



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE USO DE
ISOLADOS DE *Trichoderma* CONTRA *Sclerotinia sclerotiorum* E
Sclerotium rolfsii

MARCELLA TELES DOS REIS

Brasília-DF

2014

MARCELLA TELES DOS REIS

**IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE USO DE
ISOLADOS DE *Trichoderma* CONTRA *Sclerotinia sclerotiorum* E
*Sclerotium rolfsii***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Fitopatologia.

Orientação

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

Brasília-DF

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Reis, Marcella Teles dos.

Identificação e avaliação do potencial de uso de isolados de *Trichoderma* contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* / Marcella Teles dos Reis.

Brasília, 2014

p 117.

Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1. *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Trichoderma*.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT

II. Identificação e avaliação do potencial de uso de isolados de *Trichoderma* contra *sclerotinia sclerotiorum* e *sclerotium rolfsii*.

Dissertação de mestrado realizada junto ao programa de pós-graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília sob orientação da Dra. Sueli Corrêa Marques de Mello. Apoio institucional da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) e financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE USO DE
ISOLADOS DE *Trichoderma* CONTRA *Sclerotinia sclerotiorum* E
*Sclerotium rolfsii***

MARCELLA TELES DOS REIS

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ___/___/___ por:

Banca Examinadora:

Sueli Corrêa Marques de Mello (Orientadora)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN)

Universidade de Brasília (UnB)

Luiz E. B. Blum

Universidade de Brasília (UnB)

Peter W. Inglis

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN)

A Deus, pai todo poderoso.

Aos meus queridos pais José Manoel dos Reis e Dalvina Teles dos Reis, meus irmãos Marco Antônio dos Reis, Patrícia Teles dos Reis e Letícia dos Reis Oliveira e ao meu amor Rogério de Carvalho Andrade

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus Pai, Filho e Espírito Santo, por guiar os meus passos, por colocar pessoas maravilhosas em minha vida, por me dar saúde, força e fé, ajudando-me a perseverar e tornando esse jornada mais branda.

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pela oportunidade de aperfeiçoamento.

À Capes pela concessão da bolsa de estudos, tornando possível a dedicação integral aos estudos.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo espaço concedido e recursos financeiros disponibilizados para realização deste trabalho.

À Dra. Sueli Corrêa Marques de Mello em especial pelo apoio, dedicação e paciência, me tratando sempre como uma filha e posso afirmar que foi para mim como uma mãe me tratando sempre com carinho e atenção e me corrigindo sempre que necessário. Muito obrigada por tudo, serei eternamente grata.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação Juvenil E. Cares pelo apoio e enorme paciência para comigo.

Aos professores do departamento de Fitopatologia, Adalberto C. Café Filho, Carlos H. Uesugi, Cleber Furlanetto, Helson Mário Martins do Valle, José C. Dianese, Juvenil E. Cares, Luiz Eduardo B. Blum e Robert Miller pelos valiosos ensinamentos.

À FAP-DF pelo auxílio financeiro ao projeto e para participação em congressos.

À Univeridade Católica de Brasília e ao professor Dr. Otávio Luiz Franco, pelo espaço e equipamentos concedidos para separação dos metabólitos.

Ao Dr. Magno Rodrigues de Carvalho Filho pela grande ajuda e amizade durante de realização de várias etapas deste trabalho; mostrou ser como um irmão, sempre me salvando nos momentos mais difíceis.

À estudante de doutorado em Biologia Molecular Saluana Craveiro pela grande ajuda na elaboração das árvores filogenéticas.

À Aninha pelo carinho, atenção e as belas imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura.

À Secretaria do Departamento de Fitopatologia levada à frente pelo Sr. José Ribamar Frazão por sua ajuda e amizade.

À Joseane Padilha pelas análises estatísticas.

À Prof^a. Zuleide pela paciência, zelo e ensinamentos.

A Secretária do PCB do CENARGEN, Rosângela Zansavio, pelo carinho, atenção e ajuda dispensada.

Aos amigos do laboratório de Fitopatologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Dr. João Batista Tavares, José Eustáquio pela amizade, companheirismo e incentivo e, em especial a Irene Martins, que se tornou uma grande amiga e sempre vou levar comigo no coração. Obrigada por toda ajuda na execução dos experimentos, pelos conselhos e pelos momentos de descontração.

Aos estudantes do laboratório que foram e que ficaram: Laura Jeaninne, Mariana Oliveira, Sandro Montalvão, Marcello Castro pelo carinho e amizade e Eder Marques, companheiro de viagens, pela ajuda e incentivo.

À Rafaela Borges, amiga fiel, companheira e conselheira, esteve ao meu lado em todos os momentos tristes e alegres, estudos, congressos, trabalho, nos fins de semana nos laboratórios de Nematologia e Micologia.

À amiga mais que especial Rayane Lima pelas várias noites em claro, estudando para as provas, pelas longas conversas e momentos de descontração.

Aos amigos da UnB Ícaro, Elenice, Juliana, Cléia, Pedro, Jesiane, Josefa, Nédio, Maria, William, Nancy, Kamila e todos os colegas com quem tive o prazer de conviver.

As amigas Déborah Mesquita e Luiza Achiame companheiras de todas as horas, obrigada por toda a alegria proporcionada, vocês sempre estiveram no meu coração.

Por fim, a Deus que me presenteou com a família que tenho. Papai e Mamãe obrigada pela confiança, incentivo, força e fé nessa dura jornada, sem vocês não teria conseguido.

Aos meus irmãos Marco, Patrícia e Letícia pelo amor, carinho, diversão e distração durante esses anos.

A Bruna Laís minha “primã” tagarela e Vanda Mancini cunhadinha que me presenteou com José Neto e a Alícia, dois anjinhos que tanto amo, obrigada por todo o amor e carinho.

Ao meu noivo Rogério de Carvalho Andrade, que é o meu amor e minha inspiração e que primeiro me incentivou a fazer o mestrado, obrigada por todo amor, carinho, atenção e cumplicidade.

Aos meus parentes que de alguma forma estiveram envolvidos nessa jornada.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO	3
OBJETIVOS.....	6
GERAL.....	6
ESPECÍFICOS	6
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
MATERIAL E MÉTODOS	20
OBTENÇÃO DOS ISOLADOS	20
CULTURAS MONOSPÓRICAS	20
PAREAMENTO DE CULTURAS DE <i>TRICHODERMA</i> CONTRA <i>SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</i> E <i>SCLEROTIUM ROLFSII</i>	20
ANÁLISE DA INTERAÇÃO DE <i>TRICHODERMA</i> , <i>SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</i> E <i>SCLEROTIUM</i> <i>ROLFSII</i>	22
EFEITO INIBIDOR DE METABÓLITOS NÃO-VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR <i>TRICHODERMA</i> CONTRA <i>S. SCLEROTIORUM</i> E <i>S. ROLFSII</i>	22
ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE <i>TRICHODERMA</i>	23

Extração de DNA	23
Amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e sequenciamento.....	25
Análise filogenética.....	26
MALDI - TOF MS	27
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE <i>TRICHODERMA ASPERELLUM</i>	29
Extração de metabólitos secundários de <i>Trichoderma asperellum</i>	30
Purificação de compostos metabólicos	31
Avaliação das frações obtidas pela técnica de HPLC	32
Análises por Espectrometria de Massa.....	33
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE <i>TRICHODERMA</i> EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	33
Condições de cultura	33
Avaliação da promoção de crescimento de <i>Trichoderma</i> spp. em casa de vegetação.....	33
Método da validação da Silhueta	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
PAREAMENTO DE CULTURAS DE <i>TRICHODERMA</i> CONTRA <i>SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</i> (SS) E <i>SCLEROTIUM ROLFSII</i> (SR)	36
ANÁLISE DAS INTERAÇÕES DE PATÓGENOS X <i>TRICHODERMA</i>	39
EFEITO INIBIDOR DE METABÓLITOS NÃO-VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR <i>TRICHODERMA</i> CONTRA <i>S. SCLEROTIORUM</i> E <i>S. ROLFSII</i>	43
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE <i>TRICHODERMA</i>	49
AMPLIFICAÇÃO POR PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE) E SEQUENCIAMENTO	49
DIVERSIDADE DE ESPÉCIES	54
CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA	57
MALDI TOF MS.....	64
HPLC - METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE <i>TRICHODERMA ASPERELLUM</i>	73

AVALIAÇÃO DAS FRAÇÕES DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ADQUIRIDOS POR HPLC QUANTO À INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>S. SCLEROTIORUM</i> E <i>S. ROLFSSII</i>	75
ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSA	76
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE FEIJÃO EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	79
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
ANEXO 1	111

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Isolados de <i>Trichoderma</i> testados em casa de vegetação quanto a promoção de crescimento.....	34
Tabela 2: Inibição do crescimento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> por isolados de <i>Trichoderma</i> em cultivo pareado.	37
Tabela 3: Inibição do crescimento de <i>Sclerotium rolfsii</i> por isolados de <i>Trichoderma</i> em cultivo pareado.	38
Tabela 4: Inibição do crescimento de <i>Sclerotium rolfsii</i> por isolados de <i>Trichoderma</i> em ensaio com metabólitos não-voláteis.....	47
Tabela 5: Inibição do crescimento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> por isolados de <i>Trichoderma</i> em ensaio com metabólitos não-voláteis.....	48
Tabela 6: Identificação molecular, clado, espécie, isolados e total de indivíduos dos 51 isolados de <i>Trichoderma</i> utilizados nesse estudo.	55
Tabela 7: Isolados de <i>Trichoderma</i> obtidos do <i>GenBank</i> usados para este estudo como referência.....	61
Tabela 8: Porcentagem de massa seca (g) de parte aérea de plantas de feijão, obtidos nos ensaios com relação a testemunha segundo agrupamento sugerido pelo método do comprimento médio da Silhueta. Silhueta total: 0,65.	80
Tabela 9: Porcentagem de massa seca (g) de raiz de plantas de feijão, em relação a testemunha absoluta, segundo agrupamento sugerido pelo método do comprimento médio da Silhueta. Silhueta total: 0,64.	81

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Representação da escala de notas. 21
- Figura 2: Balão volumétrico mostrando a formação das duas fases: superior, o acetato de etila e inferior, o metabólito bruto..... 31
- Figura 3: Testes de inibição do crescimento micelial de *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum* por metabólitos purificados em HPLC de *T. asperellum* 32
- Figura 4: A – Imagem aproximada do confronto direto de culturas com *Trichoderma*, *S. rolfsii* (CEN216) e *S. sclerotiorum* (CEN217) ao microscópio de luz. B – Isolados CEN216 x CEN220. C – Isolados CEN217 x CEN220. D – Antagonista CEN168 crescendo paralelamente na hifa do patógeno CEN217. E – Enrolamento do *Trichoderma* CEN168 e a deformação na hifa do patógeno CEN217..... 40
- Figura 5: Imagens obtidas ao microscópio eletrônico de varredura. A – Hifas do *Trichoderma* (CEN160) crescendo paralelamente a hifa de *S. rolfsii*; B – Hifas de *S. rolfsii* deformadas e presença de clamidósporo de *Trichoderma*; C – Enrolamento de hifa do isolado CEN142 sobre *S. rolfsii* e D – Zona de confronto entre o isolado CEN002 e o patógeno *S. rolfsii*. 41
- Figura 6: Imagens obtidas ao microscópio eletrônico de varredura. A – Hifa do *Trichoderma* penetrando a hifa do patógeno e conídio de *Trichoderma* (CEN142) sobre *S. sclerotiorum*. B – Hifas do isolado CEN228 se enrolando em hifas do patógenos. C e D – Conídios, hifas de *Trichoderma* crescendo paralelamente ao patógeno e hifas danificadas de *S. sclerotiorum* e E – Disco de micélio ágar ilustrando a região de confronto entre CEN142 (direita) e *S. sclerotiorum* (esquerda). 42
- Figura 7: Diversidade de pigmentos produzidos por *Trichoderma* spp. em meio líquido BD.43

Figura 8: A. Efeito inibidor de metabólitos não-voláteis do CEN002 <i>T. stromaticum</i> sobre o crescimento de <i>S. sclerotiorum</i> com 100% de inibição e B. CEN126 <i>T. harzianum</i> sobre o crescimento de <i>S. rolfsii</i> com 97,7% de inibição.	44
Figura 9: Análise de produtos de PCR em gel de agarose 1%, da região do rDNA com iniciadores ITS1 e ITS4. Marcador molecular (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen); 1 a 22: amplificação de amostras de rDNA utilizando-se iniciadores ITS1 e ITS4 com aproximadamente 630 pares de bases.	50
Figura 10: Análise de produtos de PCR em gel de agarose 1%, da região do rDNA com iniciadores TEF-1 α e EF1. M: marcador molecular (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen); amplificação de amostras de rDNA utilizando-se iniciadores TEF-1 α e EF1 com aproximadamente 1061 pares de bases.	50
Figura 11: Culturas de <i>Trichoderma</i> obtidas em meio BDA após sete dias de incubação a 25°C e fotoperíodo de 12 h. Placa 01: <i>T. harzianum</i> (CEN152); Placa 02: <i>T. asperellum</i> (CEN277); Placa 03: <i>T. asperellum</i> (CEN160); Placa 04: <i>T. tomentosum</i> (CEN168); Placa 05: <i>T. spirale</i> (CEN188); Placa 06: <i>T. erinaceum</i> (CEN190); Placa 07: <i>T. koningiopsis</i> (CEN142); Placa 08: <i>T. stromaticum</i> (CEN02).	51
Figura 12: Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostrando os detalhes de hifas, fiálides, conídio (ornamentados ou não) e clamidósporos em algumas espécies. A, B, e C (<i>T. stromaticum</i>); D, E e F (<i>T. koningiopsis</i>); G, H e I (<i>T. asperellum</i>); J, K e L (<i>T. spirale</i>) e H Clamidósporos.....	52
Figura 13: Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostrando os detalhes de hifas, fiálides, conídio (ornamentados ou não) e clamidósporos em algumas espécies. A, B e C (<i>T. erinaceum</i>); D, E e F (<i>T. tomentosum</i>); G, H e I (<i>T. harzianum</i>) e J, K e L (<i>T. asperellum</i>). K Clamidósporo	53

- Figura 14: Localização geográfica no mapa do Brasil dos locais de coleta dos isolados de *Trichoderma* indicados pelas linhas..... 54
- Figura 15: Árvore filogenética baseada na região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA dos 49 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 MP e os valores de suporte estão acima com *bootstrap* acima de 50%. Os isolados *T. asperellum* (DQ381957), *T. erinaceum* (DQ109534), *T. harzianum* (EF392746), *T. spirale* (JF439515), *T. stromaticum* (HQ342398), *T. tomentosum* (HQ857116), *T. koningiopsis* (DQ313138) e *T. longibrachiatum* (EU401551) são referências externas retiradas do GenBank, o último foi utilizado como *outgroup*..... 58
- Figura 16: Árvore filogenética baseada na região TEF-1 α do rDNA dos 47 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 MP e os valores de suporte estão acima com *bootstrap* acima de 50%. Os isolados *T. asperellum* (DQ381958), *T. erinaceum* (DQ109547), *T. harzianum* (FJ179573), *T. spirale* (AF534626), *T. stromaticum* (HQ342204), *T. tomentosum* (AF534630), *T. koningiopsis* (DQ284972) e *T. longibrachiatum* (EU401582) são referências externas retiradas do GenBank, o último foi utilizado como *outgroup*..... 59
- Figura 17: Árvore filogenética baseada na região TEF-1 α do rDNA dos 50 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 MP e os valores de suporte estão acima com *bootstrap* acima de 50%. 60
- Figura 18: Dendrograma resultante da análise por MALDI-TOF MS de oito isolados de *Trichoderma* com três repetições cada..... 66

Figura 19: Espectros de massa obtidos para <i>T. asperellum</i> preparadas a partir das amostras de esporos do mesmo isolado estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 2000 e 14.000 Da.	67
Figura 20: Espectros de massa obtidos para <i>T. asperellum</i> preparadas a partir das amostras de esporos do mesmo isolado estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 2000 e 14.000 Da.	67
Figura 21: Espectros de massa obtidos para <i>T. harzianum</i> preparadas a partir das amostras de esporos do mesmo isolado estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 2000 e 13.000 Da.	68
Figura 22: Espectros de massa obtidos para <i>T. koningiopsis</i> preparadas a partir das amostras de esporos do mesmo isolado estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 2000 e 12.000 Da.	68
Figura 23: Espectros de massa obtidos para <i>T. spirale</i> preparadas a partir das amostras de esporos do mesmo isolado estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 2000 e 14.000 Da.	69
Figura 24: Espectros de massa obtidos para <i>T. stromaticum</i> preparadas a partir das amostras de esporos do mesmo isolado estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 2000 e 14.000 Da.	69
Figura 25: Espectros de massa obtidos para <i>T. tomentosum</i> preparadas a partir das amostras de esporos do mesmo isolado estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 2000 e 14.000 Da.	70
Figura 26: Espectros de massa obtidos para <i>Trichoderma</i> sp. preparadas a partir das amostras de esporos do mesmo isolado estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 2000 e 14.000 Da.	70

Figura 27: Inibição do crescimento micelial de <i>S. sclerotiorum</i> por extrato bruto obtido do filtrado de colônias do isolado CEN277 de <i>Trichoderma asperellum</i>	74
Figura 28: Cromatograma líquida de alta eficiência da corrida de 500 ml do extrato bruto do isolado CEN277 de <i>T. asperellum</i> . As frações numeradas de 1 a 7 foram testados contra <i>S. sclerotiorum</i> e <i>S. rolfsii</i>	74
Figura 29: Bioensaio conduzido com a fração 4 dos metabólitos secundários de <i>T. asperellum</i> contra <i>S. sclerotiorum</i> e <i>S. rolfsii</i>	75
Figura 30: Espectros de massa obtidos a partir da fração 4 do metabólito bruto de <i>T. asperellum</i> . Estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 200 e 12.000 Da. demonstrando maior intensidade relativa entre 400 e 700 m/z.	76

RESUMO

O Brasil se destaca no cenário mundial como um dos principais produtores de feijão. Entretanto, vários problemas fitossanitários contribuem para redução da renda líquida auferida na exploração da cultura, entre os quais, o mofo branco e a podridão de escleródio, causadas pelos fungos *Sclerotinia sclerotiorum* (SS) e *Sclerotium rolfsii* (SR), respectivamente, reconhecidas como principais doenças do feijão. O controle biológico, pelo uso de *Trichoderma* tem sido proposto como um dos métodos de manejo das doenças. Espécies desse gênero possuem grande importância agrônômica e atuam como decompositores primários de matéria orgânica, destacando-se também pela produção de metabólitos e enzimas com propriedades antifúngicas. Em face disso, o trabalho foi conduzido com o objetivo de identificar isolados de *Trichoderma* com potencial de uso contra SS e SR. Cento e quarenta e nove isolados foram testados *in vitro* e 50 destes foram pré-selecionados e identificados com base no sequenciamento das regiões ITS e TEF do rDNA. Dentre esses, foram identificadas sete espécies do gênero *Trichoderma*: *T. harzianum*, *T. stromaticum*, *T. koningiopsis*, *T. asperellum*, *T. tomentosum*, *T. spirale* e *T. erinaceum*. Vinte isolados foram testados em casa de vegetação. Resultados desse estudo mostram que, *in vitro*, 10,6% dos isolados testados contra SS e 14% contra SR apresentaram nota 1 no pareamento de cultura; 15,33% dos isolados para SS e 4,6% para SR mostram níveis elevados de antagonismo quanto a inibição micelial do patógeno por metabólitos não-voláteis. Dos 20 isolados selecionados para os estudos em casa de vegetação, quatro se destacaram: CEN207 (*T. koningiopsis*), CEN188 (*T. spirale*), CEN200 (*T. koningiopsis*) e CEN189 (*T. spirale*) sobre os demais quanto a promoção de crescimento. A técnica de identificação por MALDI TOF MS foi utilizada com oito dos isolados de *Trichoderma* previamente identificados com base no sequenciamento de fragmentos do DNA, agrupando-se de acordo com as espécies, conforme o esperado e formando clados no dendograma. Metabólito bruto extraído do isolado CEN277 (*T. asperellum*) foi analisado em HPLC e mostrou grande potencial quanto à inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. As técnicas utilizadas com cromatografia líquida e MALDI TOF MS, embora iniciais, proporcionaram resultados interessantes e necessitam de mais dedicação para a obtenção de resultados conclusivos na identificação das moléculas envolvidas.

Palavras-chave: *Trichoderma*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, identificação molecular, seleção de agentes de biocontrole.

ABSTRACT

Brazil stands out in the global scenario as one of the leading producers of beans. However, many phytosanitary problems contribute to a reduction of yield, including white mold and sclerotia rot, caused by the fungi *Sclerotinia sclerotiorum* (SS) and *Sclerotium rolfsii* (SR) respectively, which are recognized as major bean diseases. Biological control using *Trichoderma* has been proposed as a method of managing these diseases. Species of this genus are, of great agronomic interest and act as primary decomposers of organic material and are, also highlighted by the production of enzymes and metabolites with antifungal properties. For this reason, this study was conducted in order to identify *Trichoderma* isolates able to implement the biocontrol of these diseases. One hundred forty-nine isolates were tested *in vitro* and 50 of these were pre-selected and identified based on sequencing of the TEF and ITS regions of rDNA. Seven species of *Trichoderma* have been identified based on molecular characterization: *T. harzianum*, *T. stromaticum*, *T. koningiopsis*, *T. asperellum*, *T. tomentosum*, *T. spirale* and *T. erinaceum*. Among fifty isolates, 20 were tested under greenhouse conditions. Results of this study show that, *in vitro*, 10.6% of the isolates tested against SS and 14% against SR reached note 1 in paired culture; 15.33% of the isolates for SS and 4.6% for SR show elevated levels of antagonism regarding pathogen mycelial inhibition by non-volatile metabolites. From 20 isolates selected for studies under greenhouse conditions, four stood out compared to others, as promoting growth: CEN207 (*T. koningiopsis*), CEN188 (*T. spirale*), CEN200 (*T. koningiopsis*) and CEN189 (*T. spirale*). The technique of identification by MALDI TOF MS was used with eight isolates of *Trichoderma* previously identified based on DNA sequencing, grouped according to the species, as expected forming a clade on the dendrogram. Crude metabolite extracted from the CEN277 (*T. asperellum*) was analyzed by HPLC and showed great potential for the inhibition of mycelial growth of *S. sclerotiorum*. The techniques used in liquid chromatography and MALDI TOF MS, although preliminary, have provided interesting results and motivate further studies to identify the involved molecule.

Keywords: *Trichoderma*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, molecular identification, selection of biocontrol agent.

INTRODUÇÃO

O Brasil aparece no cenário mundial como principal produtor e também maior consumidor de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.). O consumo *per capita* da leguminosa no país vem aumentando ao longo dos anos e hoje está situado entre 16,0-19,0 kg/habitante/ano. A preferência do brasileiro é regionalizada, diferenciando-se quanto à cor e ao tipo de grão, embora os feijões do grupo carioca sejam aceitos em praticamente todo o país e, portanto, são os mais cultivados (MAPA, 2013). Essa cultura, de grande importância social e econômica, é explorada por diferentes tipos de produtores, nas diversas regiões do país, utilizando diferentes níveis tecnológicos. Entretanto, o maior volume produzido no país é atribuído aos pequenos produtores, que utilizam quase sempre mão de obra familiar e são responsáveis por quase 70% da produção nacional do grão (Silva & Wander, 2013). Nos últimos anos, a produção de feijão em várias épocas do ano, principalmente pelo advento da irrigação por aspersão, vem ganhando espaço nas grandes propriedades, onde essa leguminosa é cultivada principalmente em sistema de plantio direto e com alta tecnologia, incluindo o uso da colheita mecanizada (Kluthcouski *et al.*, 2007). Graça as esse fato, verificou-se a profissionalização da produção de feijão, conseqüentemente, o aumento da produtividade.

Fatores bióticos e abióticos podem interferir na produção. Dentre os principais fatores da baixa produtividade do feijoeiro, encontram-se as doenças causadas por patógenos que habitam o solo e que podem provocar prejuízos severos, chegando a até 100% de perda na produtividade da cultura (Barbosa & Gonzaga, 2012). Estas doenças constituem um complexo etiológico caracterizado pelas podridões e murchas, que causam redução de estande e vigor das plantas, comprometendo, desta forma, a produtividade da cultura (Bernardes *et al.*, 2010).

Dentre as principais doenças que acometem a cultura do feijão cita-se o mofo branco, causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Esse patógeno possui importância mundial por ocorrer em regiões temperadas, subtropicais e tropicais, além de ser um fungo polífago, abrangendo 408 espécies e 278 gêneros de plantas hospedeiras (Bolton *et al.*, 2006).

A podridão de escleródio ou murcha de escleródio, causada por *Sclerotium rolfsii* Sacc., é também uma doença importante, que afeta uma vasta lista de espécies de plantas hospedeiras, dentre estas o feijão (Punja, 1985; Punja & Rahe, 1993). É ainda conhecida como podridão do colo do feijoeiro e pode causar tombamento de mudas e podridão do coleto e raízes, resultando em murcha, o que, na maioria das vezes, culmina com a morte da planta (Martins *et al.*, 2010).

Para o controle dessas doenças, o tratamento químico é fortemente recomendado em tratamento das sementes. Em contraste, o tratamento biológico com microrganismos benéficos, em tratamento de sementes, é muito pouco conhecido (Bernardes *et al.*, 2010). Espécies de *Trichoderma* spp. são consideradas eficientes antagonistas contra uma série de fungos fitopatogênicos. De acordo com Melo (1998), a ação de *Trichoderma* spp. ocorre por meio da ação isolada ou conjunta dos três principais mecanismos: parasitismo, antibiose e competição.

Trichoderma é um microrganismo naturalmente encontrado no solo, e apresenta importante função ecológica, participando da decomposição e mineralização dos resíduos vegetais contribuindo com a disponibilização de nutrientes para as plantas. Ele é considerado, também, um biofungicida natural, que reduz em até 100% as chances de fungos fitopatogênicos atingir a cultura (Menezes *et al.*, 2007).

A identificação de *Trichoderma* é originalmente baseada em características morfológicas (Rifai, 1969; Bisset, 1984; 1991a; 1991b; 1991c). Métodos moleculares baseados na análise de DNA são ferramentas muito úteis, pois são capazes de determinar o

polimorfismo existente (Kistler *et al.*, 1987) em espécies e entre espécies de fungos. A análise macromolecular baseada nos ácidos nucléicos tem sido usada para diferenciar entre e dentro de espécies agregadas de *Trichoderma*, podendo demonstrar a diversidade genética de isolados (Hermosa *et al.*, 2000). Outros métodos taxonômicos complementares à morfologia incluem estudos de metabólitos secundários, que mostram uma grande diversidade neste gênero (Okuda *et al.*, 1982). Características fisiológicas detectáveis em placas de microtitulação podem eventualmente proporcionar um sistema útil para a identificação. Os perfis de isoenzimas têm sido utilizados como uma ferramenta taxonômica eficaz (Leuchtman *et al.*, 1996). Os dados moleculares, particularmente sequências da região ITS e técnicas de impressões digitais tem, nos últimos anos, permitido uma melhor resolução a níveis taxonômicos (Fujimori & Okuda, 1994; Muthumeenakshi *et al.*, 1994).

A técnica de MALDI TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry) é uma técnica espectral que pode ser aplicada na análise da composição química celular dos microrganismos, gerando rapidamente uma impressão “digital” para identificação microbiana (Santos *et al.*, 2012). O arsenal metodológico hoje existente permite a identificação de isolados de *Trichoderma* com potencial de uso na inovação tecnológica, especialmente na produção de biofungicidas e inoculantes, beneficiando a agricultura com vantagens para o meio ambiente, na medida em que esses fungos forem adequadamente caracterizados, avaliados e prospectados quanto à produção de metabólitos secundários.

OBJETIVOS

Geral

- Identificar e selecionar isolados de *Trichoderma* que apresentem potencial de biocontrole contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii*.

Específicos

- Testar 149 isolados de *Trichoderma* em experimentos *in vitro* contra *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*.
- Identificar 50 isolados de *Trichoderma* com base na caracterização molecular das regiões ITS1-5.8S-ITS2 do nuclear rDNA e do gene do Fator de alongação da tradução TEF-1 α .
- Testar a promoção de crescimento do feijoeiro por 20 isolados de *Trichoderma* em casa de vegetação.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Phaseolus pertence à família Fabaceae e possui mais de 50 espécies, todas originárias do Continente Americano. Dessas, cinco são cultivadas: *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray e *P. polyanthus* Greeman (Debouck, 1999). A espécie *P. vulgaris* (feijão comum) é a mais explorada comercialmente, ocupando posição de destaque no cenário agrícola nacional (Barbosa *et al.*, 2010).

O feijoeiro-comum é considerado uma cultura atípica, pois possibilita três safras anuais. A produção de feijão é realizada por diferentes tipos de produtores nas diversas regiões do país, utilizando variados níveis tecnológicos. Entretanto, a agricultura familiar é apontada como maior responsável pelo abastecimento do mercado de feijão no país (Silva & Wander, 2013).

O feijoeiro-comum, sendo cultivado durante todo o ano, é afetado por inúmeras doenças as quais, além de diminuir a produtividade da cultura, depreciam a qualidade do produto. As principais doenças fúngicas que afetam a cultura são: antracnose, mancha angular, mofo branco, ferrugem, alternaria e as murchas de fusarium e de sclerotium, entre outras.

Sclerotinia, especialmente *S. sclerotiorum*, causam doenças destrutivas a diversas culturas. A característica de *Sclerotinia* spp. na planta infectada é o crescimento micelial branco de aspecto cotonoso nos órgãos da planta que depois desenvolve corpos de resistência chamados de esclerócios (Agrios, 2005). O fungo pode afetar toda parte área da planta, causando lesões inicialmente pequenas e aquosas. Estas lesões rapidamente aumentam de tamanho, tomando todo o órgão afetado. Com o desenvolvimento da doença, as partes afetadas perdem a cor, tornando-se amareladas e depois marrons, produzindo uma podridão

mole nos tecidos que provoca a morte de ramos. Nesta fase, observa-se que o micélio branco apresenta engrossamentos, que são os escleródios em formação. Estes são inicialmente brancos e tornam-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 (Kimati *et al.*, 2011).

Sclerotinia sclerotiorum pertence ao filo Ascomycota e 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 elipsóides, 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 através de ascósporos e micélio. Temperaturas entre 11-20°C e solo úmido por mais de uma semana são condições propícias para tal doença. Clima frio e úmido em lavouras fechadas promove condições para que os apotécios permaneçam esporulando por 5-10 dias. Os ascósporos são ejetados e a maioria fica aderida à parte aérea das plantas, mas alguns podem ser levados pelo vento a vários metros de distância (Kimati *et al.*, 2011). Na primavera ou início do verão, escleródios germinam e produzem hastes finas que terminam em um pequeno disco ou em forma de taça denominada apotécio (Agrios, 2005).

O mofo branco desenvolve-se numa faixa de temperatura entre 5-30°C, com ótimo em torno de 25°C. No entanto, a umidade é o fator climático mais importante para o desenvolvimento da doença. 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 parecem ter papel importante no início da doença. *S. sclerotiorum* ocorre em vários países, principalmente nas regiões de clima temperado e subtropical. É bastante destrutiva e no caso do feijoeiro pode ser

problema sério em áreas com histórico da doença na safra irrigada de inverno. O patógeno possui mais de 300 espécies hospedeiras (Kimati *et al.*, 2011).

