

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E  
BIOQUÍMICA DE *TRICHODERMA* SPP. ISOLADAS DE  
SOLO DE CERRADO**

**ADILSON L. LIMA**

Tese apresentada ao  
Departamento de Fitopatologia da  
Universidade de Brasília, como  
requisito parcial à obtenção do  
título de Doutor em Fitopatologia.

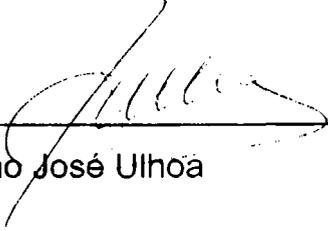
**BRASÍLIA - DF  
2002**

# CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E BIOQUÍMICA DE *TRICHODERMA* SPP., ISOLADAS DE SOLO DE CERRADO

Trabalho desenvolvido junto ao Laboratório de Enzimologia/UFG, sob orientação do Prof. Dr. Cirano José Ulhoa, com apoio institucional do Departamento de Fitopatologia/UnB e bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Tese defendida e aprovada em 02 de julho de 2002.

Banca Examinadora:



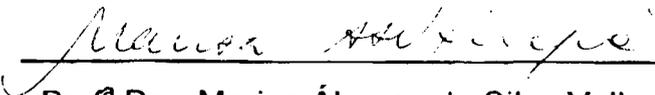
---

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa  
(Orientador)



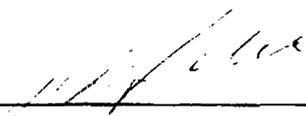
---

Dr. Itamar Soares de Melo



---

Profª Dra. Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira



---

Prof. Dr. Carlos Roberto Felix



---

Dra. Sueli Corrêa Marques de Melo

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Cirano J. Ulhoa pela amizade, compreensão e apoio fornecidos durante toda a realização deste trabalho; além dos ensinamentos em bioquímica, especialmente sobre enzimas hidrolíticas.

A Professora Silvana Petrofeza da Silva pela disposição constante, amizade e ensinamentos em Biologia Molecular.

Ao Professor Luiz Artur Mendes Bataus pela grande amizade e disponibilidade de seu laboratório.

A professora Sônia N. Bão por sempre disponibilizar a estrutura do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UnB.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da UnB A. Takatsu, J. C. Dianese, Adalberto C. Café Filho, Cláudio L. Costa, Mariza A. S. V. Ferreira, Juvenil Cares, S. P. Huang e C. H. Uesugi pelos ensinamentos fundamentais na fase inicial deste curso.

Aos colegas de turma Barone, Herickson, John, Denise, Elíria, Rosa, Camila e Alessandra pelo grande companheirismo durante a fase inicial deste trabalho.

Aos colegas Luciana, Valdirene, Maria Tereza, Kênia, Kasue e Roberto pela amizade inesquecível e, por proporcionarem um ambiente de trabalho muito agradável no Laboratório de Enzimologia da UFG.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

A Professora Wilma Rose Coelho Ribeiro (*In Memoriam*) por ter tido a oportunidade de compartilhar de sua amizade e ensinamentos durante a fase inicial deste trabalho. Que Deus a acompanhe.

## ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS .....	2
CAPÍTULO 1	
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ESPÉCIES DE <i>TRICHODERMA</i> ISOLADAS DE SOLO DO CERRADO .....	4
1. INTRODUÇÃO .....	5
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	7
2.1- ISOLAMENTO .....	7
2.2- CULTIVO E OBSERVAÇÕES .....	9
2.3- FOTODOCUMENTAÇÃO .....	10
2.4- ANÁLISE DOS DADOS .....	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	11
3.1- FREQUÊNCIA DE ESPÉCIES .....	11
3.2- CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES .....	12
3.2.1- <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai .....	12
3.2.2- <i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg .....	17
3.2.3- <i>Trichoderma koningii</i> Out .....	20
3.2.4- <i>Trichoderma</i> sp. (sp. nov.) (?) .....	21
3.2.5- <i>Trichoderma spirale</i> Bisset (?) .....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	26
CAPÍTULO 2	
ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. ATRAVÉS DE MARCADORES DE rDNA e RAPD .....	32
INTRODUÇÃO .....	33
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	34

2.1- ISCLADOS UTILIZADOS .....	34
2.2- EXTRAÇÃO DE DNA .....	35
2.3- AMPLIFICAÇÃO E DIGESTÃO DOS PRODUTOS DO RDNA.....	35
2.4- PCR-RAPD.....	36
2.5- DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ISOLADOS DE <i>TRICHODERMA</i> SPP.....	38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
3.1- DIVERSIDADE GENÉTICA BASEADA NO PERFIL DE DIGESTÃO DO RDNA .....	38
3.2- DIVERSIDADE GENÉTICA BASEADA EM MARCADORES RAPD.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
CAPÍTULO 3	
AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>TRICHODERMA HARZIANUM</i> QUANTO A	
CAPACIDADE MICOPARASÍTICA E PRODUÇÃO DE ENZIMAS	
HIDROLÍTICAS.....	
	53
1. INTRODUÇÃO .....	54
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.1- AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ENROLAMENTO DE <i>T. HARZIANUM</i> .....	59
2.2- AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE <i>R. SOLANI</i> DURANTE O PROCESSO DE	
MICOPARASITISMO.....	59
2.3- ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	60
2.3.1- Produção de $\beta$ -1,3-glucanases e quitinases em meio líquido .....	60
2.3.2- Quitinase.....	60
2.3.1- $\beta$ -1,3- Glucanase .....	61
2.3.4 - Dosagem de proteínas.....	61
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
3.1- AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ENROLAMENTO.....	61
3.2- AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE <i>R. SOLANI</i> .....	63
3.3- ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR <i>T. HARZIANUM</i> .....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
CONCLUSÕES .....	74

