AFD, Endo AS (2002) Xylanase production by *Trichoderma harzianum* rifai by solid state fermentation on sugarcane bagasse. *Brazilian Journal of Microbiology* 33:67-72

Rosa DR, Herrera CJL (2009) Evaluation of *Trichoderma* sp. as biocontrol agents against avocado root rot. *Biological Control* 51:66-71

Rousseeuw PJ (1987) Silhouettes: a graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *Journal of Computational and Applied Mathematics* 20:53-65

Sadfi-Zouaoui N, Hannachi I, Rouaissi M, Hajlaoui MR, Rubio MB, Monte E, Boudabous A, Hermosa MR (2009) Biodiversity of *Trichoderma* strains in Tunisia. *Canadian Journal of Microbiology*. 55:154-162

Samuels GJ, Ismaiel A, Bom MC, De Respini S, Petrini O (2010) *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia* 201:944-966

Santos C, Paterson RRM, Venâncio A, Lima N (2009) Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Applied Microbiology* 108:375-85

Sun RY, Liu ZC, Fu K, Fan L, Chen J (2012) *Trichoderma* biodiversity in China. *Journal of Applied Genetics* 53:343-354

Swofford DL (2003) Paup*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods) version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

Viterbo A, Horwitz BA (2010) Mycoparasitism. In Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi vol. 42, pp. 676–693. Edited by K. A. Borkovich & D. J. Ebbole. Washington: American Society for Microbiology.

Viterbo A, Horwitz BA (2010) Mycoparasitism. In: Borkovich K, Ebbole D (ed.) Cellular and molecular biology of filamentous fungi. ASM Press, Washington, DC

Webster J, Lomas N (1964) Does *Trichoderma viride* produce gliotoxin and viridinl. Transactions of the *British Mycological Society* 47:535-540

Weidling R (1934) Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology* 24:1153-1179

Weindling R (1932) *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology* 22:837-845

Weindling R (1941) Experimental consideration of the mold toxin of *Gliocladium* and *Trichoderma*. *Phytopathology* 31:991-1003

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, Inc., New York

Wuczowski M, Druzhinina I, Gherbawy Y, Klug B, Prillinger HJ, Kubicek CP (2003) Species pattern and genetic diversity of *Trichoderma* in a mid-European, primeval floodplain-Forest. *Microbiology Research* 133:158-125

Zhang C-L, Xu T (2005) Records of *Trichoderma* species from Hebei, Zhejiang, Yunnan and Tibet of China. *Mycosystema* 24:184-192

Anexo 1: Identificação molecular e análise das sequências de 144 espécies *Trichoderma* utilizados nesse estudo e procedência dos isolados.

Códigos dos isolados	Localização/substrato	Espécie	Clado	Nº GenBank
CEN126	Bahia/ <i>Moniliophthora perniciosa</i>	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC213490
CEN133	Bahia/ <i>Moniliophthora perniciosa</i>	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC509887
CEN134	Bahia/ <i>Moniliophthora perniciosa</i>	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC509889
CEN139	Goiás/Solo de campo de soja	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576639
CEN141	Goiás/Solo de campo de soja	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576640
CEN153	Goiás/Solo de campo de milho	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576641
CEN155	Goiás/Solo de campo de milho	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576642
CEN158	Goiás/Solo de campo de arroz	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576643

CEN162	Distrito Federal/ solo de cultivo de arroz	<i>T. asperellum</i>	Hamatum	KC56106
CEN169	Goiás/Solo de campo de sorgo	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576644
CEN170	Goiás/Solo de campo de milho	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576645
CEN192	Goiás/solo de pomar de goiabeira	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576646
CEN194	Goías/solo	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576647
CEN196	Goiás/solo de pomar de goiabeira	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576648
CEN197	Goiás/Solo de campo de sorgo	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576649
CEN198	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. tomentosum</i>	Harzianum	KC576650
CEN199	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. tomentosum</i>	Harzianum	KC576651
CEN201	Mato Grosso/solo de raiz de Vochyziaceae	<i>T. asperellum</i>	Hamatum	KC561056
CEN202	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576652
CEN203	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>N.I.</i>	N.I.	----
CEN205	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576653
CEN206	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. spirale</i>	Spirale	KC576654
CEN209	Distrito Federal/solo de copaíba	<i>T. koningiopsis</i>	Viride	KC561058
CEN210	Distrito Federal/solo de copaíba	<i>T. koningiopsis</i>	Viride	KC561059
CEN220	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576655
CEN221	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. koningiopsis</i>	Viride	KC576656
CEN222	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. spirale</i>	Spirale	KC576657
CEN223	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576658
CEN224	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576659
CEN230	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576660
CEN233	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. tomentosum</i>	Harzianum	KC576661
CEN234	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC561060
CEN235	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576662
CEN236	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576663
CEN238	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576664
CEN239	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576665
CEN240	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576666
CEN241	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576667
CEN243	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576668
CEN244	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576669
CEN245	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576670
CEN246	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576671
CEN247	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576672
CEN248	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576673
CEN249	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576674
CEN250	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC561061
CEN251	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576675
CEN252	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. tomentosum</i>	Harzianum	KC561062
CEN253	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576676
CEN254	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576677
CEN255	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576678
CEN256	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. tomentosum</i>	Harzianum	KC576679
CEN257	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576680

CEN258	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576681
CEN259	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>N.I.</i>	N.I.	----
CEN260	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. koningiopsis</i>	Viride	KC576682
CEN261	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576683
CEN262	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576684
CEN263	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576685
CEN264	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576686
CEN265	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. spirale</i>	Spirale	KC576687
CEN266	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. tomentosum</i>	Harzianum	KC576688
CEN267	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576689
CEN268	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576690
CEN269	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576691
CEN271	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576692
CEN272	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576693
CEN274	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576694
CEN280	São Paulo/solo	<i>T. longibrachiatum</i>	Longibrachiatum	KC576695
CEN284	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC561063
CEN287	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC561064
CEN288	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576696
CEN289	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC561065
CEN290	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576697
CEN298	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576698
CEN316	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576699
CEN435	Goiás/solo de cerrado	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576700
CEN437	Goiás/solo de cerrado	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576701
CEN438	Goiás/solo de cerrado	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576702
CEN439	Goiás/solo de cerrado	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576703
CEN440	Goiás/solo de cerrado	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576704
CEN441	Goiás/solo de cerrado	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576705
CEN500	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. erinaceum</i>	Viride	KC576706
CEN501	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. longibrachiatum</i>	Longibrachiatum	KC576707
CEN503	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. asperellum</i>	Hamatum	KC561066
CEN504	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. asperellum</i>	Hamatum	KC561067
CEN506	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. longibrachiatum</i>	Longibrachiatum	KC576708
CEN507	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. virens</i>	Virens	KC576709
CEN508	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576710
CEN509	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. brevicompactum</i>	Brevicompactum	KC561068
CEN510	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC561069
CEN511	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. brevicompactum</i>	Brevicompactum	KC561070
CEN512	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. asperellum</i>	Hamatum	KC561071
CEN514	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. asperellum</i>	Hamatum	KC561072
CEN516	Goiás/solo de cerrado	<i>T. brevicompactum</i>	Brevicompactum	KC576711
CEN518	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. asperellum</i>	Hamatum	KC561073
CEN519	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. asperellum</i>	Hamatum	KC561074
CEN520	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. asperellum</i>	Hamatum	KC561075

CEN521	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. erinaceum</i>	Viride	KC576712
CEN522	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. brevicompactum</i>	Brevicompactum	KC561076
CEN523	Distrito Federal/solo de pomar de maracujazeiro	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576713
CEN555	Bahia/solo	<i>T. ghanense</i>	Longibrachiatum	KC576714
CEN648	Goiás/solo de cultivo de café orgânico	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576715
CEN660	Goiás/solo	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576716
CEN682	Goiás/solo	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576717
CEN689	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	<i>T. asperellum</i>	Hamatum	KC576718
CEN691	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576719
CEN693	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	<i>T. hamatum</i>	Hamatum	KC576720
CEN698	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	<i>T. koningiopsis</i>	Viride	KC561077
CEN703	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	<i>T. koningiopsis</i>	Viride	KC576721
CEN718	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	<i>T. koningiopsis</i>	Viride	KC576722
CEN723	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	<i>T. koningiopsis</i>	Viride	KC576723
CEN725	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	N.I.	N.I.	-
CEN732	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576724
CEN739	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	<i>T. koningiopsis</i>	Viride	KC576725
CEN747	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	<i>T. asperellum</i>	Hamatum	KC561078
CEN758	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	<i>T. koningiopsis</i>	Viride	KC576726
CEN759	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	<i>T. asperellum</i>	Hamatum	KC576727
CEN761	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	<i>T. koningiopsis</i>	Viride	KC561079
CEN766	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC57672
CEN768	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	<i>T. asperellum</i>	Hamatum	KC57672
CEN775	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	<i>T. spirale</i>	Spirale	KC57673
CEN776	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	<i>T. koningiopsis</i>	Viride	KC56100
CEN779	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	K576731
CEN785	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	<i>T. koningiopsis</i>	Viride	KC76732
CEN786	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	<i>T. asperellum</i>	Hamatum	KC51081
CEN826	Distrito Federal/solo	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC57733
CEN827	Distrito Federal/solo	<i>T. hamatum</i>	Hamatum	KC57634
CEN828	Distrito Federal/solo	<i>T. hamatum</i>	Hamatum	KC57675
CEN829	Distrito Federal/solo	N.I.	N.I.	-----
CEN830	Distrito Federal/solo	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576736
CEN834	Distrito Federal/solo	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576737
CEN835	Distrito Federal/solo	<i>T. virens</i>	Virens	KC576738
CEN839	Distrito Federal/solo	<i>T. hamatum</i>	Hamatum	KC576739
CEN841	Distrito Federal/solo	<i>T. virens</i>	Virens	KC576740
CEN847	Distrito Federal/solo de cultivo de soja	<i>T. asperellum</i>	Hamatum	KC561082
CEN849	Distrito Federal/solo	<i>T. spirale</i>	Spirale	KC576742
CEN852	Rio Grande do Sul/solo nativo	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576743
CEN853	Rio Grande do Sul/solo nativo	<i>T. koningiopsis</i>	Viride	KC576744
CEN854	Rio Grande do Sul/solo nativo	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC561083
CEN855	Rio Grande do Sul/solo nativo	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576745
CEN857	Rio Grande do Sul/solo nativo	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576741
CEN858	Rio Grande do Sul/solo de lavoura	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576746

CEN859	Rio Grande do Sul/solo de lavoura	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC576747
CEN860	Rio Grande do Sul/solo nativo	<i>T. virens</i>	Virens	KC576748
CEN862	Rio Grande do Sul/solo de lavoura	<i>T. harzianum</i>	Harzianum	KC509888
CEN865	Rio Grande do Sul/solo nativo	<i>T. asperellum</i>	Hamatum	KC561084
CEN1067	Distrito Federal/Cylindrocladium	<i>T. longibrachiatum</i>	Longibrachiatum	KC576749

*N.I.: Gêneros identificados apenas por morfologia.

Capítulo II

Relações filogenéticas, identificação pela técnica MALDI-TOF MS e potencial de isolados de *Trichoderma* no controle do mofo branco

Resumo: O feijoeiro comum é uma das grandes culturas mais plantadas no Brasil e sofre sérios danos pelo mofo branco, doença causada pelo patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. Espécies do gênero *Trichoderma*, com distribuição cosmopolita, são facilmente isolados do solo e matéria orgânica em decomposição. Esses fungos podem atuar como agentes de biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* por diversos mecanismos, inclusive por metabólitos não voláteis, competição e micoparasitismo. Sua identificação é primordial para estabelecer um programa de controle biológico de fitopatógenos, que pode ser estabelecida por métodos moleculares pelo gene ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA e por espectrometria de massa utilizando MALDI-TOF MS. Nesse estudo observou-se a ação de 29 isolados de *Trichoderma* contra o patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro* e em casa de vegetação, promoção de crescimento em feijoeiro e perfis moleculares por espectrometria de massa de proteínas. A nova análise dos resultados obtidos nos testes *in vitro* realizados no capítulo anterior, verificando-se que 38% dos isolados alcançaram o valor máximo (nota 1) em pareamento de culturas e todos os isolados atingiram 82,9 a 100% de inibição micelial do patógeno quando expostos aos metabólitos não voláteis do antagonista, resultando em 29 isolados que se destacaram quanto ao alto grau de inibição do patógeno. Nos experimentos em casa de vegetação, verificou-se que um grupo com 19 isolados proporcionaram defesa total aos feijoeiros, sendo que foi observada severidade nula do patógeno com os isolados CEN201 e CEN162 da espécie *Trichoderma asperellum* resultaram nos maiores índices de promoção de crescimento nos feijoeiros com variação de 26,2 a 33,9%. Os perfis moleculares e por MALDI-TOF MS demonstraram ser de grande valia para a designação das espécies de *Trichoderma*, as duas técnicas confirmaram as espécies, com exceção de dois isolados das espécies *Trichoderma asperellum* (CEN768) e *Trichoderma koningiopsis* (CEN698).

Palavras chave: Identificação molecular, seleção de agentes de biocontrole *in vitro*, Promoção de crescimento, *Trichoderma*

Abstract: The common bean is a major crop grown in Brazil and suffers serious damage by white mold disease caused by the pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. Species of the genus *Trichoderma*, with a cosmopolitan distribution, are easily isolated from soil and decomposing organic matter. These fungi can act as biocontrol agents of *Sclerotinia sclerotiorum* by several mechanisms, including a non-volatile metabolites, mycoparasitism and competition. His identification is paramount to establish a program of biological control of plant pathogens, which can be established by molecular methods for gene ITS1-5.8S-ITS2 rDNA and by mass spectrometry using MALDI-TOF MS. This study was reported the antagonist action of 29 isolates of *Trichoderma* against the pathogen *S. sclerotiorum* *in vitro*, in greenhouse and in promoting growth in bean and

molecular profiles by protein mass spectrum. A reanalysis of the results obtained in vitro tests performed in the previous chapter, checking that 38% of isolates reached the maximum value (note 1) of pairing cultures and all isolates had 82,9 to 100% inhibition of mycelial pathogen when exposed to volatile metabolites of the antagonist, resulting in 29 isolates outstanding as the high degree of inhibition of the pathogen. In greenhouse experiments, a group of 19 isolates provided the total suppression of disease in bean seedlings, and that was observed no severity of the pathogen with the CEN201 and CEN162 identified as *T. asperellum* resulted in higher rates of growth promotion in bean plants ranging from 26,2 to 33,9%. The molecular profiles by MALDI-TOF MS proved invaluable for the designation of *Trichoderma* species, both techniques confirmed the species, except for isolated CEN768 (*T. asperellum*) and CEN698 (*T. koningiopsis*).

Key words: Molecular identification, selection of biocontrol agents in vitro, promoting growth, *Trichoderma*

Introdução

O Feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) é uma das principais culturas produzidas no Brasil e no mundo. Sua importância vai além do seu aspecto econômico, por sua relevância nutricional e sua importância cultural na culinária de diversos países e culturas (Barbosa e Gonzaga 2012). Essa planta é cultivada durante todo o ano no Brasil em grande diversidade de agroecossistemas, situação que expõe as plantas a inúmeros tipos de doenças. As principais doenças do feijoeiro-comum são provocadas por fungos habitantes do solo, tais como *Fusarium solani* f. sp. *Phaseoli* (W.C. Snyder & H.N. Hansen), *Rhizoctonia solani* (J.G. Kühn), *Macrophomina phaseolina* (Goid) e *Sclerotinia sclerotiorum* de Bary (lib.), entre outras e podem ser responsáveis por até 100% de perdas na produção (Barbosa e Gonzaga 2012).

S. sclerotiorum, agente causal do mofo branco, possui um círculo de hospedeiros constituído de aproximadamente 408 espécies em 278 gêneros de plantas. Esse patógeno pode afetar toda parte aérea da planta, causando lesões inicialmente pequenas e aquosas. Estas lesões rapidamente aumentam de tamanho, tomando todo o órgão afetado (Boland e Hall 1994, Kimati et al. 2005). A doença causa perdas significantes

em campos de feijão irrigado, principalmente na Região Central do Brasil (Charchar et al., 1999).

A agricultura moderna é dependente de produtos químicos para o controle fitossanitário. Entretanto, fungicidas e fumigantes são responsáveis por drásticos efeitos na microbiota do solo, assim como os herbicidas e inseticidas. Esses produtos são capazes de poluir a atmosfera e o meio ambiente, conseqüentemente atingindo os organismos, com os quais entram em contato de forma direta ou indireta (Kamala e Indira 2011). Além disso, o uso repetitivo de agroquímicos induz a resistência dos patógenos alvos contra esses compostos (Goldman et al. 1994).

Mais de 30 espécies de fungos e bactérias são antagonistas de *S. sclerotiorum*. Entre esses antagonistas estão incluídos espécies de *Trichoderma*, fungo considerado um dos mais atrativos para controle biológico, uma vez que apresenta diferentes mecanismos de ação contra os patógenos de plantas (Castillo et al. 2011).