A rotação de cultura com gramíneas pode ajudar a reduzir o inóculo inicial. Recomenda-se ainda o plantio de sementes saudáveis. Uma vez que a doença é favorecida por alta umidade, deve-se ter especial atenção ao controle de irrigação, evitando o encharcamento. 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. Os fungicidas benomyl, vinclozolin e procimidone têm sido recomendados no controle da doença (Kimati *et al.*, 2011).

A murcha de sclerotium causada pelo fungo *Sclerotium rolfsii* Sacc. é também chamada de podridão do colo e está distribuída em regiões de clima tropical e subtropical, em locais onde ocorrem temperaturas altas e umidade seguida de períodos de seca. O patógeno afeta um grande número de hospedeiros em diversos gêneros de plantas cultivadas e silvestres. Os sintomas iniciam-se por lesões marrons e aquosas sobre o colo. As lesões avançam, produzindo escurecimento e podridão do caule, resultando em destruição do córtex e da raiz principal. Os sintomas reflexos ocorrem na parte aérea na forma de amarelimento das folhas baixas, seguindo em direção às folhas superiores. Plantas severamente afetadas têm o colo estrangulado, o que provoca murcha da parte aérea, seca, queda de folhas e morte da planta. Em condições de alta umidade, aparece um crescimento micelial branco sobre o colo da planta, que pode se desenvolver também sobre o solo adjacente. Sobre este micélio vigoroso formam-se escleródios esféricos, inicialmente brancos e posteriormente escuros.

Plântulas em emergência também podem ser afetadas, provocando redução do estande (Kimati *et al.*, 2011).

S. rolfsii caracteriza-se pela produção de micélio vigoroso e grampos de conexão nas hifas. Produz escleródios globosos, pequenos, medindo 0,5-1,5 mm de diâmetro. Os escleródios podem sobreviver no solo por no mínimo 1 ano. A fase teleomórfica corresponde ao basidiomiceto *Athelia rolfsii* (Curzi) Tu & Kimbrough, mas este é raramente observado. A sobrevivência ocorre por meio do micélio em matéria orgânica e pelos escleródios presentes no solo. Água de irrigação, implementos agrícolas, esterco e sementes podem disseminar o fungo. Os escleródios germinam entre 10-35°C, mas as condições ideais para o desenvolvimento da doença são alta umidade e temperaturas ao redor de 30°C. A germinação dos escleródios diminui com o aumento da profundidade no solo. A faixa de pH ideal para a germinação está entre 2,6 e 4,4, mas pode ocorrer entre 2,6 e 7,7. Além disso, a germinação é induzida pela presença de compostos voláteis que emanam de restos de cultura no solo, uma vez que o fungo necessita crescer saprofiticamente sobre substrato orgânico antes de atuar como patógeno. *S. rolfsii* é favorecido por fermentos no hospedeiro, mas pode invadi-lo por penetração direta, geralmente próximo à superfície do solo (Kimati *et al.*, 2011).

No controle da doença algumas medidas podem ser tomadas para reduzir os danos causados pela doença, como por exemplo, a rotação de cultura com cereais reduzindo-se o inóculo presente no solo. Deve-se eliminar plantas daninhas suscetíveis ao patógeno e destruir e incorporar os restos de cultura. O plantio deve ser feito em solos com boa drenagem, evitando-se plantios densos e em solos áridos. A redução da severidade da doença em solos pobres e áridos tem sido conseguido através de adubação equilibrada e calagem do solo, além do uso de variedades tolerantes como Rio Tibagi (Kimati *et al.*, 2011).

O uso intensivo de agrotóxicos para o controle de doenças tem afetado o meio ambiente. A preocupação da sociedade com o impacto da agricultura no ambiente e a

contaminação da cadeia alimentar com pesticidas vem alterando o cenário agrícola, resultando na presença de segmentos de mercado ávidos por produtos diferenciados (Bettiol & Ghini, 2001). Este fator favorece o uso do controle biológico no controle de doenças fitopatogênicas que, além de mitigar os efeitos adversos da agricultura sobre o meio ambiente e qualidade da água, promove a segurança alimentar e a saúde dos trabalhadores.

Segundo Bettiol (1991), controle biológico de doenças de plantas é resultado da ação de um microrganismo sobre outro microrganismo. O antagonista pode atuar por meio de antibiose, parasitismo, competição, predação ou hipovirulência (Cook & Baker, 1983). O controle biológico, para sua maior eficiência deve ser acompanhado por um conjunto de práticas culturais para criar um ambiente favorável aos antagonistas e à resistência da planta hospedeira.

Weindling & Fawcett (1936), deram início aos trabalhos com fungos antagonistas contra patógenos do solo. Foram pioneiros e utilizaram *Trichoderma* no controle de doenças do citros provocadas por *Rhizoctonia solani*. Entre os principais fungos utilizados como agente de biocontrole se destacam *Trichoderma* spp. por serem antagonistas eficazes contra uma gama de patógenos de solo, entre os quais, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* (Melo, 1998; Louzada *et al.*, 2009), *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (Carvalho *et al.*, 2011), *Verticillium dahliae* (Isaias *et al.*, 2014).

O gênero *Trichoderma* é amplamente distribuído em todo o mundo e ocorre em quase todos os tipos de solo e outros habitats naturais, especialmente nos constituídos por matéria orgânica. A abundância de *Trichoderma*, em diferentes solos, pode estar relacionada a suas características peculiares, como capacidade para degradar diversos substratos orgânicos, versatilidade metabólica, resistência aos inibidores microbianos e capacidade de sobreviver em diferentes nichos ecológicos. Dentro de espécies desse gênero podem ser encontrados

variantes com distintos níveis de importância como agentes de biocontrole (Papavizas, 1985; Harman *et al.*, 2004; Rosa & Herrera, 2009; Consolo *et al.*, 2012).

Face ao que foi dito, não causa surpresa o fato de espécies de *Trichoderma* representarem o grupo de microrganismos mais estudado e utilizado como antagonistas. *Trichoderma* é um fungo natural do solo, encontrado especialmente em solos orgânicos, que pode viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos (Melo, 1998). Dessa forma, espécies desse gênero possuem grande importância agrônômica e atuam como decompositores primários de matéria orgânica; destacam-se pela produção de metabólitos e enzimas com propriedades antifúngicas (Harman *et al.*, 2004), com potencial para a indústria farmacêutica e de bioensaios agrícolas. Segundo Van Driesche & Bellows (1996), organismos desse gênero de fungos, utilizam basicamente quatro mecanismos de ação no controle de fitopatógenos: micoparasitismo, antibiose, competição e a indução de mecanismos de defesa da planta.

Atuação de *Trichoderma* por micoparasitismo – O parasitismo é a relação nutricional entre dois seres vivos em que um deles, obtém todo ou parte de seu alimento às custas do outro (Amorin *et al.*, 2011; Benítez *et al.*, 2004). Uma das características mais marcantes de *Trichoderma* é a sua capacidade de parasitar outros fungos (Howell, 2003). Weindling & Fawcett (1936) & Harman *et al.*, (2004) descreveram com detalhes o mecanismo de micoparasitismo de hifas de *Rhizoctonia solani* por hifa do agente de biocontrole, incluindo enrolamento em torno da hifa do patógeno, penetração e subsequente dissolução do citoplasma do hospedeiro. Segundo Amorin *et al.*, (2011), após reconhecimento do patógeno, *T. harzianum* pode expressar genes de defesa como quitinases e beta glucanases, enzimas degradadoras de quitina e beta glucana, dois açúcares componentes da parede celular de fungos verdadeiros. As enzimas produzidas podem alterar a permeabilidade da membrana e/ou degradar a parede celular, o que facilita a entrada das hifas de *Trichoderma* no lúmen das

hifas do fungo parasitado e assimilação do conteúdo da parede celular (Benítez *et al.*, 2004). Concomitantemente podem ser produzidas substâncias com propriedades antibióticas, como alguns peptabólitos, que 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, estes contém 7-20 resíduos de aminoácidos como característica, um grupo N- terminal acilado, um C- terminal amino álcool e um alto teor de 2-amino-isobutírico (AIB), conforme descrição de Reino *et al.* (2008).

Atuação de *Trichoderma* por antibiose – É a interação entre organismos na qual indivíduos de uma população secretam metabólitos capazes de inibir ou impedir o desenvolvimento dos indivíduos de outra espécie. Esses metabólitos são usualmente denominados antibióticos. Espécies do gênero *Trichoderma* são capazes de secretar mais de 100 diferentes tipos de antibióticos que são capazes de inibir o crescimento de diferentes patógenos (Amorin *et al.*, 2011). Ainda, alta capacidade de biocontrole deve-se a produção de enzimas líticas extracelulares degradadoras da parede celular de muitos fungos, tais como quitinases, celulasas, β -1,3-D-glicanases, β -1,4-glicosidase e proteases. Sabe-se, atualmente, que essas enzimas estão envolvidas diretamente no processo de parasitismo (Ridout *et al.*, 1986; Elad *et al.*, 1982). A maioria das espécies de *Trichoderma* produzem metabólitos tóxicos voláteis e não-voláteis, os quais atuam na supressão da colonização do organismo atingido. Metabólitos voláteis são substâncias que entram facilmente na fase gasosa e em sua maioria são lipídeos solúveis oriundos de vias primárias e secundárias do metabolismo de fungos (Pagans *et al.*, 2006). Dentre esses voláteis e não-voláteis, são conhecidos: ácido harziânico, alamethicinas, tricholina, antibióticos, glisopreninas, ácido heptelídico, gliovirina, viridina e massoilactona (Benítez *et al.*, 2004).

Atuação de *Trichoderma* por competição – Envolve a interação entre dois ou mais organismos na disputa por nutrientes e por espaço. A competição por espaço se dá, principalmente, pela ocupação dos sítios de colonização e a competição por nutrientes, principalmente pelos três elementos essenciais para a maioria dos patógenos: carbono, nitrogênio e ferro (Paulitz, 1990). A capacidade de competir pela ocupação dos locais de infecção do patógeno é um requisito para qualquer agente de controle biológico. *Trichoderma* além de competir por sítios de infecção, tem mostrado habilidade na colonização de raízes de plantas como verdadeiros simbioses, adiantando-se à chegada dos patógenos (Harman *et al.*, 2004). Assim, competição é considerada um dos mecanismos de ação mais eficientes exercidos por espécies do gênero *Trichoderma* (Jacobs & Gray, 2003; Benítez *et al.*, 2004).

Indução de resistência por *Trichoderma* – É um mecanismo na qual a planta se defende da agressão por fitopatógenos produzindo diferentes substâncias tais como lignina, fitoalexina e compostos fenolíticos (Bailey, 1985; Harman *et al.*, 2004). Algumas espécies de *Trichoderma* são capazes de ativar mecanismos de resistência em plântulas de pepino. Outras plantas também respondem à inoculação de *Trichoderma* com a ativação de mecanismos de defesa (Amorin *et al.*, 2011). A capacidade de isolados de *Trichoderma* proteger plantas contra patógenos radiculares tem sido atribuída a um efeito antagônico contra o agente patogênico invasor. No entanto, estas associações raiz-fungo também estimulam a planta a ativar mecanismos de defesa (Harman *et al.*, 2004).

Até 1998 acreditava-se que os principais mecanismos de ação do controle biológico fossem a antibiose e o micoparasitismo, embora *Trichoderma* tenha habilidades para aumentar o crescimento das plantas e induzir resistência à planta (Harman & Kubicek, 1998). Agora sabe-se que grande parte ou a maioria das atividades de biocontrole desses fungos é através da suas habilidades para induzir resistência sistêmica a doenças (Howell, 2006; Shores *et al.*, 2010).

Alguns isolados de *Trichoderma* também atuam como estimuladores do crescimento vegetal, por meio da solubilização de fosfato e outros minerais, colocando-os disponíveis para as plantas (Harman, 2000; Vinale *et al.*, 2008). Tais substâncias apresentam propriedades de induzir a alongação celular nos vegetais superiores (Taiz & Zeiger, 2006). Efeitos negativos de *Trichoderma* em plantas são raros embora Carvalho *et al.*, (2006) relataram produção de metabólitos tóxicos a coleóptilos de trigo por *T. viride*. Carvalho Filho *et al.* (2008) em seu estudo com *Trichoderma* em eucalipto, não verificou o incremento na promoção do crescimento. Esses resultados sugerem que a promoção de crescimento de plantas depende fortemente da interação isolado e espécie vegetal.

Os produtos biológicos à base de *Trichoderma* podem ser aplicados, tanto em tratamento de sementes como nos sulcos de plantio, ou agregados ao substrato ou ainda por meio de pulverizações da parte aérea das plantas, seguindo as recomendações do fabricante. Há informações de que *Trichoderma* proporciona uma redução dos gastos com o controle das doenças do feijoeiro que chega a 40%. Porém, isso é altamente variável, dependendo do clima, método de aplicação e das características particulares de cada produto (Mello, comunicação pessoal).

Trichoderma é a fase imperfeita de *Hypocrea*, portanto pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Ascomycetes, Ordem Hypocreales e Família Hypocreaceae (Index Fungorum, 2014).

A taxonomia de *Trichoderma* é bastante complexa e isso se deve ao fato de que, no gênero, as características morfológicas que definem uma espécie são muito variáveis. Por isso tem sido utilizado pelos taxonomistas o termo espécie agregada (Samuels, 1996), ou grupo de espécies morfológicamente muito semelhantes, que hoje se sabe que são polifiléticas. Inicialmente, nove espécies foram propostas (Rifai, 1969), com base em caracteres microscópicos (*T. viridi* Persoon, *T. aureoviride* Rifai, *T. koningii* Lieckfeldt, *T. harzianum*

Rifai, *T. longibrachiatum* Bisset, *T. polysporum* Link e *T. glaucum* Rifai.). Estas mais tarde foram elevados ao nível de seção por Bisset (1984, 1991a, b, c), a saber: seções *Trichoderma*, *Longibrachiatum*, *Saturnisporum* e *Pachybasium*.

Devido ao isolamento de algumas espécies de *Trichoderma* a partir de ascósporos do gênero *Hypocrea*, estas são atualmente classificadas como formas anamórficas desse gênero (Samuels, 1996). As espécies de *Trichoderma* são caracterizadas por apresentarem rápido crescimento de colônia, atingindo 9 cm de diâmetro após quatro dias de cultivo em meio de cultura (Esposito & Silva, 1998). As colônias podem se apresentar dispersas e flocosas ou compactadas em tufos. O tamanho e o formato dos conídios são muito variáveis e de limitado valor taxonômico. É observada nas espécies de *Trichoderma* a existência de clamidósporos, os quais são esporos assexuais originados pela modificação de segmentos de hifas, podendo ser intercalares ou terminais. Os conídios podem ser verdes, amarelos ou de tons verdes amarelados e ainda incolores. Não existem em *Trichoderma* conidióforos bem definidos (Samuels, 1996), sendo os conídios formados nas extremidades das fiálides em determinadas hifas diferenciadas. Os conídios tendem a se agregar em massas, sendo estes agregados formados em hifas contendo fiálides. Em algumas espécies do gênero existe uma dependência de luz para esporulação (Gressel & Hartmann, 1968).

A homoplasia de caracteres dificulta a determinação morfológica dos táxons e isto freqüentemente resultou em erros na designação de espécies em *Trichoderma* (Kovacs *et al.*, 2004; Wey *et al.*, 1994). Consequentemente, a maioria dos estudos recentes têm utilizado dados moleculares para caracterizar e identificar espécies de *Trichoderma*. A caracterização molecular e análise filogenética permitiram que cepas de *T. harzianum* originalmente identificadas como da mesma espécie, fossem distribuídas em diferentes espécies agrupadas em seções e grupos distintos (Kubicek *et al.*, 2003; Kraus *et al.*, 2004; Jaklitsch *et al.*, 2005). A classificação taxonômica ou identificação de fungos tem sofrido grandes avanços nas

últimas décadas, principalmente na adoção de abordagens moleculares (Hibbett *et al.*, 2007). Métodos moleculares baseados na análise de DNA, são ferramentas muito úteis nos estudos de filogenia de fungos e na diferenciação de espécies, *formae speciales*, raças e isolados (Kumarae & Sousa, 2002), pois são capazes de determinar o polimorfismo existente entre as sequências de nucleotídeos dos organismos (Kistler *et al.*, 1987). A análise macromolecular baseada nos ácidos nucléicos tem sido usada para diferenciar entre e dentro dos agregados de *Trichoderma*, podendo demonstrar a diversidade genética de isolados individuais (Hermosa *et al.*, 2000).

Atualmente são 220 espécies de *Trichoderma* (Index Fungorum, 2014). A utilização de ferramentas moleculares resultou na expansão do número de espécies reconhecidas de *Trichoderma* (Druzhinina & Kopchinskiy, 2008). Embora quase todas as alterações com base molecular atuais derivam de comparação de sequências de genes, tecnologias com perfil molecular alternativos, como ionização e dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo espectrometria de massa (MALDI-TOF MS - Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight – Mass Spectrometry) pode permitir identificações rápidas a baixo custo e confiáveis, para uma vasta gama de microrganismos (Santos *et al.*, 2010; Croxatto *et al.*, 2012), incluindo *Trichoderma* (De Respinis *et al.*, 2010; Samuels *et al.*, 2010).

A técnica MALDI-TOF MS vem sendo usada na caracterização e identificação de microrganismos há vários anos. Com essa técnica, gera-se um tipo de impressão digital de cada molécula, já que cada uma tem seu próprio perfil espectrômetro, constituindo assim, assinaturas únicas para cada microrganismo e que são, portanto, ideais para uma correta identificação microbiana aos níveis de gênero e espécie (Croxatto *et al.*, 2012). Trata-se de uma ferramenta importante para fins taxonômicos e envolve procedimento rápido (Keller *et al.*, 2008). As características fenotípicas analisadas variam de acordo com meios de cultura e tempo de incubação (Carbonnelle *et al.*, 2011; Valentine *et al.*, 2005). Muitos parâmetros

experimentais podem ter um efeito importante sobre os espectros de massa observados (Wang *et al.*, 1998). A reprodutibilidade é dependente do instrumento MALDI-TOF MS, matriz utilizado, a idade do microorganismo, a amostra: proporção da matriz, a concentração da amostra, o meio de cultura e condições de crescimento (Valentine *et al.*, 2005). Os espectros de massas são obtidos e processados por softwares específicos, Flexanalysis® (Bruker Daltonics/BD, Alemanha/EUA) ou Myla (BioMérieux, França), e posteriormente são comparados ao banco de dados que contém espectros de referência (ER) ou “super espectros” para a identificação de espécie. O banco de dados mais recente da Bruker Daltonics/BD (Alemanha/EUA) é o Biotyper 3.2.1.0, que contém 82000 ERs que contemplam cerca de 2000 espécies de bactérias e leveduras.

A matriz assistida de laser dessorção/ionização de tempo de voo em espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) é um método rápido, preciso e eficaz em termos de custos de caracterização microbiana e identificação. Esta técnica tem sido usada como uma abordagem fenotípica para a identificação rápida de fungos (Santos *et al.*, 2010). 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.*, 2010; De Respini *et al.*, 2010; Del Chierico *et al.*, 2012).

Uma vez ajustados os parâmetros, 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 (Bille *et al.*, 2012; De Respini *et al.*, 2010 & Tonolla *et al.*, 2010). O método consiste na deposição de uma determinada amostra em uma matriz capaz de fornecer prótons (ou H⁺) para o processo de ionização dos componentes da amostra. Quando esta matriz absorve a energia emitida por um laser, ocorre a transferência de prótons da matriz

para os componentes da amostra e ao mesmo tempo desencadeia-se um processo de dessorção, o que possibilita a passagem da amostra do estado sólido para o gasoso. Dessorção é um fenômeno pelo qual uma substância é liberada através de uma superfície (Goulart & Resende, 2013).

Finalmente, cabe enfatizar que várias técnicas têm sido utilizadas para esclarecer circunscrições de espécies em *Trichoderma* (Gams & Bissett, 1998; Samuels *et al.*, 1998). Abordagens multidisciplinares utilizadas para classificar *Penicillium*, *Fusarium* e *Alternaria* foram bem sucedidas (Frisvad, 1998) e têm sido sugeridos também para *Trichoderma* (Samuels, 1996). Nielsen *et al.*, (1999) têm identificado estirpes de fungos através da aplicação de técnicas de análise de imagem química de matrizes cromatográficas totais de extratos bruto de culturas do fungo, que são separados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC - High Performance Liquid Chromatography). Para a análise de componentes menores tem sido relatada a aplicação da técnica de HPLC em combinação com a espectrometria de massa em tandem (Poirier *et al.*, 2007; Ruiz *et al.*, 2007; Theis *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2009). Portanto, existe atualmente um arsenal de técnicas importantes, de forma que a integração das características moleculares, proteômicas e fisiológicas, baseadas em testes *in vitro*, é um procedimento seguro para caracterizar e selecionar isolados de *Trichoderma* potencialmente úteis para o desenvolvimento de biopesticidas e inoculantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos isolados

Inicialmente foram selecionados 150 isolados de *Trichoderma* da Coleção de Microrganismos para o Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Anexo 1). Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia do Prédio de Controle Biológico. Os isolados foram reativados 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 destilada. As culturas dos fungos foram incubadas a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. Nos ensaios em que *Trichoderma* spp. foram testados como agentes de biocontrole, empregaram-se os isolados CEN217 de *Sclerotinia sclerotiorum* e CEN216 de *Sclerotium rolfsii*, ambos obtidos de feijoeiro com sintomas de mofo branco e podridão do colo, respectivamente.

Culturas Monospóricas

Para a obtenção das culturas monospóricas dos isolados de *Trichoderma*, plaquearam-se diluições seriadas de suspensão de esporos em placas de Petri contendo o meio BDA. Após incubação por no mínimo 8 h no escuro, esporos germinados foram transferidos individualmente para outras placas contendo o mesmo meio.

Pareamento de culturas de *Trichoderma* contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii*

O potencial antagônico dos 150 isolados de *Trichoderma* contra *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii* foi avaliado em confronto direto, utilizando o método de pareamento de culturas em

placas de Petri, de acordo com Dennis & Webster (1971a). A multiplicação inicial, tanto dos isolados de *Trichoderma* quanto do patógeno foi realizada em placas contendo o meio BDA, acondicionadas em câmara *Biochemical Oxygen Demand* (B.O.D.) a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. Discos (5 mm de 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. Como testemunha, foram preparadas placas de BDA contendo somente o patógeno. Foram estabelecidas três repetições por tratamento (isolado do antagonista) e o experimento foi conduzido duas vezes com delineamento inteiramente casualizado. As avaliações foram realizadas aos sete dias de cultivo, atribuindo-se notas de acordo com escala estabelecida por Bell *et al.* (1982), descrita a seguir (Figura 1).

- (1) sobreposição de *Trichoderma*, que colonizou toda a superfície do meio.
- (2)- sobreposição de *Trichoderma*, que colonizou pelo menos 2/3 da superfície do meio.
- (3) *Trichoderma* e patógeno colonizaram mais que 1/3 e menos que 2/3 da superfície do meio.
- (4) patógeno colonizou ao menos 2/3 da superfície do meio, sem sobreposição por *Trichoderma*.
- (5) sobreposição do patógeno que colonizou toda a superfície do meio.

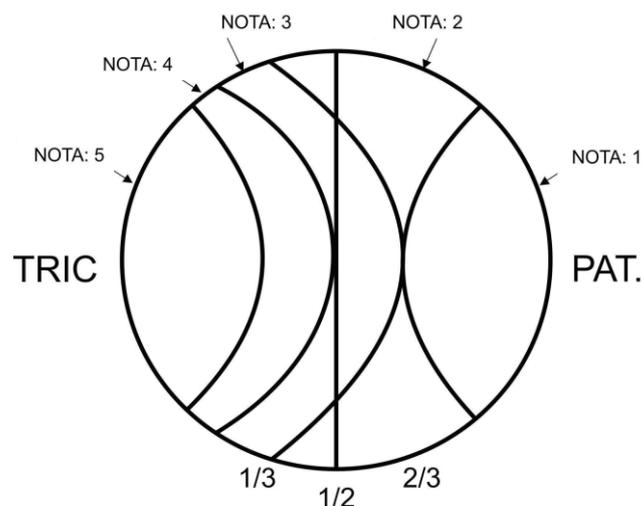


Figura 1: Representação da escala de notas.

Análise da interação de *Trichoderma*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii*

Pela técnica da microscopia eletrônica de varredura (MVE) foi possível averiguar a interação entre isolados de *Trichoderma* e os patógenos alvos deste estudo, utilizando amostras provenientes do ensaio de pareamento de culturas de oito isolados do antagonista. Discos de BDA (5mm Ø) provenientes de áreas de confronto entre as colônias foram removidos e colocados em tubos *ependorf* com o micélio voltado para cima, sendo então fixados por 24 horas a 4°C em uma solução contendo glutaraldeído 2% e paraformaldeído 2% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 6,8. Seguiram-se duas lavagens em tampão cacodilato 0,1 M (pH 6,8) e foram, então, pós-fixados durante uma hora em tetróxido de ósmio (OsO₄) 1%. Logo depois as amostras foram lavadas duas vezes em água Mili-Q autoclavada, seguindo-se a desidratação em gradiente crescente de etanol (10%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100%) por duas vezes a cada 15 minutos.

Para secagem ao ponto crítico, utilizou-se Elmitech Critical Point Drayer K850 a uma corrente de 25mA e 1.10⁻² mbar. As observações foram realizadas e fotodocumentadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura DSM 962 no Laboratório de Microscopia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Efeito inibidor de metabólitos não-voláteis produzidos por *Trichoderma* contra *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*

A realização desse ensaio foi baseada na metodologia descrita por Agrawal *et al.* (1977). Filtrados das culturas de *Trichoderma* foram incorporados ao meio da seguinte maneira. Para a obtenção de filtrados, cinco discos (5 mm Ø) contendo micélio de *Trichoderma* foram transferidos para frascos *Erlenmeyer* (250 mL de capacidade), contendo 100 mL de meio batata-dextrose (BD). Após sete dias de cultivo em agitador orbital (Lab line Instruments, Inc., modelo 60160) a 150 rpm e temperatura de 25°C, em ausência de luz, as

culturas foram filtradas com auxílio de bomba a vácuo. Cada isolado passou por duas filtrações, com 1 e 2 papéis de filtro. O filtrado foi colocado em tubos falcon e centrifugado por 12 minutos a 5867 x g rpm para retirar o excesso de esporos. A parte líquida foi esterilizada por filtração (filtro Millipore 0,45 µm). Cinco mililitros do filtrado de cada isolado foram acrescidos a 15 mL de BDA fundente contendo ágar a 28%, em placa de Petri. Após solidificação do meio, um disco de ágar (5 mm Ø) contendo micélio do patógeno foi depositado sobre o meio. Como testemunha, adicionaram-se 5 ml de água destilada esterilizada ao BDA fundente. As placas foram mantidas a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, até a completa colonização do meio pelo patógeno, nas placas da testemunha, que foi observada no quinto dia. Tomaram-se, então, as medidas de diâmetro das colônias do patógeno.

O experimento foi conduzido duas vezes, com três repetições em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições para cada isolado de *Trichoderma*.

Análise estatística

Para a análise estatística elegeu-se o método de agrupamento de ligação média (UPGMA), utilizando como métrica a distância euclidiana, que possibilitou uma análise mais detalhada da similaridade das porcentagens de inibição promovidas pelo antagonista.

Caracterização Molecular dos isolados de *Trichoderma*

Extração de DNA

Os isolados de *Trichoderma* foram cultivados em meio líquido. Para tanto, três discos de ágar (5 mm Ø) retirados de culturas desenvolvidas como descrito anteriormente foram transferidos para frascos *Erlenmeyer* de 250 mL de capacidade, contendo 100 mL do meio BD. 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 com auxílio de bomba a vácuo e macerada em nitrogênio líquido utilizando pistilo e almofariz de porcelana. O DNA genômico total foi extraído pelo método fenol-clorofórmio (Raeder & Broda, 1985), homogeneizando-se 50 mg de micélio macerado em 500 µl de tampão de extração Tris HCL (Invitrogen) 200 mM, EDTA (Vetec) 25 mM e SDS 0,5% pH 7,0. Em seguida, foram adicionados 350 µl de fenol (Sigma – Aldrich) à amostra. Incorporaram-se, então, 150 µl de clorofórmio (Vetec), misturando gentilmente até a amostra apresentar o aspecto leitoso, iniciando-se nessa fase a degradação do material protéico. Esse material foi centrifugado a 12.960 x g a 4°C por 30 minutos. Nessa fase removeram-se no máximo 750 µl da fase aquosa superior, sendo a amostra transferida para outro tubo *ependorf* de 1,5 mL de capacidade. Acrescentaram-se 10 unidades de RNase e incubou-se a amostra a 37°C por 15 minutos. Para eliminação das proteínas residuais, acrescentou-se igual volume de clorofórmio, misturando o conteúdo suavemente por inversão, seguindo-se novamente a centrifugação a 12.960 x g por 10 minutos. Transferiu-se a fase aquosa superior para novos tubos e adicionou-se isopropanol (Vetec) gelado na proporção de 54% do volume da solução, para a precipitação do DNA. Efetuou-se nova centrifugação a 12.960 x g por 30 segundos e descartou-se o sobrenadante. Para a remoção das impurezas do DNA, o precipitado foi lavado duas vezes com 200 µl de etanol (Vetec) 70% a 4°C e centrifugado por 1 minuto, sendo o sobrenadante descartado. Procedeu-se a secagem do precipitado de DNA em *speedvac* (Eppendorf Concentrator 5301) por 10 a 15 minutos, que em seguida foi ressuscitado 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 fotodocumentado 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 (Reação em Cadeia da Polimerase) e sequenciamento

Para caracterização taxonômica dos isolados de *Trichoderma*, utilizaram-se os pares de oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5'TTC CGT AGG TGA ACC TGC GG 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') White *et al.*, (1990) e EF1-728F (5'CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG-3') e TEF1-LLErev (5'AAC TTG CAG GCA ATG TGG-3') Jaklitsch *et al.*, (2006). A reação totalizou 25 µl tanto para ITS quanto TEF. Prepararam-se as amostras ITS1 com 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 mM de cada), 0,75 µl de MgCl₂ 50 mM, oligonucleotídeos iniciadores 10 mM ITS1 e ITS4 (0,5 mM cada), 0,125 µl de Taq DNA polimerase (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. Para TEF, as amostras continham 1 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 mM de cada), 0,75 µl de MgCl₂ 50 mM, oligonucleotídeos iniciadores 10 mM EF e TEF (1 µl cada), 0,2 µl de Taq DNA polimerase (5 U/µl) e água ultrapura para completar o volume final da reação. As reações foram realizadas em termociclador Thermal Cycler – Esco (Escohealthcare) Swift MaxPro, sob as seguintes condições térmicas: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto e 72°C por 10 minutos.

Ao final da reação, o produto foi mantido a 4°C. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese 5 V/cm em gel de agarose 1,0%, em tampão TBE 0,5X e posteriormente submetidos à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) 1% (5 V/cm), corados em solução de brometo de etídio e fotodocumentados em luz UV. Os produtos obtidos pela PCR foram purificados e sequenciados (Empresa Macrogen Inc., Seoul, Korea do

Sul). Os iniciadores utilizados para a reação de sequenciamento foram os mesmos descritos anteriormente para as reações da PCR.