## RESUMO

Quarenta e seis isolados de *Trichoderma* provenientes de solo do cerrado brasileiro foram purificados através de cultura monospórica e caracterizados com base em aspectos morfológicos, culturais e moleculares (perfil de digestão da região correspondente os espaços transcritos internos (ITS) 1 e 2 e o gene 5,8S). A espécie mais freqüentemente isolada foi *T. harzianum* (34 isolados), seguida de *T. asperellum* (4 isolados), *T. koningii* (3 isolados) e *T. spirale* ? (2 isolados). Três isolados constituíram um grupo com características peculiares, como conídios lisos e elipsóides e culturas com pronunciado odor de coco, podendo constituir uma espécie ainda não descrita; embora a digestão da região do rDNA desses isolados com as enzimas de restrição *Eco* RI, *Hha* I, *Bam* HI e *Msp* I tenha mostrado o mesmo perfil apresentado por isolados de *T. koningii*. Variação morfológica foi encontrada especialmente entre isolados de *T. koningii* e *T. harzianum*. Diversidade genética através de PCR-RAPD, atividade biológica contra *R. solani* e capacidade de produção de enzimas hidrolíticas foram analisadas para isolados de *T. harzianum*. A maioria dos isolados de *T. harzianum* testados foram capazes de produzir quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases quando crescidos em meio contendo quitina como fonte de carbono e apresentaram diferentes níveis de micoparasitismo contra *R. solani*. Relações entre níveis de atividade biológica e similaridade genética entre isolados de *T. harzianum* são discutidos em relação ao seu potencial como agente de biocontrole.

## ABSTRACT

Monoconidial cultures of 46 strains of *Trichoderma* isolated from Brazilian cerrado soils were characterized on the basis of morphological and cultural characteristics, and on RFLP of the internal transcribed spacer (ITS 1 and 2, including 5.8S gene). The most common group comprised 34 isolates and was identified as *T. harzianum*. The remainder isolates clustered into three groups: *T. asperellum* (4 isolates), *T. koningii* (3 isolates), and *T. spirale* ? (2 isolates). In addition, three isolates with smooth ellipsoidal conidia, and pronounced coconut odour may be an undescribed taxon; although the digestion analysis of the rDNA these isolates with *Eco* RI, *Hha* I, *Bam* HI, and *Msp* I have showed the same pattern of the *T. koningii* group. Morphological variation was noted especially among isolates of *T. koningii*, and more subtle variation were also observed for *T. harzianum*. Genetic diversity using RAPD-PCR, biological activity against *R. solani*, and biochemical features were also assessed for *T. harzianum* isolates. Considerable genetic variation was noted among isolates of *T. harzianum*. Most of the *T. harzianum* tested are able to produce chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases when grown in chitin containing medium and presented different levels of mycoparasitic activity against *R. solani*. Similarities between levels and specificities of biological activity and the DNA-analysis-based groupings are both discussed in relation to *T. harzianum*'s potential as a biocontrol agent.

## INTRODUÇÃO GERAL

A partir do trabalho pioneiro de Weindling (1932), onde foi constatado a capacidade de *Trichoderma lignorum* (Tode) Harz (= *Trichoderma viride* Pers.:Fr.) parasitar importantes patógenos de solo em cultura, vários trabalhos visando a utilização de espécies do gênero *Trichoderma* para fins de controle biológico de patógenos de planta tem sido desenvolvidos. Esse estímulo deve-se, principalmente, ao aumento da conscientização da opinião pública sobre os danos causados por pesticidas químicos ao ambiente, bem como sobre a possibilidade da presença de resíduos carcinogênicos nos alimentos (Ragsdale & Sisler, 1994; Gullino & Kuijpers, 1994); além da constante preocupação quanto ao surgimento de patógenos resistentes aos fungicidas disponíveis no mercado (Hjeljord & Tronsmo, 1998).

Uma das alternativas à redução da aplicação de fungicidas químicos para o controle de doenças de plantas é a utilização de fungicidas a base de organismos biologicamente ativos (biopesticidas). Nesse sentido, as inúmeras estratégias de sobrevivência e proliferação de espécies de *Trichoderma*, como o rápido crescimento, produção de clamidósporos, capacidade de produzir antibióticos e atacar outros fungos, bem como sua elevada capacidade de degradar carboidratos estruturais e não estruturais, o tornam de elevado interesse para fins de controle biológico, uma vez que essas características ecológicas o possibilitam competir, colonizar e proteger importantes cortes de infecção do hospedeiro, como raízes, lesões e tecido em senescência (Hjeljord & Tronsmo, 1998). Por outro lado, é de conhecimento corrente entre pesquisadores que trabalham com controle biológico, que candidatos de elevado potencial para controle de patógenos em condições experimentais restritas, podem ser incapazes de produzir os mesmos resultados em condições de campo. Isso deve-se ao fato de que as condições de armazenamento e aplicação são mais críticas para organismos biológicos, uma vez que estes estão mais sujeitos a reações diferenciais do hospedeiro e ambiente (Callan *et al.*, 1997), fazendo com que se tenha uma eficácia de controle mais variável do que a obtida com fungicidas químicos (Harman, 1991). Essa característica (reação diferencial a fatores bióticos e abióticos) faz com que um passo fundamental no desenvolvimento de agentes de biocontrole

seja o desenvolvimento de uma formulação apropriada, a qual vise superar limitações ambientais e proporcionar ao antagonista uma vantagem competitiva em relação ao patógeno(s) e organismos da microflora nativa (Fravel *et al.*, 1995; Hjeljord & Tronsmo, 1998). Felizmente, o acúmulo de informações quanto a capacidade antagônica e habilidade de colonização e proliferação em diferentes habitats, associado a sistemas de produção massal, formulação e aplicação eficientes, tem levado ao desenvolvimento de produtos estáveis a base de *Trichoderma* (especialmente *T. harzianum*). Tais produtos, como RootShield™, T-22 Planter Box™ e Trichodex™, já encontram-se em comercialização nos Estados Unidos, Europa e Israel (Harman, 2000).

Tendo em vista que o gênero *Trichoderma* apresenta espécies de elevado potencial para utilização como agentes de controle biológico de doenças de plantas (como evidenciado nos parágrafos anteriores), especialmente se considerarmos a crescente demanda por produtos orgânicos ("green products") (Gullino & Kuijpers, 1994) e, a contínua elevação dos custos e restrições a utilização de fungicidas químicos (Ragsdale & Sisler, 1994), trabalhos que visem o isolamento, caracterização e seleção de isolados com potencial para utilização em programas de controle biológico devem ser estimulados. Assim, o presente trabalho teve por objetivo fazer a caracterização morfológica e molecular de isolados de *Trichoderma* oriundos de solo do cerrado brasileiro, bem como, avaliar o potencial de isolados de *T. harzianum* quanto a sua capacidade micoparasítica e de produção de enzimas hidrolíticas.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

CALLAN, N. W., MATHRE, D. E., MILLER, J. B. & VAVRINA, C. S. Biological seed treatments: factors involved in efficacy. *HortScience* 32:179-183, 1997.