A forma amórfica do gênero *Trichoderma* (Hypocreales, Ascomycota) tem distribuição cosmopolita no solo, em material vegetal ou tronco de árvores em decomposição (Druzhinina e Kubicek 2004). Esses organismos são economicamente importantes pela produção de enzimas industriais (*Trichoderma reesei*=*Hypocrea jecorina*) (Alvira et al. 2012) e antibióticos (Reino et al. 2008), além de suas aplicações como agentes de biocontrole (Figueirêdo et al. 2010, Affokpon et al. 2011).

A identificação por morfologia é uma técnica morosa que gera muitas dificuldades devido à homoplasia de características morfológicas entre as formas anamórficas de *Trichoderma* (Chaverri e Samuels, 2003; Druzhinina et al, 2006). Rifai (1969) em sua classificação para o gênero, reconheceu nove espécies: *T. viridi* Persoon, *T. aureoviride* Rifai, *T. koningii* Lieckfeldt, *T. harzianum* Rifai, *T. longibrachiatum* Bisset, *T. polysporum* Link e *T. glaucum* Rifai. Ao estudar a discriminação das espécies

delimitadas por Rifai, Bisset (1991a,b) propôs o termo “seções” para separar espécies similares dentro das nove espécies originalmente aceitas até então. De acordo com esse sistema taxonômico, os fungos do gênero *Trichoderma* estão distribuídos em cinco seções: *Trichoderma*, *Longibrachiatum*, *Saturnisporum* e *Pachybasium*

Até os anos 1990, a taxonomia de *Trichoderma* era baseada inteiramente em características morfológicas observadas em microscopia óptica e a maioria dos isolados de *Trichoderma* citados na literatura eram erroneamente identificados em razão da dificuldade na diferenciação interespecífica das estruturas morfológicas (Kullnig et al. 2001). Após a década de 1990, quando as técnicas moleculares passaram a ser rotineiramente empregadas, ocorreu a confirmação ou a correção das espécies anteriormente designadas. Já na década passada, um banco de dados virtual (Gen Bank) foi estabelecido, onde estão depositadas sequências nucleotídicas da maioria das espécies conhecidas. Além dessa base de dados, foi criado um site dedicado à comparação de sequências nucleotídicas exclusiva para espécies de *Trichoderma* e seus teleomorfos do gênero *Hypocrea* (Druzhinina et al. 2006, <http://www.isth.info/>), inaugurando, assim, uma nova era na taxonomia desses fungos (De Respini et al. 2010, Degenkolb et al. 2008).

Recentemente, a técnica baseada em perfis de proteínas por MALDI-TOF MS (Matriz assistida de laser de dessecção/ionização de tempo de voo em espectrometria de massa) surgiu como ferramenta valiosa para a identificação e classificação de microrganismos. Esta técnica se baseia no fato de que espécies distintas apresentam variações no seu perfil de proteínas, as quais podem ser detectadas pela análise dos perfis protéicos obtidos. Sua aplicação vem sendo bem sucedida na diferenciação de espécies de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Emericella*, *Fusarium*, *Geosmithia*, *Neosartorya*, *Penicillium*, *Pseudallescheria*, *Scedosporium*, *Talaromyces*,

Fomitopsis (Santos et al. 2009, De Respinis et al. 2010, Carbonnelle et al. 2012, Del Chierico et al. 2012)

O objetivo desse trabalho foi realizar a identificação com base nos perfis moleculares e pela técnica MALDI TOF-MS, bem como a análise filogenética, de vinte e nove isolados de *Trichoderma* spp. Objetivou-se também selecionar isolados de *Trichoderma*, com alto nível de antagonismo contra *S. sclerotiorum* e que promovessem o crescimento em feijoeiro utilizando-se experimentos *in vitro* e em casa de vegetação.

Materiais e Métodos

Microorganismos e condições de cultura

Vinte e nove isolados de *Trichoderma* pertencentes à Coleção de Fungos para Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa foram utilizados neste trabalho por apresentarem alto nível de inibição micelial de *S. sclerotiorum*. As culturas, mantidas em nitrogênio líquido, foram recuperadas em placas de Petri contendo o meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA), confeccionado com caldo de 200 g de batata e 20 g de dextrose em 1 L de água. As culturas foram incubadas a 25° C. Nos ensaios em que *Trichoderma* spp. foram desafiados como agentes de biocontrole, empregou-se um isolado do fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum* de Bary (CEN217) oriundo de feijoeiro, o qual foi cedido pela Embrapa Cerrados.

Extração do rDNA

Três discos de ágar (5 mm Ø) colonizado com o fungo para frascos Erlenmeyer de 225 mL de capacidade, contendo 75 mL de meio líquido à base de batata e dextrose (200 g de batata e 20 g de dextrose em 1 L de água). Após três dias de incubação a 25°C em agitador orbital (Lab line Instruments, Inc., modelo 60160 a 150 rpm), a massa fúngica foi coletada por filtração à vácuo e macerada em nitrogênio líquido utilizando pistilo e almofariz de porcelana. O DNA genômico total foi extraído pelo método fenol-

clorofórmio (Raeder e Broda, 1985). Para a remoção das impurezas do DNA, o precipitado foi lavado duas vezes com 200 µl de etanol (Vetec) 70% a 4°C, centrifugado por 1 minuto e novamente o sobrenadante foi descartado. A secagem do precipitado de DNA foi realizada em *speedvacuum* (Eppendorf Concentrator 5301) por 10 a 15 minutos e em seguida ressuspendido em 50 µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 e 1 mM EDTA). O DNA assim purificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) 1% (5V/cm), corado em solução de brometo de etídio e foto documentado sob luz UV. A quantificação do DNA genômico total foi realizada por meio de comparação com marcador 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Amplificação por PCR e sequenciamento

O agrupamento do gene do rRNA nuclear contendo espaçadores transcritos ITS1-5.8S-ITS2 do rRNA foi amplificado utilizando a combinação de iniciadores ITS1 (5'TTC CGT AGG TGA ACC TGC GG 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') conforme White et al. (1990). A reação totalizou 25 µL contendo 4 µl com a concentração de 5 ng/µl de DNA, 2,5 de tampão 10x na concentração final de 1x, 0,5 µl de dNTP 10 mM (0,2 nM de cada), 0,75µl de MgCl₂ 50 mM, oligonucleotídeos iniciadores 10 mM ITS1 e ITS4 (0,5 mM cada), 0,125 µl de Taq DNA polimerase (0,5 U/ µl) e água ultrapura para completar o volume final da reação. As reações foram realizadas em termociclador MJ Research, INC. PTC – 100MT, sob as seguintes condições térmicas: 94 °C por 4 minutos, 39 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 72°C por 8 minutos. Ao final da reação, o produto foi mantido a 4 °C. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese 5V/cm em gel de agarose 1,0%, em tampão TBE 0,5X, posteriormente submetidos à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) 1% (5V/cm), corados em solução de brometo de etídio e foto documentados em luz UV. Os produtos obtidos pela PCR

foram purificados e sequenciados pela empresa Macrogen Inc. (Seoul, Coreia do Sul). Os iniciadores utilizados para a reação de sequenciamento foram os mesmos descritos anteriormente para as reações da PCR.

Análise das sequências

Os eletrofenogramas resultantes do sequenciamento automático foram analisados e as sequências contíguas, montadas com o auxílio do programa DNA *Sequence Assembly* BASER *Software* 2,93 (<http://www.dnabaser.com/index.html>). Pesquisas para a verificação da autenticidade de todas as sequências nucleotídicas foram realizadas utilizando-se dois bancos de dados genéticos, como a seguir: 1) análise comparativa no banco de dados *basic local alignment search tool* (BLAST) do NCBI, (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Este utiliza o método heurístico para encontrar o melhor escore de alinhamentos locais entre a sequência submetida e o banco de dados; 2) busca na base de dados TrichoKEY, específica para taxonomia de *Trichoderma* e seu teleomorfo *Hypocrea* (ISTH, <http://www.isth.info/>). Esta permite o diagnóstico de sequências nucleotídicas com ferramentas de busca por similaridade (*DNA oligonucleotide barcode*) e cobre a maioria das espécies geneticamente caracterizadas das espécies de *Trichoderma/Hypocrea*.

Análise filogenética

As sequências dos ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA foram analisadas pelos método da máxima parsimônia (MP), ponderada (reponderação progressiva) e não ponderada, e da inferência filogenética Bayesiana (IB) para a caracterização taxonômica e o estabelecimento das relações filogenéticas entre os isolados de *Trichoderma* analisados. As sequências ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA de 144 isolados de *Trichoderma* foram alinhadas utilizando o programa MUSCLE - Multiple Sequence Alignment v3.5 (Edgar,

2004) e o alinhamento obtido foi corrigido manualmente utilizando BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.8.0, 1997-2007 (Hall, 1999). Os *gaps* presentes no alinhamento original foram preservados e codificados separadamente utilizando o programa FastGap v1.2 (Borchsenius, 2009). A análise MP foi realizada utilizando o programa PAUP* v4.0b10, 2001 (Swofford, 2003). A busca heurística consistiu de 1.000 repetições utilizando a adição randômica dos táxons (Stepwise Addition). A troca de ramos foi realizada pelo algoritmo TBR (Tree bisection and reconnection) salvando as primeiras 1.000 árvores mais parsimoniosas. Na análise MP os indels foram tratados como *newstate*. A IB foi realizada utilizando o programa MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001). O modelo de substituição nucleotídica mais apropriados ao alinhamento das sequências ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA foi o modelo GTR (*General Time Reversible*). O algoritmo Monte Carlo via Cadeia de Markov (MCMC) foi iniciado a partir de uma árvore aleatória e seis Cadeias de Markov processadas para 1.000.000 gerações com amostras coletadas a cada 100 gerações. Nas análises, foram descartadas 25% das amostras iniciais (*burn-in*) e o restante utilizado para determinar as distribuições dos valores de probabilidade posterior. Os *indels* foram excluídos da análise. As árvores MP e IB foram editadas com o auxílio do programa Fig Tree – Tree figure drawing toll v1.3.1 (Raumbaut, 2009) e Adobe Illustrator Cs5 v15.0.0.0. O *outgroup* utilizado para o enraizamento da árvore foi o isolado CEN1067 da espécie *T. longibrachiatum*.

MALDI-TOF MS

A análise dos perfis protéicos dos fungos por MALDI-TOF MS foi desenvolvida na Micoteca da Universidade do Minho, na cidade de Braga em Portugal. Os isolados de *Trichoderma* spp. foram previamente enviados para Portugal com autorização dos órgãos competentes brasileiros e portugueses.

As colônias de *Trichoderma*, cultivadas em BDA a 25°C em frascos plásticos com volume de 2 mL, foram mantidas em câmara fria até o uso. Os isolados foram reativados, transferindo-se pequenos fragmentos de micélio e esporos contidos nos tubos para placas de Petri de 4,5 cm de diâmetro contendo 10 mL do meio BDA. As colônias foram incubadas em condições aeróbias por quatro dias em câmara de crescimento à temperatura de 25°C na ausência de luz. Foram necessários dois repiques consecutivos para que as características originais das colônias fossem restabelecidas. Ao atingirem a fase exponencial de crescimento (24 horas de cultivo), uma pequena quantidade do material biológico contendo micélio, esporos ou a mistura dos foi transferida para placas de MALDI-TOF MS. Cada amostra foi recoberta com 0,5 µl de solução aquosa do ácido 2,5-dihidroxibenzoico (75 mg/mL do ácido 2,5-diidroxibenzoico [DHB] em etanol/água/acetonitrila [1:1:1] com 0,03% ácido trifluoroacético [TFA]) (Santos et. al., 2011) e depois de agitada suavemente com a ponta da pipeta a fase líquida foi evaporada a temperatura ambiente. As amostras foram então analisadas em um equipamento de MALDI-TOF MS Axima LNR system (Kratos Analytical, Shimadzu, Manchester, UK) equipado com laser de nitrogênio que opera em um comprimento de onda de 337 nm. A intensidade do laser foi ajustada para um nível suficiente à produção de íons. Os espectros de massa das proteínas dos fungos foram obtidos dentro da escala compreendida entre 2000 e 20000 m/z, onde as proteínas ribossomais aparecem. Doze proteínas ribossomais da cepa de *E. coli* DH5α com os valores bem definidos das suas massas moleculares (4365,4; 5096,8; 5381,4; 6241,4; 6255,4; 6316,2; 6411,6; 6856,1; 7158,8; 7274,5; 7872,1; 9742,0 e 12227,3 Da) foram utilizadas para a calibração externa do equipamento. Os espectros foram adquiridos no modo linear, com um retardamento de 104 ns e uma voltagem de aceleração de +20 kV. Os espectros finais foram obtidos pela soma de 20 tiros de laser acumulados por

cada espectro parcial e 50 espectros parciais foram produzidos por amostra, levando a um total de 1000 tiros por cada espectro final. As listas dos picos foram então exportadas para o software SARAMIS™ (Spectral Archiving and Microbial Identification System, AnagnosTec, Postdam-Golm, Alemanha, www.anagnostec.eu). As listas de picos dos espectros de cada amostra foram comparadas no banco de dados SARAMIS™, gerando um agrupamento estatístico baseado nas similaridades espectrais por agrupamento.

Ação supressiva de *Trichoderma* spp. ao mofo branco em casa de vegetação

Os ensaios conduzidos para verificar a ação de *Trichoderma* spp. contra *S. sclerotiorum*, *in vivo*, foram realizados com feijão ‘carioca’, em casa de vegetação monitorada quanto às condições de temperatura e umidade. Utilizaram-se os mesmos isolados de *Trichoderma* descritos anteriormente.

Inóculo para o ensaio foi produzido em frascos Erlenmeyer de 125 mL de capacidade, contendo 20 g grãos de arroz parboilizado previamente umedecidos (60% p/v) e autoclavados. Cada frasco recebeu, assepticamente, três discos (5 mmØ) de micélio/âgar retirados de colônias de *Trichoderma* previamente desenvolvidas em placas de Petri. As culturas foram incubadas como descrito anteriormente. A cada três dias o substrato foi revolvido para promover a troca gasosa, quebra do micélio e aumento da superfície de conidição (Jackson, 1997). Após sete dias nessas condições, o substrato de cada frasco foi lavado individualmente com água corrente para a extração dos esporos. A concentração de inóculo foi quantificada em câmara de Neubauer e ajustada para 10⁸ conídios/mL.

Processo similar foi empregado para a multiplicação da *S. sclerotiorum*, apenas substituindo-se os frascos por saco de polipropileno, os quais foram preenchidos com

100 g de arroz, devidamente lacrados e autoclavados, e então, recebendo cada um, 10 discos (5 mmØ) de micélio/Agar retirados de culturas do patógeno.

Cem gramas de solo previamente autoclavado e adubado foram colocados em células de bandejas plásticas contendo 72 unidades (4.5 cm de diâmetro e 110 mL de capacidade/célula). As células receberam 50 g de solo, em seguida, 1 grama de arroz colonizado com o patógeno, que foi distribuída uniformemente sobre a superfície e, finalmente, o restante do solo. Verteram-se, então, 10 mL de suspensão de inóculo (10^8 conídios/mL) do antagonista e semearam-se sementes de feijão (uma por célula) pré-geminadas em papel filtro umedecido (3 dias à 25°C no escuro). O experimento foi conduzido com 4 repetições por tratamento com delineamento inteiramente casualizado. As avaliações foram realizadas a cada sete dias no período de 4 semanas a contar da data de plantio (totalizando quatro avaliações ao longo do experimento), com base na severidade de doença, valendo-se da escala proposta por Balmas et al. (2004) para *Vicia faba*, adaptada para o feijoeiro. De acordo com essa escala, as notas variaram de 0 (ausência de doença) a 3, desfolha total da planta. O experimento foi conduzido 2 vezes com quatro repetições por tratamentos com delineamento inteiramente casualizados.

Análises estatísticas

Para o agrupamento dos isolados de *Trichoderma* em relação às diversas variáveis estudadas, utilizou-se o algoritmo geral PAM (Partitioning Around Medoids), uma versão mais robusta do K-means. De acordo com os K-clusters formados calcularam-se as informações da silhueta. Os dados relativos ao estudo do antagonismo obtidos no capítulo 1, para os 29 isolados, foram re-agrupados neste capítulo.

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa R, versão 2.15.1 utilizando-se os testes de Silhueta (<http://www.r-project.org/>).

Reanálise dos Dados de Pareamento de Culturas e Metabólitos não voláteis

Foram realizados reagrupamentos dos 29 isolados, com base nos resultados obtidos nos experimentos conduzidos no capítulo I.

Resultados

Identificação das espécies

A região espaçadora transcrita ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA de 29 isolados de *Trichoderma* pertencentes a três estados brasileiros foram sequenciados, identificados e relacionados de acordo com suas filogenias (Tabela 01).

Tabela 01: Identificação molecular e análise das sequências de *Trichoderma* utilizados nesse estudo dos diferentes isolados coletados em localidades distintas do país.