Os eletroferogramas resultantes do sequenciamento automático foram analisados e as sequências contíguas, montadas com o auxílio do programa DNA BASER Sequence Assembly 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) Genbank - 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 e TrichoBLAST, 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 e TEF-1 α do rDNA foram analisadas pelo método da máxima parsimônia (MP), para a caracterização taxonômica e o estabelecimento das relações filogenéticas entre os isolados de *Trichoderma* analisados. As sequências ITS1-5.8S-ITS2 e TEF-1 α do rDNA de 51 isolados de *Trichoderma* foram alinhadas e corrigidas manualmente utilizando o programa 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, 2007). 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*. O modelo de substituição nucleotídica mais apropriados ao alinhamento das sequências ITS1-5.8S-ITS2 e TEF-1 α 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 foram editadas com o auxílio do programa Fig Tree – Tree figure drawing toll v1.3.1 (Rambaut, 2009) e Adobe Illustrator Cs5 v15.0.0.0. O *outgroup* utilizado para o enraizamento da árvore foi o isolado EU401551 (ITS) e EU401582 (TEF) da espécie *T. longibrachiatum*.

MALDI - TOF MS

Oito isolados de *Trichoderma* pertencentes à Coleção de Fungos para Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foram utilizados neste trabalho por apresentarem alto nível de inibição micelial contra *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii* e por pertencerem a diferentes espécies de *Trichoderma*. As culturas foram reativadas em placas de Petri contendo o meio BDA, como descrito anteriormente. Em seguida, discos de ágar contendo micélio dos isolados fúngicos foram transferidos para frascos *Erlenmeyer* (250 mL de capacidade), contendo arroz parboilizado (10g frasco⁻¹), previamente umedecido (70% p.v⁻¹) e autoclavado (121°C; 20 min). Os frascos foram mantidos em BOD a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. No quinto dia de cultivo, 10 grãos

de arroz colonizado foram lavados com álcool 70% em tubos de ensaio e filtrados com o auxílio de algodão, sendo possível dessa forma separar esporos do substrato. Em seguida, a suspensão de esporos obtida foi transferida para tubos *ependorf*, sendo então centrifugada a 12.960 x g por 1 minuto e deixada secar por 1 hora em temperatura ambiente.

Para gerar o perfil do espectro principal (main spectrum profile - MSP) foi utilizada metodologia desenvolvida por Lopes *et al.* (2014), na qual os *pellets* de conídios de cada uma das oito espécies de referência foram re - suspensas em 50 mL de ácido fórmico (70%), centrifugadas durante 1 min e, em seguida, submetidos a um ciclo de 15 minutos em banho maria tipo ultrassônica (original, modelo USC -1800). Em seguida, 50 mL de acetonitrila (100%) foram adicionados à mistura, que foi agitada em vortex durante 1 minuto e submetida a sonicação durante 15 minutos antes da centrifugação (12.960 x g durante 2 minutos). O sobrenadante foi diluído em água deionizada (1:10 v/v), e 1 µL do sobrenadante foi colocado diretamente sobre uma placa alvo de aço MSP96 (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemanha). A amostra assim preparada foi deixada secar ao ar durante 15 min. Uma gota de 1 mL de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) solução matriz previamente preparada por dissolução de 10 mg do pó de matriz (Bruker Daltonics GmbH) em 100 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 3% + 400mL de água deionizada + 500 mL de acetonitrila foi, então, aplicada sobre a amostra seca e novamente aguardou-se por 15 minutos até secagem ao ar. As análises foram realizadas em espectrômetro de massa MicroFlex LRF MALDI - TOF (Bruker Daltonics GmbH) dotado de laser de azoto (337 nm), com intensidade entre 20 e 65% e operando em modo de aquisição helicoidal. Um extrato de proteína de *Escherichia coli* (Bruker Daltonics GmbH) foi usado para a calibração externa do equipamento. Cada espectro foi obtido após uma média de 240 disparos de laser (40 disparos de laser em seis diferentes posições à vista) a 60 Hz de frequência, e os sinais foram coletados automaticamente com a ferramenta AutoXecute do software de aquisição FlexControl (versão 3.3; Bruker Daltonics

GmbH) em uma faixa de massa entre 2000 e 20000 m/z no modo linear. Os espectros foram utilizados em análises posteriores, quando os picos apresentaram uma resolução superior a 200. Vinte e quatro amostras independentes (três amostras de conídios coletados de oito culturas diferentes) foram analisadas. Os dados foram exportados automaticamente para o software Biotyper (versão 3.0; Bruker Daltonics GmbH) que é um banco de dados comercializado pela empresa Bruker Daltonics (Bremen, Alemanha) e cada espectro consenso incorporado na base de dados no perfil espectro principal (MSP). O espectro de consenso consiste de um perfil criado a partir dos picos obtidos por pelo menos 20 espectros recolhidos sob as mesmas condições, a partir de amostras independentes de qualquer dado isolado. O software mencionado realiza todos os alinhamentos de normalização de subtração da linha de base e as operações de colheita de pico, criando assim uma lista dos picos mais significativos (valores m/z) para cada espectro e as suas intensidades correspondentes. O pico de frequência em todos os espectros para a criação de MSP foi de pelo menos 25% (Lopes *et al.*, 2014). Neste trabalho, foram realizadas três repetições para cada isolado, no intuito de averiguar se agrupamentos dos isolados se formariam em conformidade com a distinção das espécies previamente identificadas.

Metabólitos secundários de *Trichoderma asperellum*

Dentre os isolados estudados, escolheu-se o isolado de *T. asperellum* CEN277, com base no seu desempenho apresentado nos ensaios *in vitro* contra *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*. Previamente, esse isolado foi identificado por características morfológicas, sequenciamento e análise do fator de alongação TEF-1 α . Os isolados dos fitopatógenos, CEN216 e CEN217 *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum*, respectivamente foram utilizados nos testes de inibição.

Extração de metabólitos secundários de *Trichoderma asperellum*

Para a extração dos metabólitos secundários produzidos, o isolado de *T. asperellum* foi cultivado meio líquido como descrito anteriormente. Frascos cônicos contendo 250 mL de meio autoclavado foram inoculados com sete discos (5 mm Ø) de BDA previamente colonizados com o antagonista. Os frascos contendo o meio de cultura e o fungo foram incubados em agitador orbital (Lab-line incubator-shaker, modelo NT 711) a 150 rpm, a 25°C em ausência de luz por sete dias. Após este período, separou-se a parte líquida por filtração a vácuo com auxílio de papel filtro e esta transferida para tubo falcon (50mL) e centrífuga (centrífuga QUIMIS Q22t) por 12 minutos a 5867 x g. O líquido coletado foi esterilizado por passagem através de membranas de 0,45 µm. Ao 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 (Figura 2). 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 4 mL de acetato de etila (1 mL em cada *eppendorf*) que posteriormente foi secado em *speedvac* em câmara com sílica gel para evaporação completa do solvente. O extrato bruto foi, então, ressuspenso em 1 mL de acetonitrila (Baker):água ultrapura (30%) e centrifugados a 12764 x g por 10 minutos, imediatamente antes de ser submetido à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), conforme metodologia descrita por El-hassan *et al.* (2006).

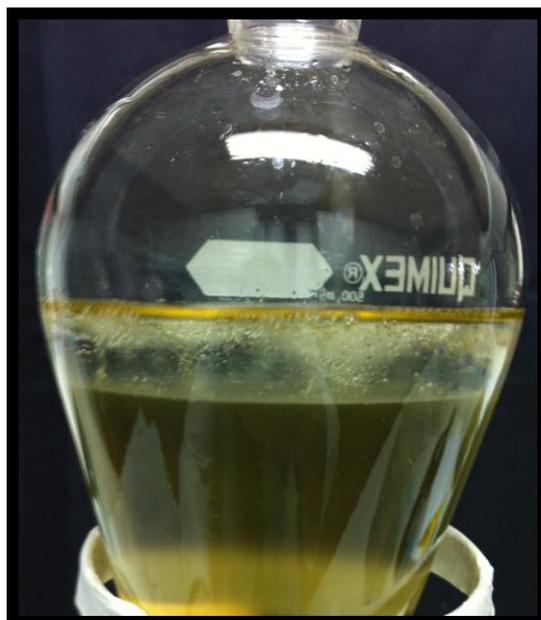


Figura 2: Balão volumétrico mostrando a formação das duas fases: superior, o acetato de etila e inferior, o metabólito bruto.

Purificação de compostos metabólicos

Após todo o processo de extração do metabólito produzido pelo isolado CEN277 de *T. asperellum*, o extrato bruto foi submetido a uma coluna semi-preparativa de fase reversa C18 HPLC (Grace Vydac, 218TP, dimensões 250 x 4,6 mm, 5 μm) conectada em uma pré-coluna (Grace Vydac, dimensões 7,5 x 4,6 mm). Para o processamento, a amostra foi dissolvida em acetonitrila 30% 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. e as frações foram detectadas a 216 nm. As frações mais representativas e com maior intensidade foram coletadas separadamente em tubos *ependorf* de 1,5 mL. Após a extração de cada fração, o material foi secado em *speedvac* e diluído em 100 μl de acetonitrila 30%. Cada fração foi testada separadamente em papéis de filtro contra os patógenos, utilizando as concentrações de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Avaliação das frações obtidas pela técnica de HPLC

Para verificar a inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii* em placas de Petri contendo meio BDA pelas frações coletadas nos procedimentos de HPLC, utilizou-se a técnica de discos de papel filtro. Esta técnica consiste na inserção de um disco de papel filtro de 5 mm de diâmetros previamente autoclavado no centro da placa de Petri de 9 cm de diâmetro, adiciona-se 20 µl de cada fração metabólica sobre esses discos e inocula-se dois discos de BDA (5mm Ø) previamente colonizados com os patógenos, nas extremidades da placa (Figura 3). O experimento foi conduzido com três repetições de cada fração metabólica. A avaliação consistiu da medição dos diâmetros dos halos de inibição formados. Como testemunha (controle negativo), foi utilizada acetoneitrila 30% (água:acetoneitrila, 7:3).

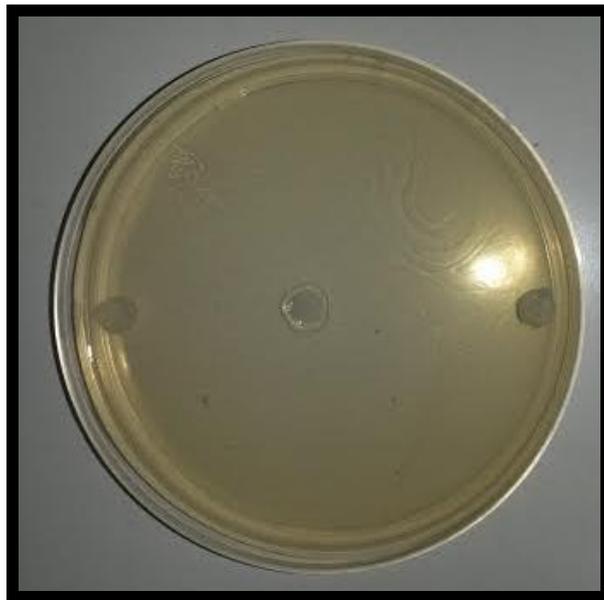


Figura 3: Testes de inibição do crescimento micelial de *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum* por metabólitos purificados em HPLC de *T. asperellum*

Análises por Espectrometria de Massa

As frações dos picos levados ao *speedvac* foram solubilizadas em acetonitrila 30% (água:acetonitrila 7:3) e misturadas com solução saturada de uma matriz constituída por ácido α -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 MS 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.

Promoção de crescimento de *Trichoderma* em casa de vegetação

Condições de cultura

Vinte isolados de *Trichoderma* foram utilizados neste ensaio. As culturas, mantidas em nitrogênio líquido, foram reativadas como descrito nos ensaios anteriores.

Avaliação da promoção de crescimento de *Trichoderma* spp. em casa de vegetação

Os isolados de *Trichoderma* que apresentaram o melhor potencial antagônico nos ensaios anteriores foram avaliados quanto a promoção de crescimento, utilizando a cultivar carioca, em casa de vegetação. Os isolados utilizados constam na Tabela 1.

Tabela 1: Isolados de *Trichoderma* testados em casa de vegetação quanto a promoção de crescimento.

Isolado	Espécie	Substrato/Local
CEN002	<i>T. stromaticum</i>	<i>Moniliophthora perniciosa</i> – Ilheus
CEN129	<i>T. harzianum</i>	<i>Moniliophthora perniciosa</i> - Itambuna
CEN142	<i>T. koningiopsis</i>	Solo do cerrado – Goiânia
CEN143	<i>T. harzianum</i>	Solo do cerrado – Goiânia
CEN151	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de milho – Orizona
CEN152	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de milho – Orizona
CEN157	<i>T. koningiopsis</i>	Solo de campo de arroz – Goiânira
CEN160	<i>T. asperellum</i>	Solo – Goiânia
CEN163	<i>T. asperellum</i>	Solo de campo de arroz – Goiânira
CEN164	<i>T. harzianum</i>	Solo – Goiânira
CEN188	<i>T. spirale</i>	Solo – Goiânia
CEN189	<i>T. spirale</i>	Solo – Goiânia
CEN190	<i>T. erinaceum</i>	Solo de campo de algodão – Acreuna
CEN200	<i>T. koningiopsis</i>	Solo raiz de Chrysomalnaceae - Goiatins/Itacajá
CEN207	<i>T. koningiopsis</i>	campo de Myrtaceae - Recanto das Emas
CEN208	<i>T. koningiopsis</i>	Solo de campo de copaífera - Planaltina
CEN220	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão - Rio Preto
CEN228	<i>T. tomentosum</i>	Solo entrelinha de algodão - Rio Preto
CEN273	<i>T. harzianum</i>	Solo entrelinha de algodão - Rio Preto
CEN277	<i>T. asperellum</i>	Jaguariuna

Para a realização destes ensaios, o antagonista foi produzido em frascos *Erlenmeyer* de 125 mL de capacidade, contendo 20 g de grãos de arroz parboilizado previamente umedecidos (60% p/v) e autoclavados. Cada frasco recebeu, assepticamente, três discos (5mm Ø) de micélio/ágar retirados de colônias de *Trichoderma* 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 Tween 0,05% para a extração dos esporos. A concentração de inóculo foi quantificada em uma câmara de Neubauer e ajustada para 10^8 conídios/mL. 100 g 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). Semearam-se sementes de feijão da cultivar BRS estilo do grupo comercial carioca (uma por célula). Verteram-se então, sobre o solo, 10 mL de suspensão de inóculo (10^8 conídios/mL) para cada isolado. O experimento foi conduzido com quatro repetições por tratamento, com delineamento inteiramente casualizado. A avaliação foi realizada após quatro semanas a contar da data de plantio. O experimento foi conduzido duas vezes.

Método da validação da Silhueta

Para analisar os resultados estatisticamente foi utilizada a técnica de Validação da Silhueta (Rousseeuw, 1987), partindo do princípio de que se calcula 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 de seu estreitamento 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), de acordo com a 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 em um cluster apropriado. Se o valor da silhueta 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 clusters. 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 E DISCUSSÃO

Pareamento de culturas de *Trichoderma* contra *Sclerotinia sclerotiorum* (SS) e *Sclerotium rolfsii* (SR)

Os resultados obtidos no pareamento de culturas foram agrupados de acordo com as notas, formando-se cinco grupos distintos entre os isolados do antagonista, conforme escala proposta por Bell *et al.* (1982). Essa escala permitiu delimitar os graus de inibição do crescimento do patógeno em relação ao antagonista, conforme Tabela 2 para *S. sclerotiorum* e Tabela 3, para *S. rolfsii*. O grupo 1 (nota 1) foi o que apresentou os melhores níveis de inibição do crescimento micelial do patógeno, fato verificado com 10,6% dos isolados para

SS e 14% dos isolados para SR. No grupo 2 (nota 2), se enquadraram 40,6% dos isolados frente a SS e 60% dos isolados frente a SR. O grupo 3 (nota 3) cobriu 44,6% dos isolados de *Trichoderma*, frente a SS e 24% frente a SR. Já no grupo 4 (nota 4) foram alocados apenas 3,3% e 0,6% dos isolados de *Trichoderma*, quando confrontados com SS e SR, respectivamente. Finalmente, no grupo 5 (nota 5) foram alocados 0,6% dos isolados de *Trichoderma*, apenas em relação a SR.

Tabela 2: Inibição do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* por isolados de *Trichoderma* em cultivo pareado.

Agrupamento	n	% de isolados	Código dos isolados (CEN) contra <i>S. sclerotiorum</i>
Grupo 1	16	10,6	125, 129, 132, 141, 161, 194, 170, 171, 173, 223, 277, 281, 295, 296, 298, 316.
Grupo 2	61	40,6	001, 002, 126, 127, 130, 131, 133, 134, 140, 150, 153, 154, 155, 156, 157, 162, 164, 166, 167, 168, 192, 196, 198, 200, 202, 203, 205, 208, 209, 210, 219, 220, 228, 229, 230, 232, 234, 235, 237, 238, 248, 250, 251, 252, 254, 255, 260, 262, 268, 275, 280, 282, 283, 284, 287, 288, 289, 293, 294, 297, 299.
Grupo 3	67	44,6	128, 139, 142, 143, 144, 145, 146, 148, 149, 151, 152, 158, 159, 160, 163, 165, 169, 170, 188, 190, 191, 195, 197, 201, 204, 206, 207, 211, 221, 222, 224, 225, 226, 227, 231, 233, 236, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 246, 249, 253, 256, 257, 258, 259, 261, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 272, 274, 276, 278, 279, 285, 286, 290, 291, 292.
Grupo 4	5	3,3	147, 189, 193, 245, 247.
Grupo 5	-	-	-

*n: Número de isolados de cada grupo (nota). Bell *et al.*, 1982.

Tabela 3: Inibição do crescimento de *Sclerotium rolfii* por isolados de *Trichoderma* em cultivo pareado.

Agrupamento	n	% de isolados	Código dos isolados (CEN) contra <i>S. rolfii</i>
Grupo 1	21	14	001, 131, 140, 141, 154, 160, 161, 162, 170, 194, 223, 254, 273, 275, 277, 281, 284, 287, 289, 290, 297.
Grupo 2	90	60	002, 125, 126, 127, 129, 130, 132, 133, 139, 142, 144, 146, 148, 149, 150, 153, 155, 156, 157, 158, 159, 163, 164, 165, 166, 168, 190, 191, 192, 193, 197, 198, 200, 202, 203, 204, 205, 207, 208, 209, 210, 219, 221, 224, 225, 228, 229, 230, 231, 232, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 241, 243, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 255, 256, 260, 261, 262, 266, 267, 268, 271, 272, 274, 276, 279, 280, 283, 285, 288, 292, 294, 295, 296, 298, 299, 316.
Grupo 3	36	24	128, 134, 143, 145, 147, 151, 152, 167, 169, 188, 189, 195, 196, 201, 211, 220, 222, 226, 227, 233, 240, 242, 244, 245, 257, 258, 259, 263, 264, 269, 270, 278, 282, 286, 291, 293.
Grupo 4	1	0,6	265.
Grupo 5	1	0,6	206.

*n: Número de isolados de cada grupo (nota) . Bell *et al.*, 1982.

No experimento de cultivo pareado com *S. sclerotiorum* não se verificou crescimento do patógeno sobre as colônias de *Trichoderma*, de modo que nenhum dos isolados recebeu nota cinco. O grupo que apresentou maior número de isolados foi o grupo 3, seguido do grupo 2. Amin *et al.* (2010) obtiveram resultados similares com *T. harzianum* e *T. viride*, ou seja, a maioria dos isolados com notas 2 e 3, quando confrontados com *Rhizoctonia solani*, *S.*

sclerotiorum e *S. rolfsii*. Esse fato pode também ser verificado em trabalhos conduzidos por Louzada *et al.* (2009) com *S. sclerotiorum* e *F. solani*, Figueiredo *et al.* (2010) com *S. sclerotiorum* e Isaias *et al.* (2014), este último com os patógenos *S. rolfsii* e *Verticillium dahliae*, utilizando com espécies e isolados de *Trichoderma* distintos.

O antagonismo de patógenos contra *Trichoderma* é verificado mais raramente e, neste experimento, apenas o CEN206 apresentou nota 5 frente a *S. rolfsii*. Mello *et al.* (2007) afirmaram a importância do ensaio de pareamentos de culturas, não só pela possibilidade de seleção inicial dos isolados para testes mais decisivos, mas também porque nesses testes é possível observar interações entre os microrganismos e determinar os mecanismos de ação envolvidos. Tais mecanismos, como competição e micoparasitismo exercidos por fungos do gênero *Trichoderma*, podem permanecer ativos mesmo sob condições ambientais desfavoráveis para o crescimento micelial, o que sugere a possibilidade de tolerância do fungo a estresses (Sathiyaseelan *et al.*, 2009), característica importante, considerando a questão das mudanças climáticas e suas possíveis consequências para as espécies vegetais exploradas economicamente.

Análise das interações de patógenos x *Trichoderma*

Análises de interação entre o antagonista e os patógenos foram realizadas a partir de amostras das culturas estabelecidas em cultivos pareados. Aos sete dias do confronto direto, foi observado entrelaçamento e deformação de hifas tanto de *S. sclerotiorum* quanto de *S. rolfsii*, (Figuras 4, 5 e 6). Alterações nas estruturas fúngicas como consequência de parasitismo foram amplamente descritas na literatura por Papavizas (1985), estes resultados estão evidenciados nas Figura 4D e E. Em todas as amostras examinadas ao microscópio houve inibição do crescimento micelial do patógeno, a exceção do isolado CEN206 com *S.*

rolfsii, como mencionado anteriormente. Também foi observado que os isolados de *Trichoderma* penetraram e colonizaram propágulos dos isolados CEN216 e CEN217 (Figuras 5C e 6A). Mais de um mecanismo de ação podem estar simultaneamente envolvidos nessas ações antagônicas (Perello *et al.*, 2003).

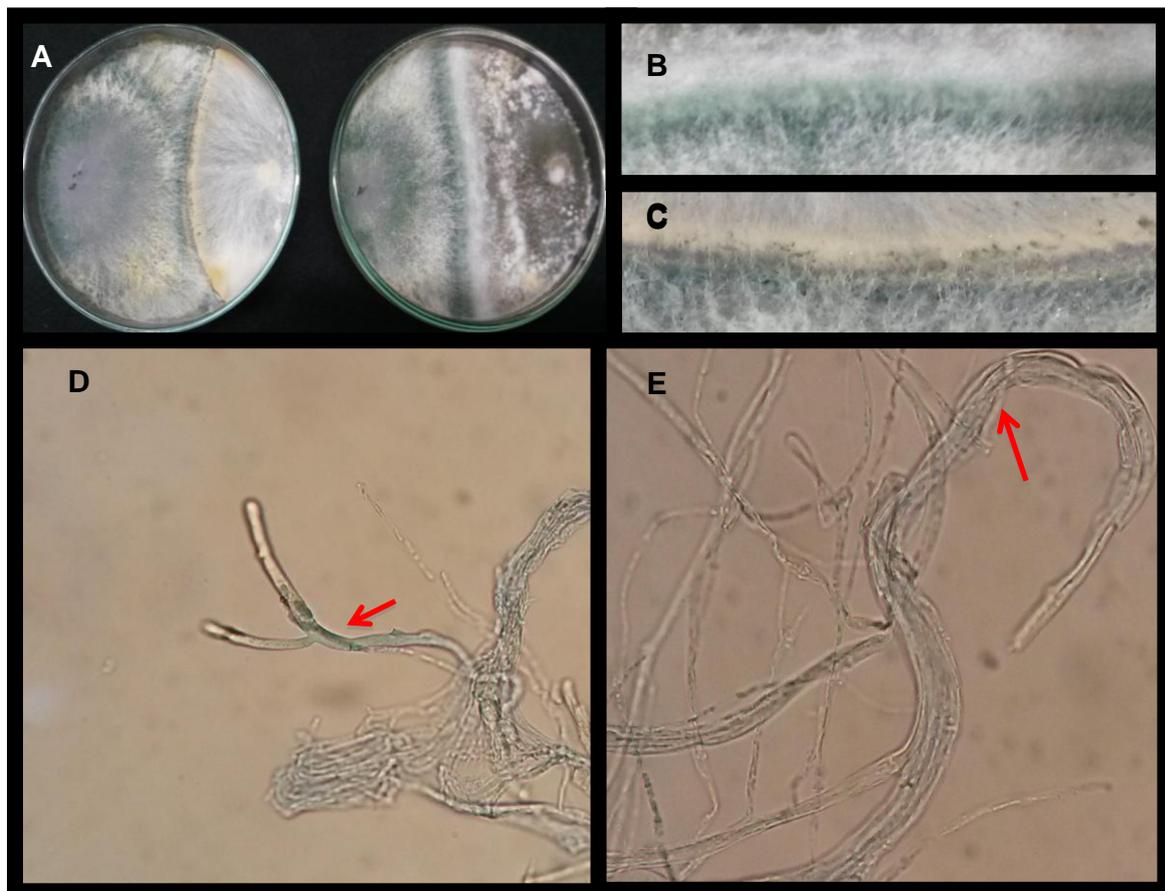


Figura 4: A – Imagem aproximada do confronto direto de culturas com *Trichoderma*, *S. rolfssii* (CEN216) e *S. sclerotiorum* (CEN217) ao microscópio de luz. B – Isolados CEN216 x CEN220. C – Isolados CEN217 x CEN220. D – Antagonista CEN168 crescendo paralelamente na hifa do patógeno CEN217. E – Enrolamento do *Trichoderma* CEN168 e a deformação na hifa do patógeno CEN217.

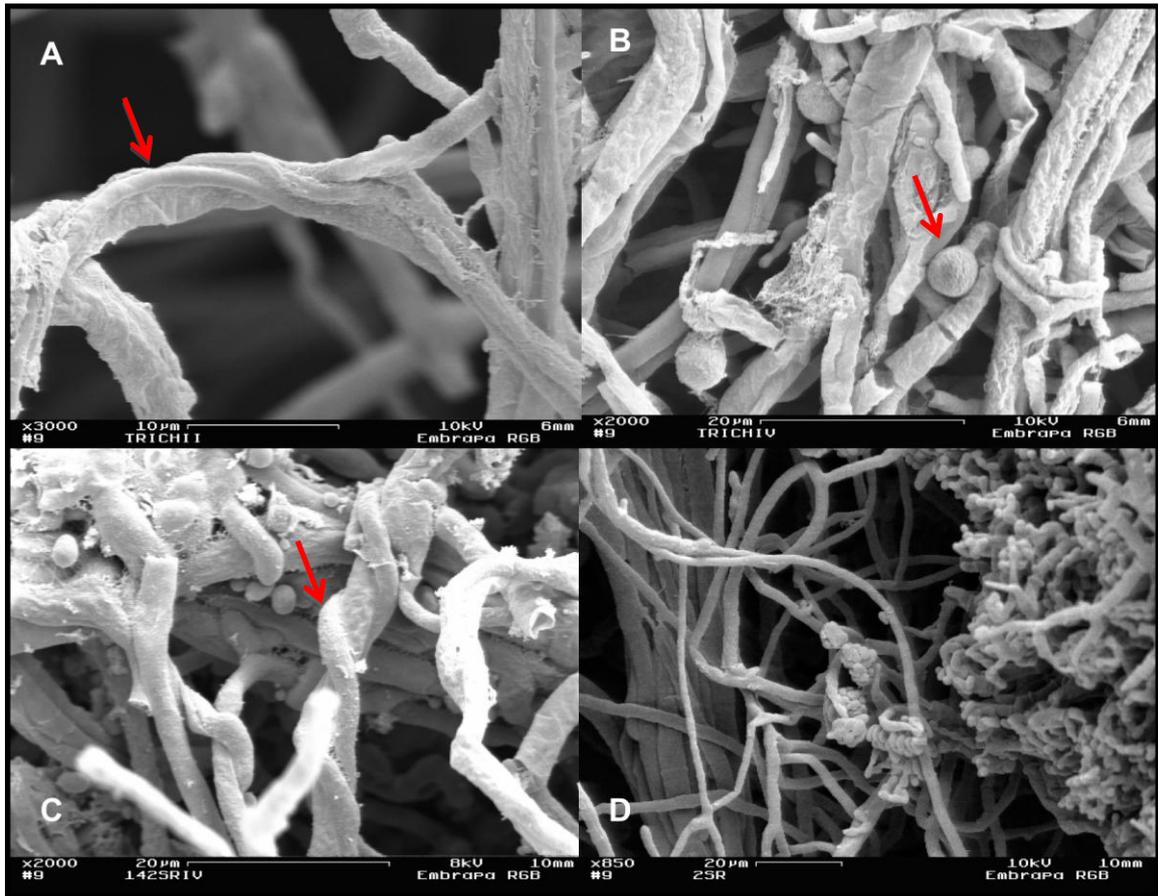


Figura 5: Imagens obtidas ao microscópio eletrônico de varredura. A – Hifas do *Trichoderma* (CEN160) crescendo paralelamente a hifa de *S. rolfssii*; B – Hifas de *S. rolfssii* deformadas e presença de clamidósporo de *Trichoderma*; C – Enrolamento de hifa do isolado CEN142 sobre *S. rolfssii* e D – Zona de confronto entre o isolado CEN002 e o patógeno *S. rolfssii*.

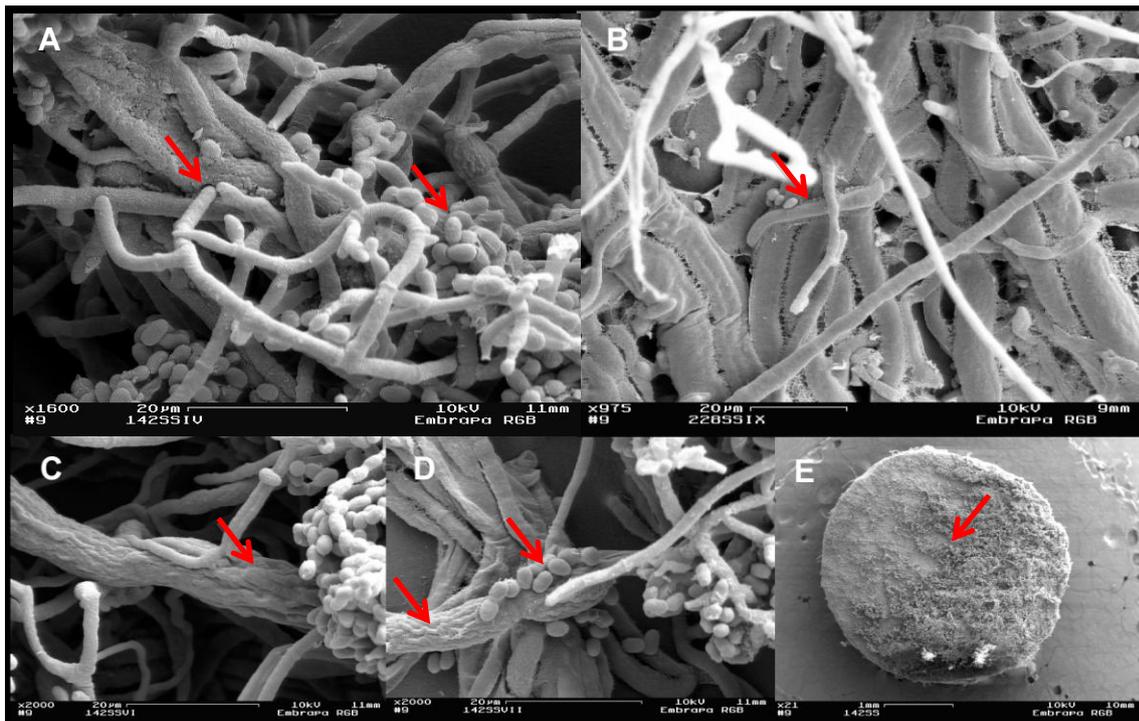


Figura 6: Imagens obtidas ao microscópio eletrônico de varredura. A – Hifa do *Trichoderma* penetrando a hifa do patógeno e conídio de *Trichoderma* (CEN142) sobre *S. sclerotiorum*. B – Hifas do isolado CEN228 se enrolando em hifas do patógenos. C e D – Conídios, hifas de *Trichoderma* crescendo paralelamente ao patógeno e hifas danificadas de *S. sclerotiorum* e E – Disco de micélio ágar ilustrando a região de confronto entre CEN142 (direita) e *S. sclerotiorum* (esquerda).