FRAVEL, D. R., LEWIS, J.A. & CHITTAMS, J. L. Alginate prill formulations of *Talaromyces flavus* with organic carriers for biocontrol of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 85:165-168, 1995.

- GULLINO, M. L. & KUIJPERS, A. M. Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. *Ann. Rev. Phytopathol.* 32:559-79, 1994.
- HARMAN, G. E. Seed treatment for biological control of plant disease. *Crop Protection* 10:166-171, 1991.
- HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.* 84:377-393, 2000.
- HJELJORD, L. & TRONSMO, A. *Trichoderma and Gliocladium* in biological control: an overview. *In: KUBICEK, P. & HARMAN, G. E. (eds.). Trichoderma and Gliocladium: basic biology, taxonomy and genetics, vol. 2.* Taylor & Francis, London, p.131-151, 1998.
- RAGSDALE, N. N. & SISLER, H. D. Social and political implications of managing plant diseases with decreased availability of fungicides in the United States. *Ann. Rev. Phytopathol.* 32:545-57, 1994.
- WEINDLING, R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology* 22:837-845, 1932.

# CAPÍTULO 1

## CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ESPÉCIES DE *TRICHODERMA* ISOLADAS DE SOLO DO CERRADO

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Trichoderma* (Ascomycetes, Hypocreales) foi introduzido por Persoon a mais de 200 anos atrás (Persoon, 1794) e consiste de um fungo anamórfico habitante principalmente do solo, matéria orgânica e árvores em decomposição (Danielson & Davey, 1973; Roigers *et al.*, 1991; Samuels, 1996; Gams & Bisset, 1998). Isolados de *Trichoderma* freqüentemente podem ser reconhecidos por suas características macroscópicas, tais como rápido crescimento em cultura, micélio aéreo esparso e pústulas conidiogênicas verdes ou brancas (Rifai, 1969; Bissett, 1984, 1991a). Em relação as características microscópicas deste gênero, Rifai (1969) propôs um delineamento genérico que é geralmente aceito até hoje. O conidióforo apresenta-se repetidamente ramificado, sendo normalmente em uma forma dendrítica regular, isto é, ramificado a um elevado número de níveis, com as ramificações primárias produzindo ramificações secundárias menores, as quais também podem se ramificar e, assim por diante. Apêndices terminais estéreis também são característicos ao conidióforo de determinadas espécies. As fiálides variam de ampuliformes a lageniformes, são usualmente constrictas na base, mais ou menos intumescidas na porção mediana e, abruptamente atenuadas próximo da região apical, formando um "pescoço" subcilíndrico curto. Estas são dispostas em verticilos terminais nas ramificações do conidióforo ou, menos freqüentemente, isoladamente ou em espiras logo abaixo do septo localizado ao longo do conidióforo. Os conídios podem ser hialinos ou, mais freqüentemente, verdes, com parede lisa ou rugosa, dependendo da espécie. Clamidósporos estão normalmente presentes, especialmente no micélio submerso, podendo ser intercalares ou terminais.

A despeito de suas características macroscópicas serem facilmente reconhecidas, este gênero carece de um conceito de espécie mais definido, em virtude de variações dentro e entre grupos de espécies, as quais foram definidas por Rifai como espécies agregadas (Rifai, 1969). Ademais, a maioria dos isolados de *Trichoderma* não são encontrados associados com seus estágios sexuais, sendo considerados fungos de reprodução clonal (mitóticos). Esta aparente ausência de sexualidade constitui-se em uma barreira ainda maior para a melhor compreensão das inter-relações dentro e entre espécies

deste gênero (Samuels, 1996). Quando conhecidos, os teleomorfos de *Trichoderma* encontram-se principalmente no gênero *Hypocrea* Fr.. Mais de 60 espécies de *Hypocrea* e gêneros relacionados foram estudados e listados juntamente com seus anamorfos por Doi (1966; 1969; 1971; 1972) e Doi & Doi (1979). A maioria dos anamorfos de *Hypocrea* estudados pelo(s) referido(s) autor(es) enquadraram-se no gênero *Trichoderma*, sendo que as espécies agregadas definidas por Rifai (1969) poderiam ser conectadas a mais de um desses teleomorfos (Bissett, 1984). Desta maneira, obviamente que as espécies de *Trichoderma* provenientes de diferentes teleomorfos são geneticamente distintas; embora suas características morfológicas não sejam suficientes para diferenciá-las (Bissett, 1984). Assim, o principal problema é definir os limites para espécies individuais e delinear um sistema eficiente para distinguir espécies geneticamente heterogêneas, porém fenotipicamente similares (Bissett, 1984; Samuels & Rehner, 1993).

Com o objetivo de facilitar as pesquisas dentro do gênero *Trichoderma*, as quais são dificultadas pela ausência de critérios morfológicos para diferenciação de espécies, como evidenciado no parágrafo anterior, Bissett, em 1991a, propôs o termo "seções" para acomodar formas similares dentro das espécies agregadas estabelecidas por Rifai (1969), bem como variantes morfológicas de anamorfos de *Hypocrea*, já que o sistema de Rifai, embora sendo o mais amplamente utilizado, reconhece apenas nove espécies agregadas, dentro das quais o limite entre espécies individuais não são claros; além de não ser capaz de acomodar a ampla variação morfológica reconhecida atualmente (Samuels & Seifert, 1995). Este novo sistema de classificação propõe a distribuição do gênero *Trichoderma* em cinco seções: seção *Trichoderma* Bissett, seção *Longibrachiatum* Bissett, seção *Saturnisporum* Doi, Abe & Sugiyama, seção *Pachybasium* (Sacc.) Bissett e seção *Hypocreanum* Bissett (Bissett, 1991a).