Código dos isolados	Localização/substrato	ITS1-5-8S-ITS2	Nº de acesso do NCBI Genbank
CEN162	Distrito Federal/ solo de cultivo de arroz	<i>T. asperellum</i>	KC561056
CEN201	Mato Grosso/solo de raiz de <i>Vochysiaceae</i>	<i>T.asperellum</i>	KC561057
CEN209	Distrito Federal/solo de copaíba	<i>T. koningiopsis</i>	KC561058
CEN210	Distrito Federal/solo de copaíba	<i>T. koningiopsis</i>	KC561059
CEN234	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	KC561060
CEN250	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	KC561061
CEN252	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. tomentosum</i>	KC561062
CEN284	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	KC561063
CEN287	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	KC561064
CEN289	Distrito Federal/solo de campo de algodão	<i>T. harzianum</i>	KC561065
CEN503	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. asperellum</i>	KC561066
CEN504	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. asperellum</i>	KC561067
CEN509	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. brevicompactum</i>	KC561068
CEN510	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. harzianum</i>	KC561069
CEN511	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. brevicompactum</i>	KC561070
CEN512	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. asperellum</i>	KC561071
CEN514	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. asperellum</i>	KC561072
CEN518	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. asperellum</i>	KC561073
CEN519	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. asperellum</i>	KC561074
CEN520	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. asperellum</i>	KC561075
CEN522	Pernambuco/solo de pomar de goiabeira	<i>T. brevicompactum</i>	KC561076
CEN698	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	<i>T.koningiopsis</i>	KC561077
CEN747	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	<i>T. asperellum</i>	KC561078

CEN761	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	<i>T. koningiopsis</i>	KC561079
CEN776	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	<i>T. koningiopsis</i>	KC561080
CEN786	Distrito Federal/solo de pomar de morangueiro	<i>T. asperellum</i>	KC561081
CEN847	Distrito Federal/solo de cultivo de soja	<i>T.asperellum</i>	KC561082
CEN854	Rio Grande do Sul/solo nativo	<i>T.harzianum</i>	KC561083
CEN865	Rio Grande do Sul/solo nativo	<i>T. asperellum</i>	KC561084

As sequências amplificadas por PCR geraram produtos de 630 pares de bases (figura 02). Após o sequenciamento e montagem das sequências contíguas, foram observados produtos variando de 435 a 1243 pares de bases. Pela análise das 29 sequências, distinguiram-se cinco espécies diferentes: *T. asperellum* Samuels, Liechfeldt & Nirenberg (13 isolados), *T. tomentosun* Bisset (1), *T. harzianum* Rifai (7), *T. koningiopsis* Samuels C. Suárez & H.C. Evans (5) e *T. brevicompactum* G.F. Kraus, C.P. Kubicek & W. Gams (3).

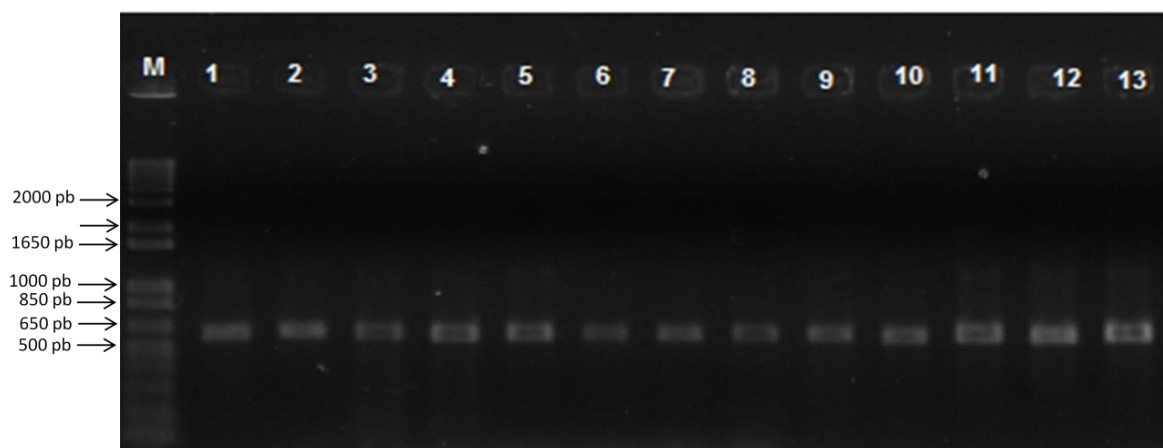


Figura 02 Análise de produtos de PCR em gel de agarose 1%, da região do rDNA com iniciadores ITS1 e ITS4. M: marcador molecular (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen); 1 a 13: amplificação de amostras de rDNA utilizando-se iniciadores ITS1 e ITS4 com aproximadamente 630 pares de bases.

Caracterização taxonômica

A árvore filogenética gerada a partir das sequências de genes ITS1-5.8S- ITS2 do rDNA, para os 29 isolados (Figura 03) mostra a existência de 4 clados bem definidos e fortemente suportados com probabilidade posterior acima de 0,9 e/ou *bootstrap* acima

de 80%. Os clados são: Hamatum, Viride; Brevicompactum e Harzianum, agrupados com suas respectivas referências. O clado Hamatum é composto por 13 isolados de *T. asperellum* e 6 desses isolados (CEN503, CEN504, CEN512, CEN514, CEN519 e CEN520), formando um grupo monofilético conservado e fortemente suportado com probabilidade posterior de 0,95 e *bootstrap* 92%. Esses 6 isolados foram coletados em solo de pomar de goiabeira em Pernambuco e pode-se inferir que eles possuem alta similaridade. Entretanto, observou-se que o isolado CEN518, também coletado em Pernambuco, encontra-se fora desse grupo supracitado, concluindo-se que ele possui maior diferença filogenética dos outros isolados coletados nessa mesma região. O clado Viride é composto por 5 isolados de *T. koningiopsis* e pode-se inferir que os isolados CEN761 e CEN776 coletados no solo de pomar de morangueiro no DF apresentam alta similaridade. O isolado CEN698, coletado nessa mesma localidade/substrato, demonstrou-se ser filogeneticamente diferente dos isolados supracitado. No clado Harzianum observa-se a formação de dois grupos monofiléticos bem determinados e fortemente suportados com probabilidade posterior acima de 0,8 e/ou *bootstrap* acima de 75%: um grupo composto por 7 isolados de *T. harzianum* e outro grupo formado por 1 isolado de *T. tomentosum*. Esses são dados informativos que determinam a boa separação dos isolados das espécies *T. harzianum* e *T. tomentosum*.

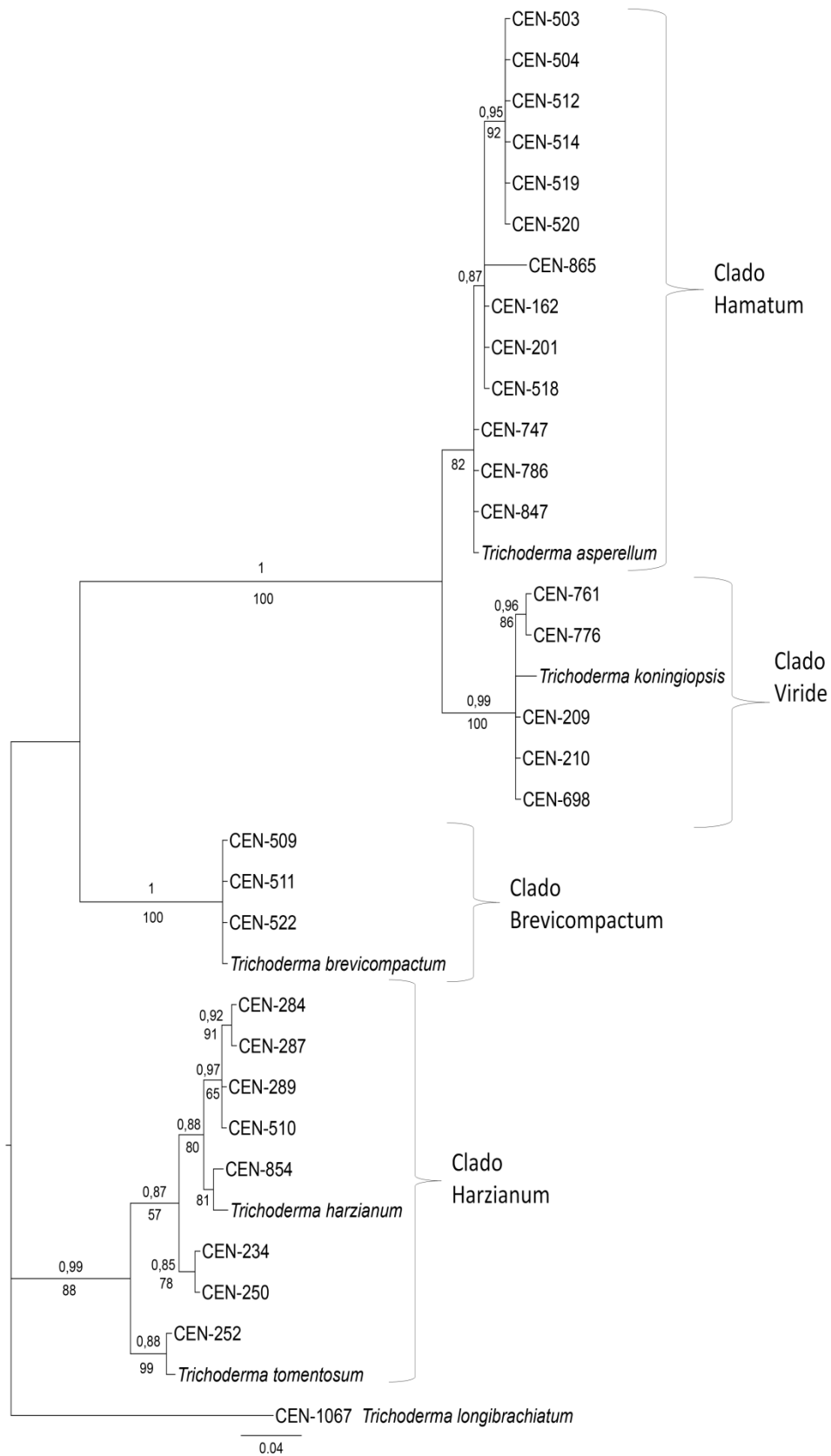
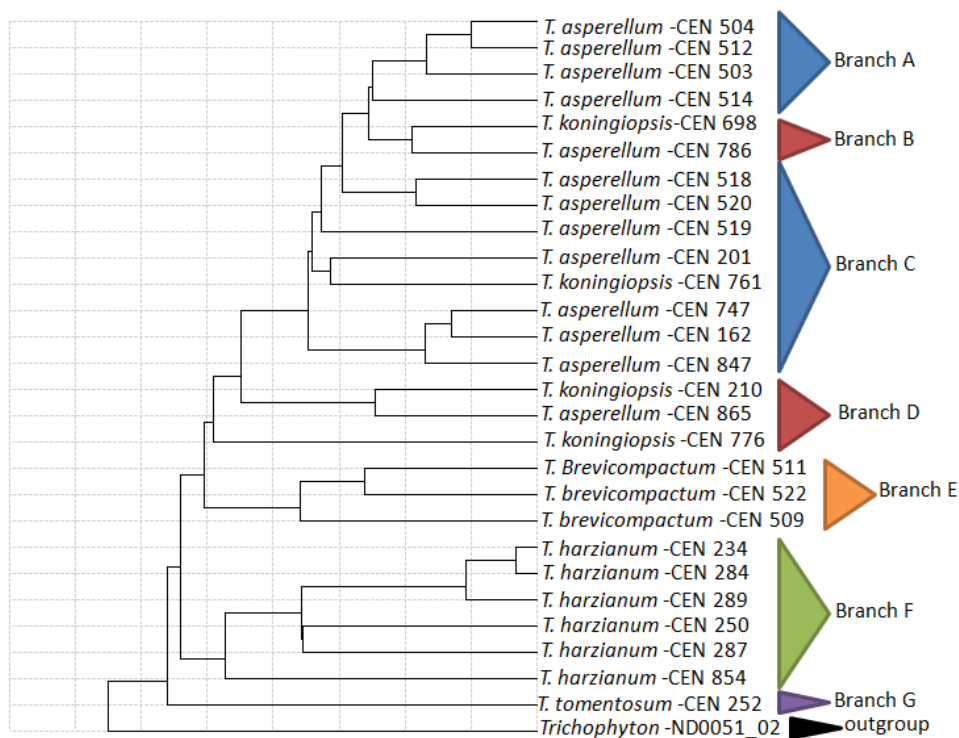


Figura 03 Árvore filogenética baseada na região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA dos 29 isolados de *Trichoderma* pertencentes à Coleção de Fungos para Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa da Embrapa. A topologia da árvore foi

obtida da IB e os valores de suporte da IB e MP estão presentes acima (probabilidade posterior > 0,8) e abaixo (bootstrap > 50%) dos ramos, respectivamente. Os isolados *T. asperellum* (JN004182), *T. koningiopsis* (HQ857120), *T. harzianum* (JN179079), *T. tomentosum* (HQ857116) e *T. brevicompactum* (JQ040334) são referências externas retiradas do GenBank. O isolado CEN1067 (*Trichoderma longibrachiatum*) foi utilizado como *outgroup*. A escala em barra representa o número de substituições nucleotídica para cada base

Análise dos espectros do perfil proteômico por MALDI TOF-MS

Os espectros de massa obtidos na faixa de 2000 a 20000 m/z para obter os perfis moleculares de cada isolado de *Trichoderma* foram alcançados para os 29 isolados em estudo a partir da mistura micélios/esporos com dois dias de crescimento. Dois isolados de *T. koningiopsis* (CEN209 e CEN510) não foram incluídos nesta análise por apresentar baixa qualidade em seus espectros. Na Figura 04 observa-se um dendrograma baseado no agrupamento estatístico entre os espectros de MALDI-TOF MS para 27 isolados de *Trichoderma* com as seguintes espécies distinguidas por biologia molecular baseada na região do rDNA. No dendrograma observou a formação de sete ramos distintos. Nos ramos A e C, observou-se um bom agrupamento dos isolados de *T. asperellum*. Já no grupo B e D os ramos foram formados com a mistura de espécies de dois isolados de *T. asperellum* e *T. koningiopsis*. No ramo E observou-se a formação de um grupo único de três isolados de *T. brevicompactum*. No ramo F, os seis isolados de *T. harzianum* também foram bem separados pela técnica. No ramo G, o único isolado de *T. tomentosum* ficou inserido no dendrograma, num ramo único, logo abaixo do ramo composto pelos isolados de *T. harzianum*.



Filter:
 Error (%): 0.08
 Absolute Intensity >= 0
 Relative Intensity >= 0
 Massrange from 2000 to 20000
 Select Exclusion list:

Figura 04 Dendrograma resultante da análise por MALDI TOF MS de 27 isolados de *Trichoderma*. Erro 0,08%; faixa de massa de 2000 a 20000 Da.

Avaliação do antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *S. sclerotiorum* em pareamento de culturas

Os dados de pareamento de culturas obtidos no capítulo anterior, relativos aos 29 isolados de *Trichoderma* aqui estudados dividiram-se em dois grupos distintos relativos ao grau de antagonismo, notas 1 e 2 (capítulo 1). O melhor resultado de inibição atribuiu-se ao grupo onde estão alocados isolados com notas 1 (38% dos isolados), seguido do grupo 2 (62% dos isolados), constituído pelos isolados com nota 2, da escala utilizada.

Tabela 02. Inibição do crescimento micelial do patógeno *S. sclerotiorum* pela escala de Bell et al., 1982

Escala de Bell et al., 1982	n	Código dos isolados (CEN)
Nota 1	11	162, 201, 209, 504, 511, 512, 514, 518, 519, 520, 747
Nota 2	18	210, 234, 250, 252, 284, 287, 289, 503, 509, 510, 522, 698, 761, 776, 786, 847, 854, 865

*n: Número de isolados para cada grupo.

Avaliação da inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* por metabólitos não voláteis produzidos por *Trichoderma* spp.

Também os dados dos testes de inibição do crescimento micelial por filtrados de culturas (capítulo 1) relativos aos 29 isolados de *Trichoderma*, ao serem submetidos ao reagrupamento neste capítulo (tabela 03) evidenciou mais uma vez os efeitos desses metabólitos no desenvolvimento do fungo em meio artificial. Todos os filtrados de culturas, ao serem adicionados ao meio de cultivo, apresentaram efeito inibitório, cuja variação foi de 85.9% a 100. O isolado CEN201 proporcionou maior valor médio de porcentagem de inibição. A testemunha cultivada na ausência de filtrado de cultura apresentou desenvolvimento normal das colônias.

Tabela 03: Inibição micelial, mediada em diâmetro, de *S. sclerotiorum* por metabólitos não voláteis de 29 isolados de *Trichoderma* em meio BDA. Como testemunha (SS), utilizou-se um isolado de *S. sclerotiorum* em BDA sem filtrado de cultura do antagonista. Média geral da silhueta: 0,95

Grupo	N	Cód. Dos isolados (CEN)	% de inibição/ desvio padrão	Média da Silhueta
1	28	162, 209, 210, 234, 250, 252, 284, 287, 289, 503, 504, 509, 510, 511, 512, 514, 518, 519, 520, 522, 698, 747, 761, 776, 786, 847, 854, 865, S.S	85,9 +/- 0,03	0.98
2	01	201	100 +/- 0.0	1

*n: Número de isolados para cada grupo.

*SS: Placa inoculada apenas com o *S. sclerotiorum*

Indução do crescimento de feijoeiro por *Trichoderma* spp.

De acordo com a análise pelo método de comprimento de silhueta, os 29 isolados de *Trichoderma* separaram-se em seis agrupamentos distintos, conforme ilustra a tabela 04. O comprimento médio da silhueta foi de 0.68, indicando uma razoável separação dos grupos.