Martins-Corder & Melo (1998) e Melo & Faull (2000) documentaram o antagonismo de *Trichoderma* contra *V. dahliae* e *R. solani*, respectivamente. Foram observados enrolamento e crescimento paralelo de hifas em ambos os casos. O enrolamento e estrangulamento das hifas do patógeno podem promover a destruição da parede celular, seguindo-se a liberação de nutrientes a partir de células mortas (Melo, 1998). Trabalho desenvolvidos por Elad *et al.* (1982) já evidenciavam a produção de enzimas degradadoras de parede, como quitinases e celulases, como modo de ação de *Trichoderma* spp. contra fungos fitopatogênicos. Essas enzimas que promovem a lise das células seriam induzidas por diferentes polímeros componentes da parede dos fungos-alvo (Howell, 2005). Louzada *et al.*

(2009) observaram que nem todos os isolados de uma mesma espécie do agente de biocontrole são capazes de exercer o hiperparasitismo, embora capazes suprimir o crescimento do patógeno, sugerindo que outros mecanismos como antibiose ou competição possam ser tão eficientes quanto o parasitismo. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com as observações desses autores, evidenciando variação de reações em função do isolado do antagonista e do patógeno considerado.

Efeito inibidor de metabólitos não-voláteis produzidos por *Trichoderma* contra *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*

Espécies do gênero *Trichoderma* são capazes de inibir o desenvolvimento de vários patógenos por mecanismos diversos, dentre eles a produção de diferentes metabólitos secundários de efeito antibiótico e enzimas líticas (Melo, 1998). *T. harzianum* cresce rapidamente e produz um amplo espectro de metabólitos que incluem antibióticos, antifúngicos, pigmentos, vitaminas, ácidos orgânicos e enzimas hidrolíticas (Grondona *et al.*, 1997). Na Figura 7 podemos observar a diversidade de pigmentos produzidos por diferentes espécies de *Trichoderma*.



Figura 7: Diversidade de pigmentos produzidos por *Trichoderma* spp. em meio líquido BD.

De um modo geral, os isolados de *Trichoderma* promoveram a inibição do crescimento micelial tanto de *S. sclerotiorum* quanto de *S. rolfsii*, quando testados quanto à produção de compostos tóxicos. Além de restringirem o crescimento micelial, as colônias dos patógenos apresentaram-se menos densas ou com deformações, como mostra a Figura 8.

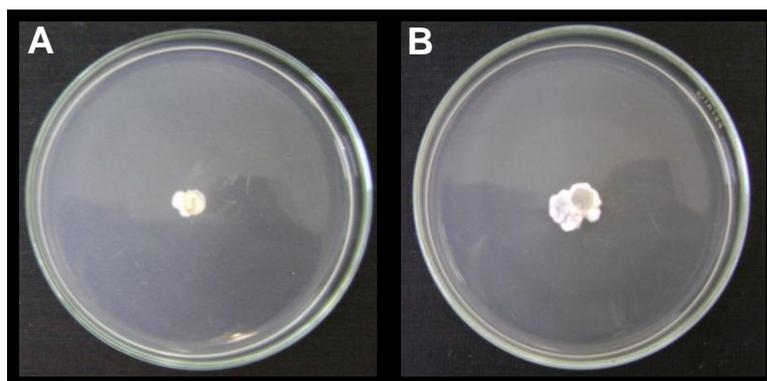


Figura 8: A. Efeito inibidor de metabólitos não-voláteis do CEN002 *T. stromaticum* sobre o crescimento de *S. sclerotiorum* com 100% de inibição e B. CEN126 *T. harzianum* sobre o crescimento de *S. rolfsii* com 97,7% de inibição.

Importante ressaltar que o efeito inibidor de *Trichoderma* por metabólitos voláteis sobre *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii* foi positivo para a maioria dos isolados testados, conforme ilustram as tabelas 4 e 5. Nesse ensaio, destacaram-se os isolados CEN266, CEN211, CEN157, CEN194, CEN126, CEN200, CEN228, CEN191, CEN142, CEN231, CEN284, CEN289, CEN249, CEN280, CEN151, CEN002, CEN143, CEN159, CEN160, CEN162, CEN201, CEN207, CEN219, CEN225, CEN227, CEN229, CEN252, CEN254, CEN265, CEN277 e CEN287 com taxa de inibição entre 80 e 100% para *S. sclerotiorum* (tabela 5). Os isolados com melhores taxas para *S. rolfsii* foram o CEN001, CEN125, CEN126, CEN127, CEN129, CEN141, CEN170, CEN192, CEN225 e CEN280 com taxa de inibição entre 64 e 98% (tabela 4).

Os 149 isolados foram agrupados em uma tabela com base na similaridade da porcentagem de inibição com o intuito de organizar e identificar os isolados com maior taxa de inibição do patógeno. Assim, na tabela 4 para *Sclerotium rolfsii*, foram formados cinco agrupamentos, onde o primeiro é composto com isolados com 0% de inibição ou seja, o patógeno (*S. rolfsii*) preencheu toda a superfície da placa de Petri. O segundo grupo com taxa de inibição de 1 - 20%, o terceiro com 21 - 40%, o quarto com 41 - 79% e por fim o quinto grupo com 80 - 98% de inibição. Na tabela 5 para *Sclerotinia sclerotiorum*, também foram formados cinco agrupamentos, onde no primeiro estão inseridos os com 0% de inibição que representam 22% do total estudado. Os do segundo agrupamento com 1 - 20% de inibição, correspondem a 25% dos isolados, o terceiro corresponde a 14%, o quarto 18% e o quinto 20%.

A redução do crescimento dos fitopatógenos pode ser atribuída à competição por nutrientes, como também e à liberação de substâncias tóxicas pelos antagonistas, sendo que ambos os mecanismos contribuem para o melhor potencial de antagonismo exercido pelos isolados de *Trichoderma*.

Weidling (1934), em seus estudos, sugeriu o envolvimento de compostos que atuam na ação antagonista. Mas, somente quase 30 anos depois, Dennis & Webster (1971 a,b) descreveram experimentos mostrando a inibição do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos por metabólitos de *Trichoderma*. Mais tarde vários antibióticos foram relacionados e tiveram sua ação elucidada em trabalhos desenvolvidos por Haran *et al.*, (1996) e Inbar *et al.* (1994). Mais recentemente, Vinale *et al.* (2014) relata a atividade direta de metabólitos secundários de *Trichoderma* contra fitopatógenos e compostos que afetam substancialmente o metabolismo da planta. A aplicação em larga escala de metabólitos selecionados para induzir a resistência do hospedeiro e / ou para promover o rendimento das

culturas pode tornar-se uma realidade no futuro próximo e representa uma poderosa ferramenta para implementação de estratégias de biocontrole.

A capacidade de inibição do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos ocorre com diferentes espécies de *Trichoderma* e é variável entre isolados de uma mesma espécie. Carvalho *et al.* (2011) trabalhou com seis isolados de *Trichoderma harzianum* no controle de *Fusarium oxysporum* e, buscando conhecer seu efeito no crescimento inicial do feijoeiro comum. Todos os isolados apresentaram antagonismo *in vitro* contra o patógeno. O crescimento médio do isolado CEN239 foi superior aos demais (37,43cm), enquanto com os outros tratamentos as medidas de comprimentos das plantas variaram entre 27,84 e 33,95 cm. Já Fontenelle *et al.* (2011) testou trinta e cinco isolados pertencente às espécies *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. koningiopsis*, *T. tomentosum* e *T. brevicompactum*, que, embora distintamente, apresentaram inibição micelial do patógeno por metabólitos voláteis e 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.

Neste trabalho, os ensaios realizados para testar a capacidade de isolados de *Trichoderma* em inibir o crescimento de *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii in vitro* foi demonstrada tanto nos testes de pareamento de culturas como produção de metabólitos não-voláteis e possibilitaram selecionar potenciais agentes de biocontrole contra os patógenos-alvo.

Tabela 4: Inibição do crescimento de *Sclerotium rolfii* por isolados de *Trichoderma* em ensaio com metabólitos não-voláteis.

Inibição %	N	% de isolados	Isolados cod. CEN.
0	61	40	CEN131, CEN132, CEN133, CEN133, CEN134, CEN140, CEN143, CEN146, CEN148, CEN150, CEN153, CEN154, CEN156, CEN166, CEN166, CEN168, CEN188, CEN189, CEN193, CEN198, CEN199, CEN204, CEN206, CEN211, CEN220, CEN221, CEN223, CEN226, CEN230, CEN233, CEN234, CEN236, CEN241, CEN242, CEN243, CEN244, CEN245, CEN253, CEN255, CEN257, CEN258, CEN259, CEN261, CEN262, CEN263, CEN264, CEN265, CEN270, CEN271, CEN278, CEN282, CEN285, CEN286, CEN288, CEN290, CEN291, CEN292, CEN295, CEN296, CEN297, CEN299.
1 – 20	38	25	CEN201, CEN284, CEN232, CEN203, CEN238, CEN207, CEN210, CEN277, CEN145, CEN202, CEN194, CEN250, CEN165, CEN275, CEN191, CEN298, CEN279, CEN316, CEN251, CEN274, CEN222, CEN195, CEN205, CEN151, CEN276, CEN147, CEN155, CEN281, CEN267, CEN237, CEN283, CEN169, CEN268, CEN294, CEN248, CEN269, CEN209, CEN289.
21 – 40	22	14	CEN219, CEN240, CEN142, CEN224, CEN190, CEN163, CEN208, CEN229, CEN139, CEN228, CEN273, CEN161, CEN162, CEN260, CEN249, CEN247, CEN160, CEN239, CEN272, CEN197, CEN196, CEN287.
41 – 79	18	12	CEN170, CEN192, CEN225, CEN235, CEN252, CEN293, CEN231, CEN164, CEN266, CEN159, CEN002, CEN256, CEN254, CEN227, CEN158, CEN144, CEN152, CEN200.
80 – 98	9	6	CEN001, CEN126, CEN280, CEN125, CEN127, CEN129, CEN128, CEN130, CEN141.

* Número de isolados

Tabela 5: Inibição do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* por isolados de *Trichoderma* em ensaio com metabólitos não-voláteis.

Inibição %	N*	% de isolados	Isolados cod. CEN.
0	30	22	CEN001, CEN131, CEN139, CEN141, CEN148, CEN152, CEN153, CEN155, CEN206, CEN236, CEN242, CEN244, CEN245, CEN246, CEN250, CEN253, CEN255, CEN261, CEN262, CEN264, CEN272, CEN275, CEN278, CEN286, CEN291, CEN294, CEN296, CEN297, CEN299, CEN316.
1 – 20	38	25	CEN150, CEN202, CEN130, CEN279, CEN276, CEN247, CEN134, CEN192, CEN193, CEN288, CEN268, CEN274, CEN127, CEN205, CEN270, CEN140, CEN285, CEN298, CEN149, CEN292, CEN168, CEN248, CEN283, CEN293, CEN243, CEN251, CEN158, CEN241, CEN271, CEN190, CEN295, CEN128, CEN163, CEN133, CEN267, CEN233, CEN230, CEN282.
21 – 40	22	14	CEN257, CEN154, CEN281, CEN125, CEN132, CEN238, CEN258, CEN165, CEN290, CEN259, CEN147, CEN221, CEN235, CEN263, CEN156, CEN234, CEN239, CEN260, CEN269, CEN161, CEN220, CEN240.
41 – 79	28	18	CEN169, CEN167, CEN146, CEN144, CEN222, CEN198, CEN145, CEN195, CEN224, CEN237, CEN170, CEN129, CEN273, CEN210, CEN188, CEN199, CEN197, CEN226, CEN166, CEN203, CEN196, CEN223, CEN204, CEN208, CEN209, CEN232, CEN256, CEN189.
80 – 100	31	20	CEN266, CEN211, CEN157, CEN194, CEN126, CEN200, CEN228, CEN191, CEN142, CEN231, CEN284, CEN289, CEN249, CEN280, CEN151, CEN002, CEN143, CEN159, CEN160, CEN162, CEN201, CEN207, CEN219, CEN225, CEN227, CEN229, CEN252, CEN254, CEN265, CEN277, CEN287.

* Número de isolados

Caracterização Molecular dos isolados de *Trichoderma*

Amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e sequenciamento

A amplificação das regiões ITS1-5.8S-ITS2 rDNA e TEF-1 α permitiu uma análise bastante completa dos isolados para caracterizar as diferentes espécies. As sequências amplificadas por PCR geraram produtos de aproximadamente 630 pares de bases para a região ITS (figura 9) e de 1061 pares de base para TEF (figura 10). Pela análise das 50 sequências de cada região, utilizando as bases de dados NCBI (BLAST – Basic Local Alignment Search Tool (Altschul *et al.*, 1997) e TrichOKEY, foi possível distinguir sete espécies distintas: *T. asperellum* Samuels, Liechfeldt & Nirenberg, *T. erinaceum* Bisset, C.P. Kubicek & Skakács, *T. harzianum* Rifai, *T. koningiopsis* Samuels C. Suárez & H.C. Evans, *T. stromaticum* Samuels & Pardo-Schulth, *T. spirale* Bisset e *T. tomentosum* Bisset. O isolado CEN159 não foi identificado em nível de espécie, pois não formou *contigs* com nenhuma das regiões. Sugere-se que sejam tentadas outras metodologias de extração de DNA de forma a aprimorar a qualidade do extrato, já que o método usando não tem se mostrado eficiente, no caso específico desse isolado. Caso a identificação não seja possível, mesmo com DNA de melhor qualidade, pode-se lançar mão da análise de outras sequências, como fragmentos do gene β -tubulina, entre outras.

Exemplares de cada espécie foram crescidos em placas de Petri e observados quanto às características de colônia em meio BDA a 25°C por sete dias em ambiente de laboratório e em seguida fotografados (figura 11). Essa mesmas amostras foram tratadas e levadas ao microscópio eletrônico para mostrar detalhes das hifas, fiálides e conídios (figura 12 e figura 13).

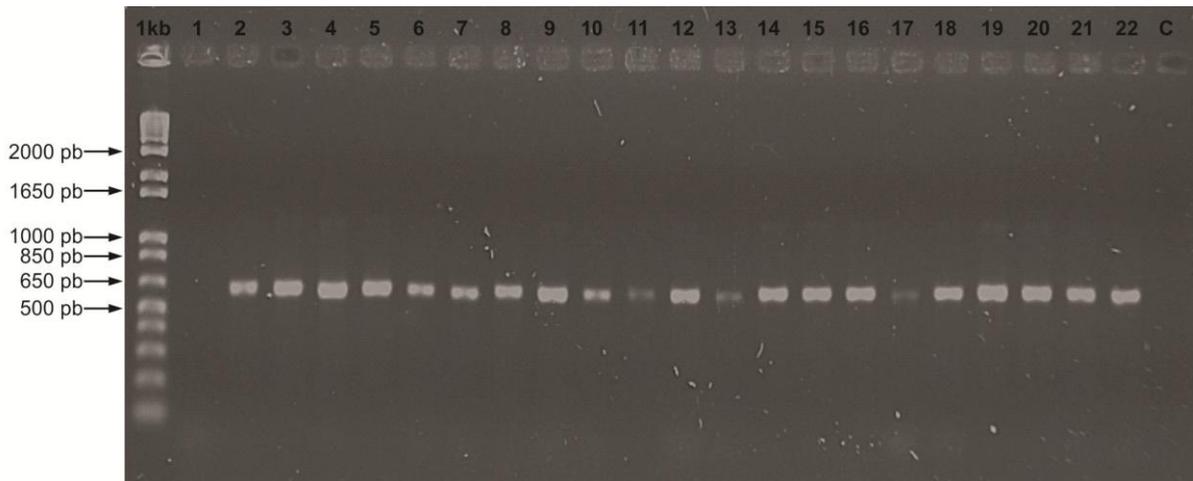


Figura 9: Análise de produtos de PCR em gel de agarose 1%, da região do rDNA com iniciadores ITS1 e ITS4. Marcador molecular (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen); 1 a 22: amplificação de amostras de rDNA utilizando-se iniciadores ITS1 e ITS4 com aproximadamente 630 pares de bases.

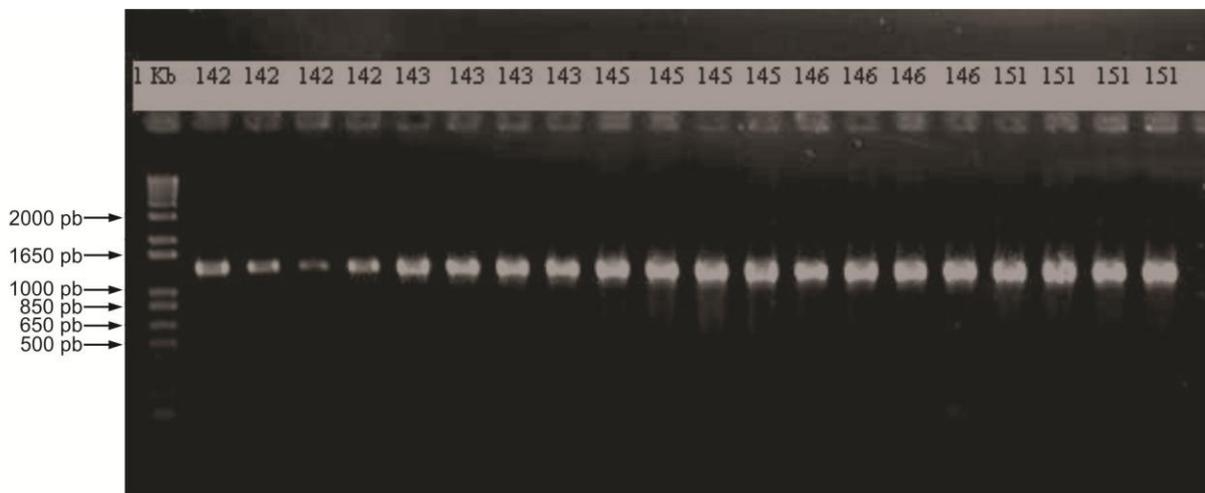


Figura 10: Análise de produtos de PCR em gel de agarose 1%, da região do rDNA com iniciadores TEF-1 α e EF1. M: marcador molecular (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen); amplificação de amostras de rDNA utilizando-se iniciadores TEF-1 α e EF1 com aproximadamente 1061 pares de bases.

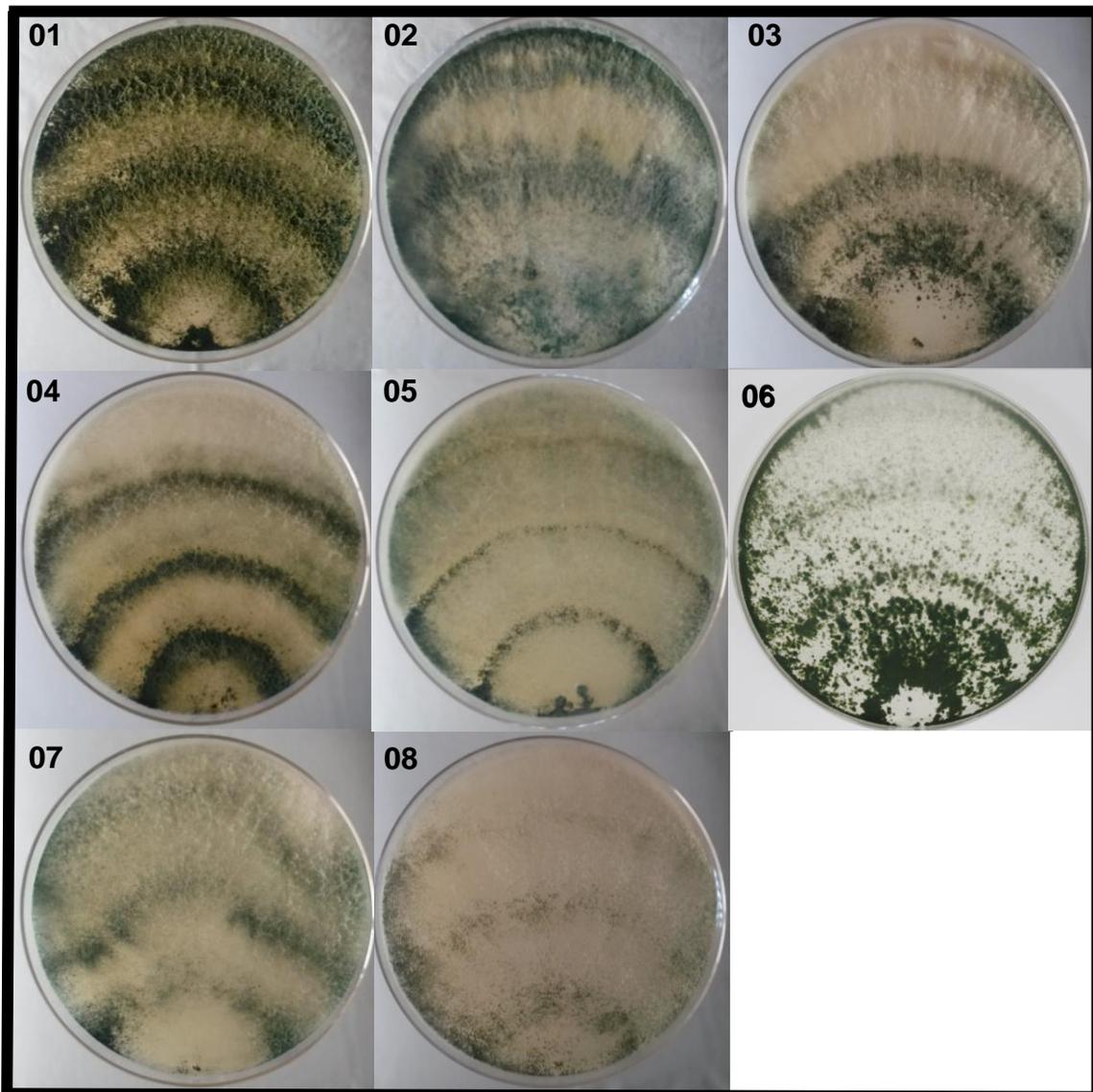


Figura 11: Culturas de *Trichoderma* obtidas em meio BDA após sete dias de incubação a 25°C e fotoperíodo de 12 h. Placa 01: *T. harzianum* (CEN152); Placa 02: *T. asperellum* (CEN277); Placa 03: *T. asperellum* (CEN160); Placa 04: *T. tomentosum* (CEN168); Placa 05: *T. spirale* (CEN188); Placa 06: *T. erinaceum* (CEN190); Placa 07: *T. koningiopsis* (CEN142); Placa 08: *T. stromaticum* (CEN02).

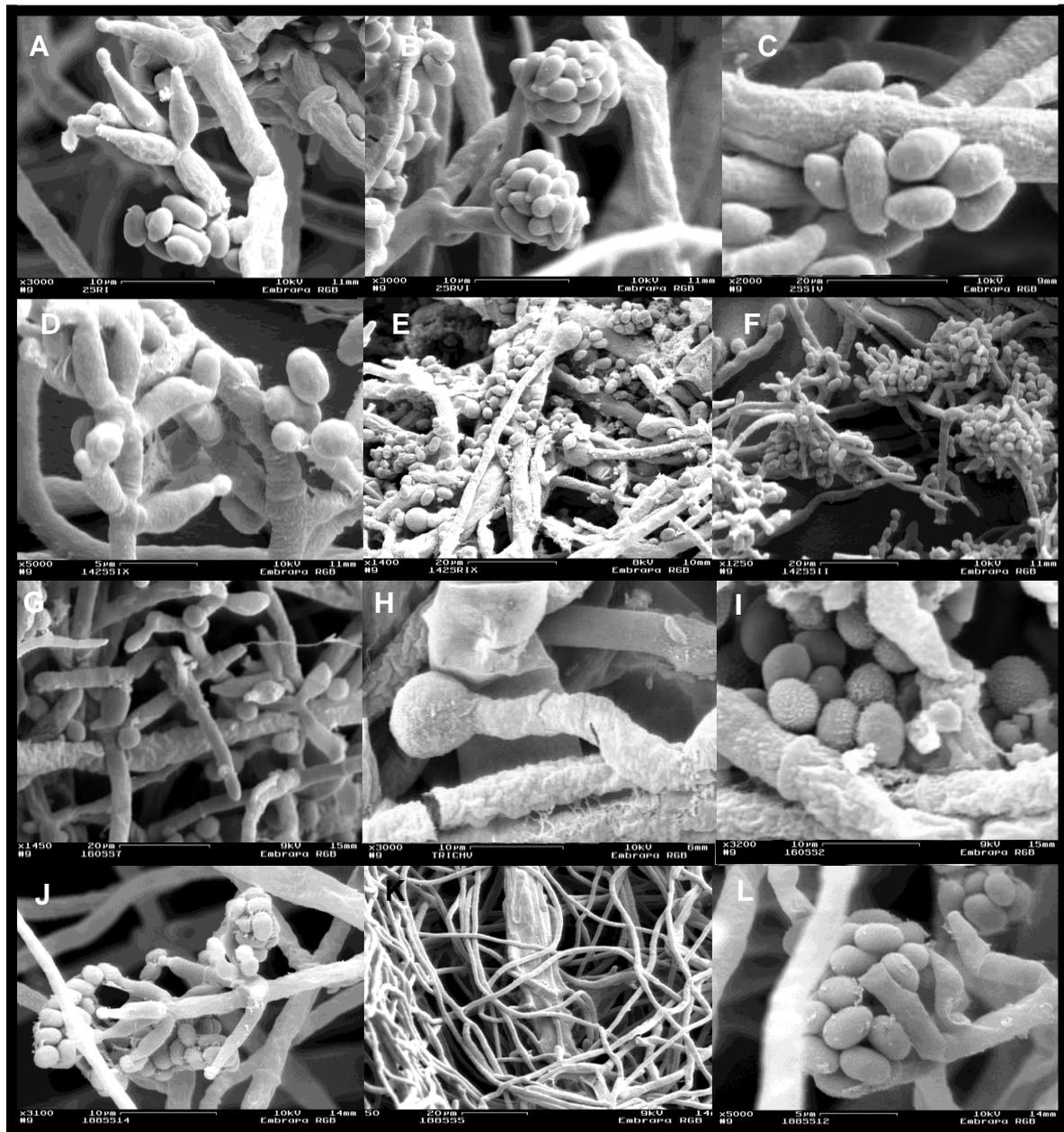


Figura 12: Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostrando os detalhes de hifas, fiálides, conídio (ornamentados ou não) e clamidósporos em algumas espécies. A, B, e C (*T. stromaticum*); D, E e F (*T. koningiopsis*); G, H e I (*T. asperellum*); J, K e L (*T. spirale*) e H Clamidósporos.

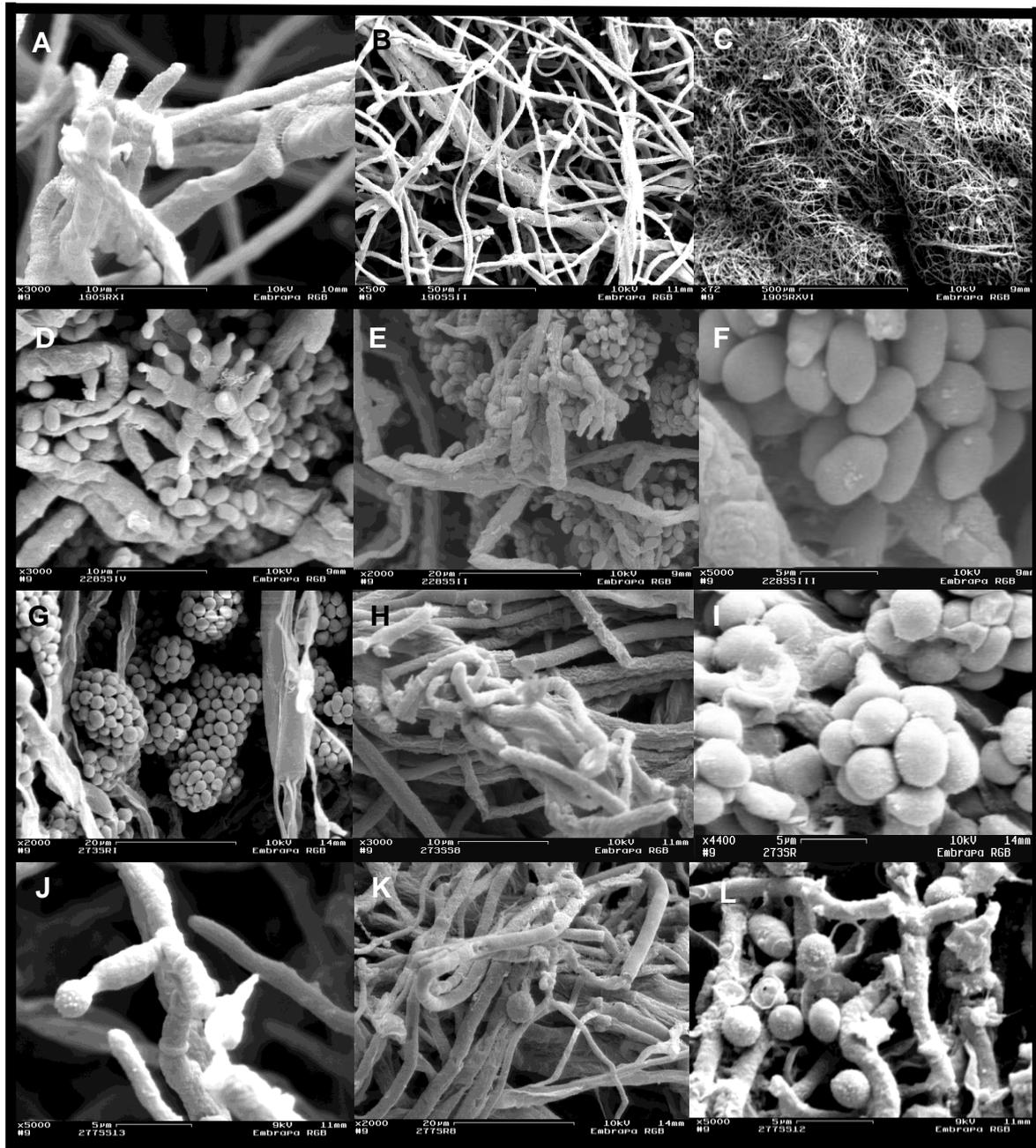


Figura 13: Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostrando os detalhes de hifas, fiálides, conídio (ornamentados ou não) e clamidósporos em algumas espécies. A, B e C (*T. erinaceum*); D, E e F (*T. tomentosum*); G, H e I (*T. harzianum*) e J, K e L (*T. asperellum*). K Clamidósporo

Diversidade de espécies

Entre os 51 isolados de *Trichoderma* caracterizados por meio da análise molecular de duas regiões (ITS e TEF-1 α), identificaram-se sete espécies: *T. asperellum*, *T. erinaceum*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. stromaticum*, *T. spirale* e *T. tomentosum*.

Os isolados são procedentes de cinco unidades da federação: Bahia, Goiás, São Paulo, Tocantins e Distrito Federal (figura 14) e provêm de amostras de solo coletadas em áreas com diferentes culturas, como algodão, arroz, milho, goiaba e sorgo.