Apesar da maior facilidade proporcionada pelo sistema proposto por Bissett, é importante ressaltar que a classificação de espécies de *Trichoderma* baseada somente em critérios morfológicos pode não ser suficiente para resolver todas as espécies, já que dentro deste gênero é impossível inferir sobre relações genéticas entre isolados, em virtude da aparente ausência de reprodução sexual para a maioria destes (Samuels & Rehner, 1993; Samuels,

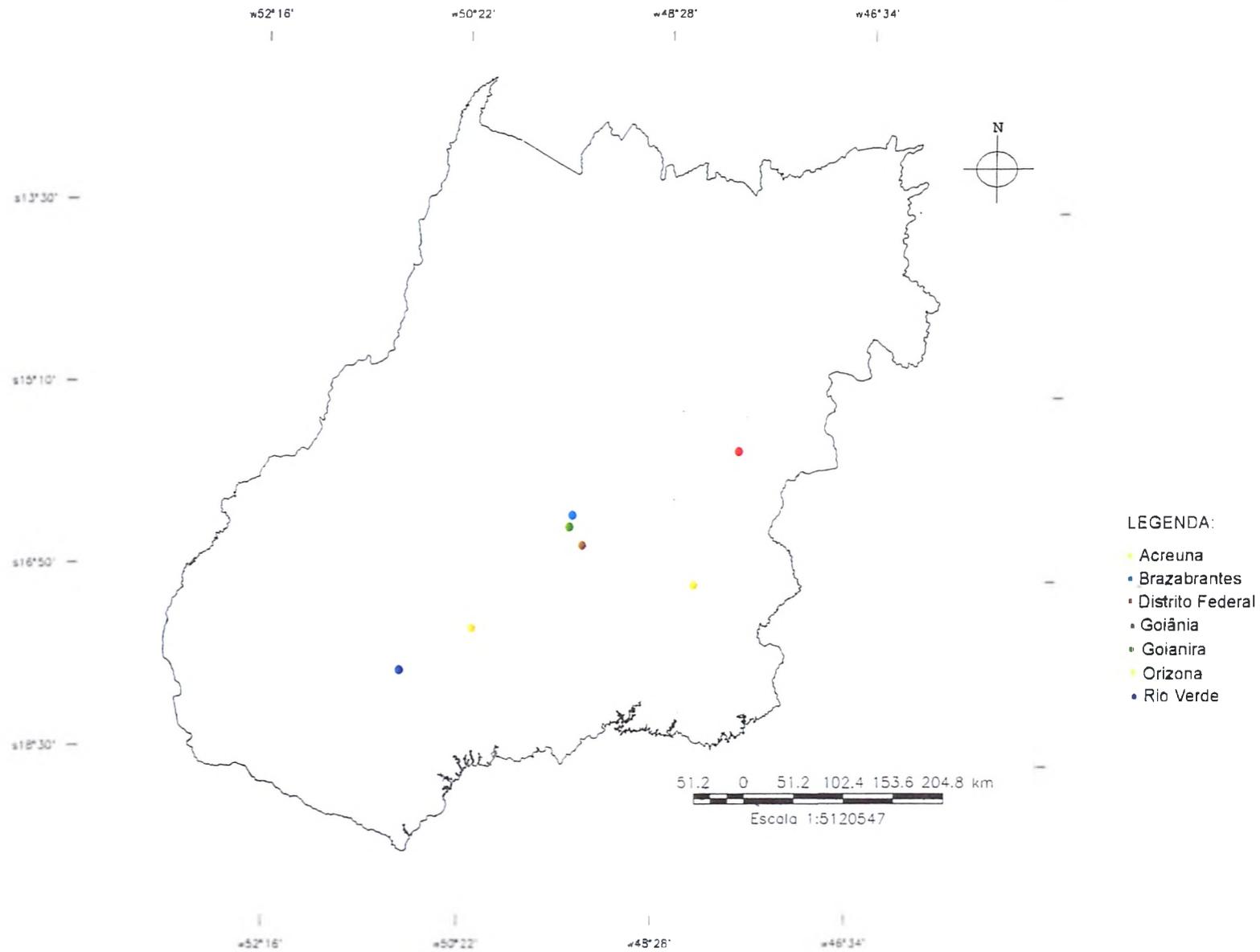
1996). Assim, pesquisadores que utilizam somente características morfológica devem ter em mente que similaridades entre dois isolados de *Trichoderma* não significa, necessariamente, que estes sejam da mesma espécie, ou seja, considerações a nível de espécie devem ser realizadas com certa reserva (Domsch *et al.* 1980; Samuels & Rehner, 1993).

Os objetivos do presente estudo foram analisar a diversidade morfológica de espécies de *Trichoderma* isoladas de solo do cerrado brasileiro, levando em consideração características macroscópicas e microscópicas e, se possível, correlacionar esses resultados com os obtidos a partir da variabilidade molecular dos mesmos (Capítulo 2). Tal correlação será analisada com base nas seções estabelecidas por Bissett (1991a).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1- ISOLAMENTO

Os isolados utilizados no presente estudo foram obtidos a partir de amostras tomadas dos primeiros 5-7 cm do solo, com auxílio de um trado de 5 cm de diâmetro. Todas as amostras constituíram-se de 10 sub-amostras, as quais foram misturadas e passadas através de uma peneira de 2mm de malha. Em virtude da formação de clamidósporos, colonização da matéria orgânica, rápido crescimento e abundante esporulação por parte de isolados de *Trichoderma* (Gams & Bissett, 1998), utilizou-se a técnica de lavagem de solo; onde 10g foram serialmente diluídas em água estéril e, uma alíquota de 0,1 mL das suspensões foram distribuídas em placas de 9 cm diâmetro contendo meio seletivo para *Trichoderma* (TSM) (Smith *et al.*, 1990), adaptado de Davet (1979). Após 7-9 dias de incubação a temperatura ambiente, as colônias características do gênero foram transferidas massalmente para meio de cultura BDA e, posteriormente, purificadas a partir de cultura monospórica (CBS, 1998). A Figura e Tabela 1 apresentam a origem geográfica e hábitat dos isolados de *Trichoderma* analisados no presente estudo.



**Figura 1.** Mapa do estado de Goiás (incluindo o Distrito Federal), mostrando as áreas onde foram coletadas as amostras para isolamento de *Trichoderma* spp..

Tabela 1. Identificação, origem e hábitat dos isolados de *Trichoderma* spp. utilizados no presente estudo.