Como mostra a Tabela 04, os maiores valores médios de massa seca de plantas de feijão foram apresentados pelos isolados pertencentes aos grupos 1 e 5, os quais foram significativamente superiores aos tratamentos sem *Trichoderma* e sem o patógeno. O incremento na promoção de crescimento médio nesses dois grupos, em termos massa seca, variou de 30% a 26,8%, respectivamente. Os isolados dos grupos 2, 3 e 6 apresentaram valores de crescimento médio abaixo da testemunha absoluta (sem *Trichoderma* e sem o patógeno), enquanto os isolados do grupo 4 apresentaram porcentagens de massa seca estatisticamente similares à testemunha inoculada com o patógeno.

Tabela 04 Porcentagem de massa seca (g) de plantas de feijão, em relação a testemunha absoluta, segundo agrupamento sugerido pelo método do comprimento médio da Silhueta. Silhueta total: 0.68

Grupos	n	Ódigos dos Isolados (CEN)	Peso seco médio (g) do feijoeiro	Promoção de Crescimento do feijoeiro (%) Média +/- Desvio padrão	Média da silhueta
1	02	162, 201	5,0	30,0 +/- 0,26	0,47
2	08	209, 250, 287, 504, 510, 847, 854, ABS	3,88	-6,2 +/- 0,21	0,60
3	11	210, 234, 252, 289, 509, 511, 514, 522, 698, 747, 776	2,98	-23,6 +/- 0,29	0,69
4	02	284,SS	0,86	-26,3 +/- 0,27	0,36
5	05	503, 512, 518, 519, 786	4,47	26,8 +/- 0,25	0,86
6	03	520, 761, 865	2,26	-41,9 +/- 0,30	0,91

*n: Número de isolados para cada grupo.

*ABS: Planta controle sem inóculo fúngico.

*SS: Planta inoculada apenas com *S. sclerotiorum*.

Severidade do mofo branco em feijoeiro

Pelo método de análise de comprimento de silhueta, os 29 isolados de *Trichoderma* foram reunidos em dois grupos distintos, conforme tabela 05. O comprimento médio da silhueta foi de 0.86, valor indicativo de uma boa separação dos grupos de isolados. No grupo 01 estão alocados os isolados que suprimiram os sintomas da doença. Já com relação aos isolados de *Trichoderma* alocados nos demais grupos,

verificaram-se diferentes índices de severidade do mofo branco. Os valores médios de índice de doença obtidos com o isolado CEN865 não diferiram significativamente daqueles relativos ao grupo 06, isto é, tratamento com o patógeno e sem *Trichoderma*.

Tabela05 Severidade do mofo branco em feijoeiro, segundo os grupos sugeridos pelo método do comprimento médio da Silhueta. Média da silhueta 0.86

Grupos	n	Cod. Dos isolados (CEN)	Severidade Média/desvio	Silhueta
1	20	162, 201, 209, 210, 234, 250, 252, 284, 503, 510, 512, 514, 518, 519, 522, 698, 747, 847, 854, ABS	0	1
2	3	287, 761, 786	0.42 +/- 0.57	0.61
3	2	289, 776	0.28 +/- 0.63	0.45
4	2	504, 509	0.43 +/- 0.72	1
5	2	511, 520	0.51 +/- 0.81	1
6	1	865	0.8 +/- 0.81	0
7	1	SS	2.0 +/- 1.0	0

*n: Número de isolados para cada grupo.

*ABS: Planta sem inóculo fúngico.

*SS: Planta inoculada apenas com *S. sclerotiorum*.

Discussão

A integração de características moleculares e fisiológicas, com base em testes realizados em laboratório e casa de vegetação, foi utilizada neste estudo para caracterizar e selecionar um grupo de isolados de *Trichoderma* potencialmente capazes de exercer o biocontrole de *S. sclerotiorum*, fungo causador de tombamento pré e pós-emergência e do mofo branco de feijoeiro (Kimati *et al.*,2005) e estabelecer relações filogenéticas e proteômicas das espécies de *Trichoderma*.

Os isolados de *Trichoderma* foram pré-selecionados (capítulo 01) por meio de ensaios *in vitro* contra o patógeno em questão. Dentre estes, observou-se a predominância das espécies de *T. asperellum* (13 isolados) e de *T. harzianum* (07 isolados) em relação aos 29 isolados identificados. A maioria dos trabalhos que relatam efeitos benéficos do *Trichoderma* no crescimento de plantas, aumento da resistência (tanto agentes bióticos e abióticos), e controle de inúmeras fitomoléstias, está relacionada com as espécies *T. asperellum* e *T. harzianum* (Akladios e Abbas 2012, Sharma *et al.* 2012, Harman 2004, Affokpon *et al.* 2011, Fontenelle *et al.* 2011).

Com base nos ensaios conduzidos *in vitro* no capítulo anterior e reagrupamento dos 29 isolados estudados neste capítulo, somados aos ensaios conduzidos em casa de vegetação, constatou-se o potencial desses isolados de *Trichoderma* como agentes de biocontrole para o mofo branco do feijoeiro. Amin et al. (2010), observaram a inibição micelial e o decaimento da produção de escleródios de *S. sclerotiorum* em culturas de outros dois patógenos (*S. rolfsii* e *Rhizoctonia solani*) por isolados das espécies *T. harzianum* e *T. viride*. Os efeitos inibitórios observados em pareamentos de culturas são principalmente atribuídos à competição por espaço, nutrição e micoparasitismo exercido sobre o patógeno pelo antagonista (Benitez et. al. 2004).

Em relação à inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* por metabólitos não voláteis de *Trichoderma* Castillo et al. (2001) relataram a ação de cinco isolados de *T. asperellum* com taxa de 100% de inibição de crescimento de *S. sclerotiorum* e dois isolados de *T. longibrachiatum* com uma inibição de 86,6 e 89,4% desse patógeno. Tais experimentos *in vitro*, por permitirem visualizar a inibição do crescimento micelial do patógeno, são importantes para determinação dos mecanismos de ação utilizados por isolados específicos de *Trichoderma*: secreção de enzimas líticas, produção de metabólitos secundários difusíveis ou voláteis, e competição (Schuster e Schuster, 2010).

Apesar do alto desempenho dos antagonistas na inibição micelial de *S. sclerotiorum in vitro*, não houve reflexo total dos resultados obtidos nos experimentos em casa de vegetação. Os vinte isolados do grupo 1 da tabela 5 demonstraram o mesmo potencial de inibição micelial do patógeno *in vitro* e em casa de vegetação, já que inibiram completamente o mofo branco nos feijoeiros. Os isolados do grupo 1 e 5 presentes na tabela 4, promoveram a maior promoção de crescimento (26 a 30%) também foram capazes de suprimir totalmente a severidade do mofo branco com

exceção do isolado CEN786 que não controlou com eficiência a doença. Através desses experimentos foi possível selecionar agentes de controle biológico contra *S. sclerotiorum* e promotores de crescimento de feijoeiro destacando-se os isolados CEN162 e CEN201, esses isolados apresentaram alto nível de controle do patógeno *in vitro*, em casa de vegetação e quanto à promoção do crescimento em feijoeiro. Este trabalho corrobora resultados obtidos por Carvalho et al., (2011), que observaram que isolados de *T. harzianum* foram capazes de promover significativamente o crescimento em feijoeiro e diminuir a incidência do mofo branco causado pela *S. sclerotiorum* em até 92%. Harman et al. (2004) comprovaram em seus estudos que o isolado T22 da espécie *T. harzianum* foi altamente competente para promover o crescimento de plantas e auxiliar no controle e resistências contra patógenos. Sharma et al. (2012) demonstrou que a aplicação de *T. harzianum* na cultura do trigo aumentou significativamente a promoção de crescimento em termos de número de perfilhos, raízes e número de grãos por espiga.

Tem sido verificado que a promoção de crescimento em plantas está relacionada também com o processo de solubilização de nutrientes do solo, como o fosfato, pelo *Trichoderma*, podendo aumentar sua disponibilidade para absorção das plantas resultando em aumentos significativos na massa seca, comprimento da parte aérea e da área foliar (Hermosa et al. 2012). Friedl & Druzhinina (2012) observaram que um número pequeno de isolados de *Trichoderma* possui o solo como habitat natural, enquanto a maioria consiste em colonizadores de ambientes radiculares ou interior dos tecidos vegetais (endofíticos). Assim, *Trichoderma* interage com a planta pelas raízes ou no entorno delas, estabelecendo uma comunicação química e sistêmica, alterando a expressão de inúmeros genes das plantas e podendo proporcionar resistência a estresses bióticos e abióticos.

As diferenças de comportamento do *Trichoderma* em relação ao controle do patógeno *in vitro* e *in vivo* podem ser explicadas pelo fato de que esses agentes são organismos vivos, cujas atividades dependem principalmente das diferentes condições físico-químicas e ambientais a que são submetidos. Por esta razão, o biocontrole exercido pode ser imprevisível. Com a compreensão, da diversidade genética dos isolados de *Trichoderma* e seus mecanismos de controle biológico, é possível alcançar a melhoria das aplicações práticas de diferentes isolados com potencial de biocontrole de doenças e como promotores de crescimento em plantas (Benitez et. al. 2004).

Ao se observar os clados formados na árvore filogenética baseada na região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, infere-se que houve boa separação entre os grupos das cinco espécies de *Trichoderma*. Xia et al. (2011) obtiveram resultados similares ao agrupar seis espécies diferentes utilizando-se o gene ITS. Entretanto, os autores encontraram identificações ambíguas para as espécies de *T. asperellum* e *T. brevicompactum*. Ao comparar à árvore filogenética gerada baseada na região do ITS1-5.8S-ITS2 dos 29 isolados reagrupados neste estudo em relação à árvore baseada na região TEF1- α presente no trabalho de Lopes et al. (2012), observou-se grande similaridade nos agrupamentos das espécies de *Trichoderma*. Os isolados de *T. asperellum* e *T. koningiopsis* agruparam em clados separados por pequena distância filogenética, tal como os isolados de *T. harzianum* e *T. tomentosum*.

A análise dos perfis moleculares por MALDI-TOF MS das células intactas dos isolados de *Trichoderma* revelou convergência dessa técnica com a análise filogenética. A maioria dos isolados foi alocada em grupos ou clados semelhantes na árvore filogenética (figura 03) e no dendrograma (figura 04), com exceção dos isolados das espécies *T. asperellum* e *T. koningiopsis*. Estudos conduzidos por Samuels et al. (2010), tenham indicaram que a separação das espécies *T. asperellum*, *T. asperelloides* e *T.*

yunnanense por meio de marcadores moleculares é relativamente “limpa“, a técnica MALDI-TOF MS não foi capaz de separar essas espécies. De acordo com os autores, o processo evolutivo protéico dessas linhagens caminha lentamente em relação ao processo evolutivo genético, por isso MALDI-TOF MS não reflete os resultados filogenéticos nesses casos. De Respinis et al. (2010), demonstraram sucesso na identificação molecular e por MALDI-TOF MS de diversas espécies de *Trichoderma*, validando essa técnica, que manteve relação direta com a identificação molecular. Nesse trabalho, os autores exaltaram a rapidez na identificação das espécies de *Trichoderma* por MALDI TOF. Vale ressaltar que esse grupo de pesquisa não trabalhou com isolados da espécie *T. koningiopsis*, porém, trabalhou com outras espécies discriminadas no presente estudo. Anteriormente, Degenkolb et al. (2008) consolidaram o clado Brevicompactum utilizando MALDI-TOF MS e ferramentas moleculares. Esses autores demonstraram que o clado Brevicopactum é um ramo relativamente diferente dos outros clados das espécies de *Trichoderma*. Em seus estudos, relataram a dificuldade de separação das espécies *T. asperellum* e *T. koningiopsis* utilizando-se genes ITS, *tef1*, e *rpb2*.

O controle biológico, induzido com aplicação massal de antagonistas, pode ser considerado uma alternativa viável para o controle de fungos de solo como *S. sclerotiorum* (Melo 1996). Os isolados de *T. asperellum* CEN162 e CEN201 selecionados em testes *in vitro* e *in vivo* foram considerados excelentes agentes de biocontrole de *S. sclerotiorum* e como promotores de crescimento feijoeiro. Além desses resultados positivos para o controle do mofo branco e para a promoção de crescimento em feijoeiro, estudos anteriores também demonstraram a alta eficiência dos isolados CEN162 e CEN201 para o controle de outros patógenos e como promotores de

crescimento outras plantas. Entretanto, são necessários mais estudos que incluam testes de campo para confirmação de suas características como agentes de controle biológico.

A caracterização dos isolados de *Trichoderma* não se limita ao conhecimento desses fungos para serem utilizados tanto na agricultura como na pesquisa, uma vez que algumas espécies não são recomendadas por causa de possíveis riscos à saúde humana, como é o caso do *T. longibrachiatum*, que pode se comportar como patógenos oportunistas a mamíferos, incluindo seres humanos com o sistema imunológico debilitado (Druzhinina et al. 2006).

As técnicas de identificação molecular e por MALDI-TOF MS de isolados de *Trichoderma* são técnicas já estabelecidas para a identificação de espécies fúngicas, incluindo os do gênero *Trichoderma*. Entretanto, é necessária a formação de banco de dados e aprimoramento da técnica MALDI-TOF MS para sua utilização ampla. A técnica de MALDI-TOF MS pode refletir o genoma através de análise das proteínas, com a vantagem de ser rápida para a determinação das espécies de *Trichoderma*, requerendo apenas uma colônia do fungo, transferência do material fúngico com a matriz para a placa apropriada e deposição no equipamento, para em poucos minutos obter-se o resultado (De Respinis et al., 2010).

Conclusão

Foram sequenciados 29 isolados de *Trichoderma* e realizada a construção da árvore filogenética não que apresentou politonia entre os isolados e nem entre os 7 clados onde os valores de bootstrap e probabilidade posterior mantiveram fortemente suportados. A comparação entre a árvore filogenética e o dendrograma gerado pelo MALDI TOF resultou em similaridades entre os resultados das técnicas para todos isolados, com exceção dos isolados CEN698 e CEN761 das espécies *T. koningiopsis* e *T. asperellum*, respectivamente. Esses isolados apresentaram-se em ramos no

dendrograma que não condizem com sua taxonomia molecular. Os isolados CEN162 e CEN201 foram o que mais destacaram nos experimentos *in vitro* e em casa de vegetação. Esses isolados alcançaram inibição micelial do patógeno maiores que 85% em pareamento de culturas, apresentaram as maiores porcentagens médias de 30 % na promoção de crescimento do feijoeiro e anularam os sintomas do mofo branco nas plantas.

Referências bibliográficas

Agrawal SC, Khare MN, Agrawal PS (1977) Biological control of *Sclerotium rolfsii* causing collar rot of lentil. *Indian Phytopathology* 30:176-179

Affokpon A, Coyne DL, Htay CCH, Agbèdè RD, Lawouin L, Coosemans J (2011) Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems *Soil Biology & Biochemistry* 43:600-608

Akladios AS, Abbas SM, (2012) Application of *Trichoderma harziunum* T22 as a biofertilizer supporting maize growth. *African Journal of Biotechnology* 11:8672-8683

Alvira P, Gyalai-Korpos M, Barta Z, Oliva JM, Réczey K, Ballesteros M (2012) Production and hydrolytic efficiency of enzymes from *Trichoderma reesei* RUTC30 using steam pretreated wheat straw as carbon source. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. doi: 10.1002/jctb.3955

Amin F, Razdan VK, Mohiddin FA, Bhat KA, Banday S (2010) Potential of *Trichoderma* species as biocontrol agents of soil borne fungal propagules. *Journal of Phytology* 2:38-41

Barbosa FB, Gonzaga ACO (2012) Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014. Embrapa Arroz e Feijão, Documentos 272

Balmas V, Scherm B, Cerial R, Fiori S, Zelazowska MK., Druzhinina I, et al. (2006) Species pattern, genetic diversity and biocontrol potential of *Trichoderma* in Sardinia, Italy. *Proceedings of the 9th International Workshop on Trichoderma and Gliocladium*, Vienna, Austria, 5-9

Bell DK, Wells HD, Markham CR (1982) *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72:379-382

Benítez T, Rincón AM, Limón MC Codón AC (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7:249-260

Bolland GJ, Hall R (1994) Index of plants of hostes *Sclerotinia sclerotiorum*. Canadian Journal Plant Pathology 16:93-108

Borchsenius F (2007) FastGap 1.0.8. Software distributed by the author (http://192.38.46.42/aubot/fb/FastGap_home.htm)

Carvalho DDC, Mello SCM, Lobo Júnior M, Geraldine AM (2011) Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. Pesquisa Agropecuária brasileira 46:822-828

Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E Day N, Dauphin B, Beretti J, Ferroni A, Gutmann L, Nassif X (2011) MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. Clinical Biochemistry 44:104-109

Castillo FDH, Padilla AMB, Morales GG, Siller MC, Herrera RR, Gonzales CNA, Reyes FC (2011) *In Vitro* Antagonist Action of *Trichoderma* Strains Against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. American Journal of Agricultural and Biological Sciences 6:410417

Charchar MJD, Anjos JRN, Ossipi O (1999) Ocorrência de nova doença do algodoeiro irrigado, no Brasil, causada por *Sclerotinia sclerotiorum*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 34:1101-1106

Consolo VF, Monaco CI, Cordo CA, Salerno GL (2012) Characterization of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. World Journal of Microbiology and Biotechnology 28:1389-1398