As informações da análise filogenética nas sequências gênicas da região ITS1-5.8S-ITS2 e TEF1- α dos 51 isolados de *Trichoderma*, clado, espécie, isolado e total de organismos estão listados na Tabela 6.

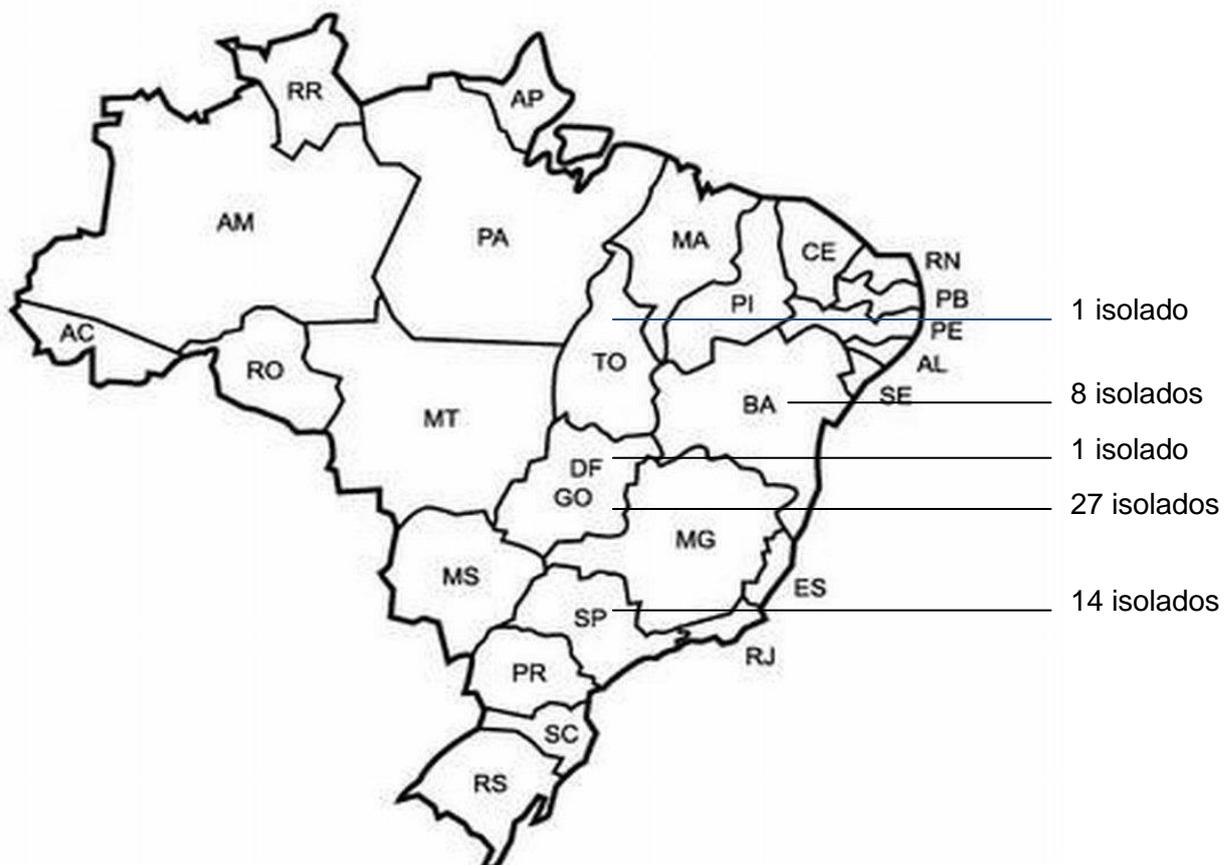


Figura 14: Localização geográfica no mapa do Brasil dos locais de coleta dos isolados de *Trichoderma* indicados pelas linhas.

Tabela 6: Identificação molecular, clado, espécie, isolados e total de indivíduos dos 51 isolados de *Trichoderma* utilizados nesse estudo.

Clado	Espécie	Isolado (CEN)	Total
Harzianum	<i>T. harzianum</i>	1, 125, 127, 128, 129, 130, 132, 143, 145, 146, 151, 152, 153, 156, 158, 161, 164, 165, 166, 167, 170, 191, 195, 267, 270, 273, 282, 293, 295 e 296.	30
	<i>T. tomentosum</i>	168, 211, 225, 226, 227, 228 e 232.	7
Stromaticum	<i>T. stromaticum</i>	002	1
Viride	<i>T. koningiopsis</i>	142, 144, 157, 200, 207 e 208.	6
	<i>T. erinaceum</i>	190	1
Hamatum	<i>T. asperellum</i>	160, 163, 229 e 277.	4
Spirale	<i>T. spirale</i>	188 e 189	2

O estado do Brasil que contribuiu com maior número de isolados foi o de Goiás com 53% do total. Nas amostras procedentes desse estado foram identificadas seis espécies: *T. harzianum* (15 isolados), *T. koningiopsis* (4 isolados), *T. spirale* (2 isolados), *T. tomentosum* (2 isolados), *T. erinaceum* e *T. asperellum* (1 isolado), seguido por São Paulo com 27,4% e três diferentes espécie, *T. harzianum* (7 isolados), *T. tomentosum* (5 isolados) e *T. asperellum* (2 isolados); Bahia com 15,6% e duas diferentes espécies, *T. harzianum* (7 isolados) e *T. stromaticum* (1 isolado); de Tocantins e Distrito Federal com 1,9% foi identificada apenas uma espécie (*T. koningiopsis*).

Com base nos resultados obtidos com a caracterização molecular, foi possível calcular o índice de biodiversidade relativa de *Trichoderma* (ID = 0,13) referente aos 51 isolados na qual foram identificadas sete espécies distintas. Calcular a biodiversidade relativa

permite uma melhor análise sobre o comportamento de defentes espécies em uma determinada área. Resultados semelhantes aos observados neste trabalho, foram obtidos por Druzhinina *et al.* (2005) onde o ID foi de 0,20 referente a 10 espécies em 53 isolados em diversas regiões da América do Sul, sendo que no atual estudo os isolados foram coletados em quatro estados brasileiros e no Distrito Federal. Com base em outros trabalhos referentes a biodiversidade relativa de *Trichoderma* em diversas partes do mundo, pode-se dizer que o índice de biodiversidade foi relativamente alto quando comparado com estudos realizados por Zhang *et al.* (2005) na China relatou 13 espécies de *Trichoderma* em 135 isolados, com ID igual a 0,096. Migheli *et al.* (2009) em Sardinia na Itália onde 15 espécies foram identificadas em 482 isolados com ID= 0,03. Sadfi-Zouaoui *et al.* (2009) na Tunísia, identificaram 5 espécies entre 53 isolados com ID igual a 0,094. Sun *et al.* (2012) identificaram 23 espécies entre os 1910 isolados trabalhados, obtendo um ID igual a 0,012. Já no Brasil, Carvalho-Filho (2013) relatou em seus estudos a identificação de 11 espécies de *Trichoderma* entre os 144 isolados trabalhados obtendo um ID igual a 0.076. Portanto, o valor de ID encontrado neste trabalho foi relativamente elevado, se comparado aos encontrados em distintas regiões do globo, inclusive o que foi obtido por Carvalho Filho (2013) com isolados brasileiros, revelando-se mais baixo apenas quando comparado ao de Druzhinina *et al.* (2005).

Neste trabalho, a grande maioria dos isolados pertence à espécie *T. harzianum*, seguido por *T. tomentosum*, *T. koningiopsis* e *T. asperellum*. Hoyos-Carvajal *et al.* (2009) realizou um estudo sobre a biodiversidade genética de *Trichoderma* e constatou a predominância de duas espécies da Colômbia, *T. asperellum* seguida de *T. harzianum*. Esses resultados mostram uma alta capacidade adaptativa à maioria dos ecossistemas principalmente por parte da espécie de *T. harzianum*. Isolados desta espécie foram coletados de ambientes extremamente secos, quentes, úmidos e de clima temperado.

Caracterização taxonômica

Para a caracterização taxonômica foram formadas duas árvores filogenéticas geradas a partir das sequências de genes ITS1-5.8S- ITS2 do rDNA (Figura 15) e TEF-1 α (Figura 16) suportada com valores de *bootstrap* acima de 50% para os 50 isolados. Cinco clados foram formados: Clado Hamatum, Viride, Stromaticum, Spirale e Harzianum. Os resultados foram compatíveis para as duas regiões analisadas, tanto ITS quanto TEF formaram cinco clados com sete espécies. A figura 17 representa apenas os isolados trabalhados sem os isolados de referências presentes na tabela 7.

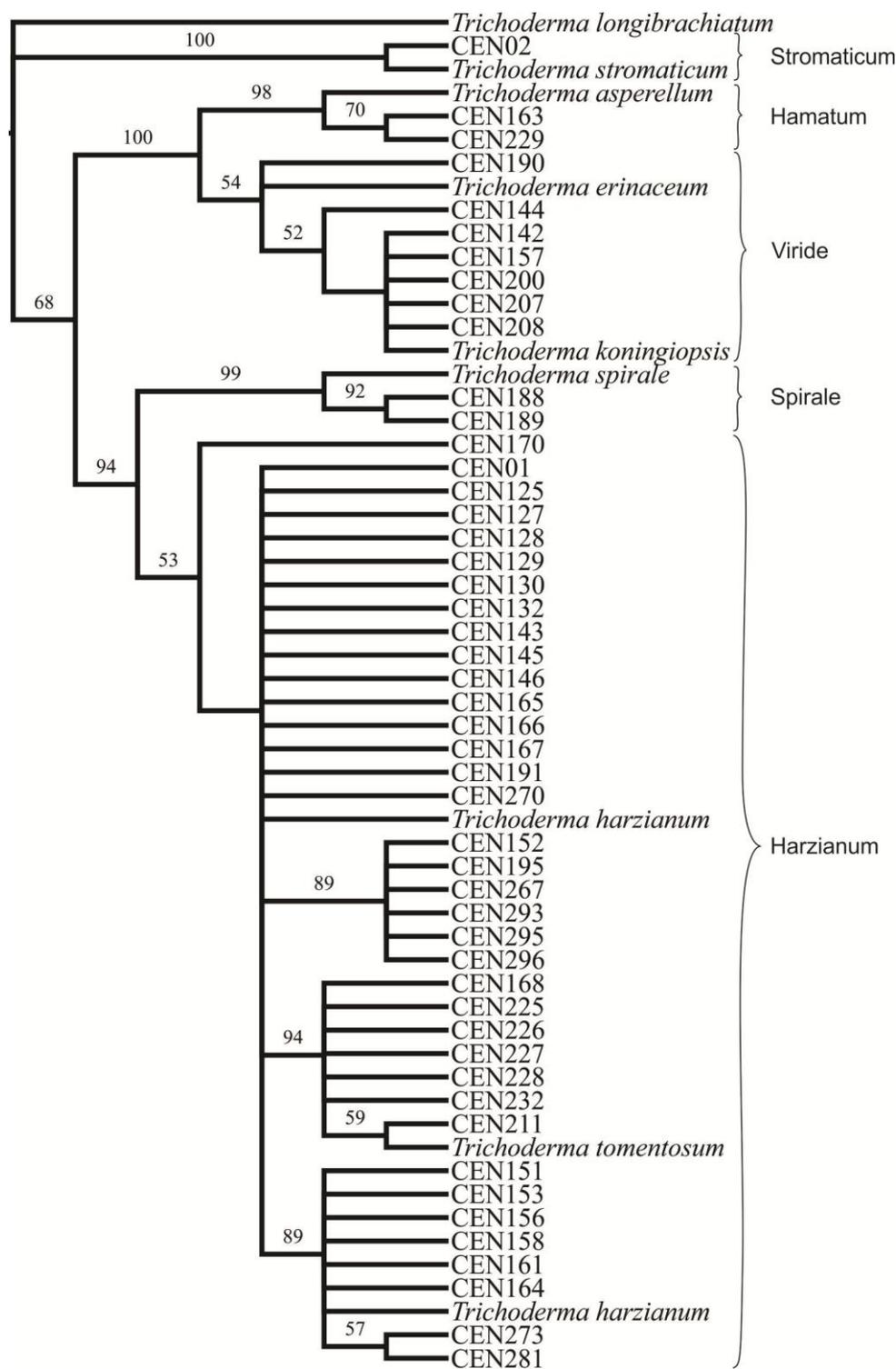


Figura 15: Árvore filogenética baseada na região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA dos 49 isolados de *Trichoderma* pertencentes à Coleção de Fungos para Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa. A topologia da árvore foi obtida da MP e os valores de suporte estão acima com *bootstrap* acima de 50%. Os isolados *T. asperellum* (DQ381957), *T. erinaceum* (DQ109534), *T. harzianum* (EF392746), *T. spirale* (JF439515), *T. stromaticum* (HQ342398), *T. tomentosum* (HQ857116), *T. koningiopsis* (DQ313138) e *T. longibrachiatum* (EU401551) são referências externas retiradas do GenBank, o último foi utilizado como *outgroup*.

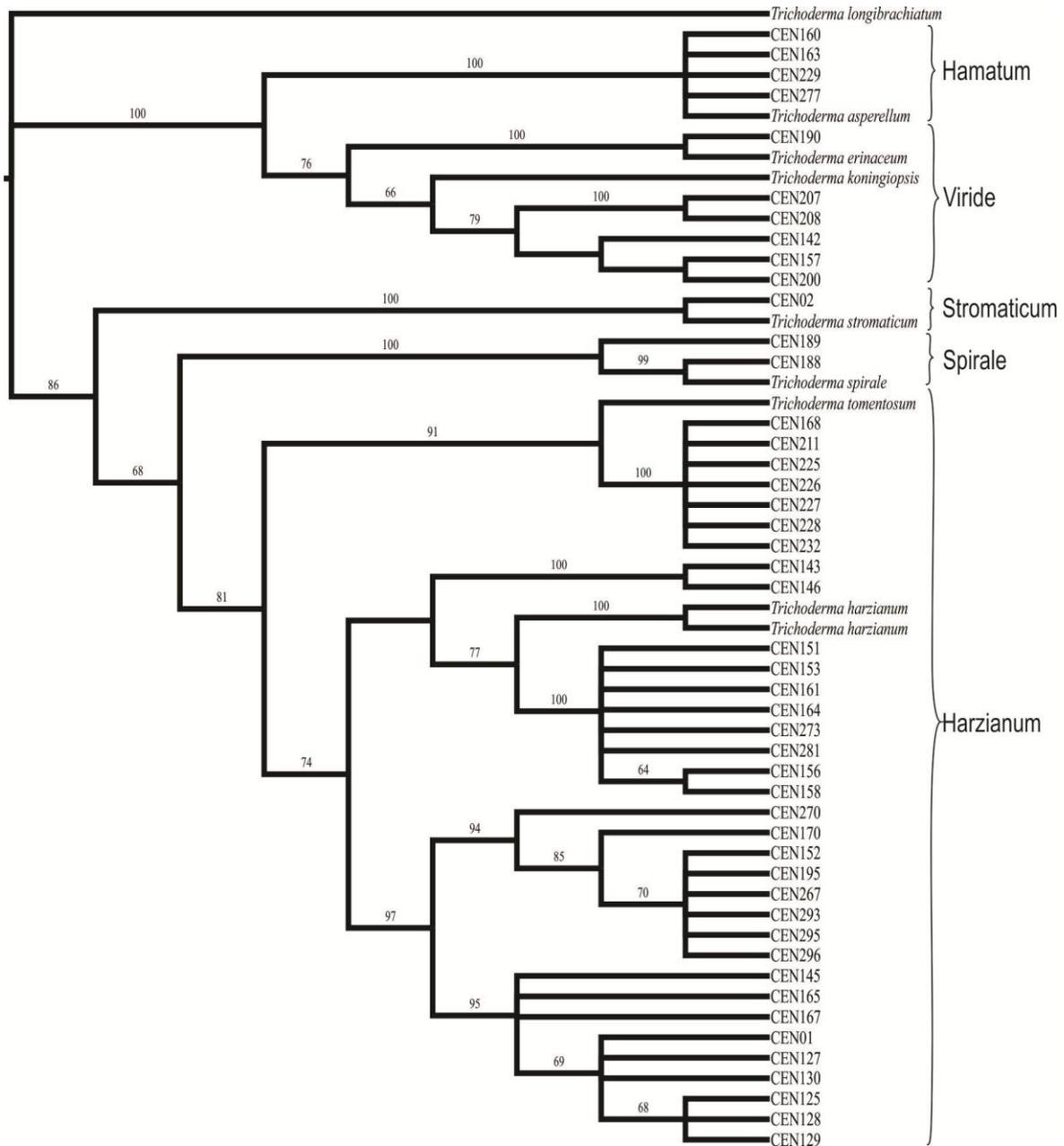


Figura 16: Árvore filogenética baseada na região TEF-1 α do rDNA dos 47 isolados de *Trichoderma* pertencentes à Coleção de Fungos para Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa da Embrapa. A topologia da árvore foi obtida da MP e os valores de suporte estão acima com *bootstrap* acima de 50%. Os isolados *T. asperellum* (DQ381958), *T. erinaceum* (DQ109547), *T. harzianum* (FJ179573), *T. spirale* (AF534626), *T. stromaticum* (HQ342204), *T. tomentosum* (AF534630), *T. koningiopsis* (DQ284972) e *T. longibrachiatum* (EU401582) são referências externas retiradas do GenBank, o último foi utilizado como *outgroup*.

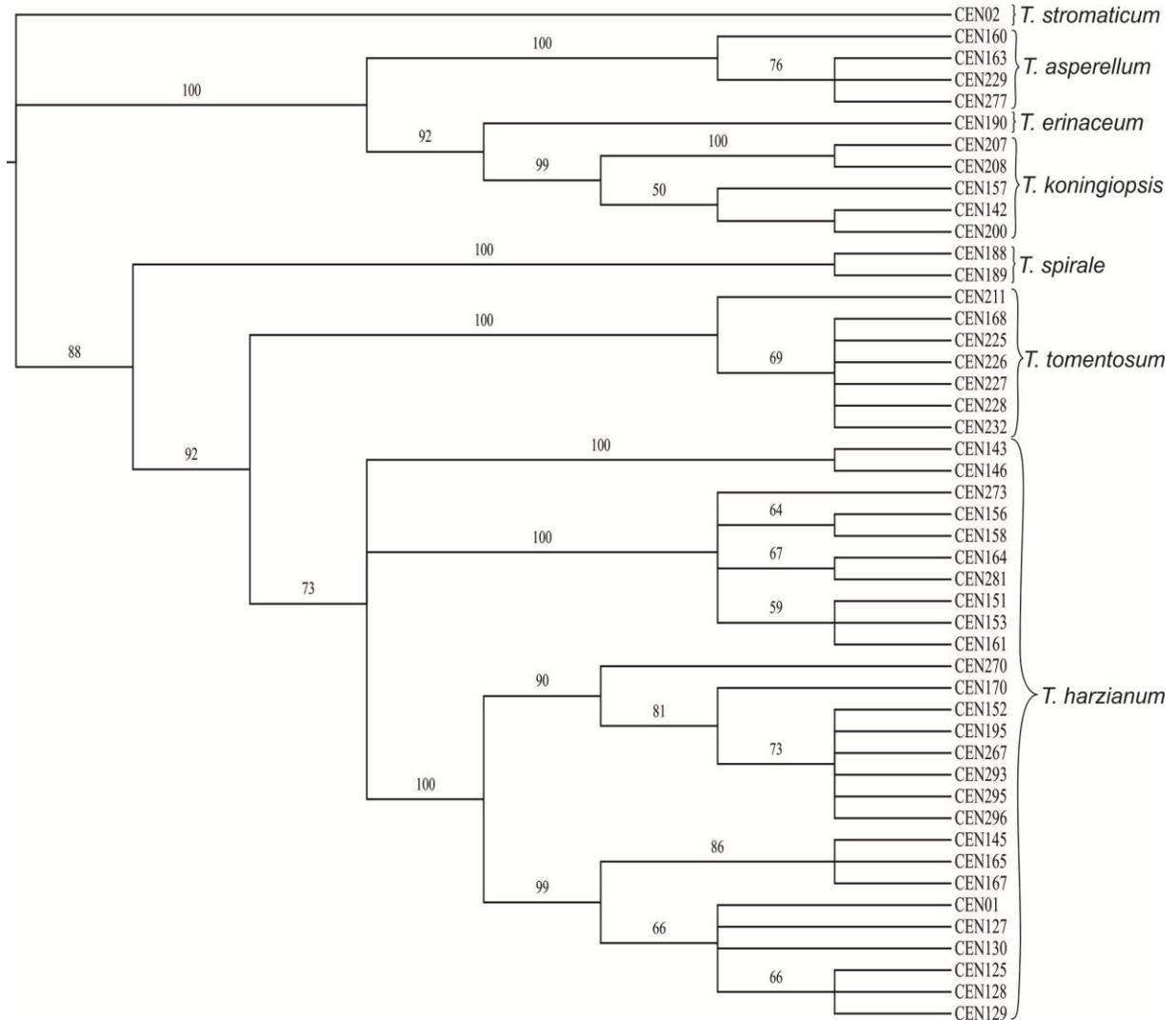


Figura 17: Árvore filogenética baseada na região TEF-1 α do rDNA dos 50 isolados de *Trichoderma* pertencentes à Coleção de Fungos para Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa da Embrapa. A topologia da árvore foi obtida da MP e os valores de suporte estão acima com *bootstrap* acima de 50%.

Tabela 7: Isolados de *Trichoderma* obtidos do *GenBank* usados para este estudo como referência.

Espécie	Número de acesso - ITS	Número de acesso – TEF
<i>T. asperellum</i>	DQ381957	DQ381958
<i>T. erinaceum</i>	DQ109534	DQ109547
<i>T. harzianum</i>	EF392746	FJ179573
<i>T. spirale</i>	JF439515	AF534626
<i>T. stromaticum</i>	HQ342398	HQ342204
<i>T. tomentosum</i>	HQ857116	AF534630
<i>T. koningiopsis</i>	DQ313138	DQ284972
<i>T. longibrachiatum</i>	EU401551	EU401582

O clado Hamatum foi composto por quatro isolados de *T. asperellum*, pela análise da região TEF-1 α . Esses isolados são provenientes de dois estados brasileiros Goiás e São Paulo e foram obtidos de amostras de solo várias delas coletadas em campos cultivados com algodão. Para ITS e TEF observou-se a formação de um grupo monofilético bem determinado e fortemente suportado com valores de *bootstrap* de 100%. Apesar dos isolados pertencerem a diferentes regiões foi observado uma alta similaridade entre os mesmos. A caracterização pela região ITS permitiu a identificação de apenas dois isolados de *T. asperellum* CEN163 e CEN229, enquanto pela região TEF-1 α foram identificados 4 isolados.(CEN160, CEN163, CEN229 e CEN277).

O clado Viride foi composto por sete isolados, sendo um *T. erinaceum* e seis *T. koningiopsis*, com valores de *bootstrap* de 51 e 73% para ITS e TEF, respectivamente, sendo que os mesmos possuem isolados procedentes de diferentes culturas localizadas em áreas geográficas distintas.

O clado Stromaticum foi composto por um isolado de *T. stromaticum* fortemente suportado por valores de *bootstrap* de 100%.

O clado Harzianum foi composto por 37 isolados, sendo 30 de *T. harzianum* e sete de *T. tomentosum*, suportado com valores de *bootstrap* superior a 80%. Os isolados foram provenientes de três estados, Goiás, São Paulo e Bahia e em sua maioria foram obtidos de amostras de solo cultivado com algodão, milho, arroz, goiaba, sorgo e fungo (*Moniliophthora perniciosa*).

O clado Spirale foi composto por dois isolados de *T. spirale* fortemente suportado com valores de *bootstrap* de 100%. Ambos os isolados foram extraídos do solo da região do Goiás.

É importante levar em conta que, nos últimos anos, as técnicas de biologia molecular têm se tornado ferramentas valiosas na taxonomia dos fungos, e sua aplicação levou a reconsideração de diversos gêneros (LoBuglio *et al.*, 1993; Sheriff *et al.*, 1994). 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 (Jaklisch *et al.*, 2006). Análises das sequências de rDNA tem sido utilizadas na caracterização intraespecífica de espécies que foram definidas por morfologia ou ecologia comum. Estes resultados demonstram a necessidade do uso de técnicas moleculares na indicação das inter-relações entre as espécies (Muthumeenakshi *et al.*, 1994; Kuhls *et al.*, 1996). *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). Kraus *et al.* (2004) e Degenkolb *et al.* (2008) relatam em seus trabalhos que as espécies *T. harzianum* e *T. brevicompactum* podem ser confundidas quando utilizada a taxonomia clássica e que pode ser facilmente distinguida pela análise filogenética.

Muitos estudos com base em um único gene ter sido posto em dúvida. Identificação com base apenas em sequências ITS às vezes não consegue distinguir entre táxons proximalmente relacionados, pois mais de uma espécie podem compartilhar o mesmo genótipo (Druzhinina *et al.*, 2005). Um único gene não tem mostrado ser suficiente para a caracterização das espécies de *Trichoderma/Hypocrea*, conforme diversos autores vem alertando (Bissett *et al.*, 2003; Chaverri *et al.*, 2004 a,b; Lu *et al.*, 2004). A região ITS foi isoladamente utilizada por vários anos e Carvalho-Filho (2013) em seu estudo, identificou 11 espécies de *Trichoderma* dentre 144 isolados, utilizando apenas a região ITS 1 e 2 obtendo bons resultados. A caracterização molecular de *Trichoderma* utilizando apenas essa região é possível, embora hoje não seja recomendado trabalhar apenas com uma região. Trabalhos mais recentes indicam que as espécies estreitamente relacionadas, por vezes, não são distinguíveis com essa região. Isto é especialmente verdadeiro para *Trichoderma sect. Trichoderma*, que inclui *T. viride*, onde mais do que uma espécie podem partilhar a mesma sequência ITS (Lieckfeldt *et al.*, 1999). Assim, TEF-1 α pode ser uma escolha alternativa ou adicional, por ser mais variável do que a ITS rDNA, e por isso, capaz de melhor refletir diferenças entre as espécies dentro e entre os grupos de espécies estreitamente relacionadas (Samuels, 2006). Devi *et al.* (2012) obtiveram resultados significativos utilizando TEF-1 α para distinguir isolados de *Trichoderma* oriundos da Índia. López-Quintero *et al.* (2013) não conseguiu identificar com clareza 13 estirpes de *Trichoderma* apenas com as regiões ITS 1 e 2 e Li Destri Nicosia *et al.* (2014) utilizando as regiões ITS e TEF, teve erroneamente apenas para a região ITS, um isolado identificado como *T. viride* sendo que o mesmo recentemente havia sido identificado como *T. viridarium*. O polimorfismo dentro da região ITS permitiu a identificação dos isolados de *Trichoderma*, mas errou na identificação da espécie de referência. O gene TEF é um marcador de valor para determinar a diversidade genética entre os isolados de *T. viride* que são caracterizadas por sequências ITS idênticas. Tendo revelado

um alto nível de diversidade genética dentro de *T. viride*, tal como definido por Jaklitsch *et al.* (2006).

Analisando as figuras 15 e 16 acima, pode-se observar pequenas diferenças entre os agrupamentos utilizando as regiões ITS e TEF-1 α . Embora todas as espécies identificadas tenham sido correspondentes para ambas as regiões, o número de grupos monofiléticos formados em TEF- α foi muito superior quando comparado com ITS, principalmente no clado Hamatum composto quase exclusivamente de *T. harzianum*. Esse fato comprova a versatilidade dessa região na análise intraespecífica, como mencionado anteriormente.

MALDI TOF MS

A utilização do MALDI-TOF MS nesse estudo foi com o objetivo de testar a base de dados em fase de construção para o gênero *Trichoderma*, utilizando o software Biotyper (version 3.0; Bruker Daltonics 156 GmbH) disponível na Embrapa. e que conta com informações suficientes para identificação de outros microrganismos, principalmente bactérias e leveduras, mas não para fungos filamentosos. Estudos anteriores na identificação de isolados desta coleção de agentes de biocontrole através da técnica MALDI-TOF MS foram desenvolvidos por Carvalho Filho (2013), que utilizou com sucesso o software Saramis. Este já conta com uma base de dados significativa e vem sendo utilizado em vários laboratórios mundialmente distribuídos.

Ao se compararem os resultados aqui obtidos na discriminação de espécies com os dados de sequenciamento e análises de sequências gênicas, verificou-se correspondência de 100% nos agrupamentos dos clados. Embora se tratando de dados preliminares, já que a base de dados se encontra ainda em construção, fica aqui demonstrado que a técnica de análise utilizando o sistema Biotyper confirma-se como uma alternativa rápida e eficiente para identificação de *Trichoderma* spp. e deverá ser incorporada como parte do arsenal moderno

de uso rotineiro para a identificação das espécies desse fungo e formação de um banco de caracteres associados ao acervo mantido na Coleção. É importante enfatizar que a integração de características moleculares, proteômica e fisiológicas obtidas em testes realizados *in vitro* e *in vivo*, constitui caminho seguro para caracterizar e selecionar isolados microbianos potencialmente capazes de exercer o biocontrole de doenças de plantas e estabelecer relações filogenéticas e proteômicas entre as espécies.

Conforme mostrado nas Figuras 19 a 26, os espectros de massa obtidos para formar os perfis moleculares de cada isolado de *Trichoderma* foram alcançados para os oito isolados estudados. Já a Figura 18 apresenta um dendrograma baseado no agrupamento entre os espectros de MALDI-TOF MS para esses isolados de *Trichoderma*, segundo o qual, formaram-se cinco ramos maiores cada qual relacionado a espécie-clado correspondente: clado Harzianum, clado Stromaticum, clado Viride, clado Spirale e clado Hamatum.

Os espectros em bruto, não foram comparados com espectros de referência pelas razões óbvias expostas anteriormente e a análise de agrupamento foi realizada pelo software Biotyper, calculando-se a distância entre os valores por uma função de correlação. Assim, o dendrograma foi criado a partir dos valores calculados à distância através de um algoritmo estatístico (Lopes *et al.*, 2014).

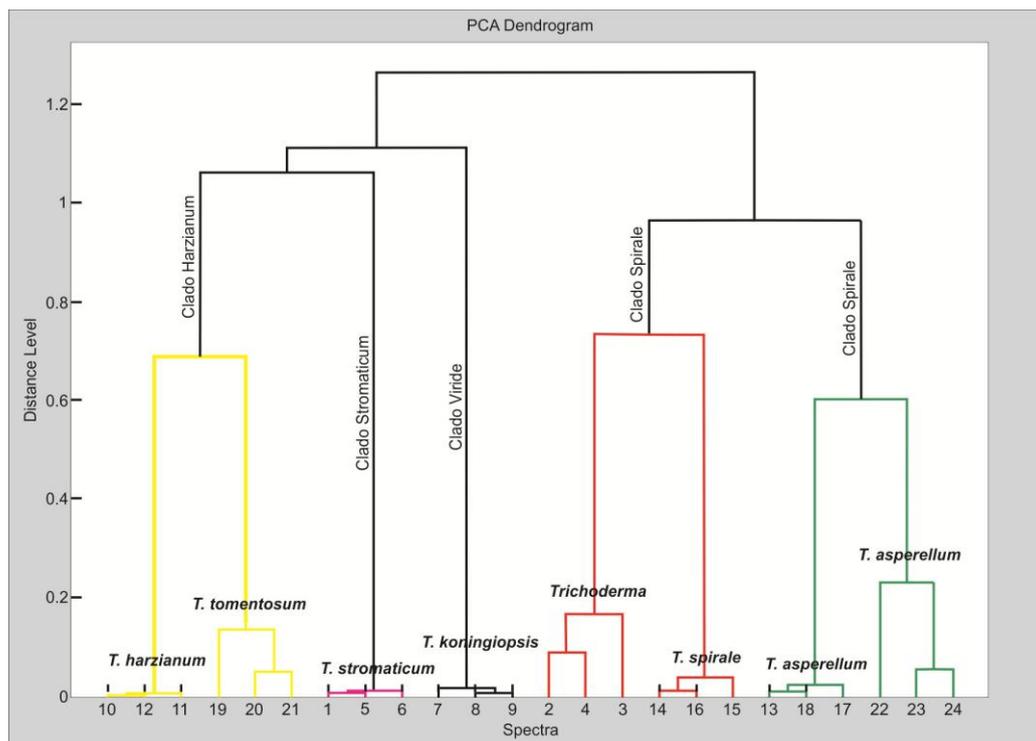


Figura 18: Dendrograma resultante da análise por MALDI-TOF MS de oito isolados de *Trichoderma* com três repetições cada.