Espécie	Identificação inicial	Origem	Hábitat
<i>T. harzianum</i>	UnB-1642	Formosa, DF	Solo
<i>T. harzianum</i>	UnB-1643	Taquara, DF	Solo
<i>T. harzianum</i>	UnB-1644	Pipiripau, DF	Solo
<i>T. harzianum</i>	UnB-1645	Sobradinho, DF	Solo
<i>T. harzianum</i>	UnB-1647	ND, DF	Solo
<i>T. harzianum</i>	UnB-1649	ND, DF	Solo
<i>T. harzianum</i>	UnB-1650	Planaltina, DF	Solo
<i>T. asperellum</i>	UnB-1700	PAD, DF	Solo
<i>T. koningii</i>	ALL-01 01	Goiânia, GO	Mata nativa
<i>T. spirale</i> ?	ALL-03 01	Goiânia, GO	Mata nativa
<i>T. spirale</i> ?	ALL-04 01	Goiânia, GO	Mata nativa
<i>T. harzianum</i>	ALL-05 01	Goiânia, GO	Mata nativa
<i>T. harzianum</i>	ALL-07 01	Goiânia, GO	Brachiaria sp.
<i>T. harzianum</i>	ALL-11 01	Goiânia, GO	Brachiaria sp.
<i>Trichoderma</i> sp. ?	ALL-13 01	Goiânia, GO	Sorgo forrageiro
<i>T. koningii</i>	ALL-14 01	Goiânia, GO	Sorgo forrageiro
<i>T. harzianum</i>	ALL-16 01	Orizona, GO	Milho
<i>T. harzianum</i>	ALL-17 01	Orizona, GO	Milho
<i>T. harzianum</i>	ALL-18 01	Orizona, GO	Milho
<i>T. harzianum</i>	ALL-19 01	Orizona, GO	Milho
<i>T. harzianum</i>	ALL-20 01	Orizona, GO	Milho
<i>T. harzianum</i>	ALL-21 01	Orizona, GO	Milho
<i>T. harzianum</i>	ALL-22 01	Orizona, GO	Soja
<i>T. harzianum</i>	ALL-23 01	Orizona, GO	Soja
<i>T. harzianum</i>	ALL-24 01	Orizona, GO	Soja
<i>T. harzianum</i>	ALL-25 01	Brazabrantes, GO	Mata nativa
<i>T. asperellum</i>	ALL-26 01	Goianira, GO	Milho
<i>T. koningii</i>	ALL-27 01	Goianira, GO	Arroz
<i>T. harzianum</i>	ALL-28 01	Goianira, GO	Arroz
<i>T. asperellum</i>	ALL-30 01	Goianira, GO	Arroz
<i>T. asperellum</i>	ALL-31 01	Goianira, GO	Arroz
<i>T. harzianum</i>	ALL-32 01	Goianira, GO	Arroz
<i>Trichoderma</i> sp. ?	ALL-34 01	Acreuna, GO	Algodão
<i>T. harzianum</i>	ALL-38 01	Rio Verde, GO	Pomar de goiaba
<i>T. harzianum</i>	ALL-40 01	Rio Verde, GO	Pomar de goiaba
<i>T. harzianum</i>	ALL-41 01	Rio Verde, GO	Pomar de goiaba
<i>T. harzianum</i>	ALL-42 01	Rio Verde, GO	Pomar de goiaba
<i>T. harzianum</i>	ALL-43 01	Rio Verde, GO	Pomar de goiaba
<i>T. harzianum</i>	ALL-44 01	Rio Verde, GO	Pomar de goiaba
<i>Trichoderma</i> sp. ?	ALL-45 01	Rio Verde, GO	Pomar de goiaba
<i>T. harzianum</i>	ALL-46 01	Rio Verde, GO	Sorgo forrageiro
<i>T. harzianum</i>	ALL-47 01	Rio Verde, GO	Sorgo forrageiro
<i>T. harzianum</i>	ALL-48 01	Rio Verde, GO	Sorgo forrageiro
<i>T. harzianum</i>	ALL-49 01	Rio Verde, GO	Sorgo forrageiro
<i>T. harzianum</i>	ALL-51 01	Rio Verde, GO	Milho
<i>T. harzianum</i>	ALL-52 01	Rio Verde, GO	Milho

ND = Não determinada

## 2.2- CULTIVO E OBSERVAÇÕES

Os métodos de cultivo descritos por Rifai (1969) ainda são geralmente seguidos. Para descrição das colônias, conidióforos, fiálides e conídios utilizou-se o meio de cultura extrato de malte 2%, com incubação a temperatura ambiente e luz difusa. As características do conidióforo foram descritas aos 3-4 dias de cultivo, a partir de áreas de intensa formação de conídios (pústulas). Já as características dos conídios foram tomadas aos 12-14 dias de cultivo,

invariavelmente utilizando-se a objetiva de x100. Tanto para observação do conidióforo como dos conídios o material foi montado em lâminas semi-permanente, com lactoglicerol, sem corante. Ainda para observação das características do conídio utilizou-se microscopia eletrônica de varredura (MEV), cujo material foi preparado da seguinte forma: discos de cultura de 5 mm foram retirados de áreas de conidiação intensa e fixados em solução à base de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 2%, em tampão cacodilato 0,05 M (pH = 7,2), por 12 horas, a 4°C. Após a fixação o material sofreu quatro lavagens em tampão cacodilato 0,05 M (pH = 7,2) e foi pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio ( $O_5O_4$ ) 1%, em tampão cacodilato 0,01 M, retornando a geladeira (4°C) por mais 1 hora. Posteriormente, o material sofreu uma nova série de quatro lavagens com tampão cacodilato (pH = 7,2) e, em seguida, foi desidratado em série aquosa de acetona a concentração de 30, 50, 70, 85, 95 e 100%. O material permaneceu por 15 minutos em cada uma das concentrações, sendo que para a concentração final de 100% o material recebeu duas lavagens de 10 minutos cada. Logo após a desidratação foi feita a secagem ao ponto crítico, utilizando-se o equipamento de secagem Balzers CPD 030 (Bal-Tec, Fuerstentum, Liechtenstein). Em seguida o material foi vaporizado com ouro, durante 150 segundos, usando-se o "Sputter Coater" Balzers SCD 50 (Bal-Tec, Fuerstentum, Liechtenstein), completando-se assim o preparo do material para observação ao MEV.

Para medição do crescimento linear das colônias também foi utilizado o meio extrato de malte 2%, sendo que a incubação foi a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  no escuro, por quatro dias. Todas as descrições morfológicas foram baseadas nos trabalhos desenvolvidos por Bissett (1984; 1991a; 1991b; 1991c e 1992) e Gams & Bissett (1998).