De Respinis S, Vogel G, Benagli C, Tonolla M, Petrini O, Samuels GJ (2010) Maldi-tof ms of *Trichoderma*: a model system for the identification of microfungi. Mycological Progress 9:79-100

Chierico FD, Masotti A, Onori M, Fiscarelli E, Mancinelli L, Ricciotti G, Alghisi F, Dimiziani D, Manetti C, Urbani A, Muraca M, Putignani L (2012) MALDI-TOF MS proteomic phenotyping of filamentous and other fungi from clinical origin. Journal of proteomics 75:3314-3330

Degenkolb T, Dieckmann R, Nielsen KF, Gräfenhan T, Theis C, Zafari D, Chaverri P, Ismaiel A, Brückner H, von Döhren H, Thrane U, Petrini O, Samuels GJ (2008) The *Trichoderma brevicompactum* clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. Mycological Progress 7:177-219

Dennis C, Webster J (1971) Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. Transactions British Mycological Society 57:363-369

Druzhinina IS, Kopchinskiy AG, Komon M, Bissett J, Szakacs G, Kubicek CP (2005) An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. Fungal Genetics and Biology 42:813-828

Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. & Kubicek, C. P. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47, 55–64 (2006)

Figueirêdo GS, Figueirêdo LC, Cavalcanti FCN, Santos AC, Costa AF, Oliveira NT (2010) Biological and Chemical Control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma* spp. and *Ulocladium atrum* and Pathogenicity to Bean Plants. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53:1-9

Fontenelle ADB, Guzzo SD, Lucon CMM, Harakava R (2011) Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. *Crop Protection* 30:1492-1500

Goldman GH, Hayes C, Harman GE (1994) Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. *Trends Biotechnol* 12:478-482

Hall TA (1999) Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98

Harman GE (2004) *Trichoderma* – not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica* 39:103-108

Harman GE (2006) Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96:190-194

Huelsenbeck,JP, Ronquist F (2001) Bayesian inference of phylogenetic tree. *Bioinformatics Application Note* 17:754-755

Hermosa MR, Grondona I, Monte E, Iturriaga EA, Diaz-Minguez JM, Castro C, Monte E, Garcia-Acha JM (2000) Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied Environmental Microbiology* 66:1890-1898

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

Kimati H, Amorim L, Bergamin filho A, Camargo LEA, Rezende JAM (2005) *Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas*. Ceres, São Paulo

Kullnig CM, Krupica T, Woo SL, Mach RL, Rey M (2001) Confusion abounds over identities of *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycol Res* 105:770-771

Lopes FAC, Steindorff AS, Geraldine AM, Brandão RS, Monteiro VN, Lobo Junior M, coelho ASG, Ulhoa CJ, Silva RN (2012) Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biology* 116:815-824

Melo IS (1996) *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 4:261-295

Raeder U, Broda P (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Letters in Applied Microbiology 1:17-20

Rambaut A (2009) FigTree v1.3.1. [<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>] website Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom

Reino JL, Guerrero RF, Hernández-Gala R, Collado IG (2008) Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. Phytochemistry Reviews 7:89-123

De Respini S, Vogel C, Benagli C, Tonolla M, Petrini O, Samuels GJ (2010) MALDI-TOF MS of *Trichoderma*: a model system for the identification of microfungi. Mycological Progress 9:79-100

Samuels GJ, Ismaiel A, Bom MC, De Respini S, Petrini O (2010) *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. Mycologia 201:944-966

Santos C, Paterson RRM, Venâncio A, Lima N (2009) Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Journal of Applied Microbiology 108:375-85

Sharma P, Patel AN, Saini MK, Deep S (2012) Field Demonstration of *Trichoderma harzianum* as a Plant Growth Promoter in Wheat (*Triticum aestivum* L.). Journal of Agricultural Science 4:65-73

Scherm B, Schmoll M, Balmas V, Kubicek CP, Migheli Q (2009) Identification of potential marker genes for *Trichoderma harzianum* strains with high antagonistic potential against *Rhizoctonia solani* by a rapid subtraction hybridization approach. Current Genetics 55:81-91

Schuster A, Schmoll M (2010) Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Applied Microbiology and Biotechnology 87:787-799

Swofford DL (2003) Paup*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods) version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

Xia X, Lie TK, Qian X, Zheng Z, Huang Y, Shen Y (2011) Species Diversity, Distribution, and Genetic Structure of Endophytic and Epiphytic *Trichoderma* Associated with Banana Roots Microbial Ecology 61:619-625

Capítulo III

Purificação de metabólitos secundários de *Trichoderma asperellum* e efeito inibidor desses metabólitos sobre o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*

Resumo: Fungos do gênero *Trichoderma* compreendem um grande número de estirpes economicamente importantes, principalmente como agentes de controle biológico. Alguns metabólitos de *Trichoderma* têm sido utilizados com sucesso no controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum*, um importante patógeno de diversas plantas cultivadas. Desta forma este estudo teve como objetivo purificar e identificar metabólitos secundários de um isolado de *Trichoderma asperellum* contidos em filtrados de culturas anteriormente verificados na inibição do desenvolvimento micelial do patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. Na purificação de metabólitos não voláteis, foram detectadas 11 frações provenientes da HPLC sendo que dessas, cinco promoveram a inibição micelial do patógeno e uma delas, nomeada fração “H” apresentou 70% de inibição micelial do patógeno. A fração “H” foi recromatografada e dividida em cinco frações distintas. Essas frações apresentaram efeitos significativos contra o patógeno e inibiram 40,3% do micélio. Análises por MALDI-TOF MS mostraram inúmeros compostos incluindo Trichopactina e Asperelina B. Em suma os dados aqui mostrados demonstraram que os metabólitos secundários podem ser altamente tóxicos para a inibição micelial de *S. sclerotiorum* sendo estes uma possível fonte para desenvolvimento de novos fungicidas.

Palavras chave: Purificação de metabólitos secundários, Trichompactina, Asperelina B, *Trichoderma*

Abstract: Fungi of the genus *Trichoderma* comprise a large number of economically important strains, mainly as biological control agents. Some metabolites of *Trichoderma* have been used successfully in biological control against *Sclerotinia sclerotiorum*, an important pathogen of diverse crops. Therefore, this study aimed to purify and identify secondary metabolites of *Trichoderma asperellum* contained in culture filtrates previously checked in inhibiting the mycelial growth of the pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. In the purification of non-volatile metabolites were detected from the 11 HPLC fractions, and of these, five promoted inhibiting the pathogen and one of them, named fraction "H" showed 70 % inhibition of the pathogen mycelial. This “H” fraction was rechromatographed and partitioned into five distinct fractions. These fractions showed significant effects against the pathogen, with up to 40.3% inhibition of mycelial. Analysis by MALDI-TOF MS showed numerous compounds including Trichopactina and Asperelina B. Briefly, the data shown here demonstrate that the secondary metabolites can be highly toxic for the inhibition of mycelial *S. sclerotiorum* these being a possible source for development of new fungicides.

Index terms: Purification of secondary metabolites, Trichompactin, Asperelin B, Biological control

Introdução

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary consiste em um fungo fitopatígeno de ampla ocorrência em todo o mundo, com pelo menos 408 espécies de plantas hospedeiras (Boland & Hall, 1994). O controle desse patógeno em diversas culturas tem sido difícil devido a sua capacidade de formar estruturas de resistência denominadas escleródios, que garantem sua sobrevivência por vários anos, mesmo em condições adversas, limitando a utilização de práticas como a rotação de culturas (Boland & Hall, 1994). Outra prática importante no manejo de *S. sclerotiorum* consiste no controle por *Trichoderma* (Ethur et al. 2005, Figueirêdo et al. 2010, Castillo et al. 2011, Haggag e Mohamed, 2011), uma vez que várias espécies desses agentes tem sido relatadas como potenciais agentes de biocontrole de fungos fitopatogênicos em solo (Chet, 1987).

Espécies de *Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales), compreendem um grande número de variantes economicamente importantes, principalmente como agentes de controle biológico. Esses microorganismos têm sido descritos como simbioses oportunistas avirulentos em plantas devido à sua habilidade de se beneficiar e ao mesmo tempo proporcionar benefícios às plantas em interações diretas com estas. *Trichoderma* é um habitante natural do solo encontrado em todos os ecossistemas, alguns sendo eficientes colonizadores de raízes. Além de possuírem a capacidade de empregar diversos mecanismos que resultam no biocontrole de doenças. Esses mecanismos podem ser exemplificados como antibiose, micoparasitismo, competição e indução de resistência. Mais de um desses mecanismos podem simultaneamente estar envolvidos no biocontrole de agentes fitopatogênicos (Bettiol e Ghini, 1995; Harman et al. 2004; Rosa e Herrera 2009; Viterbo e Horwitz, 2010, Consolo et al. 2012).

Fungos do gênero *Trichoderma*, além de serem importantes agentes de biocontrole de doenças de plantas, estão sendo aplicados com sucesso como produtos farmacêuticos. Esses fungos são conhecidos como exímios produtores de metabólitos

secundários com atividade antibiótica, sendo estes capazes de inibir crescimentos microbianos (Vinale et al. 2008).

Fungos desse gênero produzem uma grande variedade de metabólitos secundários, que consistem em pequenas moléculas que não estão ligadas diretamente à suas funções básicas de sobrevivência, mas tem papéis importantes na sinalização, desenvolvimento e interação com outros organismos (Mukherjee et al. 2012). Acredita-se que a antibiose seja um dos mecanismos mais efetivos envolvidos no controle biológico. Weindling e Emerson (1936) isolaram substâncias antifúngicas de *T. virens*. Dennis e Webster (1971) foram os primeiros a descrever as propriedades antagônicas do *Trichoderma* bem como a produção de compostos voláteis e não voláteis capazes de inibir o crescimento micelial de fungos. Desde então, inúmeros metabólitos tem sido identificados e seus efeitos adversos na inibição do crescimento micelial de diferentes fungos comprovados (Howell, 2003; El-Hassan, 2007; Reino et al., 2008).

Desta forma o objetivo desse capítulo consiste em verificar as atividades antagônicas de *Trichoderma asperellum* (CEN201) através de pareamento de culturas e pela ação de metabólitos secundários, e a purificação de seus compostos tóxicos contra *S. sclerotiorum*.

Material e Métodos

Dois isolados de fungo foram utilizados nesse estudo. O agente de biocontrole, *Trichoderma asperellum* (CEN201), previamente identificado por características micromorfológicas e pelo sequenciamento e análise do gene ITS-25S-ITS2 do DNA ribossomal, foi isolado de raiz de *Vochyziaceae* e utilizado nesse trabalho pela alta eficiência em inibir o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. A cepa do fitopatógeno, *S. sclerotiorum* (CEN 217), previamente identificado por características morfológicas, foi isolado de lesões em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). Esses isolados estão depositados

na coleção Fungos para Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa. Todos os isolados foram mantidos em nitrogênio líquido e subcultivados diretamente em placas de Petri com meio BDA (200 g caldo de de batata, 20 g de dextrose e 20 g de ágar em 1 L de água) a 25°C durante sete dias.

Extração dos metabólitos secundários de *Trichoderma asperellum*

Para a produção dos metabólitos secundários, o *T. asperellum* foi cultivado em cultura líquida em meio BD (200 g caldo de de batata e 20 g de dextrose em 1 L de água). Frascos contendo 200 mL de meio autoclavado foram inoculados com 03 discos (5 mm) de BDA previamente colonizados pelo *T. asperellum*. Os frascos contendo o meio de cultura e o fungo foram agitados em agitador orbital (Lab-line incubator-shaker, modelo NT 711) a 150 rpm e a 25°C em ausência de luz por 07 dias. Após este período, separou-se a parte líquida por filtração a vácuo com papel filtro e posterior esterilização com membranas de 0,45 µm. Do extrato obtido, foram adicionados 50 mL de acetato de etila (Merck) e 200 mL do extrato metabólico em um balão de decantação seguida por uma breve agitação manual. Após este processo, notou-se a formação de duas fases na solução. A fase superior foi coletada filtrada com sulfato de magnésio anidro (Merck) e submetida ao rotaevaporador a 40°C. Após a evaporação completa do acetato de etila da amostra, coletou-se o extrato bruto lavando-se o balão volumétrico do rotaevaporador com 3 mL de acetato de etila que posteriormente foi secado em *speed vaccum* e câmara com sílica gel para evaporação completa do solvente. Após a completa evaporação do acetato de etila, o extrato bruto foi ressuspensionado em 5 mL de acetonitrila (Baker):água ultrapura (30%) e centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos, e imediatamente submetido à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (El-hassan et al. 2006).

Purificação de compostos fungicidas a partir de *Trichoderma asperellum*

O extrato bruto foi submetido à uma coluna semi-preparativa de fase reversa C18 HPLC (Grace Vydac, 218TP, dimensões 250 x 4,6mm, 5 µm) conectada em uma pré-coluna (Grace Vydac, dimensões 7,5 x 4,6mm). A amostra foi dissolvida em acetonitrila 5% contendo pareador iônico TFA 0,1 %. Para eluição, utilizou-se gradiente não linear de acetonitrila seguindo os passos: 5% em 5 min, 5-40% em 3 min, 40-70% em 27 min, 60-90% em 5 min e 95% por 5 min. A taxa de fluxo foi de 1 mL por min. Durante a corrida do extrato bruto, as frações mais representativas e com maior intensidade foram coletadas separadamente em tubos de 1,5 mL. Após a extração de cada fração, o material foi secado em *speed vaccum* e diluído em 100 µl de água. Após a escolha da fração que proveu maior inibição micelial contra o patógeno, fração “H”, realizou-se 8 corridas em HPLC para a concentrar essa fração que posteriormente foram agrupadas e liofilizadas. Parte da amostra foi diluída em acetonitrila 30% para re-cromatografia em na mesma coluna e pré-coluna anteriormente descrita. O gradiente inicial da fase móvel foi de 0 a 5 min a 95%, 3 min a 60%, 27 min a 60% e 10 min a 10% de acetonitrila. A taxa de fluxo foi de 1 mL por min e as frações foram detectadas a 216 nm. Cada fração foi testada separadamente em papéis filtro contra o patógeno na concentração de 40 µg.mL⁻¹, como demonstrada na metodologia supracitada.

Inibição de crescimento micelial do patógeno pelas frações dos metabólitos secundários adquiridos pela HPLC

Utilizou-se a técnica de discos de papel filtro para observação da inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em placas de Petri contendo meio BDA pelas frações coletadas do metabólito de *T asperellum* por HPLC. Realizou-se esta técnica inserindo-se um disco de papel filtro de 5mm de diâmetros previamente autoclavados no centro da placa de Petri de 9 cm de diâmetro, transferiu-se 10 µl de cada fração metabólica para os papéis e inoculou-se dois discos de BDA (5mm de diâmetro em

cada) previamente colonizados com *S. sclerotiorum* com extremidade da placa. O experimento foi conduzido duas vezes com 3 repetições por cada fração metabólica e avaliada medindo-se o diâmetro do halo de inibição. Para o controle negativo, foi utilizada água destilada ultrapura ou acetonitrila 30% (água:acetonitrila, 7:3)

Análises por Espectrometria de Massa

A fração “H” liofilizada em *speedvaccum* foi solubilizada em água Milli-Q, misturadas em uma solução saturada de uma matriz constituída por ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (1:3), depositada em uma placa do tipo *Anchorchip* Var-384 e secas a temperatura ambiente. Os compostos tiveram suas massas moleculares exatas determinadas, utilizando um espectrômetro de massa do tipo MALDI-ToF Autoflex (Bruker Daltonics). A calibração foi realizada utilizando a própria matriz como calibrante. Os valores experimentais obtidos pelas análises do espectrômetro de massa foram comparados com uma base de dados de compostos metabólicos.

Resultados

Análise cromatográfica do extrato bruto do antagonista forneceu o cromatograma derivado da HPLC com 11 frações mais representativas e intensas (Figura 1). Todas as frações coletadas (marcadas por letras) apresentaram coloração transparente com exceção da fração D que apresentou coloração amarelada escura.

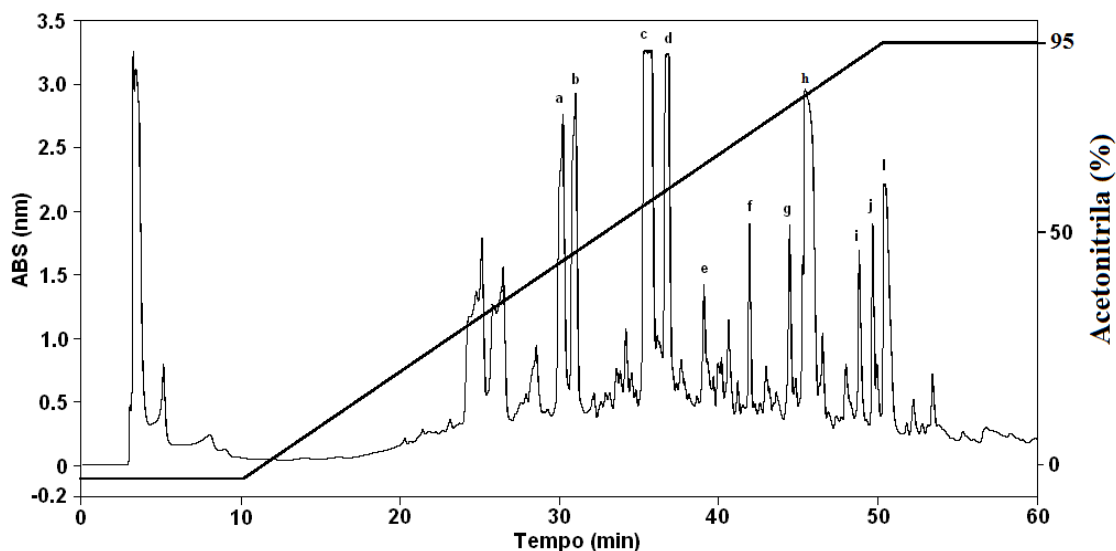


Figura 1: Cromatograma líquida de alta eficiência da corrida de 01 ml do extrato bruto de *T. asperellum* (CEN 201). As frações mais intensas e representativas foram marcadas com as letras A a L e testados em testes *in vitro* contra *S. sclerotiorum*. Gradiente da fase móvel composta por acetonitrila (linha azul).