Como se pode observar no dendrograma (Figura 18), os isolados se agruparam conforme o esperado para as três repetições das espécies *T. harzianum*, *T. tomentosum*, *T. stromaticum*, *T. koningiopsis*, *Trichoderma* sp., *T. spirale* e *T. asperellum*: Clado Harzianum (*T. harzianum* e *T. tomentosum*), Clado Stromaticum (*T. stromaticum*), Clado Viride (*T. koningiopsis*), Clado Spirale (*Trichoderma* sp. e *T. spirale*). O isolado CEN159, ainda não identificado, (*Trichoderma* sp.) agrupou-se junto com *T. spirale* este deverá ser incluído nos próximos sequenciamentos das regiões ITS/TEF-1 α , pois apresentou bons resultados nos ensaios *in vitro*. Caso se identifique como pertencente à espécie *T. spirale*, vale mencionar que em levantamentos recentes em sítios de *internet*, esta espécie não apareceu como ingrediente ativo de nenhum produto comercial (Mello, informação pessoal). Porém, existem outras espécies próximas, segundo agrupamento em seções estabelecido por Bisset (1991b), sendo comercializadas, tais como *T. polysporum*, *T. tomentosum* e *T. virens*. Por fim o Clado Hamatum foi composto pela espécie (*T. asperellum*).

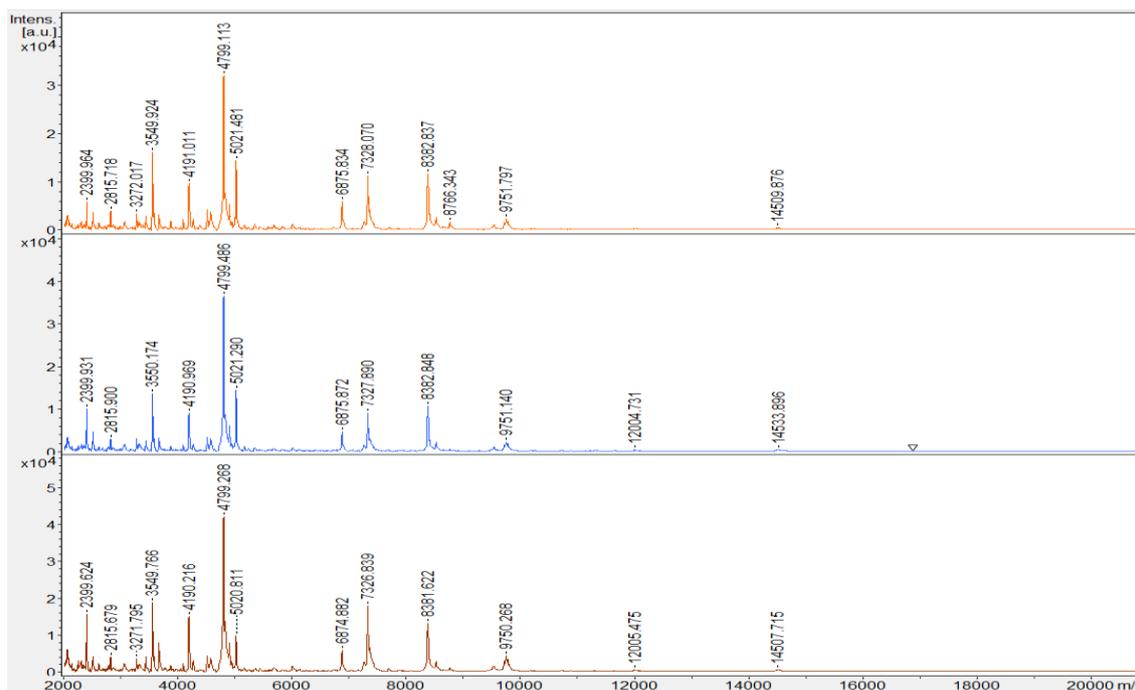


Figura 19: Espectros de massa obtidos para *T. asperellum* preparadas a partir das amostras de esporos do mesmo isolado estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 2000 e 14.000 Da.

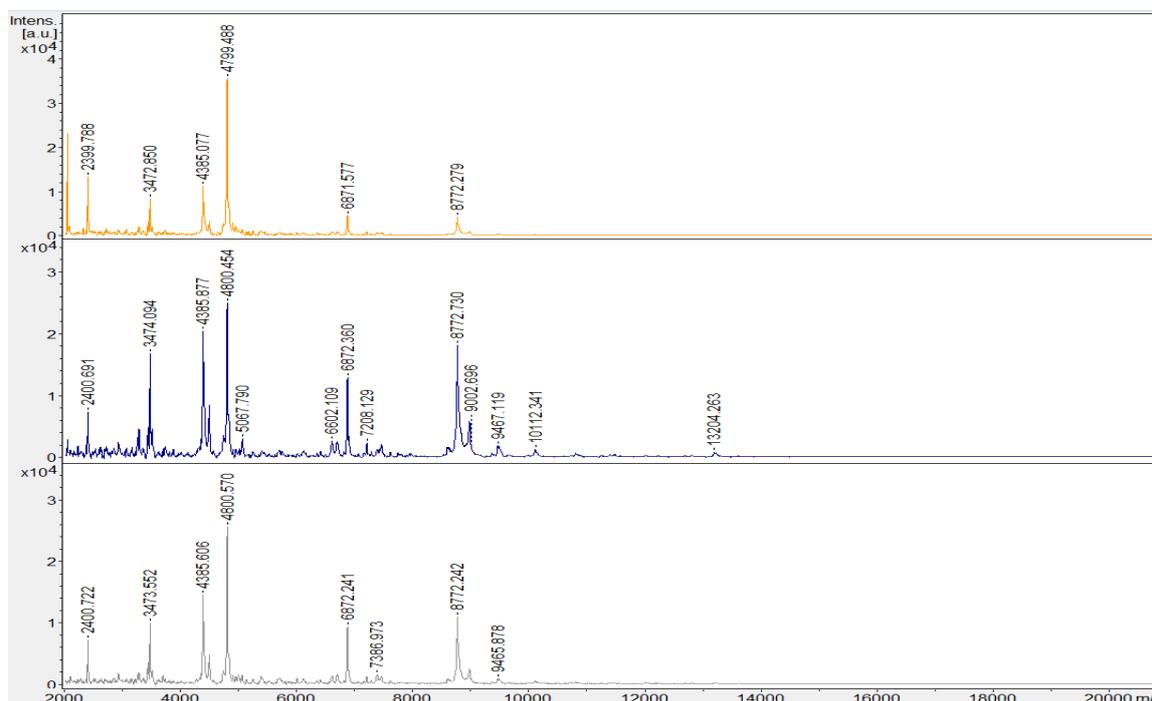


Figura 20: Espectros de massa obtidos para *T. asperellum* preparadas a partir das amostras de esporos do mesmo isolado estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 2000 e 14.000 Da.

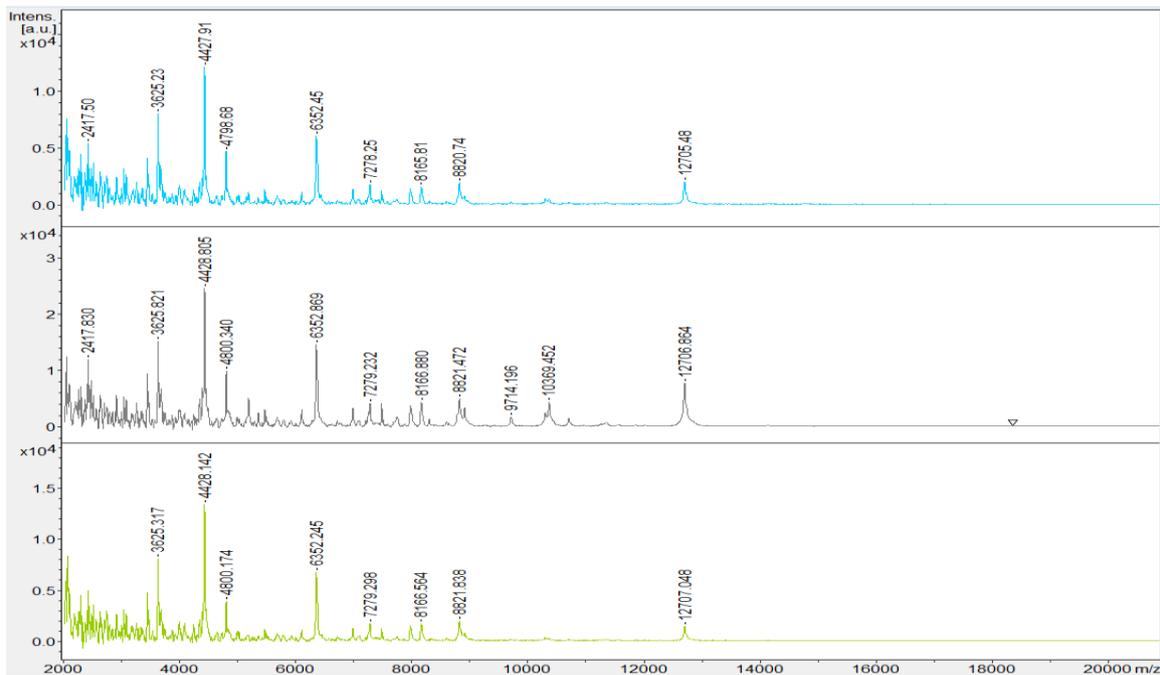


Figura 21: Espectros de massa obtidos para *T. harzianum* preparadas a partir das amostras de esporos do mesmo isolado estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 2000 e 13.000 Da.

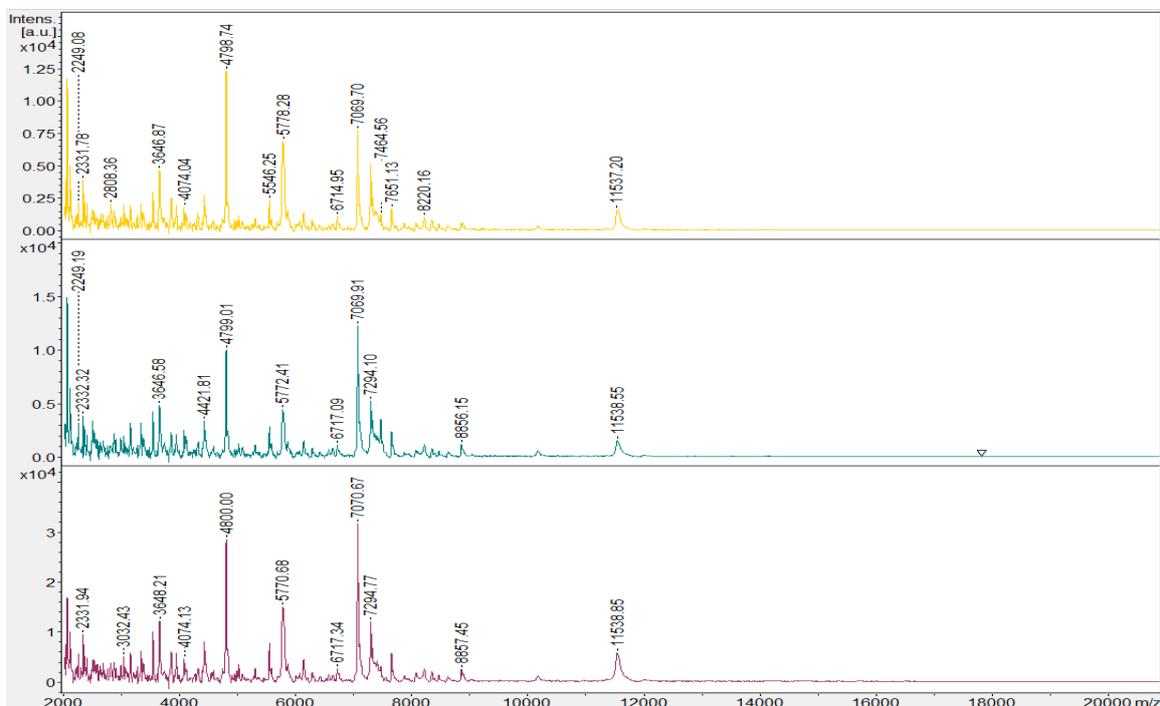


Figura 22: Espectros de massa obtidos para *T. koningiopsis* preparadas a partir das amostras de esporos do mesmo isolado estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 2000 e 12.000 Da.

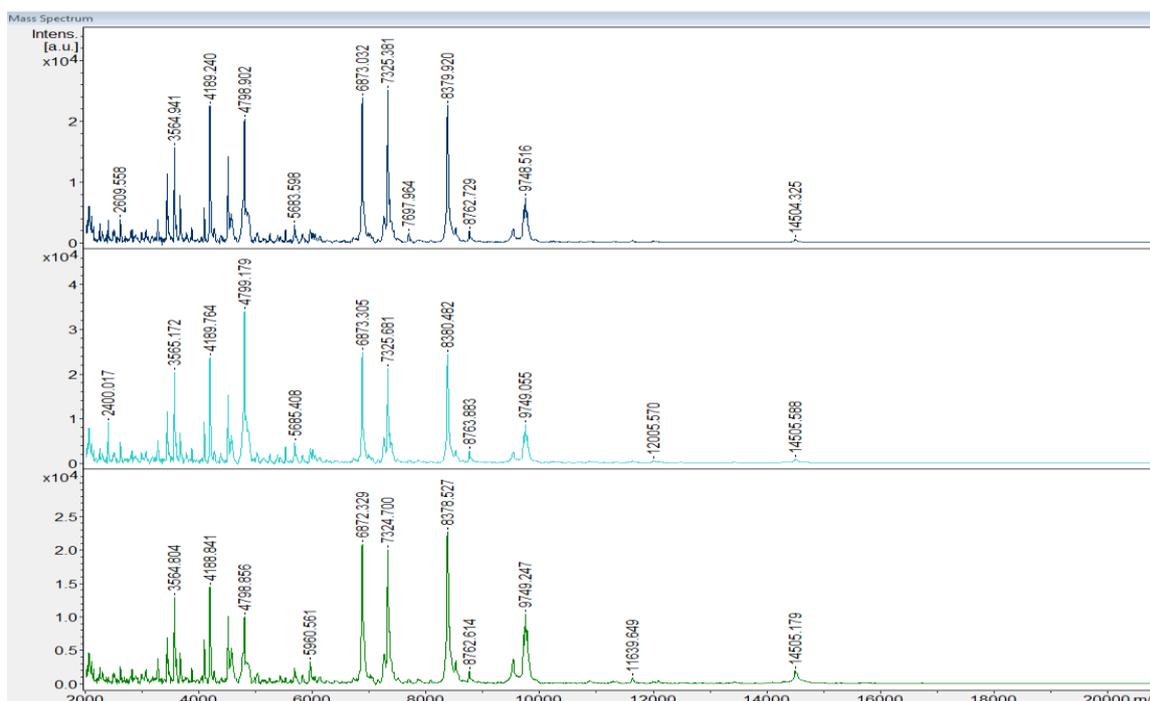


Figura 23: Espectros de massa obtidos para *T. spirale* preparadas a partir das amostras de esporos do mesmo isolado estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 2000 e 14.000 Da.

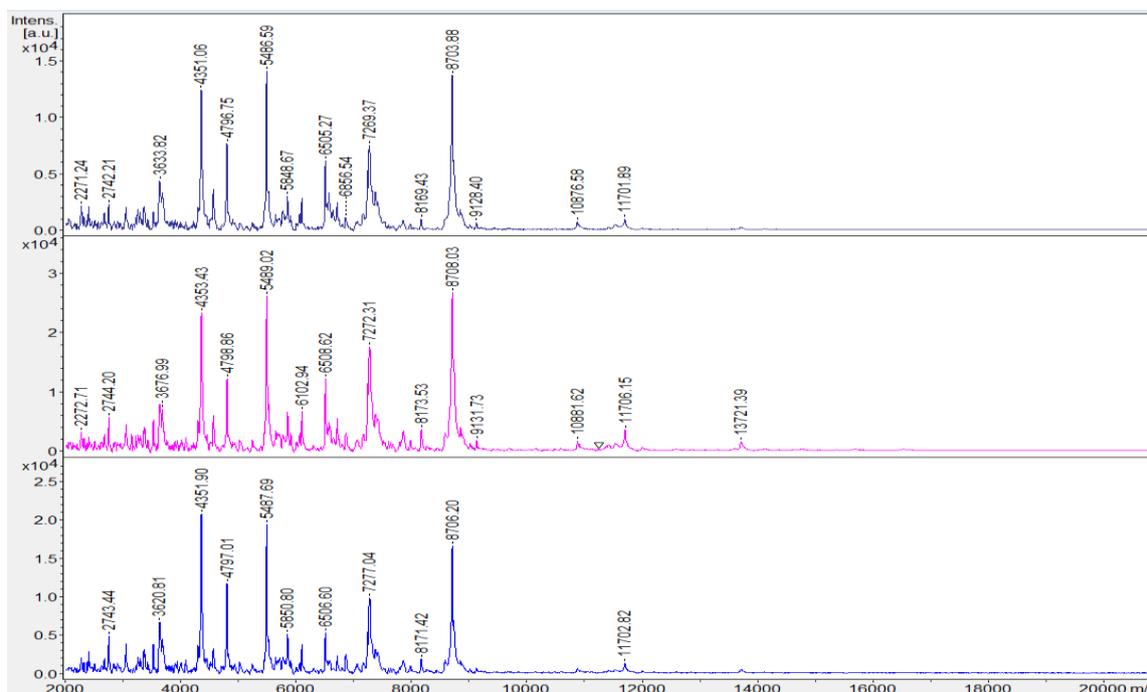


Figura 24: Espectros de massa obtidos para *T. stromaticum* preparadas a partir das amostras de esporos do mesmo isolado estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 2000 e 14.000 Da.

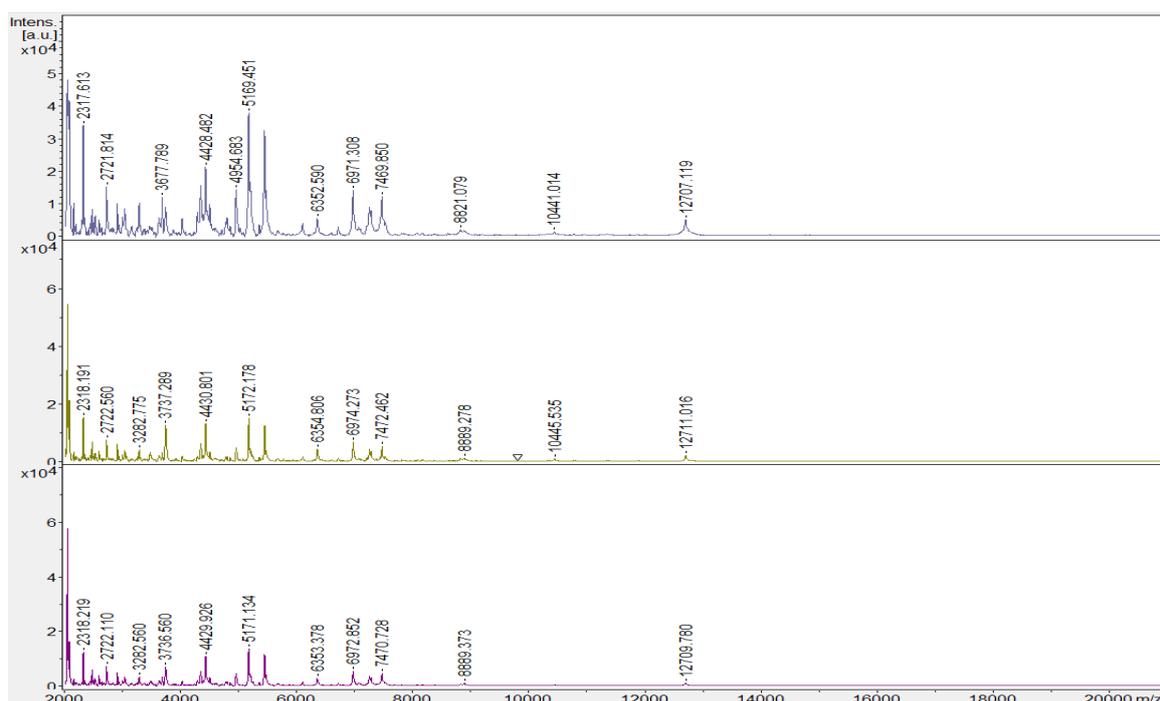


Figura 25: Espectros de massa obtidos para *T. tomentosum* preparadas a partir das amostras de esporos do mesmo isolado estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 2000 e 14.000 Da.

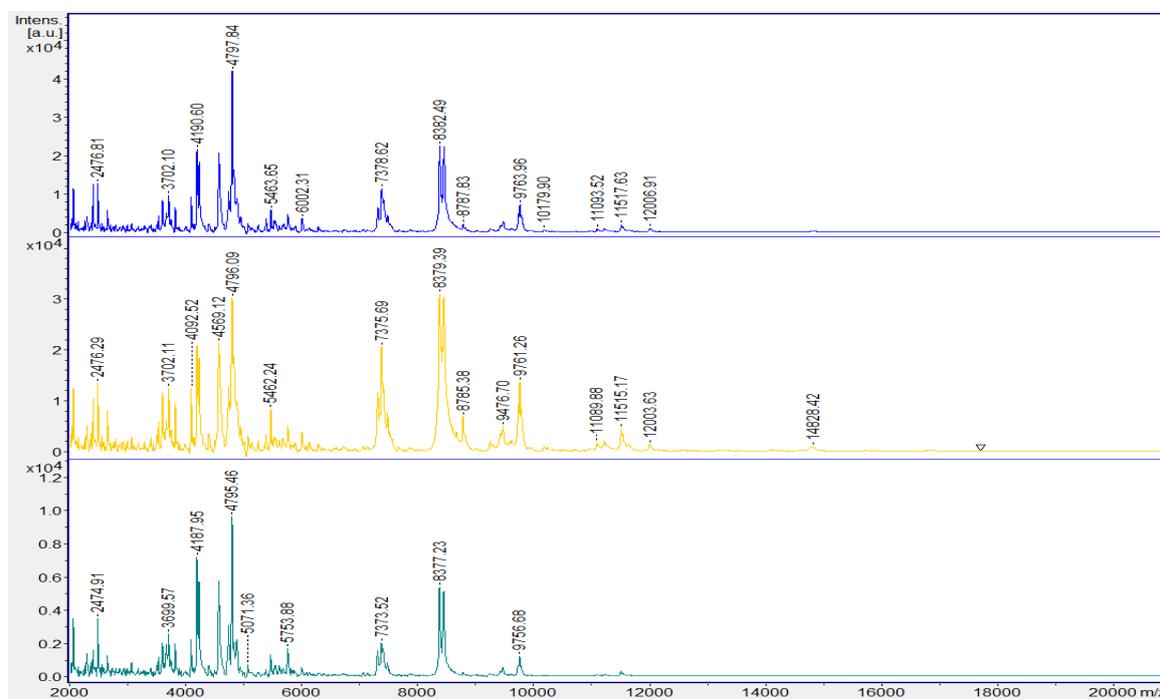


Figura 26: Espectros de massa obtidos para *Trichoderma* sp. preparados a partir das amostras de esporos do mesmo isolado estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 2000 e 14.000 Da.

Nestas análises dos perfis protéticos das espécies de *Trichoderma* por MALDI-TOF MS realizadas, os perfis, dos espectros de massa foram expressos na faixa de 2000 a 16000 m/z, para os oito isolados, utilizando amostras preparadas a partir de esporos tratados segundo metodologia citada.

Ainda com relação às Figuras 19 e 20, correspondentes a mesma espécie (*T. asperellum*), observa-se um padrão único de espectros para a espécie e repetições, obtidos com os dois isolados utilizados. As pequenas diferenças entre os espectros das duas figuras com relação à intensidade relativa e massa/carga (m/z), podem estar associadas a características peculiares de cada isolado. Por exemplo, um mesmo isolado pode apresentar em várias repetições em placa de Petri, pequenas diferenças fenotípicas que por vezes podem se refletir nos resultados.

A espécie de *T. harzianum* representada na Figura 21 apresentou o mesmo padrão de espectros para as três repetições e sua maior atividade de espectros foi expressa na faixa de 3000 a 5000 m/z. Já a espécie de *T. koningiopsis* representada na figura 22, que também exibiu o mesmo padrão de espectros para as três repetições, teve sua maior atividade de espectros expressa na faixa de 3500 a 7500 m/z. A espécie de *T. spirale* representada na Figura 23, também mostrou o mesmo padrão de espectros entre as três repetições e sua maior atividade de espectros foi expressa na faixa de 3000 a 5000 m/z e 6500 a 10000 m/z. A espécie de *T. stromaticum* representada na Figura 24, com o mesmo padrão de espectros teve sua maior atividade de espectros expressa na faixa de 4000 a 9000 m/z. Quanto à espécie de *T. tomentosum*, representada na Figura 25, com o mesmo padrão de espectros, apresentou maior atividade de espectros expressa na faixa de 2000 a 7500 m/z, embora mais significativa na primeira repetição onde os espectros possuem maior intensidade relativa quando comparado as outras duas repetições. Finalmente, a Figura 26 representa a espécie de *Trichoderma* (CEN159) não identificada nesse estudo e que exibiu espectros com maior

atividade na faixa de 3500 a 6000 m/z e 7000 a 10000 m/z. De modo geral, o padrão de espectros das três repetições diferiu dos padrões expressos nas outras espécies supracitadas. Deste modo, podemos inferir que se trata de uma espécie diferente das identificadas no presente estudo, dentro do Clado Spirale. Como mencionado anteriormente, os resultados obtidos são animadores quanto à perspectiva de, em futuro próximo, contarmos com um banco de dados que possibilitará o uso dessa técnica de forma rotineira. Essa técnica vem sendo utilizada em outros laboratórios que contam com sistema de análise e banco de dados que não estão publicamente disponíveis. De Respinis *et al.* (2010), demonstraram sucesso na identificação molecular e por MALDI-TOF MS de diversas espécies de *Trichoderma* e demonstrou o valor dessa técnica perfeitamente coerente com a técnica de comparação de sequências gênicas. Carvalho-Filho (2013) relatou convergência nos resultados entre a técnica com a análise filogenética e a análise dos perfis moleculares por MALDI-TOF MS onde a maioria dos isolados foi alocada em grupos ou clados semelhantes na árvore filogenética e no dendrograma, com exceção dos isolados das espécies *T. asperellum* e *T. koningiopsis*.

Lopes *et al.* (2014) acreditam que embora seja inerentemente uma técnica molecular, MALDI-TOF MS difere significativamente das comparações diretas de sequências genéticas que são a base da sistemática baseada filogeneticamente. Ainda de acordo com esses autores, nenhuma dessas abordagens é superior a outra e, portanto, devem ser complementares e produzir resultados paralelos, já que ambos são baseados na informação genômica. Assim sendo, esse método não deverá substituir as análises gênicas nos estudos de filogenia, pois estas se tornaram o padrão exigido de fato para quase todos os estudos taxonômicos, embora seja esperado que terá grande utilidade nas identificações rotineiras.

Com base no que foi dito, pode se afirmar que a técnica de MALDI-TOF MS vem promovendo uma revolução na identificação de microrganismos, pela sua rapidez e simplicidade, uma vez que as amostras podem ser retiradas diretamente das colônias crescidas

em placas de cultivo. A utilização de células intactas para análise produz um espectro de proteínas típicas de cada espécie, o que funciona como uma impressão digital (*fingerprinting*), que pode ser comparado aos espectros previamente identificados e depositados em banco de dados (Claydon *et al.*, 1996; Walker *et al.*, 2002; Vargha *et al.*, 2006). O tempo de análise da amostra após o crescimento em placa é de cerca de 30 segundos enquanto que em outras metodologias esse tempo pode ser de horas e até dias. Estudos de comparação mostraram que o custo, levando em conta material consumível, salários e depreciação do aparato em cinco anos, pode ser 25% menor, quando comparado à outras metodologias e o custo de análise, sem considerar custo equipamento e mão de obra, sai na ordem de centavos (Seng *et al.*, 2009; Cherkaoui *et al.*, 2010) por amostra. Uma das desvantagens desta tecnologia, é que a análise é dependente da disponibilidade do espectrômetro que é um equipamento caro e, ainda, de sistemas de análise atualmente só disponíveis comercialmente, sendo os dois principais (BIOTYPER e SARAMIS) e as entradas atuais são essencialmente de isolados clínicos o que não é adequado para quem trabalha com isolados ambientais. No entanto, há a possibilidade da criação de bancos próprios com a variedade infinita de isolados sem a necessidade da licença destes bancos. Com essa finalidade, outros membros da equipe do laboratório vem trabalhando no desenvolvimento de um banco de dados (espectros) para implementação dessa técnica na identificação de fungos do gênero *Trichoderma*.

HPLC - Metabólitos secundários de *Trichoderma asperellum*

O extrato bruto do isolado de *T. asperellum* foi testado contra *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii* utilizando a técnica do papel filtro em placas (Figura 27). Verificou-se a inibição de crescimento micelial apenas para *S. sclerotiorum*, enquanto *S. rolfsii* praticante não sofreu interferência em seu crescimento.

Com a obtenção do extrato bruto foi possível a análise cromatográfica que forneceu o cromatograma derivado da HPLC com sete frações mais representativas e intensas (Figura 28). Todas as frações coletadas (marcadas por números) apresentaram coloração transparente.

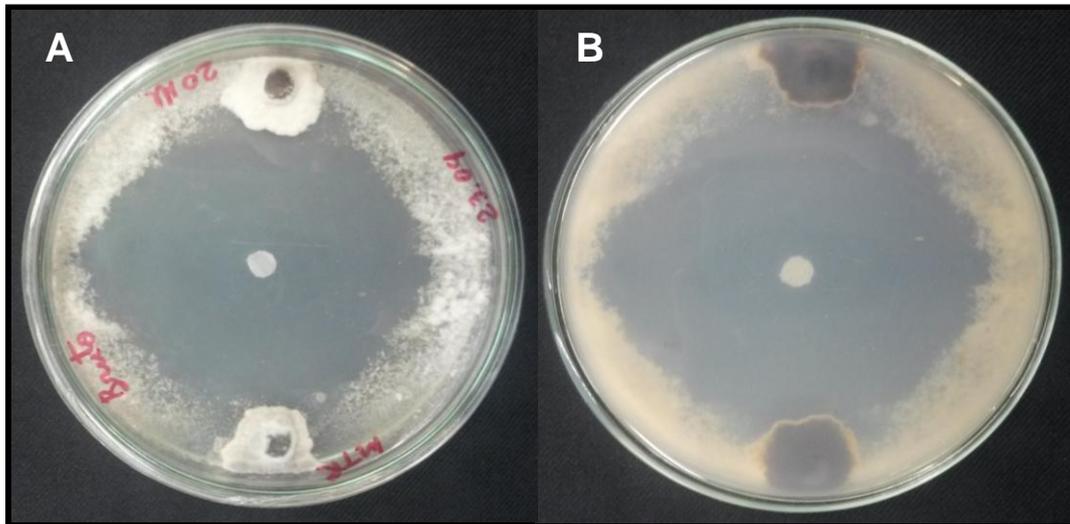


Figura 27: Inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* por extrato bruto obtido do filtrado de colônias do isolado CEN277 de *Trichoderma asperellum*.