### 2.3- FOTODOCUMENTAÇÃO

As fotomicrografias foram efetuadas utilizando-se um microscópio Zeiss, modelo Axiophot (W. Germany), equipado com contraste interferencial. Já as eletromicrografias foram realizadas com o auxílio do microscópio Jeol, modelo JSM 840-AE (Jeol Ltda., Tóquio, Japão).

## 2.4- ANÁLISE DOS DADOS

Todas as medidas morfométricas foram analisadas utilizando-se o programa STATISTICA (StatSoft, Inc., 1999), a partir de 30 medições para cada parâmetro. Os gráficos foram desenvolvidos utilizando-se o programa Microcal Origin (Microcal Software, Inc., 1997).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1- FREQUÊNCIA DE ESPÉCIES

Quatro táxons definidos foram identificados dentro dos 46 isolados analisados. A espécie mais freqüente foi *T. harzianum*, seguida por *T. asperellum*, *T. koningii*, e *T. spirale*, as quais apresentaram uma freqüência de isolamento bastante inferior (Figura 2). Três isolados (ALL-13.01, ALL-34.01 e ALL-45.01) apresentaram características culturais e morfológicas aparentemente distintas dos táxons reconhecidos atualmente e podem constituir uma espécie ainda não descrita.

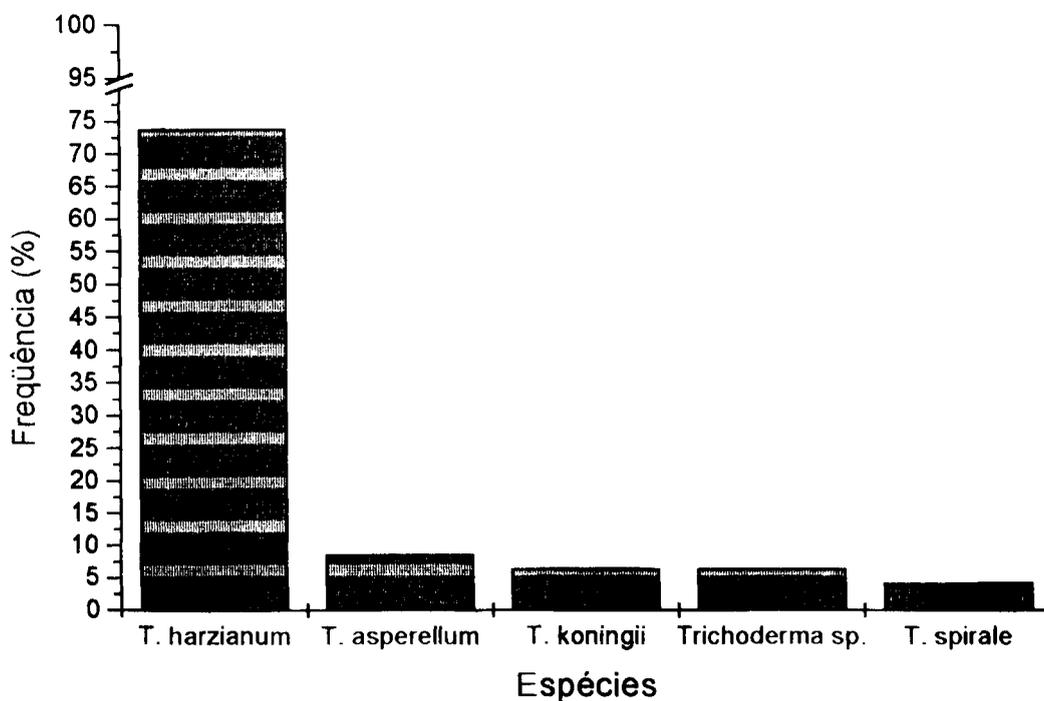


Figura 2. Freqüência de isolamento de espécies de *Trichoderma*.

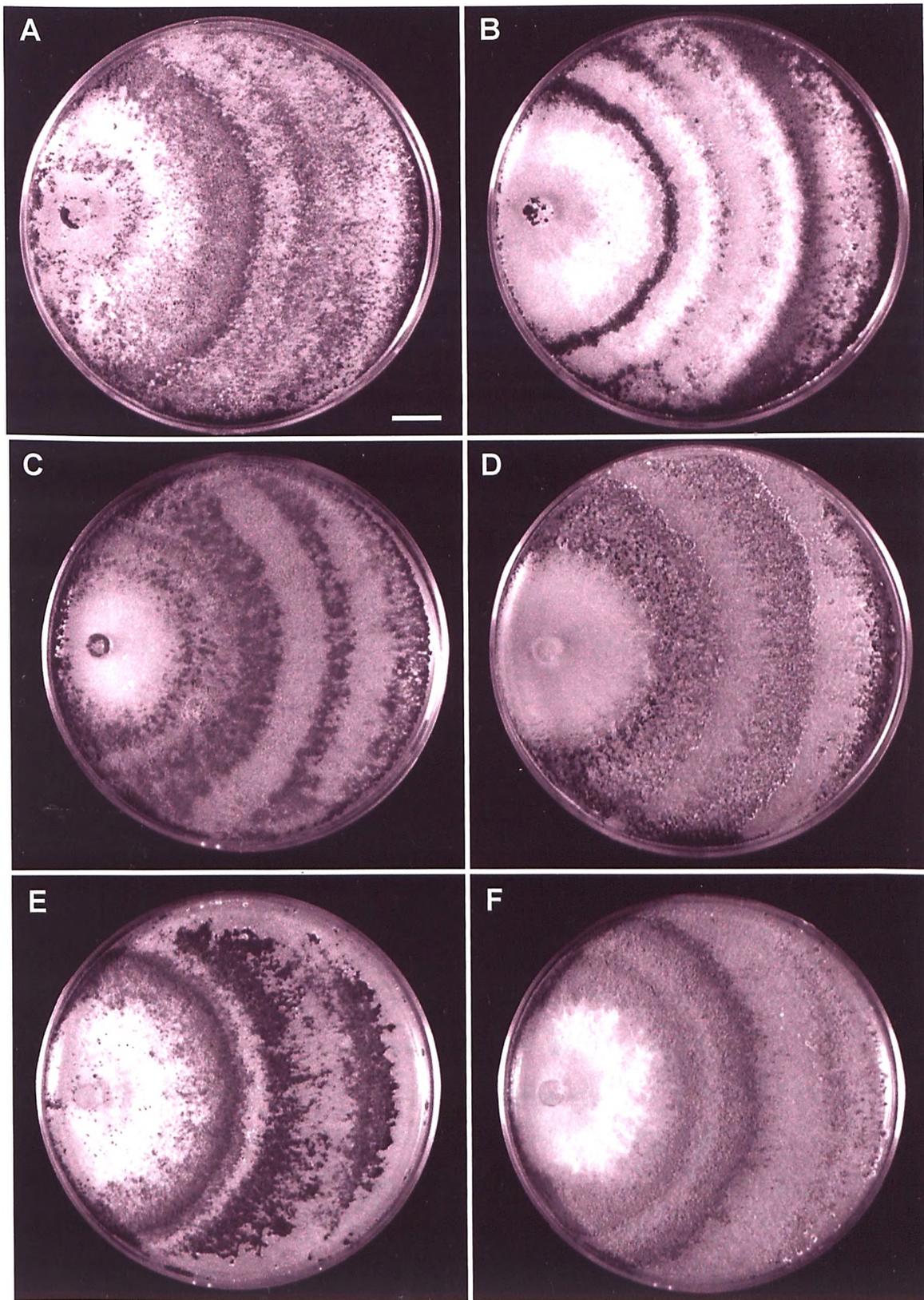
### 3.2- CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES

O sistema taxonômico mais amplamente utilizado para classificação de *Trichoderma* reconhece nove espécies agregadas (Rifai, 1969). Cada espécie agregada admite uma certa variação morfológica, embora a determinação dos limites entre as espécies individuais não seja claro (Samuels & Seifert, 1995). Bisset (1991a) reconheceu seções morfológicas dentro deste gênero e monografou a seção *Pachybasium*, reconhecendo espécies discretas dentro desta seção (Bisset, 1991b). Para identificação dos isolados utilizados no presente estudo, baseamo-nos principalmente nos trabalhos desenvolvidos por Rifai (1969) e Bisset (1991a, 1991b e 1992), embora outros trabalhos também tenham sido considerados, caso a espécie em questão não tivesse sido abordada pelos trabalhos referenciados anteriormente.

#### 3.2.1- *Trichoderma harzianum* Rifai

A espécie *T. harzianum* é considerada uma das mais comuns do gênero, sendo facilmente recuperada dos mais variados tipos de solo (Rifai, 1969; Bisset, 1991b). Caracteriza-se por apresentar colônias com considerável variação macroscópica, podendo ser de coloração verde clara, verde escura ou verde amarelada, as quais normalmente formam anéis de intensa conidiação (Rifai, 1969), os quais são induzidos principalmente pelo efeito da luz (Betina & Farkas, 1998). Tais características foram prontamente observadas para isolados identificados como *T. harzianum* no presente estudo (Figura 3A-F).

Alguns isolados de *T. harzianum* apresentaram a estrutura do conidióforo compatível com a seção *Trichoderma*, com fiálides mais alongadas (tendendo a lageniformes) e dispostas de forma menos agregada (Figura 5C e E), enquanto outros apresentaram conidióforo típico da seção *Pachybasium*, ou seja, com fiálides ampuliformes e disposta de forma bastante agregada (Figura 5A, B, D e F); porém, todos os isolados apresentaram fiálides com dimensões dentro dos limites estabelecidos para a espécie (4,0-9,5 x 2,0-3,9  $\mu\text{m}$ ). Conidióforos jovens podem apresentar elongações estéreis nos estágios iniciais de seu desenvolvimento, embora sejam totalmente férteis à completa maturação (Bisset, 1991b), o que também foi observado para alguns dos isolados analisados no presente trabalho (Figura 5B). Os conídios são



**Figura 3A-F.** Características culturais de isolados identificados como *T. harzianum*. (A) ALL-25.01; (B) ALL-07.01; (C) ALL-17.01; (D) ALL-30.01; (E) ALL-42.01; (F) ALL-52.01. Bar = 10mm.

basicamente subglobosos, lisos a alta magnificação, e com a base truncada (Figura 5G, H, I e J). As dimensões variaram entre 2,5-3,5 x 2,2-3,0  $\mu\text{m}$ , o que também é perfeitamente compatível para *T. harzianum* (Rifai, 1969; Bisset, 1991b; Gams & Meyer, 1998).

A espécie *T. harzianum* caracteriza-se principalmente por apresentar conídios pequenos e subglobosos, fazendo com que seja diferenciada de outras espécies dentro do gênero (Bisset, 1991b). Por outro lado, como esta espécie constitui-se em uma das espécies agregadas estabelecidas por Rifai (1969), isolados com uma certa variação morfológica são admitidos, uma vez que, como já foi observado, os limites entre espécies individuais não são claros (Samuels & Seifert, 1995). A figura 4 evidencia uma certa variação morfológica dentro de isolados de *T. harzianum*, principalmente quanto ao comprimento das fiálides, as quais podem ser mais longas e delgadas, especialmente quando são tomadas de regiões de conidiação mais esparsa (Bisset, 1991b), bem como, quando posicionadas na ramificação terminal do conidióforo (Rifai, 1969).

Veerkamp & Gams (1983), citados por Bisset (1991b), descreveram *T. inhamatum* como tendo forte tendência a conidiação em pústulas, fiálides mais largas e conídios levemente menores do que os observados para *T. harzianum*, o que evidencia uma alta afinidade de *T. inhamatum* com espécies da seção *Pachybasium*. Porém, Bisset (1991b) considerou esta espécie como conspecífica de *T. harzianum*, alegando que essas características são típicas de novos isolados desta espécie. Tais atributos também podem ser associados a isolados analisados no presente trabalho, os quais apresentam fiálides mais ampuliformes e largas (Figura 5A, B e D).

Bisset (1991b) considerou *T. harzianum* como pertencente a seção *Pachybasium*; porém, em virtude da perda de seu holótipo, o qual teria sido depositado por Rifai (1969) no herbário da Universidade de Sheffield (England), sob código T008, Gams & Meyer (1998) neotipificaram esta espécie e consideraram seu conidióforo como sendo típico da seção *Trichoderma*. Isso torna evidente que *T. harzianum* ocupa uma posição intermediária entre as seções *Trichoderma* e *Pachybasium* (Gams & Meyer, 1998), o que também foi perfeitamente observado para os isolados analisados aqui, os quais podem apresentar fiálides mais lageniformes, típicas da seção *Trichoderma* (Figura 5C

e E), como ampuliformes, mais características da seção *Pachybasium* (Figura 5A, B, D e F).