Em relação atividade do extrato bruto do antagonista contra o patógeno utilizando a técnica do papel filtro em placas, verificou-se a inibição micelial do patógeno contra cada fração coletada do extrato bruto de *T. asperellum* proveniente da HPLC. As frações A a F não apresentaram atividade contra o patógeno, uma vez que seu micélio cresceu por todo o meio BDA na placa de Petri sem formar halo de inibição. Já as frações G, I, J e L apresentaram atividade inibidora do micélio do patógeno com halo de inibição que variou entre 2,47 a 3,82 cm de diâmetro com porcentagem máxima de inibição de 42,5%. No entanto, a fração H apresentou a maior taxa de inibição micelial do patógeno, o halo de inibição chegou a 6,3 cm diâmetro com porcentagem de inibição de 70% (Figura 3) como pode ser observado na figura 2.

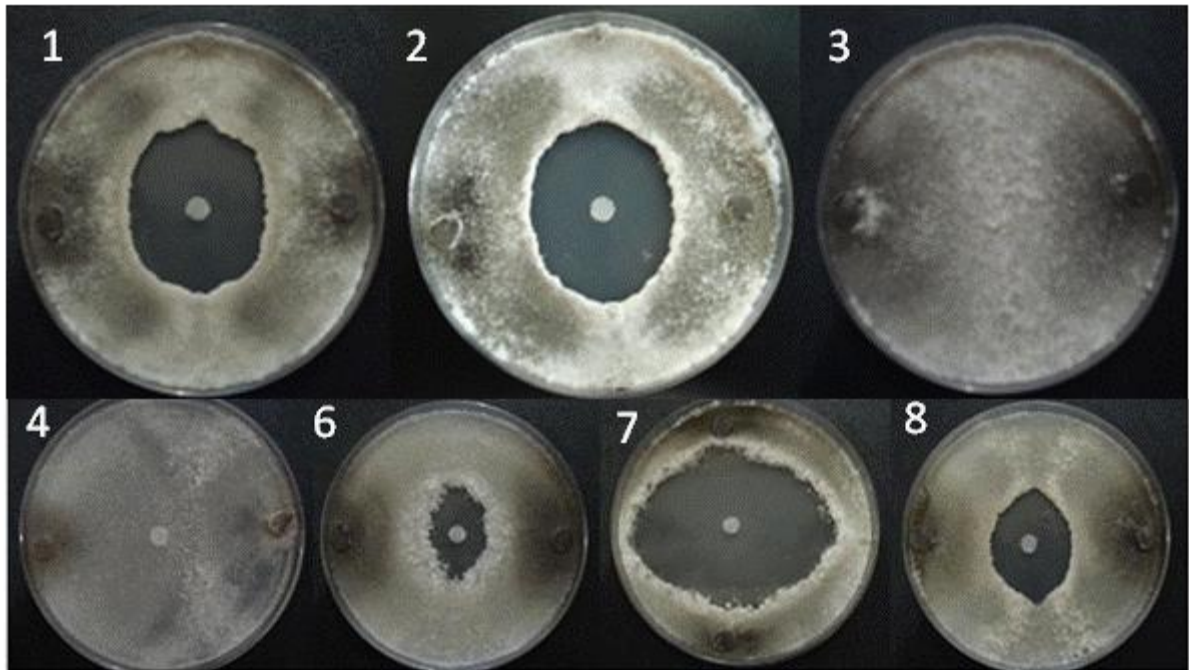


Figura 2. Bioensaio conduzido com as frações dos metabólitos secundários de *Trichoderma asperellum* para observação do halo de inibição micelial da colônia de *S. sclerotiorum*. 1: Não formação do halo de inibição das frações de A, C, D, E, F; 2 ao 6: Halo de inibição representados os frações G, H, I, J, L, respectivamente; 7: Testemunha com disco embebido com água ultrapura.

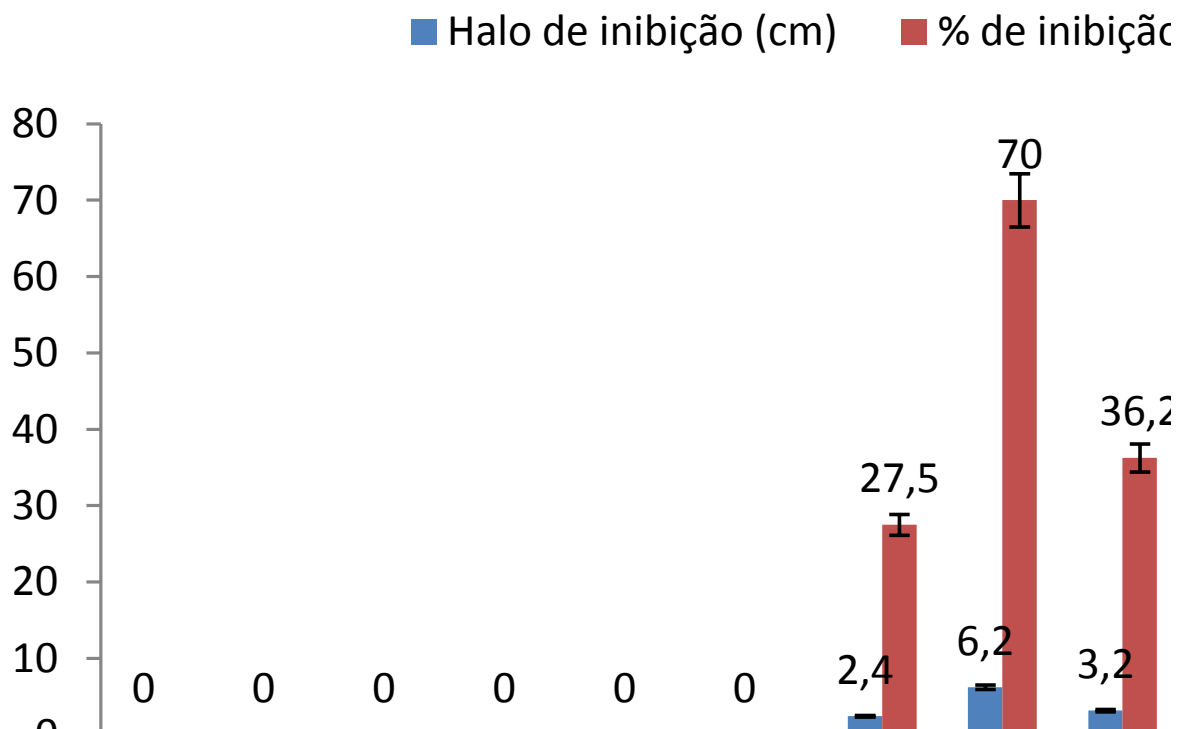


Figura 03: Halo de inibição (cm) e porcentagem de inibição (%) de cada fração obtida por HPLC do antagonista *T. asperellum* contra *S. sclerotiorum*.

A partir dos resultados obtidos comparando os halos de inibição das frações gerados por HPLC do antagonista *T. asperellum*, a fração “H” foi escolhido para a tentativa de elucidar seus compostos.

Ao recromatografar a fração “H”, observou-se a formação de uma fração composta que foi subdividida em 05 fragmentos, todos eles coletados por HPLC separadamente (Figura 4). Nos testes *in vitro*, foi observada o halo de inibição micelial do patógeno pela mistura dos fragmentos das frações 01 ao 03 e pelos fragmentos 04 e 05. Na mistura dos fragmentos da fração “H” 01 ao 03, o halo de inibição foi de 2,92 cm com porcentagem de inibição de 30,66% e no fragmento 05, com maior nível de purificação, o halo de inibição foi 3,63 cm com porcentagem de inibição de 40,33% (Figura 5).

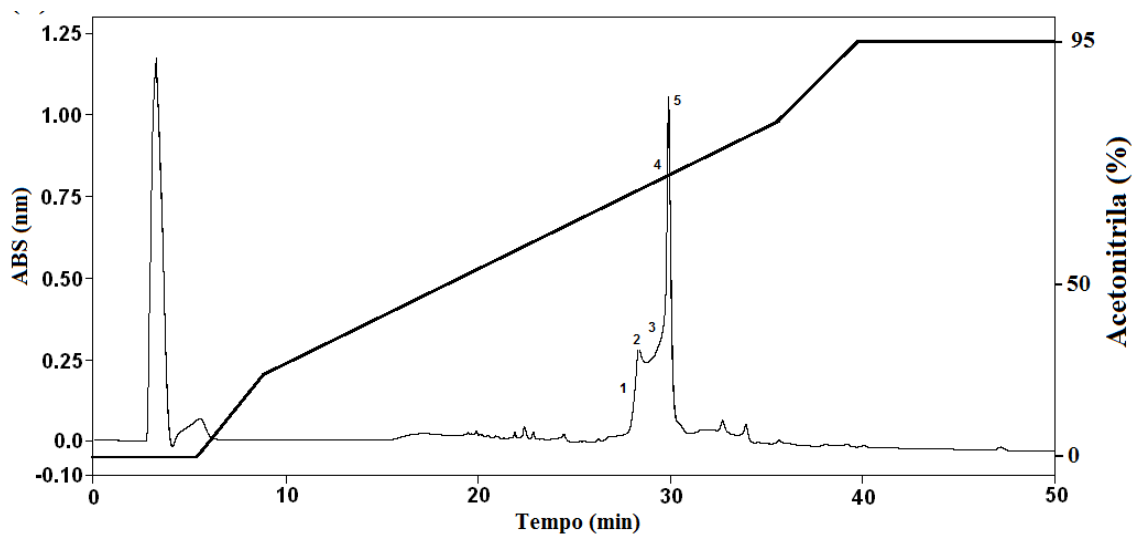


Figura 4: Recromatografia em HPLC da fração “H” de *T.asperellum*. A marcações numéricas nos picos apontam os fragmentos onde foram coletados separadamente por HPLC. Gradiente da fase móvel composta por acetonitrila.

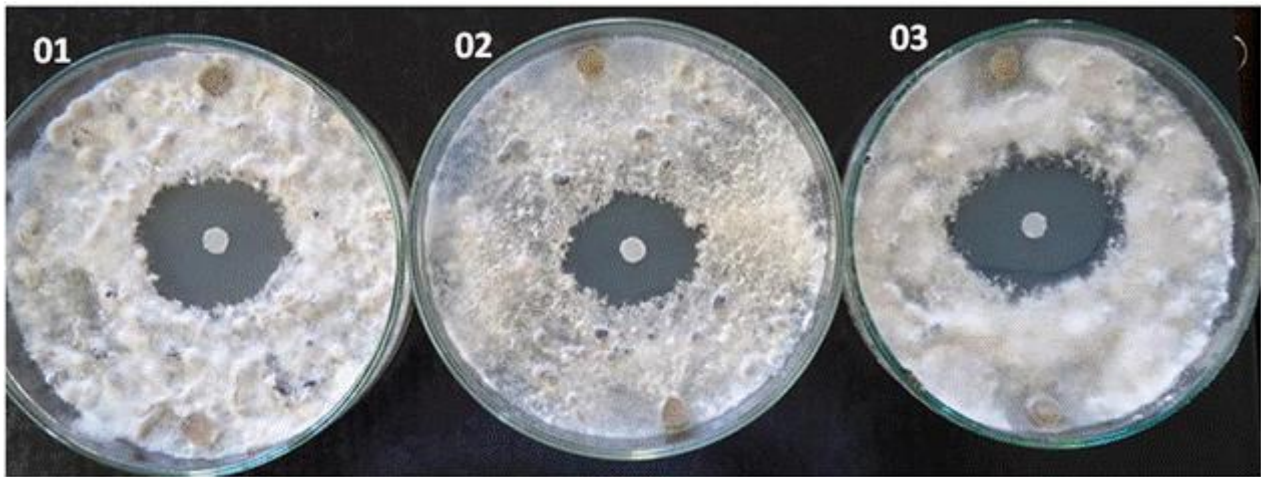


Figura 5: Bioensaio conduzido com os picos da fração “H” derivada dos metabólitos brutos de *Trichoderma asperellum* para observação do halo de inibição micelial da colônia de *S. sclerotiorum*. 01: Halo de inibição composto pelos fragmentos 01 a 03; 02: Halo de inibição composto pelo fragmento 04 e 03: halo de inibição composto pelo fragmento 05.

Ao analisar as frações obtidas da recromatografia coletadas por HPLC da fração “H” em MALDI-TOF, observou quatro espectros com uma série de íons compostas por massa/carga (m/z) diferentes que se diferenciaram da matriz na faixa de 100 a 1.200 m/z (Figura 6).



Figura 6: Espectros de massa obtidos para *T. asperellum* preparadas a partir das amostras fragmentadas da fração “H” estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 200 e 12.000 Da. O primeiro espectro corresponde ao perfil da matriz e os espectros 01 a 05 são correspondentes às frações “H”.

Observando a faixa de 100 a 400 e 930 a 1,200 m/z, não se visualizou frações expressivas que pudessem ser relevantes ao trabalho (figura 5).

Na faixa de 400 a 500 Da (figura 7), observou-se frações expressivas, subtraindo-se a matriz: os íons entre 423,16 a 420,18 m/z nas frações 01, 03, 04; 437,308 m/z no fragmento 03; 445,15 e 445,17 m/z nos fragmentos 01, 02 e 04; 461,12 a 461,15 e 477,09 a 477,12 m/z em todos os fragmentos.

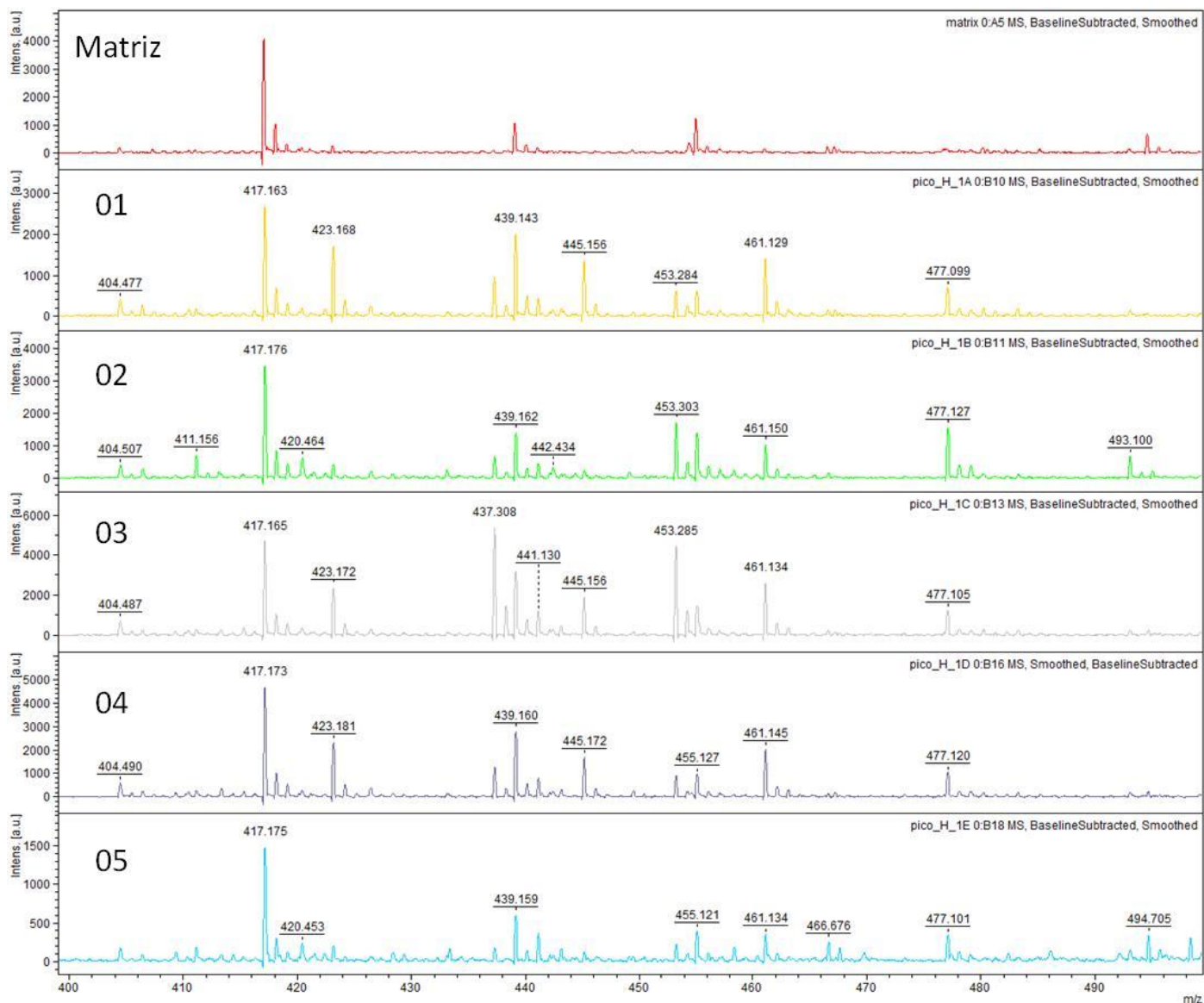


Figura 7: Espectros de massa obtidos para *T. asperellum* preparadas a partir das amostras refracionadas da fração “H” estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 400 e 500 Da. O primeiro espectro corresponde ao perfil da matriz e os espectros 01 a 05 são correspondentes às frações “H”.