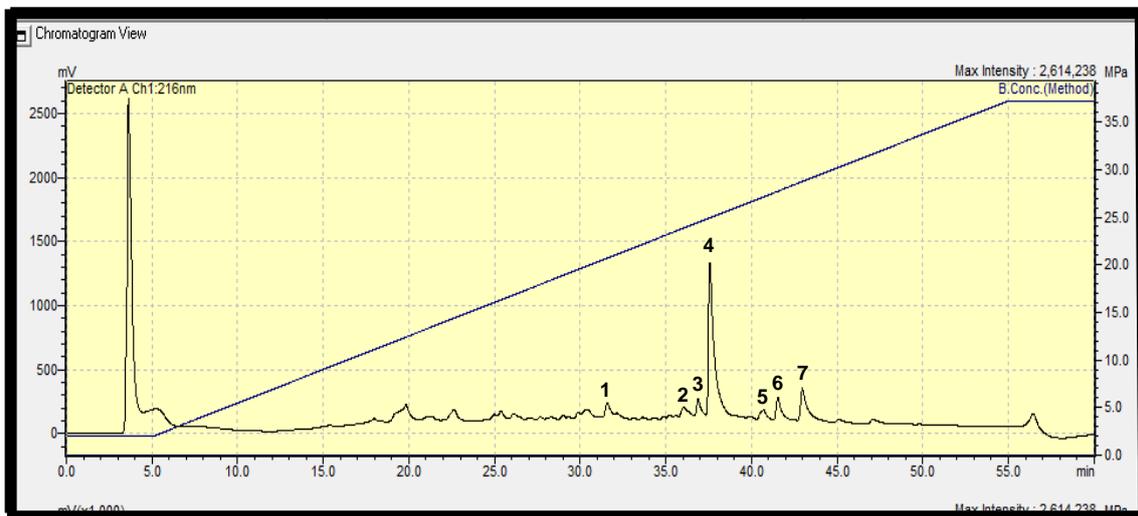


Figura 28: Cromatograma líquida de alta eficiência da corrida de 500 mL do extrato bruto do isolado CEN277 de *T. asperellum*. As frações numeradas de 1 a 7 foram testados contra *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*.

Avaliação das frações dos metabólitos secundários adquiridos por HPLC quanto à inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*.

Após o processamento das frações do extrato bruto, as mesmas foram testadas contra os patógenos, utilizando a técnica do papel filtro em placas, o que permitiu a verificação da inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* com a fração 4 eluída de coluna HPLC. As frações 1, 2, 3, 5, 6 e 7 não apresentaram inibição considerável e foram descartadas. Vale ressaltar a importância de se testar, contra outros patógenos, as frações que não se mostraram ativas em relação aos patógenos utilizados como alvo neste estudo. Nenhuma das frações apresentou atividade contra *S. rolfsii*, uma vez que não se verificou a formação de halo de inibição com esse patógeno (Figura 29).

A partir do resultado obtido com a formação do halo de inibição da fração número 4 contra *S. sclerotiorum*, verifica-se a necessidade de aprofundar os estudos no intuito de elucidar a natureza química desse material, numa próxima etapa deste trabalho.

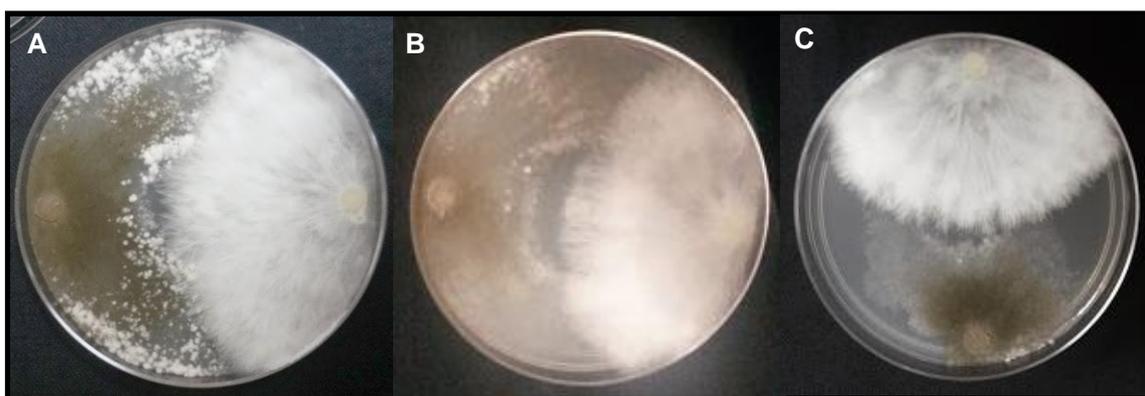


Figura 29: Bioensaio conduzido com a fração 4 dos metabólitos secundários de *T. asperellum* contra *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*.

Análises por Espectrometria de Massa

As frações coletadas (1 a 7) pela técnica de HPLC foram examinadas por MALDI-TOF MS e cada fração apresentou um padrão de espectros diferente. A fração 4 que foi a única que inibiu o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* está ilustrada na figura 30. Os espectros dessa fração se expressaram em sua maioria entre 400 a 700 m/z e 900 a 1000 m/z e todos apresentaram diferenças no padrão de espectros para cada fração.

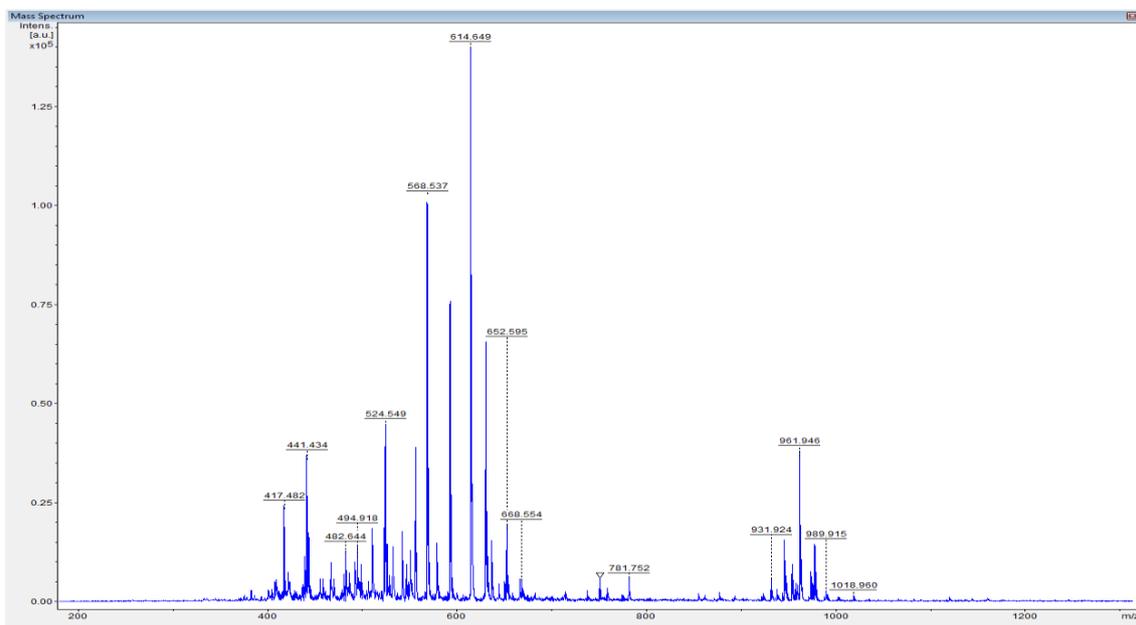


Figura 30: Espectros de massa obtidos a partir da fração 4 do metabólito bruto de *T. asperellum*. Estão indicadas a relação massa-carga (m/z), na faixa entre 200 e 12.000 Da, demonstrando maior intensidade relativa entre 400 e 700 m/z.

Na literatura recente são encontrados muitos estudos sobre metabólitos secundários produzidos por *Trichoderma*. Entretanto, pouco tem sido feito em termos de aplicação prática desses produtos. No Brasil, a baixa aplicabilidade está limitada à disponibilidade de produtos comerciais à base de *Trichoderma* legalmente registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). A difusão de conceitos, princípios e vantagens

envolvidos no uso de bioprodutos é deficiente, limitando o conhecimento dos consumidores sobre as consequências para a saúde pública e ambiental do uso intensivo de agrotóxicos (Machado *et al.*, 2012). Atualmente, a preocupação com o meio ambiente tem se tornado cada vez mais crescente e com isso uma parcela de produtores rurais já vem buscando incorporar o uso de bioprodutos alternativamente ou em conjunto com o tratamento químico, de forma a minimizar o uso destes produtos, ampliando assim, a demanda por tecnologias mais amigáveis de controle de doenças.

Em estudos recentes, Geraldine *et al.* (2013) mostraram elevada eficiência de isolados de *T. asperellum* no controle do mofo branco do feijoeiro, relacionada a alta produção de enzimas hidrolíticas, tais como NAGase e β -1,3-glucanase, envolvidas na degradação da parede celular de *S. sclerotiorum*. Tais compostos produzidos por *Trichoderma* em meio aos metabólitos secundários, devem ser estudados com maior aprofundamento pela técnica de HPLC-eletrospray purificando a fração para uma possível identificação da molécula.

Várias espécies de *Trichoderma* são reconhecidamente produtoras de metabólitos secundários, voláteis e não-voláteis, os quais apresentam amplo espectro de ação antimicrobiana (Vinale *et al.*, 2008). Dentre os metabólitos produzidos por *Trichoderma* spp. citam-se: ácido harziânico, alameticinas, antraquinonas, azafilonas, daucanas, harzialactonas, bisorbicillinoides, butenolides, tricholina, glisopreninas, ácido heptelídico, gliovirina, pironas, tricotecenos, isocianatos, trichosetina, viridina, peptaiboles, entre outros (Mohiddin *et al.*, 2010; Reino *et al.*, 2008). Na tentativa de identificar a molécula que promoveu grande inibição micelial, Carvalho Filho (2013) recromatografou as frações obtidas em coluna HPLC que apresentaram atividade e, após muitas análises, pode inferir que os compostos responsáveis por essa inibição seriam Trichopactina e Asperelina B. Fungos são organismos reconhecidamente produtores de uma grande diversidade de compostos bioativos, razão pela qual pesquisas de anos atrás, ainda continuam sendo demandadas para isolar e identificar

novos metabólitos (Archer *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2011). Esse é um desafio que pode trazer benefícios substanciais para vários setores produtivos (Gloer, 2007). Daí a importância de se abrir essa frente de trabalho nos laboratórios voltados a conservação e caracterização da biodiversidade microbiana.

Benitez *et al.* (2004) relataram que ao longo dos anos, *T. asperellum* tem agido como um eficaz agente de biocontrole de patógenos devido à produção de enzimas que hidrolisam as paredes celulares de outros microorganismos. No entanto, acredita-se que a capacidade de micoparasitismo de *Trichoderma* também esteja relacionada a grande variedade de metabólitos secundários produzidos por estes organismos (O'Brian & Wright, 2011; Mukherjee *et al.*, 2012.). Como mencionado por diversos autores citados neste trabalho, a espécie de *T. asperellum* tem se destacado entre as demais espécies com relação à inibição do crescimento micelial de fitopatógenos, entre os quais, *S. sclerotiorum*. Portanto, trata-se de um alvo de grande importância de estudos relativos à produção de metabólitos secundários.

Ensaio *in vivo* com metabólitos de *Trichoderma* em plantas de *Lupinus luteus* apresentaram bons resultados na ação preventiva da podridão branca radicular através da aplicação de 6pp (6-pentil- α -pirona) ou Harzianolide em sementes ou mudas por imersão em soluções desses metabólitos e mostrou o importante papel que esses metabólitos podem desempenhar no controle dessa doença (Arjona-Girona *et al.*, 2014). Ensaio complementares deverão ser conduzidos em trabalhos futuros, na exploração de metabólitos produzidos pelo isolado CEN277.

Estudos conduzidos por Isaias *et al.* (2014) mostraram uma proporção média de inibição do patógeno *S. rolfsii* entre metabólitos voláteis e não-voláteis estatisticamente igual apenas para um isolado de *T. koningiopsis* dentre 20 isolados, enquanto para *V. dahliae*, com exceção da testemunha, todos apresentaram diferença significativa entre metabólitos voláteis e não-voláteis, De modo geral, os não-voláteis apresentaram melhor desempenho,

corroborando os resultados obtidos por Montalvão (2012) com outros isolados de *Trichoderma* da coleção, sobre *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*. Sendo assim, esses resultados de pesquisa contribuem para a crença de uma melhor eficiência dos metabólitos não-voláteis.

Com base nessas informações existentes na literatura, testou-se neste trabalho a ação metabólica do isolado CEN277 da espécie *T. asperellum*, que apresentou excelentes resultados *in vitro*. Vários isolados dessa espécie tem mostrado a habilidade de controlar diversos patógenos como *Cylindrocladium scoparium*, causador de tombamento e manchas foliares em eucalipto (Carvalho Filho *et al.*, 2008), *S. sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani* (Carvalho Filho, 2013; Braúna *et al.*, 2009), *Verticillium dahlia* e *S. rolfsii* (Isaias *et al.*, 2014). Diversos autores (Kolombet *et al.*, 2008; Nagayama *et al.*, 2007; Mbarga *et al.*, 2012; Shores *et al.*, 2005; Wijesinghe *et al.*, 2011; Castillo *et al.*, 2011), tem comprovado o potencial de biocontrole de *T. asperellum* com formulações específicas para sua dispersão em massa no campo e em testes de laboratório. Em posse dessas informações, enfatiza-se a importância em se levar a frente esse estudo, dando continuidade desde a produção à purificação dos metabólitos secundários produzidos por *T. asperellum*. A partir da identificação desses compostos pode-se pensar, no futuro, em utilizar tais moléculas no desenvolvimento de novos produtos de origem biológica para a agricultura.

Promoção de crescimento de plantas de feijão em casa de vegetação

Pelo método de análise do comprimento da silhueta, os isolados foram separados em grupos com médias semelhantes utilizando-se o algoritmo PAM (Partitioning Around Medoids). De acordo com a análise, os 20 isolados de *Trichoderma* separaram-se em agrupamentos distintos sendo que o número ótimo de grupos foi definido pela silhueta. Ao todo foram realizadas duas análises, uma para peso seco de parte aérea e outra para peso seco de raiz.

Para a análise de peso seco de parte aérea, formaram-se quatro grupos, como mostra na Tabela 8. O comprimento médio da silhueta foi de 0,65, indicando uma razoável separação dos grupos.

Tabela 8: Porcentagem de massa seca (g) de parte aérea de plantas de feijão, obtidos nos ensaios com relação a testemunha segundo agrupamento sugerido pelo método do comprimento médio da Silhueta. Silhueta total: 0,65.

Grupos	n	Códigos dos isolados (CEN)	Peso seco médio (g) parte aérea do feijoeiro	Promoção de crescimento do feijoeiro (%) Média +/- Desvio padrão	Média da silhueta
1	6	151, 129, 002, 277, 164, 142	0,61	29,7 +/- 0,09	0,70
2	7	152, 273, 189, 208, 190, 143, 163	0,64	36,1 +/- 0,14	0,73
3	6	157, 207, 188, 220, 200, 160	0,68	44,6 +/- 0,07	0,51
4	2	228, TEST	0,47	0,0 +/- 0,11	1

*n: Número de isolados para cada grupo.

*TEST: Planta controle sem inóculo fúngico.

Os maiores valores de massa seca de plantas de feijão estão representados nos grupos 3 (CEN157, CEN207, CEN188, CEN220, CEN200 e CEN160), seguido do grupo 2 (CEN152, CEN273, CEN189, CEN208, CEN190, CEN143 e CEN163), grupo 1 (CEN151, CEN129, CEN002, CEN227, CEN164 e CEN142) os quais foram muito superiores à testemunha. E por fim grupo 4 (CEN228 e testemunha). O incremento na promoção de crescimento médio nesses três primeiros grupos, em termos de massa seca de parte aérea variou entre 29,7% e 44,6%. O isolado do grupo 4 (CEN228) apresentou valores médios de crescimento igual ao da testemunha. Não houve resultados estatisticamente inferiores ao da testemunha.

Para análise do peso seco de raiz, o número ótimo de grupos definidos pela silhueta foi dois (Tabela 9) e o comprimento médio da silhueta foi de 0,64, indicando uma boa separação dos grupos.

Tabela 9: Porcentagem de massa seca (g) de raiz de plantas de feijão, em relação a testemunha absoluta, segundo agrupamento sugerido pelo método do comprimento médio da Silhueta. Silhueta total: 0,64.

Grupos	n	Códigos dos isolados (CEN)	Peso seco médio (g) da raiz do feijoeiro	Promoção de crescimento do feijoeiro (%) Média +/- Desvio padrão	Média da silhueta
1	8	129, 002, 220, 228, 160, 277, TEST.	0,25	13,7 +/- 0,09	0,55
2	14	200, 190, 208, 188, 273, 163, 157, 151, 143, 152, 142, 164, 189, 207.	0,35	20,6 +/- 0,07	0,69

*n: Número de isolados para cada grupo.

*TEST: Planta controle sem inóculo fúngico.

O maior valor referente a massa seca de raiz está representado no grupo 2 (CEN200, CEN190, CEN208, CEN188, CEN273, CEN163, CEN157, CEN151, CEN143, CEN152, CEN142, CEN164, CEN189 e CEN207), o qual os isolados foram superiores a testemunha. O incremento na promoção de crescimento médio nesse grupo foi de 20,6%. Os isolado do grupo 1 (CEN129, CEN002, CEN220, CEN228, CEN160, CEN277 e TEST) apresentaram valores de crescimento próximos da testemunha com incremento médio de 13,7%. Não houve valores inferiores ao da testemunha, sugerindo que os isolados testados não prejudicaram o desenvolvimento das raízes das plântulas.

Os efeitos benéficos de *Trichoderma* como crescimento de plantas, podem ser atribuídos a uma ação indireta do fungo, como aumento da resistência da planta, tanto a agentes bióticos como a agentes abióticos, como afirmado por vários autores (Akladious & Abbas, 2012; Sharma *et al.*, 2012; Affokpon *et al.*, 2011; Fontenelle *et al.*, 2011; Harman, 2004). Aparentemente foi o que ocorreu no presente estudo. Todos os ensaios realizados demonstraram o potencial de distintos isolados de *Trichoderma* testados. Esses resultados corroboram os obtidos por Montalvão (2012) onde houve incremento na raiz e parte aérea em

plântulas de tomate. Em trabalho semelhante o tratamento de solo com suspensão de conídios de *T. harzianum* promoveu aumento do peso de massa seca superior à testemunha, no feijoeiro de 10,3%, no rabanete de 8,3%, no tomateiro de 36,8%, na pimenteira de 41,7% e no pepineiro de 93,3% (Chang *et al.*, 1986).

Estudos realizados com plantas de milho conduzidos por Resende *et al.* (2004) indica maior acúmulo de matéria seca das raízes. Já que Carvalho Filho *et al.* (2008) não verificou incremento na promoção de crescimento em ensaios com *Trichoderma* em Eucalipto. Esses resultados sugerem que a promoção de crescimento de plantas, depende fortemente da interação isolado e espécie vegetal.

Harman (2000) realizou experimento que mostra maior crescimento de raízes de soja e milho tratadas com *T. harzianum* T-22 e maior produtividade de pimentão, comparados com testemunhas não tratadas. Os mesmos autores, em 2004, comprovaram em seus estudos que o isolado T-22 da espécie *T. harzianum* foi altamente capaz de promover o crescimento de plantas e auxiliar no controle e resistências a doenças. Pereira *et al.* (2014) comprovou que *T. harzianum* foi capaz de promover o crescimento de plantas de feijão comum, como mostrado pelo aumento na raiz/áreas foliares e por tamanho em comparação com plantas crescidas na sua ausência. Portanto, os dados obtidos neste trabalho corroboram inúmeros outros existentes na literatura, mostrando a importância dos fungos do gênero *Trichoderma* como promotores de crescimento de plantas.

Vale enfatizar que *Trichoderma* spp. são organismos vivos cujas atividades dependem principalmente das diferentes condições físico-químicas e ambientais a que são submetidos. Os isolados CEN207 (*T. koningiopsis*), CEN188 (*T. spirale*), CEN200 (*T. koningiopsis*) e CEN189 (*T. spirale*) selecionados em testes *in vivo* foram considerados como excelentes promotores de crescimento feijoeiro. Entretanto, são necessários mais estudos que incluam testes de campo para confirmação dessas características visando à utilização desses isolados.

Alguns outros aspectos relativos à atividade de *Trichoderma* merecem ser destacados. Por exemplo, Hermosa *et al.* (2012) verificou que a promoção de crescimento em plantas está relacionada também ao processo de solubilização de nutrientes do solo, como o fósforo, por esses fungos, otimizando a disponibilização e aproveitamento desse elemento pelas plantas, resultando em aumentos significativos na massa seca, comprimento da parte aérea e da área foliar. Esse grupo de fungos também pode produzir metabólitos com atividades análogas e fitohormônios, como ácido indol acético-AIA como descrito por Cutler *et al.* (1989). Friedl & Druzhinina (2012) observaram que a maioria dos isolados de *Trichoderma* são exímios colonizadores de ambientes radiculares e 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. Portanto, são diversos os mecanismos envolvidos no estímulo de crescimento das plantas por *Trichoderma* spp. e este permanece como um campo a ser explorado.

CONCLUSÃO

- ✓ Os ensaios *in vitro* permitiram a seleção inicial de isolados de *Trichoderma* que possuem ação inibitória do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*.
- ✓ O isolado CEN277 foi o que apresentou melhor desempenho, considerando-se os dois ensaios, pareamento de cultura, com nota 1 um em relação à inibição do crescimento de ambos os patógenos e 100% de inibição por metabólitos não-voláteis.
- ✓ Os isolados CEN141, CEN161, CEN170, CEN171, CEN173, CEN194, CEN223, CEN277 e CEN281 também se destacaram com relação ao pareamento de culturas, com nota 1 pra ambos os patógenos.
- ✓ Os Isolados CEN002, CEN143, CEN159, CEN160, CEN162, CEN201, CEN207, CEN219, CEN222, CEN227, CEN229, CEN252, CEN254, CEN265, CEN277 e CEN287, com taxa de inibição de 100% para *S. sclerotiorum* devem ser considerados para futuros ensaios de biocontrole do mofo branco.
- ✓ Os CEN001, CEN125, CEN126, CEN127, CEN129 e CEN280 com taxa de inibição entre 94 e 98% por metabólitos não-voláteis contra *S. rolfsii*, são indicados para novos testes visando ao controle da podridão de esclerócios.
- ✓ Cinquenta e um isolados de *Trichoderma* foram caracterizados molecularmente utilizando duas regiões (ITS e TEF-1 α). As árvores filogenéticas geradas a partir da caracterização e correspondentes a cada região, não foram divergentes e formaram 5 clados. A região TEF-1 α separou melhor os grupos monofiléticos.
- ✓ Os oito isolados de *Trichoderma* correspondentes as diferentes espécies identificadas que foram selecionados para o MALDI TOF, se agruparam conforme o esperado formando

clados no dendrograma, mostrando a adequação dessa técnica associada ao Sistema Biotype de análise, para identificação de espécie desse gênero.

- ✓ As investigações com a fração 4 do metabólito bruto extraído do isolado CEN277 (*T. asperellum*)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFOKPON, A.; COYNE, D.L.; HTAY, C.C.H.; AGBÈDÈ, R.D.; 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.

AGRAWAL, S.C.; KHARE, M.N. & AGRAWAL, P.S. 1977. Biological control of *Sclerotium rolfsii* causing collar rot of lentil. Indian Phytopathology, 30:176-179.

AGRIOS, G.N. 2005. Plant pathology. Academic Press, New York.

AKLADIOUS, A.S. & ABBAS, S.M. 2012 Application of *Trichoderma harziunum* T22 as a
ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. & LIPMAN, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research, 25:3389-3402.

AMIN, F.; RAZDAN, V.K.; MOHIDDIN, F.A.; BHAT, K.A. & BANDAY, S. 2010. Potential of *Trichoderma* species as biocontrol agents of soil borne fungal propagules. Journal of Phytology, 2:38-41.

AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN-FILHO, A. 2011. Manual de Fitopatologia. Piracicaba: Agronômica Ceres. I: 4 ed. 383-387.

ARCHER, D.B.; CONNERTON, I.F.; MACKENZIE, D.A. 2008. Filamentous fungi for production of food additives and processing aids. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, 111: 99-147.

- ARJONA-GIRONA, F.; VINALE, D.; RUANO-ROSA, LORITO, M. & LÓPEZ-HERRERA, C.J. 2014. Effect of metabolites from different *Trichoderma* strains on the growth of *Rosellinia necatrix*, the causal agent of avocado white root rot. *European Journal of Plant Pathology*, 140: 2 385-397.
- BAILEY, J.A. 1985. *Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions*. Springer-Verlag, Berlin, German.
- BARBOSA, F.B. & GONZAGA, A.C.O. 2012. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014. Embrapa Arroz e Feijão, Documentos 272.
- BARBOSA, F.B.; GONZAGA, A.C.O.; SILVEIRA, P.M.; SILVA, C.C.; QUINTELA, E.D.; LOBO JUNIOR, M.; COBUCCI, T.; LIMA, I.M.; GASPARETTO, C.A.; PRADO, L.S. & SATO, L.M. 2010. Validação do Sistema de Produção Integrada do Feijão Comum (*Phaseolus vulgaris* L.) na Região Central Brasileira. Circular Técnica, 87. Embrapa Arroz e Feijão. Santo Antônio de Goiás.
- BELL, D.K.; WELLS, H.D. & MARKHAM, C.R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72:379-382.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C. & CODÓN, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7: 249-260.
- BERNARDES, T.G.; SILVEIRA, P.M. & MESQUITA, M.A.M. 2010. Regulador de crescimento e *Trichoderma harzianum* aplicados em sementes de feijoeiro cultivado em sucessão a culturas de cobertura. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 40:(4) 439-446.

BETTIOL, W. & GHINI, R. 2001. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. *In*: Michereff, S.J. & Barros, R. Proteção de plantas na agricultura sustentável. Imprensa Universitária. Recife. 368 p.

BETTIOL, W. 1991. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. *In*: Bettiol, W. (org.). controle bioquímico de doenças de plantas. Jaguariúna: Embrapa centro nacional de pesquisa de defesa da agricultura. p.1-3.

BILLE, E.; DAUPHIN, B.; LETO, J.; BOUGNOUX, M.E.; BERETTI, J.L.; 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. 1984. A revision of the genus *Trichoderma* sp. Sect. *Longibrachiatum* sect. *Canadian Journal of Botany*, 69:(1) 924-931.

BISSET, J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. *Canadian Journal of Botany*, 69:2372-2417.

BISSET, J. 1991c. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. *Canadian Journal of Botany*, 69:2418-2420.

BISSETT, J.; SZAKACS, G.; NOLAN, C.A.; DRUZHININA, I., GRADINGER, C. & KUBICEK, C.P. 2003. New species of *Trichoderma* from Asia. *Canadian Journal of Botany*, 81:570-586.

BOLTON, M.D.; THOMMA, B.P.H.J. & NELSON, B.D. 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 7:(1) 1-16.

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

BRAÚNA, L.M.; MARTINS, I.; SILVA, J.B.T. & MELLO, S C.M. 2009. Efeito de quatro diferentes métodos de preservação sobre o crescimento e a viabilidade de fungos agentes de controle biológico. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Circular Técnica, 88). 8p.

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.

CARVALHO D.D.C.; OLIVEIRA, D.F.; CAMPOS, V.P.; PASQUAL, M.; GUIMARÃES, R.M. & CORRÊA, R.S.B. 2006. Avaliação da capacidade de produzir fitotoxinas *in vitro* por parte de fungos com propriedades antagônicas a nematóides. *Ciência e Agrotecnologia*, 30:1230-1235.

CARVALHO FILHO, M.R. 2013. Identificação e relações filogenéticas, potencial de uso de isolados de *Trichoderma* no controle do mofo branco e como promotores de crescimento do feijoeiro. Tese de doutorado. Universidade de Brasília.

CARVALHO FILHO, M.R.; MENÊZES, J.E.; MELO, S.C.M & SANTOS, R.P. 2008. Avaliação de isolados de *Trichoderma* no controle da mancha foliar do Eucalipto *in vitro* e quanto a esporulação em dois substratos sólidos. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; LOBO JUNIOR, M. & SILVA, M.C. 2011. Controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. Tropical Plant Pathology, 36:(1) 28-34.

CASTILLO, F.D.H.; PADILLA, A.M.B.; MORALES, G.G.; SILLER, M.C.; HERRERA, R.R.; GONZALES, C.N.A. & REYES, F.C. 2011. *In Vitro* Antagonist Action of *Trichoderma* Strains Against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 6:410-417

CHANG, YA-CHUN; CHANG, YIH-CHANG & BAKER, R. 1986. Increased Growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. Plant Disease, 70:2. 145-148.

CHAVERRI, P.; CANDOUSSAU, F. & SAMUELS, G.J. 2004a. *Hypocrea phyllostachydis* and its *Trichoderma* anamorph, a new bambusicolous species from France. Mycological Progress, 3:29-36.

CHAVERRI, P.; CASTLEBURY, L.A.; OVERTON, B.E., & SAMUELS, G.J. 2004b. *Hypocrea/Trichoderma*: Species with conidiophore elongations and green conidia. *Mycologia*, 95:1100-1140.

CHERKAOUI, A.; HIBBS, J. & EMONET, S. 2010. Comparison of two matrixassisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine bacterial speciation. *Journal of Clinical Microbiology*, 48:1169-1175.

CLAYDON, M.A.; DAVEY, S.N.; EDWARDS-JONES, V. & GORDON, D.B. 1996. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nature Biotechnology*, 14:1584-1586.

CONSOLO, V.F.; MONACO, C.I.; CORDO, C.A. & SALERNO, G.L. 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.

COOK, R.J. & BAKER, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society, St.Paul, MN.

CROXATTO, A; PROD'HOM, G. & GREUB, G. 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology, 36:(2)380-407.

CUTLER, H.G; HIMMELSBACH, D.S.; ARRENDABLE, R.E.; COLE, P.D.; & COX, R.D. 1989. Koningin A: a novel plant growth regulator from *Trichoderma koningii*. *Agricultural Biological Chemistry*, 53:(10) 2604-2611.

DE RESPINIS, S.; VOGEL, G.; BENAGLI, C.; TONOLLA, M.; PETRINI, O. & SAMUELS, G.J. 2010 MALDI-TOF MS of *Trichoderma*: a model system for the identification of microfungi. *Mycological Progress*, 9:79-100.

DEBOUCK, D.G. 1999. Diversity in *Phaseolus* species in relation to the common bean. *In*: Singh, S.P. Common bean improvement in the twenty-first century. Dordrecht. Kluwer. 25-52.

DEGENKOLB, T.; DIECKMANN, R.; NIELSEN, K.F.; GRÄFENHAN, T.; THEIS, C.; ZAFARI, D.; CHAVERRI, P.; ISMAIEL, A.; BRÜCKNER, H.; VON DÖHREN, H.; THRANE, U.; PETRINI, O. & SAMUELS, G.J. 2008. The *Trichoderma brevicompactum* clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. *Mycological Progress*, 7:177-219.

DEL CHIERICO F.; 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.

DENNIS, C. & WEBSTER, J. 1971a. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57: 25-39.

DENNIS, C. & WEBSTER, J. 1971b. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57: 41-48.

DEVI, P.; PRABHAKARAN, N.; KAMIL, D.; PANDEY, P. & BORAH, J.L. 2012. Characterization of Indian native isolates of *Trichoderma* spp. and assessment of their bio-control efficiency against plant pathogens. African Journal of Biotechnology, 11:(85) 15150-15160.

DRUZHININA, I. & KOPCHINSKIY, A. 2008. International Subcommittee on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy. *ISTH*. Available from: <http://isth.info/biodiversity/index.php>. Consultado em: mar. 2013.

DRUZHININA, I.S.; KOPCHINSKIY, A.G.; KOMON, M.; BISSETT, J.; SZAKACS, G. & KUBICEK, C.P. 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. Fungal Genetics and Biology, 42:813-828.

ELAD, Y.; CHET, I. & HENIS, Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Canadian Journal of Microbiology, 28:(7)719-725.

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.

ESPOSITO, E. & SILVA, M. 1998. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. Critical Reviews in Microbiology, 24:(2) 89-98.

FIGUEIRÊDO, G.S.; FIGUEIRÊDO, L.C.; CAVALCANTI, F.C.N.; SANTOS, A.C.; COSTA, A.F. & OLIVEIRA, N.T. 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, A.D.B.; GUZZO, S.D.; LUCON, C.M.M. & 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, M.A. & DRUZHININA, I.S. 2012. Taxon-specific metagenomics of *Trichoderma* reveals a narrow community of opportunistic species that regulate each other's development *Microbiology*, 158:69-83.

FRISVAD, J.C.; THRANE, U. & FILTENBORG, O. 1998. Role and use of secondary metabolites in fungal taxonomy. *In*: Frisvad, J.C.; Bridge, P.D. & Arora, D.K. *Chemical Fungal Taxonomy*. New York. 289-319.

FUJIMORI, F. & OKUDA, T. 1994. Application of the random amplified polymorphic DNA using the polymerase chain reaction for efficient elimination of duplicate strains in microbial screening. *I Fungi. Journal of Antibiotics*, 47: 173-182.

GAMS, W. & BISSETT, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. *In*: Kubicek, C.P. and Harman, G.E. *Trichoderma and Gliocladium*, Basic Biology, Taxonomy and Genetics London. v.1, p.3-34.

GERALDINE, A.M.; LOPES, F.A.C.; CARVALHO, D.D.C.; BARBOSA, E.T.; RODRIGUES, A.R.; BRANDÃO, R.S.; ULHOA, C.J. & LOBO-JUNIOR, M. 2013. Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. *Biological Control*, 67:308-316.

GLOER, G.B. 2007. Applications of Fungal Ecology in the Search for New Bioactive Natural Products, In: Kubicek, C.P.; Druzhinina, I.S. Environmental and Microbial Relationships, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Goulart, V.A.M.; Resende, R.R. 2013. MALDI-TOF: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do câncer. Nanocell News, 1:(3). <http://dx.doi.org/10.15729/nanocellnews.2013.11.21.001>. Acessado em Dez. 2013.

GRESSEL, J.B. & HARTMANN, K.M. 1968. Morphogenesis in *Trichoderma*: Actium Spectrum of Photoinduced Sporulation Planta, 79:271-274.

GRONDONA, I.; HERMOSA, R.; TEJADA, M.; GOMIS, M.; MATEOS, P.; BRIDGE, P.; MONTE, E.; & GARCIA-ACHA, I. 1997. Physiological and Biochemical Characterization of *Trichoderma harzianum*, a Biological Control Agent Against Soilborne Fungal Plant Pathogens. Applied and Environmental Microbiology, 63:(8)3189-3198.

HALL, T.A. 1999. Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. Nucleic Acids Symposium Series, 41:95-98

HARAN, S.; SCHICKLER, H. & CHET, I. 1996. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology, 142:2321-3131.

HARMAN, G.E. & KUBICEK, C.P. 1998. *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 2: Enzymes, biological control and commercial applications. London, Taylor & Francis. 393p.

HARMAN, G.E. 2000. Myth and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease, 84:377-393.

HARMAN, G.E. 2004. *Trichoderma* – not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica*, 39:103-108.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I. & LORITO, M. 2004. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2:43-56.

HERMOSA, M.R.; GRONDONA, I.; ITURRIAGA, E.A.; DIAZ-MINGUEZ, J.M.; CASTRO, C.; MONTE, E. & GARCIA-ACHA, I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied Environmental Microbiology*, 66:(5) 1890-1898.

HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I. & MONTE, E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its Genes. *Microbiology*, 158:17-25.

HIBBETT, D.S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J.F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P.F.; ERIKSSON, O.; HUHDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P.M.; LÜCKING, R.; LUMBSCH, T.; LUTZONI, F.; MATHENY, P.B.; MCLAUGHLIN, D.J.; POWELL, M.J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C.L.; SPATAFORA, J.W.; STALPERS, J.A.; VILGALYS, R.; AIME, M.C.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G.L.; CASTLEBURY, L.A.; CROUS, P.W.; DAI, Y-C.; GAMS, W.; GEISER, D.M.; GRIFFITH, G.W.; GUEIDAN, C.; HAWKSWORTH, D.L.; HESTMARK, G.; HOSAKA, K.; HUMBER, R.A.; HYDE, K.; KÖLJALG, U.; KURTZMAN, C.P.; LARSSON, K-H.; LICHTWARDT, R.; LONGCORE, J.; MIADLIKOWSKA, J.; MILLER, A.; MONCALVO, J-M.; MOZLEY- STANDRIDGE, S.; OBERWINKLER, F.; PARMASTO, R.; REEB, V.; ROGERS, J.D.; ROUX, C.; RYVARDEN, L.; SAMPAIO, J.P.; SCHUESSLER, A.; SUGIYAMA, J.; THORN, R.G.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W.A.; WALKER, C.; WANG, Z.; WEIR, A.; WEISS, M.;

WHITE, M.; WINKA, K.; YAO, Y-J.; & ZHANG, N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111:509-547.

HOWELL, C.R. 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease*, 87:(1) 4-10.

HOWELL, C.R. 2005. Understanding the Mecanismos Employed by *Trichoderma virens* to Effect Biological Control of Cotton Diseases. *The Nature and Application of Biocontrol Microbes II: Trichoderma spp.* 227-232.

HOWELL, C.R. 2006. Effect of seed quality and fungicide/*Trichoderma* spp. seed treatments on pre- and post-emergence damping-off in cotton. *Phytopathology*, 97:66-71.

HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S. & BISSETT, J. 2009. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological Control*, 51:409-416.

INBAR, J.; ABRAMSKY, M. & COHEN, D. 1994. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedling grown under commercial conditions. *The European Journal of Plant Pathology*, 100:337–346.

INDEX FUNGORUM. <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp?pg=1>. Consultado em Fev. 2014.

ISAIAS, C.O.; MARTINS, I.; SILVA, J.B.T.; SILVA, J.P. & MELLO, S.C.M. 2014. Ação antagonica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. *Summa Phytopathologica*, 40:(1) 34-41.

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

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. *Mycological Research*, 107:47-56.

JAKLITSCH, W.M.; KOMON, M.; KUBICEK, C.P.; DRUZHININA, I.S. 2005. *Hypocrea voglmayrii* sp. nov. from the Austrian Alps represents a new phylogenetic clade in *Hypocrea/Trichoderma*. *Mycologia*, 97:1365-1378.

JAKLITSCH, W.M.; SAMUELS, G.J.; DODD, S.L.; LU, B.S. & DRUZHININA, I.S. 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.

KELLER, B.O., SUI, J., YOUNG, A.B. AND WHITTAL, R.M. 2008. Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 627:71-81.

KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. & REZENDE, J. A. M. 2011. *Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas*. Ceres, São Paulo.

KISTLER, H.C.; BOSLAND, P.W.; BENNY, U.; LEONG, S. & WILLIAMS, P.H. 1987. Relatedness of strains of *Fusarium oxysporum* from crucifers measured by examination of mitochondrial and ribosomal DNA. *Phytopathology*, 77:(9) 1289-1293.

KLUTHCOUSKI, J.; AIDAR, H. & THUNG, M. 2007. Principais problemas da cultura do feijão no Brasil. *In*: Fancelli, A.L. & Dourado-Neto, D. Feijão: estratégias de manejo para alta produtividade. Piracicaba. p.53-102.

KOLOMBET, L.V.; ZHIGLETSOVA, S.K.; KOSAREVA, N.I.; BYSTROVA, E.V.; DERBYSHEV, V.V.; KRASNOVA, S.P. & SCHISLER, D. 2008. Development of an extended shelf-life, liquid formulation of the biofungicide *Trichoderma asperellum* World Journal Microbiol Biotechnol, 24:123-131

KOVACS, K.; SZAKACS, G.; PUSZTAHELYI, T. & PANDEY, A. 2004. Production of chitinolytic enzymes with *Trichoderma longibrachiatum* IMI 92027 in solid substrate fermentation. Applied Biochemistry and Biotechnology, 118:189-204.

KRAUS, G.F.; DRUZHININA, I.; GAMS, W.; BISSETT, J.; ZAFARI, D.; SZAKACS, G.; KOPTCHINSKI, A.; PRILLINGER, H.; ZARE, R. & KUBICEK, C.P. 2004. *Trichoderma brevicompactum* sp. nov. Mycologia, 96:1059-1073.

KUBICEK, C.P.; 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 and Biology, 38:310-319.

KUHLS, K.; LIECKFELDT, E.; SAMUELS, G.J.; KOVACS, W.; MEYER, W.; PETRINI, O.; GAMS, W.; BORNER, T. & KUBICEK, C P. 1996. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 93:7755-7760.

- KURAMAE, E.E.; SOUZA, N.L. 2002. Variabilidade genética entre *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* através de RAPD e sequências de regiões ITS e rDNA. *Acta Scientiarum*, 24:(5)1481-1485.
- LEUCHTMANN, A.; PETRINI, O. & SAMUELS, G.J. 1996. Isozyme subgroups in *Trichoderma* section Longibrachiatum. *Mycologia*, 88:384-394.
- LI DESTRI NICOSIA, M.G.; MOSCA, S.; MERCURIO, R. & SCHENA, L. 2014. Dieback of *Pinus nigra* seedlings caused by a strain of *Trichoderma viride*. *Plant Disease*, 99:(1) 1-29.
- LIECKFELDT, E.; SAMUELS, G.J. & NIRENBERG, H.I. 1999. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: Is it one or two species? *Applied and Environmental Microbiology*, 65:2418-2428.
- LOBUGLIO, K.F.; PITT, J.I. & TAYLOR, J.W. 1993. Phylogenetic analysis of two ribosomal DNA regions indicates multiple independent losses of a sexual *Talaromyces* state among asexual *Penicillium* species in the subgenus *Biverticillum*. *Mycologia*, 85:592-604.
- LOPES, R.B.; FARIA, M.; SOUZA, D.A.; BLOCH JR, C.; SILVA, L.P. & HUMBER, R. A. 2014. MALDI-TOF mass spectrometry applied to identifying species of insect pathogenic fungi from the *Metarhizium anisopliae* complex. *Mycologia*, 106:(4) 865-78.
- LÓPEZ-QUINTERO, C.A.; ATANASOVA, L.; FRANCO-MOLANO, A.E.; GAMS, W.; KOMON-ZELAZOWSKA, M.; THEELEN, B.; MULLER, W.H.; BOEKHOUT, T. & DRUZHININA, I. 2013. DNA barcoding survey of *Trichoderma* diversity in soil and litter of the Colombian lowland Amazonian rainforest reveals *Trichoderma strigosellum* sp. nov. and other species. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104:(5) 657-674.

LOUZADA, G.A.S.; CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; LOBO JÚNIOR, M.; MARTINS, I. & BRAÚNA, L.M. 2009. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. *Biota Neotropica*, 9:(3) 145-149.

LU, B.S.; DRUZHININA, I.S.; FALLAH, P.; CHAVERRI, P.; GRADINGER, C.; KUBICEK, C.P. & SAMUELS, G.J. 2004. *Hypocrea/Trichoderma* species with pachybasium-like conidiophores: Teleomorphs for *T. minutisporum* and *T. polysporum* and their newly discovered relatives. *Mycologia*, 96:310-342.

MACHADO, D.F.M.; PARZIANELLO, F.R.; SILVA, A.C.F. & ANTONIOLLI, Z.I. 2012. *Trichoderma* no Brasil: O Fungo e o Bioagente. *Revista de Ciências Agrárias*, 35:(26) 274-288.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao/saiba-mais>. Consultado em: Ago. 2013.

MARTINS, M.V.V.; SILVEIRA, S.F.; MUSSI-DIAS, V. & VIEIRA, H.D. 2010. Efeito da temperatura e umidade do substrato na viabilidade de *Sclerotium rolfsii*. *Acta Scientiarum Agronomy*, 32:(2) 217-222.

MARTINS-CORDER, M.P. & MELO I.S. 1998. Atagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* Kleb. *Scientia Agricola*, 55:1.

MBARGA, J.B.; HOOPEN, G.M.T.; KUATÉ, J.; ADIOBO, A.; NGONKEU, M.E.L.; AMBANG, Z.; AKOA, A.; TONDJE, P.R. & BEGOUDE, B.A.D. 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.

MELLO, S.C.M.; ÁVILA, Z.R.; BRAÚNA, L.M.; PÁDUA, R.R. & GOMES, D. 2007. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 11:(1) 3-9.

MELO, I. S. & FAULL, J. L. 2000. Tombamento de plântulas e controle biológico de *Rhizoctonia solani* e *Pythium* spp. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. (Eds.) *Controle biológico*. Jaguariúna: Embrapa, 2. p. 237-262.

MELO, I.S. 1998. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogénicos. In: Melo, I.S. & Azevedo, J.L. (Ed.) *Controle biológico*. Jaguariúna. Embrapa.

MENEZES, M.E.L.; NASCIMENTO, K.L.; ERLO, R.; BRITO, E.S.; MOTA, E.F. & GAVA, C. 2007. Crescimento de isolados de *Trichoderma* sp. em diferentes fontes e concentrações de nitrogênio. *Embrapa Semi-Árido*, p. 71-76. Documentos, 205.

MIGHELI, Q.; BALMAS, V.; KOMOŃ-ZELAZOWSKA, M.; SCHERM, B.; FIORI, S.; KOPCHINSKIY, A.G.; KUBICEK, C.P. & DRUZHININA, I.S. 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.

MOHIDDIN, F.A.; KHAN, M.R.; KHAN, S.M. & BHAT, B.H. 2010. Why *Trichoderma* is considered super hero (super fungus) against the evil parasites? *Plant Pathology Journal*, 9:92-102.

MONTALVÃO, S.C.L. 2012. Potencial de *Trichoderma* spp. no biocontrole de doenças do

tomateiro. Dissertação de mestrado. 105 p. Universidade de Brasília.

MUKHERJEE, P.K.; HORWITZ, B.A. & KENERLEY, C.M. 2012. Secondary metabolism in *Trichoderma* – a genomic perspective. *Microbiology*, 158:35-45.

MUTHUMEENAKSHI, S.; MILLS, P.R.; BROWN, A.E. & SEABY, D.A. 1994. Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in British Isles. *Microbiology*, 140:769-777.

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.

NIELSEN, N.-P.V.; SMEDSGAARD, J. & FRISVAD, J.C. 1999. Full second-order chromatographic/spectrometric data matrices for automated sample identification and component analysis by non data reducing image analysis. *Analytical Chemistry*, 71, 727-735.

O'BRIEN, J. & WRIGHT, G.D. 2011. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, 22:552-558.

OKUDA, T.; FUJIWARA, A. & FUJIWARA, M. 1982. Correlation between species of *Trichoderma* and production patterns of isonitrile antibiotics. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46:1811-1822.

PAGANS, E.; FONT, X. & SANCHEZ, A. 2006. Emission of volatile organic compounds from composting of different solid wastes: abatement by biofiltration. *Journal of Hazardous Materials*, 131:179-186.

PAPAVIZAS, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. Annual Review Phytopathology, 23:23-54.

PAULITZ, T.C. 1990. Biochemical and ecological aspects of competition in biological control. In: Baker, R.R. (Ed.). New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases. New York. p. 713-724.

PEREIRA, J.L.; QUEIROZ, R.M.L.; CHARNEAU, S.O.; FELIX, C.R. & RICART, C.A.O. 2014. Analysis of *Phaseolus vulgaris* Response to Its Association with *Trichoderma harzianum* (ALL-42) in the Presence or Absence of the Phytopathogenic Fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. PLoS ONE 9:5.

PERELLÓ, A.; MÓNACO, C.; SIMÓN, M.R.; SISTERNA, & DAL BELLO, G. 2003. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan spot of wheat in Argentina. **Crop Protection**, 22:1099-1106.

POIRIER, L.; AMIARD, J.C.; MONDEGUER, F.; QUINIQU, F.; RUIZ, N.; POUCHUS, Y. F. & MONTAGU, M. 2007. Determination of peptaibol trace amounts in marine sediments by liquid chromatography/electrospray ionization-ion trap-mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1160:106-113.

PUNJA, Z.K. & RAHE, J.E. 1993. *Sclerotium*. In: Singleton, L.L.; Mihail, J.D. & Rush, C.M. (Ed.). Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. St. Paul. p. 166-170.

PUNJA, Z.K. 1985. The Biology, Ecology and Control of *S. rolfisii*. Annual Review of Phytopathology, 23:97-127.

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/](http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/)] website Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom.

REINO, J.L.; GUERRERO, R.F.; HERNÁNDEZ-GALÁN R. & COLLADO, I.G. 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, 7:89-123.

REN, J.; XUE, X.; 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.

RESENDE, M.L.; OLIVEIRA, J.A.; GUIMARÃES, R.M.; VON PINHO, R.G. & VIEIRA, A.R. 2004. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. *Ciência e Agrotecnologia*, 28, 793-798.

RIDOUT, C. J.; COLEY-SMITH, J. R. & LYNCH, J. M. 1986. Enzyme activity and electrophoretic profile of extracellular protein induced in *Trichoderma* spp. by cell walls of *Rhizoctonia solani*. *Journal of General Microbiology*, 132:2345-2352.

RIFAI, M. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*, 116:47-56.

ROSA, D.R. & HERRERA, C.J.L. 2009. Evaluation of *Trichoderma* sp. as biocontrol agents against avocado root rot. *Biological Control*, 51:66-71.

ROUSSEEUW, P.J. 1987. Silhouettes: a graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, 20:53-65.

RUIZ, N.; WIELGOSZ-COLLIN, G.; POIRIER, L.; GROVEL, O.; PETIT, K.E.; MOHAMED-BENKADA, M.; DU PONT, T.R.; BISSETT, J.; VÉRITÉ, P.; BARNATHAN, G. & POUCHUS, Y.F. 2007. New *Trichobrachsins*, 11 - residue peptaibols from a marine strain of *Trichoderma longibrachiatum*. *Peptides*, 28:1351-1358.

SADFI-ZOUAOU, N.; HANNACHI, I.; ROUAISSI, M.; HAJLAOUI, M.R.; RUBIO, M.B.; MONTE, E. BOUDABOUS, A. & HERMOSA, M.R. 2009. Biodiversity of *Trichoderma* strains in Tunisia. *Canadian Journal of Microbiology*, 55:154-162.

SAMUELS, G. J. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and sistematics of the genus. *Mycological Research*, 100:(8) 923-935.

SAMUELS, G.J. 2006. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, 96:195-206.

SAMUELS, G.J.; ISMAIEL, A.; BON, M.; DE RESPINIS, S. & PETRINI, O. 2010. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia*, 102: 944-966.

SAMUELS, G.J.; PETRINI, O.; KUHL, K.; LIECKFELDT, E. & KUBICEK, C. P. 1998. The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. *Studies In Mycology*, 1-54.

SANTOS, C.; PATERSON, R.R.M.; VENÂNCIO, A. & LIMA, N. 2010. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorptionionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Applied Microbiology*, 108:375-385.

SANTOS, C.; VENTURA, J.A.; & LIMA, N. 2012. A utilização da técnica de MALDI-TOF MS na identificação de fitopatógenos e no diagnóstico de doenças de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 20:387-400.

SATHIYASEELAN, K.; SIVASAKTHIVELAN, P. & LENIN, G. 2009. Evaluation of Antagonistic Activity and Shelf Life Study of *Trichoderma viride*. *Botanical Research Institute*, 2:(3) 195- 197.

SENG, P.; DRANCOURT, M. & GOURIET, F. 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*, 49:543-551.

SHARMA, P.; PATEL, A.N.; SAINI, M.K. & 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

SHERRIFF, C.; WHELAN, M.J.; ARNOLD, G.M.; LAFAI, J.F.; BRYGOO, Y. & BAILEY, J.A. 1994. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. *Experimental Mycology*, 18:121-138.

SHORESH, M., MASTOURI, F., & HARMAN, G. E. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*, 48:21-43.

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

SILVA, O.F. & WANDER, A.E. 2013. O feijão-comum no Brasil: passado, presente e futuro. Embrapa Arroz e Feijão; Documentos 287. Santo Antônio de Goiás. 63.

SUN, R.; GAO, Y.X.; SHEN, K.Z.; XU, Y.B.; WANG, C.R.; LIU, H.Y. & DONG, J.Y. 2011. Antimicrobial metabolites from the aquatic fungus *Delitschia corticola*, *Phytochemistry Letters*, 4:(2) 101–105.

SUN, R.Y.; LIU, Z.C.; FU, K.; FAN, L. & CHEN, J. 2012. *Trichoderma* biodiversity in China. *Journal of Applied Genetics* 53:343-354.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2006. *Fisiologia vegetal*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 722p.

THEIS, C.; DEGENKOLB, T. & BRUECKNER, H. 2008. Studies on the selective trifluoroacetylolytic scission of native peptaibols and model peptides using HPLC and ESI-CID-MS *Chemistry & Biodiversity*, 5:2337-2355.

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*, 6:3-10.

VALENTINE, N., WUNSCHER, S., WUNSCHER, 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(1) 58-64.

VAN DRIESCHE, R.G. & BELLOWS, J.R. 1996. *Biological Control*. Ed. Chapman & Hall, London.

VARGHA, M.; TAKATS, Z.; KONOPKA, A. & NAKATSU, C.H. 2006. Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of *Arthrobacter* isolates. *Journal of Microbiological Methods*, 66:399–409.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; MARRA, R.; SHERIDAN, L.; WOO, S.L. & LORITO, M. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*, 40:1-10.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; WOO, S.L.; NIGRO, M.; MARRA, R.; LOMBARDI, N.; PASCALE, A.; RUOCCO, M.; LANZUISE, S.; MANGANIELLO, G. & LORITO, M. 2014. *Trichoderma* Secondary Metabolites Active on Plants and Fungal Pathogens. *The Open Mycology Journal*. 8:127-139.

WALKER, J.; FOX, A.J.; EDWARDS-JONES, V. & GORDON, D.B. 2002. Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: media effects and inter-laboratory reproducibility. *Journal of Microbiological Methods*, 48: 117–126.

WANG, Z.P.; RUSSON, L.; LI, L.; ROSER, D.C. & LONG, S.R. 1998 Investigation of spectral reproducibility in direct analysis of bacteria proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 12:456–464.

WEINDLING, R. & EMERSON, O.H. 1936. The isolation of a toxic substance from the culture filtrate of *Trichoderma*. *Phytopathology* 26:1068-1070.

WEINDLING, 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.

WEY, T.T.; HSEU, T.H. & HUANG, L. 1994. Molecular cloning and sequence analysis of the cellobiohydrolase I gene from *Trichoderma koningii* G-39. *Current Microbiology*. 28:31-39.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S. & TAYLOR, J.W. 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.

WIJESINGHE, C.J.; WIJERATNAM, R.S.W.; SAMARASEKARA, J.K.R.R. & WIJESUNDERA, R.L.C. 2011. Development of a formulation of *Trichoderma asperellum* to control black rot disease on pineapple caused by (*Thielaviopsis paradoxa*). *Crop Protection* 30:300-306

ZHANG, C.L & XU, T. 2005 Records of *Trichoderma* species from Hebei, Zhejiang, Yunnan and Tibet of China. *Mycosystema* 24:184-192.

Anexo 1 - Isolados de *Trichoderma* da Coleção de Microrganismos para o Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia utilizados neste trabalho.

Isolados	Espécie	Hospedeiro/substrato	Local
CEN1	<i>T. harzianum</i>	Fungo - <i>Moniliophthora perniciosa</i>	Bahia
CEN2	<i>T. stromaticum</i>	Fungo - <i>Moniliophthora perniciosa</i>	Bahia
CEN125	<i>T. harzianum</i>	Fungo - <i>Moniliophthora perniciosa</i>	Bahia
CEN126	<i>T. harzianum</i>	Fungo - <i>Moniliophthora perniciosa</i>	Bahia
CEN127	<i>T. harzianum</i>	Fungo - <i>Moniliophthora perniciosa</i>	Bahia
CEN128	<i>T. harzianum</i>	Fungo - <i>Moniliophthora perniciosa</i>	Bahia
CEN129	<i>T. harzianum</i>	Fungo - <i>Moniliophthora perniciosa</i>	Bahia
CEN130	<i>T. harzianum</i>	Fungo - <i>Moniliophthora perniciosa</i>	Bahia
CEN131	<i>T. harzianum</i>	Fungo - <i>Moniliophthora perniciosa</i>	Bahia
CEN132	<i>T. harzianum</i>	Fungo - <i>Moniliophthora perniciosa</i>	Bahia
CEN133	<i>T. harzianum</i>	Fungo - <i>Moniliophthora perniciosa</i>	Bahia
CEN134	<i>T. harzianum</i>	Fungo - <i>Moniliophthora perniciosa</i>	Bahia
CEN139	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de soja	Goiás
CEN140	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de soja	Goiás
CEN141	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de soja	Goiás
CEN142	<i>T. koningiopsis</i>	Solo do cerrado	Goiás
CEN143	<i>T. harzianum</i>	Solo do cerrado	Goiás
CEN144	<i>T. harzianum</i>	Solo do cerrado	Goiás
CEN145	<i>T. harzianum</i>	Solo de <i>Brachiaria</i>	Goiás

CEN146	<i>T. harzianum</i>	-	Goiás
CEN147	<i>T. harzianum</i>	-	Goiás
CEN148	<i>T. harzianum</i>	Solo de <i>Brachiaria</i>	Goiás
CEN149	<i>T. harzianum</i>	-	Goiás
CEN150	<i>T. harzianum</i>	-	Goiás
CEN151	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de milho	Goiás
CEN152	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de milho	Goiás
CEN153	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de milho	Goiás
CEN154	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de milho	Goiás
CEN155	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de milho	Goiás
CEN156	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de milho	Goiás
CEN157	<i>T. koningiopsis</i>	Solo de campo de arroz	Goiás
CEN158	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de arroz	Goiás
CEN159	<i>T. asperellum</i>	Solo de campo de milho	Goiás
CEN160	<i>T. asperellum</i>	Solo	Goiás
CEN161	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de arroz	Goiás
CEN162	<i>T. asperellum</i>	Solo de campo de arroz	Distrito Federal
CEN163	<i>T. asperellum</i>	Solo de campo de arroz	Goiás
CEN164	<i>T. harzianum</i>	Solo	Goiás
CEN165	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de goiaba	Goiás
CEN166	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de goiaba	Goiás
CEN167	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de goiaba	Goiás
CEN168	<i>T. tomentosum</i>	Solo de campo de sorgo	Goiás

CEN169	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de sorgo	Goiás
CEN170	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de milho	Goiás
CEN188	<i>T. spirale</i>	Solo	Goiás
CEN189	<i>T. spirale</i>	Solo	Goiás
CEN190	<i>T. erinaceum</i>	Solo de campo de algodão	Goiás
CEN191	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de goiaba	Goiás
CEN192	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de goiaba	Goiás
CEN193	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de sorgo	Goiás
CEN194	<i>T. harzianum</i>	-	Goiás
CEN195	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de milho	Goiás
CEN196	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de goiaba	Goiás
CEN197	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de sorgo	Goiás
CEN198	<i>T. tomentosum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN200	<i>T. koningiopsis</i>	Solo raiz de Chrysomalanaceae	Tocantins
CEN201	<i>T. asperellum</i>	Solo raiz de Vochysziaceae	Tocantins
CEN202	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN203	<i>Trichoderma</i> sp.	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN204	<i>Trichoderma</i> sp.	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN205	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN206	<i>T. spirale</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN207	<i>T. koningiopsis</i>	Salo de campo de Myrtaceae	Distrito Federal
CEN208	<i>T. koningiopsis</i>	Solo de campo de copaífera	Goiás
CEN209	<i>T. koningiopsis</i>	Solo de campo de copaífera	Goiás

CEN210	<i>T. koningiopsis</i>	Solo de campo de copaífera	Goiás
CEN211	<i>T. tomentosum</i>	Solo de campo de taquara	Goiás
CEN219	<i>T. atroviride</i>	Solo	
CEN220	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN221	<i>T. koningiopsis</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN222	<i>T. spirale</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN223	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN224	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN225	<i>T. tomentosum</i>	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN226	<i>T. tomentosum</i>	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN227	<i>T. tomentosum</i>	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN228	<i>T. tomentosum</i>	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN229	<i>T. asperellum</i>	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN230	<i>T. harzianum</i>	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN231	<i>T. spirale</i>	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN232	<i>T. tomentosum</i>	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN233	<i>T. tomentosum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN234	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN235	<i>T. harzianum</i>	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN236	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN237	<i>T. harzianum</i>	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN238	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN239	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo

CEN240	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN241	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN242	<i>Trichoderma</i> sp.	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN243	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN244	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN245	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN246	<i>T. harzianum</i>	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN247	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN248	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN249	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN250	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN251	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN252	<i>T. tomentosum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN253	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN254	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN255	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN256	<i>T. tomentosum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN257	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN258	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN259	<i>Trichoderma</i> sp.	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN260	<i>T. koningiopsis</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN261	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN262	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo

CEN263	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN264	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN265	<i>T. spirale</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN266	<i>T. tomentosum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN267	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN268	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN269	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN270	<i>T. harzianum</i>	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN271	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN272	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN273	<i>T. harzianum</i>	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN274	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN275	<i>Trichoderma</i> sp.	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN276	<i>Trichoderma</i> sp.	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN277	<i>T. asperellum</i>	--	São Paulo
CEN278	<i>T. aureoviride</i>	-	São Paulo
CEN279	<i>T. stromaticum</i>	-	São Paulo
CEN280	<i>T. longibrachiatum</i>	Solo	São Paulo
CEN281	<i>T. harzianum</i>	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN282	<i>Trichoderma</i> sp.	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN283	<i>Trichoderma</i> sp.	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN284	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN285	<i>Trichoderma</i> sp.	Solo entrelinha de algodão	São Paulo

CEN286	<i>Trichoderma</i> sp.	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN287	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN288	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN289	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN290	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN291	<i>Trichoderma</i> sp.	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN292	<i>Trichoderma</i> sp.	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN293	<i>T. harzianum</i>	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN294	<i>Trichoderma</i>	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN295	<i>T. harzianum</i>	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN 296	<i>T. harzianum</i>	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN297	<i>Trichoderma</i> sp.	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN298	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo
CEN299	<i>Trichoderma</i> sp.	Solo entrelinha de algodão	São Paulo
CEN316	<i>T. harzianum</i>	Solo de campo de algodão	São Paulo