Na faixa de 500 a 600 Da (figura 8), observou-se frações significativas, subtraindo-se a matriz: as frações com massa de 550,76 e 557,6 m/z foram detectados nas frações 03 e 04; uma única fração com 556,08 m/z foi encontrado na fração 06; em todos as frações foram massas variando entre 578,77 a 578,82 m/z ; nas frações 01, 03, 04 05 observaram-se massas com variação de 590,24 a 592,46 m/z .

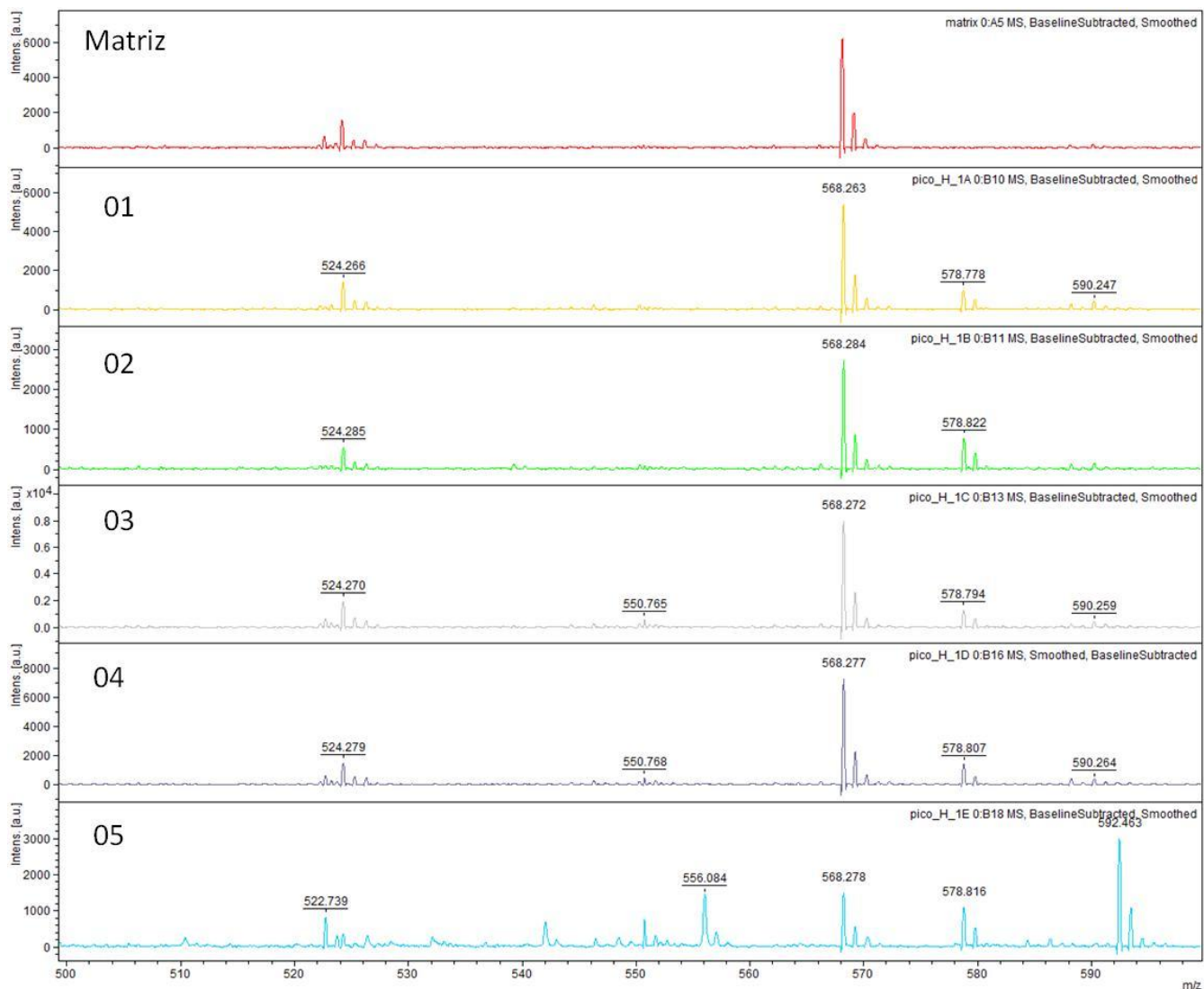


Figura 8: Espectros de massa obtidos para *T. asperellum* preparadas a partir das amostras fracionadas da fração “H” estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 500 e 600 Da. O primeiro espectro corresponde ao perfil da matriz e os espectros 01 ao 05 são correspondentes às frações “H”.

Na faixa de 600 a 700 Da (figura 9), observou-se frações expressivas, subtraindo-se a matriz: as frações com massa de 630,43 m/z foi observado apenas na fração 05; a fração com massa média de 636 m/z foi encontrado nas frações 01, 03, 04, 05; as frações com massa entre 650,18 a 652,41 m/z foram detectados em todas as frações; as frações com massas 672,18 a 672,20 m/z foram detectados nos fragmentos de 01 ao 04 e nas frações 02, 03 e 04 foram observados massas com variação entre 688,17 a 688,46.

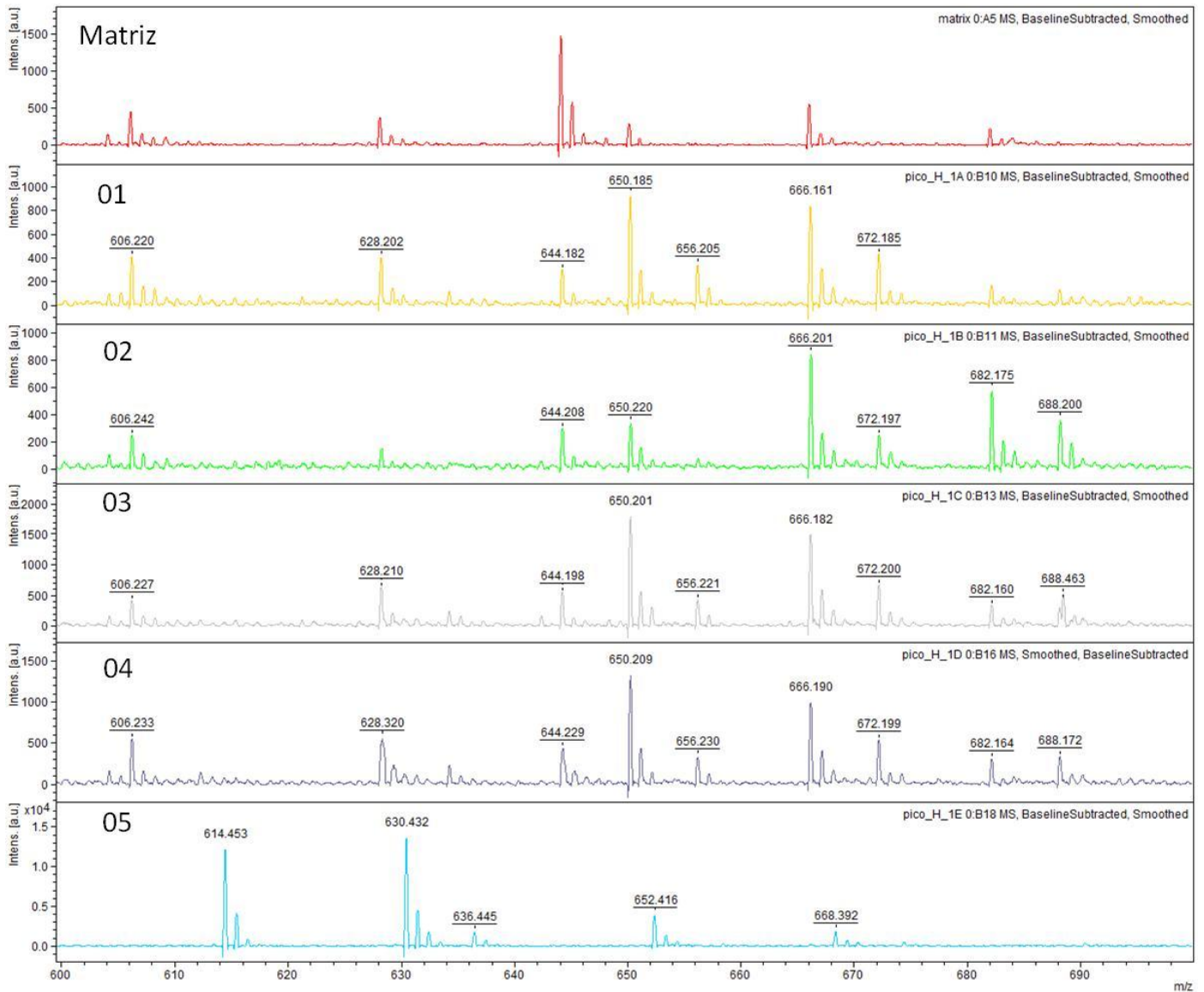


Figura 9: Espectros de massa obtidos para *T. asperellum* preparadas a partir das amostras fracionadas da fração “H” estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 600 e 700 Da. O primeiro espectro corresponde ao perfil da matriz e os espectros 01 ao 05 são correspondentes às frações “H”.

Na faixa de 700 a 800 Da (figura 10), observou-se fragmentos expressivos, subtraindo-se a matriz: as frações com carga de 754.52 e 770.50 m/z foram detectadas apenas no fragmento 05. Inere-se que as massas 754.52 e 770.50 m/z sejam do composto homólogo trichocompactinas (Degenkolb et al. 2006)

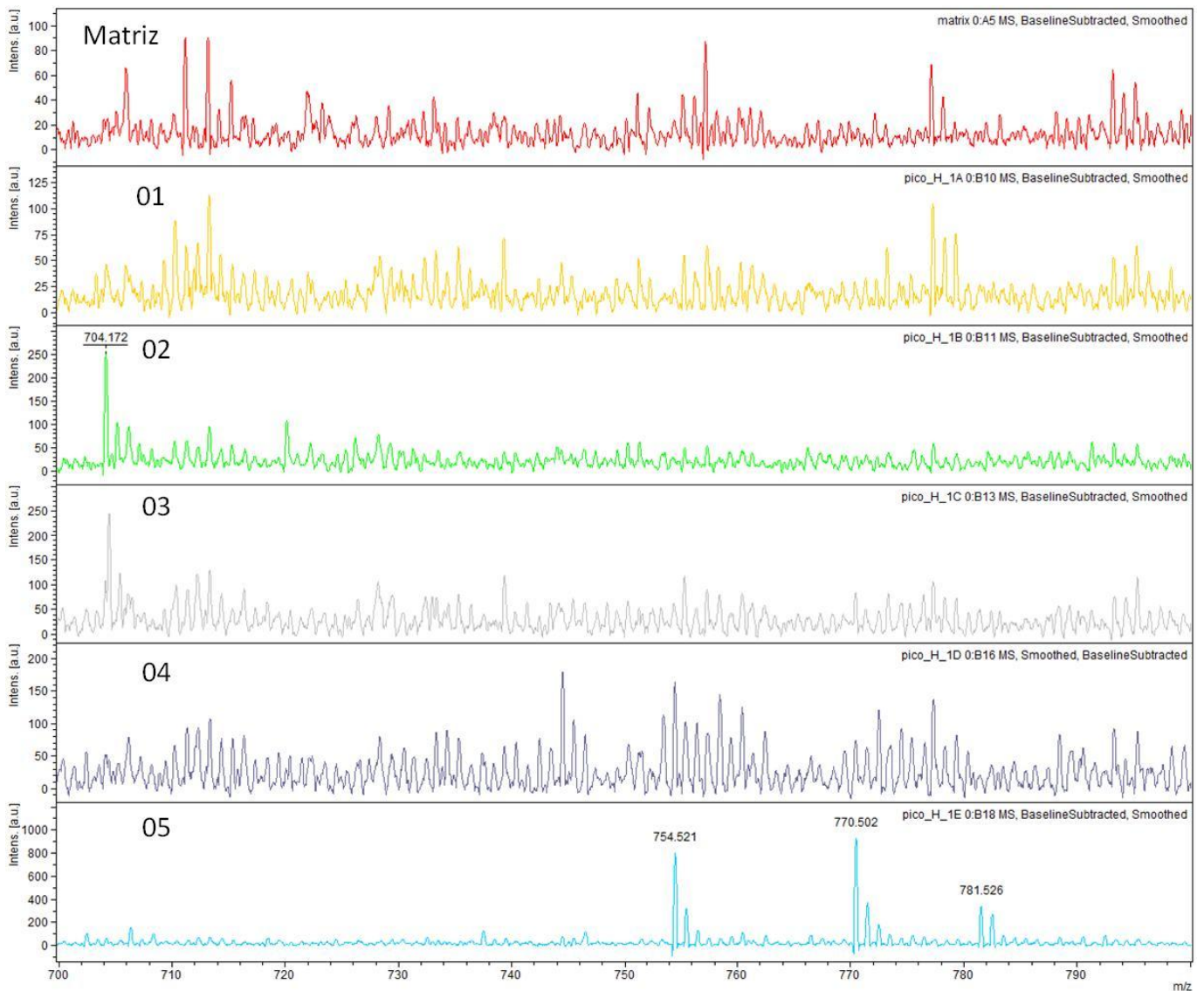


Figura 10: Espectros de massa obtidos para *T. asperellum* preparadas a partir das amostras fracionadas da fração “H” estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 700 e 800 Da. O primeiro espectro corresponde ao perfil da matriz e os espectros 01 ao 05 são correspondentes às frações “H”.

Na faixa de 800 a 900 Da (figura 11), observou-se apenas um fragmento expressivos quando subtraindo-se a matriz: o íons com massa entre 890,72 a 893,22 m/z foram detectados em todos os fragmentos.

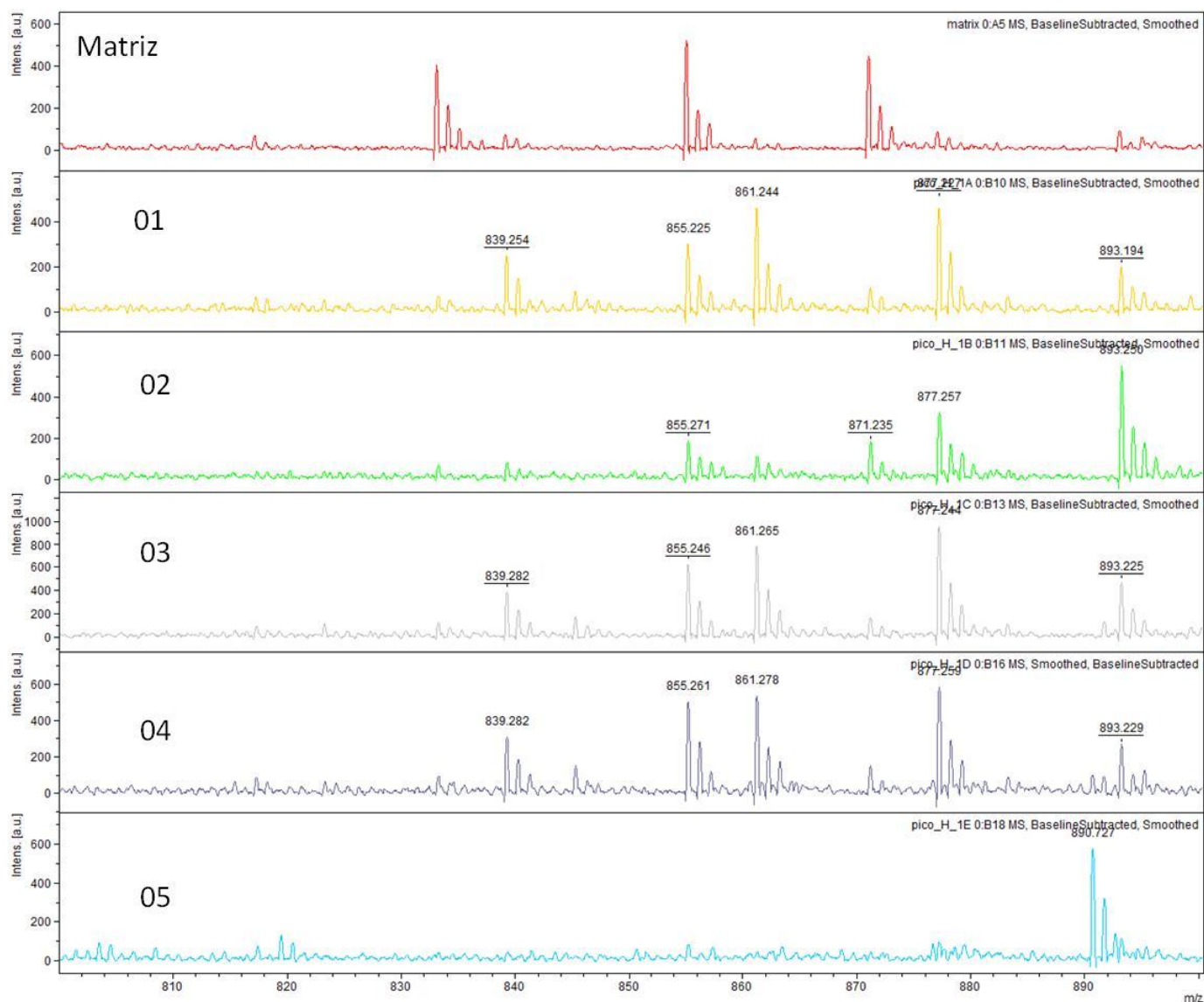


Figura 11: Espectros de massa obtidos para *T. asperellum* preparadas a partir das amostras fracionadas da fração “H” estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 800 e 900 Da. O primeiro espectro corresponde ao perfil da matriz e os espectros 01 a 05 são correspondentes às frações “H”.

Na faixa de 900 a 1000 m/z (figura 12), observou-se frações expressivas, subtraindo-se a matriz: as frações com carga de 906.71 e 921.71 m/z foram detectados apenas no fragmento 05. Infere-se que a massa carga de 921.71 seja o composto Asperelina B (Ren et al. 2009).

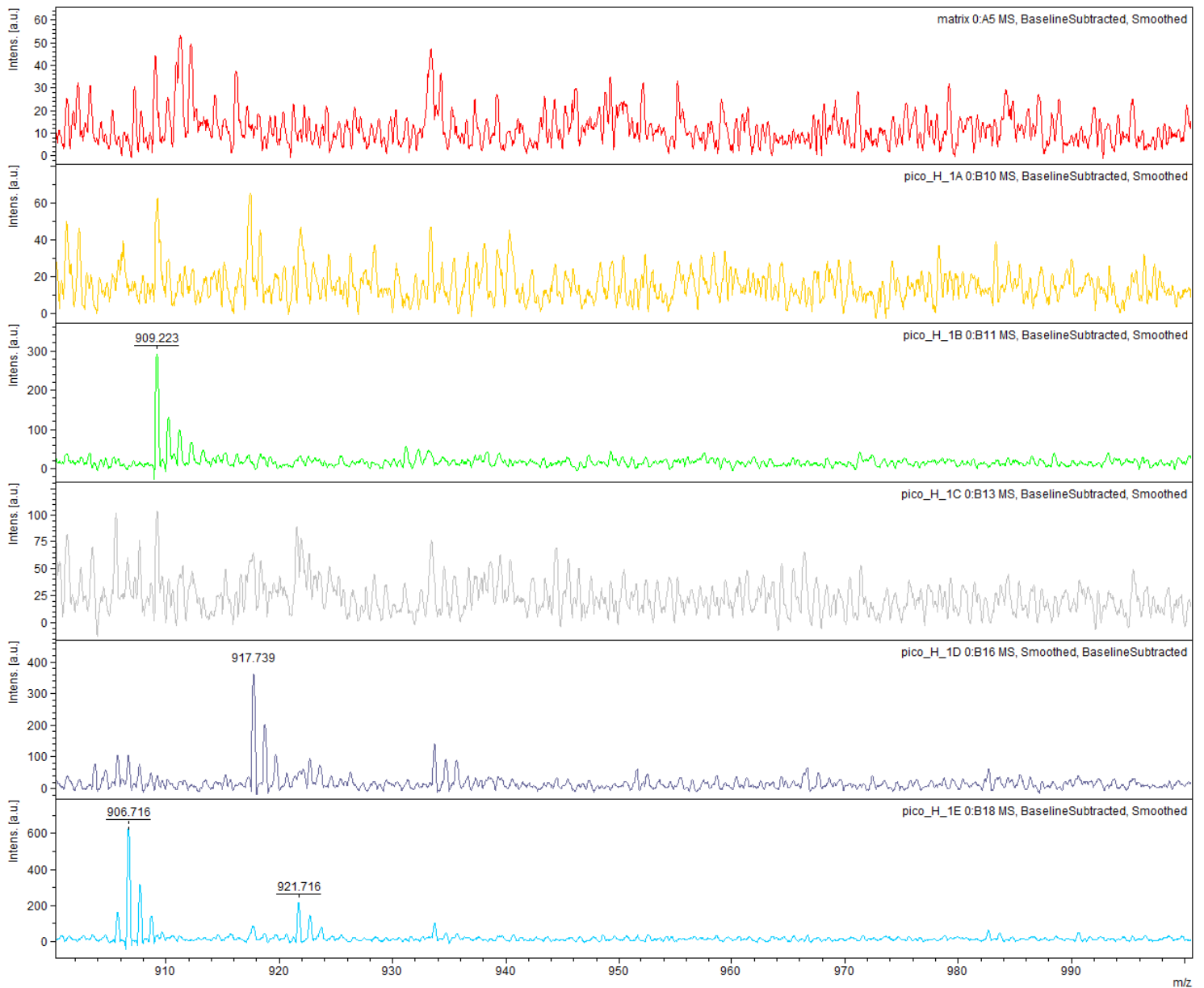


Figura 12: Espectros de massa obtidos para *T. asperellum* preparadas a partir das amostras fracionadas da fração “H” estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 900 e 1000 Da. O primeiro espectro corresponde ao perfil da matriz e os espectros 01 a 05 são correspondentes às frações “H”.

Na faixa de 1000 a 1200 m/z não foi possível diferenciar as frações oriundas da fração “H” e da matriz (dados não mostrados).

Discussão

A produção de metabólitos secundários por fungos consiste em um processo complexo associado ao seu desenvolvimento morfológico. Metabólitos secundários são

de grande importância em aplicações na área da biotecnologia, embora em alguns casos pareça não ter função clara para esses microorganismos (Maddau et al., 2009).

Nesse trabalho foi relatada e testada a ação de metabólitos extraídos do isolado CEN201 da espécie *Trichoderma asperellum*, tal fungo tem a habilidade de desempenhar o controle biológico de fitopatógenos, provavelmente, utilizando todos seus mecanismos de controle de inúmeros microorganismos como *Cylindrocladium sacoparium*, causador de tombamento e manchas foliares em eucalipto (Carvalho Filho 2008), *S. sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani* (Carvalho Filho 2013, dados não publicados; Braúna, 2009). Diversos trabalhos relatam o potencial de biocontrole dessa espécie de *T. asperellum* com formulações específicas para sua dispersão em massa no campo ou em testes em laboratório (Kolombet et al. 2008; Nagayama et al. 2007; Mbarga et al. 2012; Shores et al. 2005; Wijesinghe et al. 2011; Castillo et al., 2001).

Os metabólitos secundários do isolado CEN 201 da espécie *T. asperellum* foi submetido ao HPLC para uma breve seleção de seus metabólitos e posteriormente avaliado o potencial de cada fração em inibir o crescimento micelial, embora nem todas as frações tenham mostrado algum tipo de inibição micelial do patógeno. Entre todas as frações, a fração H apresentou notável capacidade de contenção do avanço micelial do patógeno. Vinale et al. (2008), afirma que *Trichoderma* spp. produz uma infinidade de metabólitos secundários de compostos quimicamente diferentes para a sua sobrevivência em um ambiente altamente competitivo contra outros microorganismos. Algumas moléculas são utilizadas para o transporte de nutrientes, para o acesso de diferentes fontes de carbono, ou, no caso de antibióticos, para retardar, inibir e matar o crescimento microbiano.

A fração H do extrato bruto de *T. asperellum* coletado pelo HPLC com maior taxa de inibição micelial contra *S. sclerotiorum* foi submetido à espectrometria de massa que

revelou inúmeras moléculas possivelmente ainda desconhecidas na literatura e duas moléculas candidatas já relatadas como trichocompactina (Degenkolb et al. 2006) e Asperelina B (Ren et al., 2009), essas duas moléculas relatadas do grupo dos peptaibols.

De acordo com Reino et al. (2008), os peptaibols consistem em uma grande família de produtos naturais, lineares, biossintetizado por diferentes fungos, principalmente pelos fungos do gênero *Trichoderma* que são os principais produtores dessa classe de compostos que contém 7-20 resíduos de aminoácidos como característica a presença um acilado grupo N- terminal, um C- terminal amino álcool e um alto teor de 2-amino-isobutírico (AIB) (Reino et al., 2008).

Ao longo dos anos, observou-se que a espécie de *T. asperellum*, largamente distribuído no mundo, tem agido como um eficaz agente de biocontrole de patógenos devido à sua produção de enzimas que hidrolisam as paredes celulares de outros microorganismos (Benitez et al., 2004). Mbarga et al. (2012) demonstraram o efeito antagônico dessa da espécie *T. asperellum* contra os fitopatógenos *Myriotylum* e *Pythium*. Outros estudos descreveram o isolamento de metabólitos secundários do grupo dos Peptaibols e 2 Trichotoxinas de *T. asperellum*, sugerindo que esse fungo é uma fonte rica em novos compostos (Krause et al. 2006). Ren et al. (2009) coletou um isolado de *T. asperellum* a partir de sedimentos na Antártida e isolou 6 compostos, também do grupo dos peptaibols que nomeou de Asperelinas e concluiu que esses fungos produziram altos níveis de substâncias bioativas que podem ser utilizadas para a produção de novos compostos para controle de microorganismos.

Degenolbet al., (2006), apresentou moléculas (também do grupo dos peptaibols) chamada trichocompactins. De acordo com o autor, esse composto produzido apenas pelo isolados da espécie *T. brevicompactum*, inclusive identificado pela

Chemotaxonomia, podem ser responsáveis pela proteção de plantas. Entretanto, infere-se que esse mesmo composto foi encontrado no isolado de *T. asperellum* CEN 201.

Na coleta das amostras do extrato bruto pela HPLC do *T. asperellum* CEN 201, observou-se a presença de uma substância de cor amarela escura que não teve atividade nenhuma contra o patógeno. Alguns pigmentos de fungos estão associados a estruturas de desenvolvimento, dentre esse pigmentos, a melanina é a mais comum. Melaninas são geralmente os pigmentos castanhos, ou amarelos escuros formados pela oxidação e polimerização dos compostos fenólicos e são sintetizados durante a formação dos esporos por deposição na parede celular. A biossíntese da melanina tem sido estudada em fungos fitopatogênicos em que o pigmento não só contribui para sua sobrevivência dos esporos protegendo contra a luz ultravioleta, mas é um importante fato de virulência (Calvo et al. 2002).

Conclusão

As frações “G, H, I, J e L” dos metabólitos não voláteis do isolado da espécie *Trichoderma asperellum* fragmentados por HPLC foram capazes de inibir o crescimento micelial do patógeno, sendo que a fração “H” obteve o maior nível de inibição. A maior ênfase nesse trabalho foi na purificação dos metabólitos não voláteis para avaliar a inibição micelial do patógeno *S. sclerotiorum*. Estudos mais precisos na purificação para a confirmação desses compostos devem ser elaborados em MALDI TOF MS/MS ou *Eletrospray* para afirmar realmente a identidade desses compostos.

Referências Bibliográficas

Agrawal SC, Khare MN, Agrawal PS (1977) Biological control of *Sclerotium rolfii* causing collar rot of lentil. *Indian Phytopathology* 30:176-179

Benítez T, Rincón AM, Limón MC Codón AC (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7:249-260

Bettiol W, Ghini R (1995) Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. Ceres. 3 ed. São Paulo.

Boland GJ, Hall R (1994) Index of plants of hostes *Sclerotinia sclerotiorum*. Canadian Journal Plant Pathology 16:93-108

Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP (2002) Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. Microbiology and Molecular Biology Reviews 66:447-459

Castillo FDH, Padilla AMB, Morales GG, Siller MC, Herrera RR, Gonzales CNA, Reyes FC (2011) *In Vitro* Antagonist Action of *Trichoderma* Strains Against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. American Journal of Agricultural and Biological Sciences 6:410-417

Chet I, Baker R. (1987) Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 71:286-290

Consolo VF, Monaco CI, Cordo CA, Salerno GL (2012) Characterization of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. World Journal of Microbiology and Biotechnology 28:1389-1398

Degenkolb T, Fenhan TG, Berg A, Nirenberg HI, Gams W, Bruckner H (2006) Peptaibiotics: Screening for Polypeptide Antibiotics (Peptaibiotics) from Plant-Protective *Trichoderma* Species CHEMISTRY & BIODIVERSITY 3:593-610

Dennis C, Webster J (1971) Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. Transactions British Mycological Society 57:363-369

El-Hasan A, Walker F, Schöne J, Buchenauer H (2006) Antagonistic effect of 6-pentyl-alpha-pyrone produced by *Trichoderma harzianum* toward *Fusarium moniliforme*. Journal of Plant Diseases and Protection 114:62-68

Ethur LZ, Blume E, Muniz M, Silvav ACF, Stefanelo DR, Rocha EK (2005) Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. Fitopatologia Brasileira, 30:127-133

Figueirêdo GS, Figueirêdo LC, Cavalcanti FCN, Santos AC, Costa AF, Oliveira NT (2010) Biological and Chemical Control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma* spp. and *Ulocladium atrum* and Pathogenicity to Bean Plants. Brazilian Archives of Biology and Technology 53:1-9

Haggag WM, Mohamed MES (2011) Biodiversity, Biological and Molecular Investigations of Biocontrol by the Genus *Hypocrea/Trichoderma* spp. European Journal of Scientific Research, 65:281-292

Harman GE (2004) *Trichoderma* – not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica* 39:103-108

Howell CR (2003) Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts, *Plant Disease* Vol. 87 No. 1

Kolombet LV, Zhigletsova SK, Kosareva NI, Bystrova EV, Derbyshev VV, Krasnova SP, Schisler D (2008) Development of an extended shelf-life, liquid formulation of the biofungicide *Trichoderma asperellum* *World Journal Microbiol Biotechnol* 24:123-131

Krause C, Kirschbaum J, Bruuckner H (2006) Peptaibiotics: an advanced, rapid and selective analysis of peptaibiotics/peptaibols by SPE/LC-ES-MS. *Amino Acids* 30:435-443

Mbarga JB, Hoopen GMT, Kuate J, Adiobo A, Ngonkeu MEL, Ambang Z, Akoa A, Tondje PR, Begoude BAD (2012) *Trichoderma asperellum*: A potential biocontrol agent for *Pythium myriotylum*, causal agent of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) root rot disease in Cameroon. *Crop Protection* 36:18-22

Braúna, LM (2002) Controle Biológico do Mofo Branco por Isolados de *Trichoderma* nas Culturas de Soja e Feijão Comum. *Dissertação, Universidade de Brasília*

Maddau L, Cabras A, Franceschini A, Linaldeddu BT, Crobu S, Roggio T, Pagnozzi D (2009) Occurrence and characterization of peptaibols from *Trichoderma citrinoviride*, an endophytic fungus of cork oak, using electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Microbiology* 155:3371-3381

Shoresh M, Yedidia I, Chet I (2005) Involvement of Jasmonic Acid/Ethylene Signaling Pathway in the Systemic Resistance Induced in Cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* 95:76-84

Mukherjee PK, Horwitz BA, Kenerley CM (2012) Secondary metabolism in *Trichoderma* – a genomic Perspective. *Microbiology* 158:35-45

Nagayama K, Watanabe S, Kumakura K, Ichikawa T, Makino T (2007) Development and commercialization of *Trichoderma asperellum* SKT-1 (Ecohope®), a microbial pesticide. *Journal of Pesticide Science* 32:141-142

Reino JL, Guerrero RF, Hernández-Gala R, Collado IG (2008) Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews* 7:89-123

Ren J, Xue C, Tian L, Xu M, Chen J, Deng Z, Proksch P, Lin W (2009) Asperelines A-F, Peptaibols from the Marine-Derived Fungus *Trichoderma asperellum*. *Journal of Natural Products* 72:1036-1044

Rosa DR, Herrera CJL (2009) Evaluation of *Trichoderma* sp. as biocontrol agents against avocado root rot. *Biological Control* 51:66-71

Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Barbetti MJ, Li H, Woo SL, Lorito M (2008) A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72:80-86

Vinale F, Ghisalberti EL, Sivasithamparam K, Marra R, Ritieni A, Ferracane R, Woo S, Lorito M (2009) Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology* 48:705-711

Viterbo A, Horwitz BA (2010) Mycoparasitism. In *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi* vol. 42, pp. 676–693. Edited by K. A. Borkovich & D. J. Ebbole. Washington: American Society for Microbiology.

Weindling R, Emerson OH (1936) The isolation of a toxic substance from the culture filtrate of *Trichoderma*. *Phytopathology* 26:1068-1070

Wijesinghe CJ, Wijeratnam RSW, Samarasekara JKRR, Wijesundera RLC (2011) Development of a formulation of *Trichoderma asperellum* to control black rot disease on pineapple caused by (*Thielaviopsis paradoxa*). *Crop Protection* 30:300-306