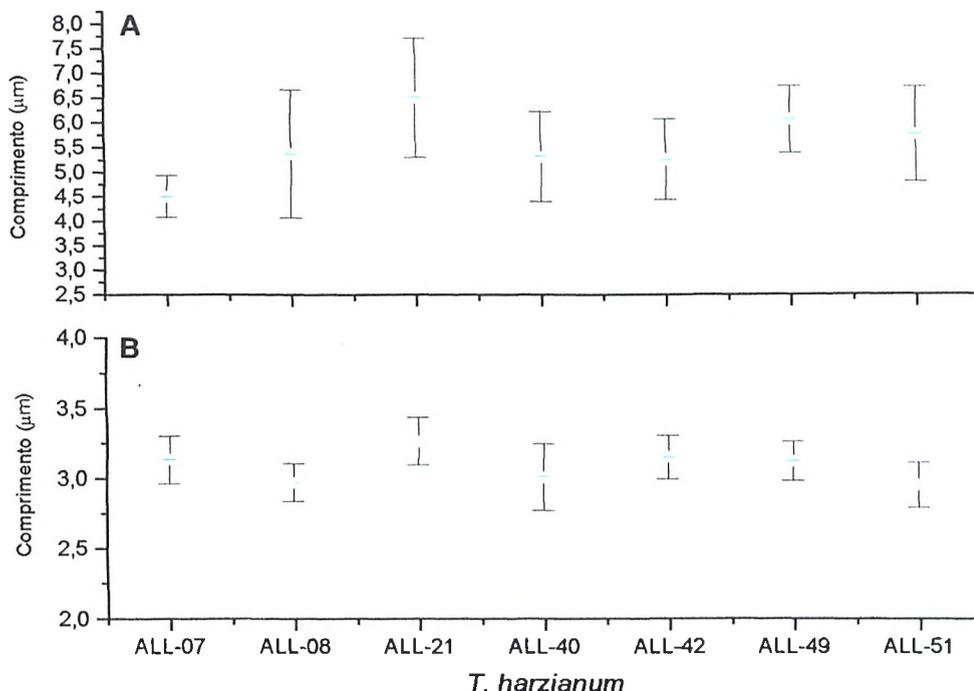
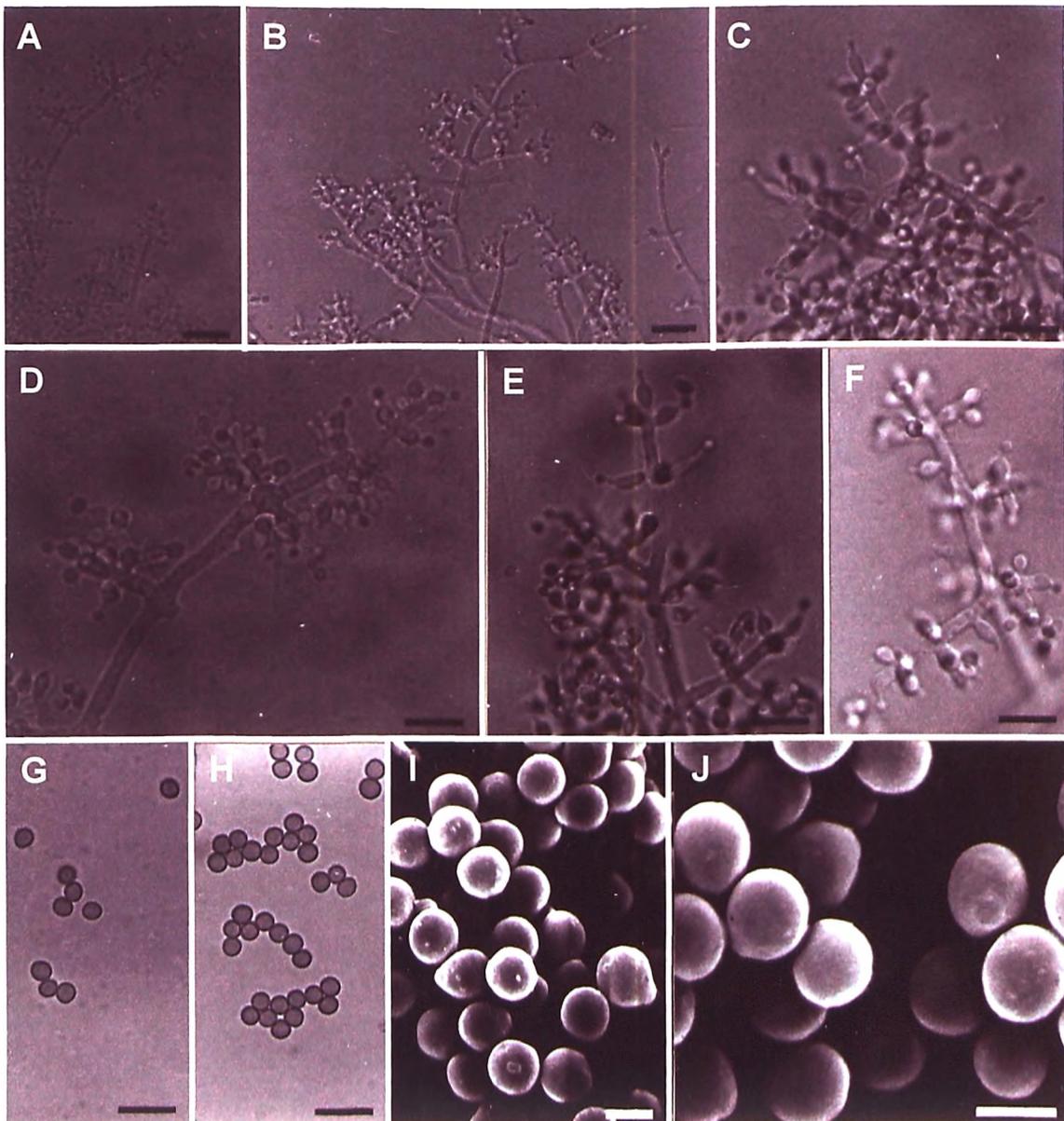


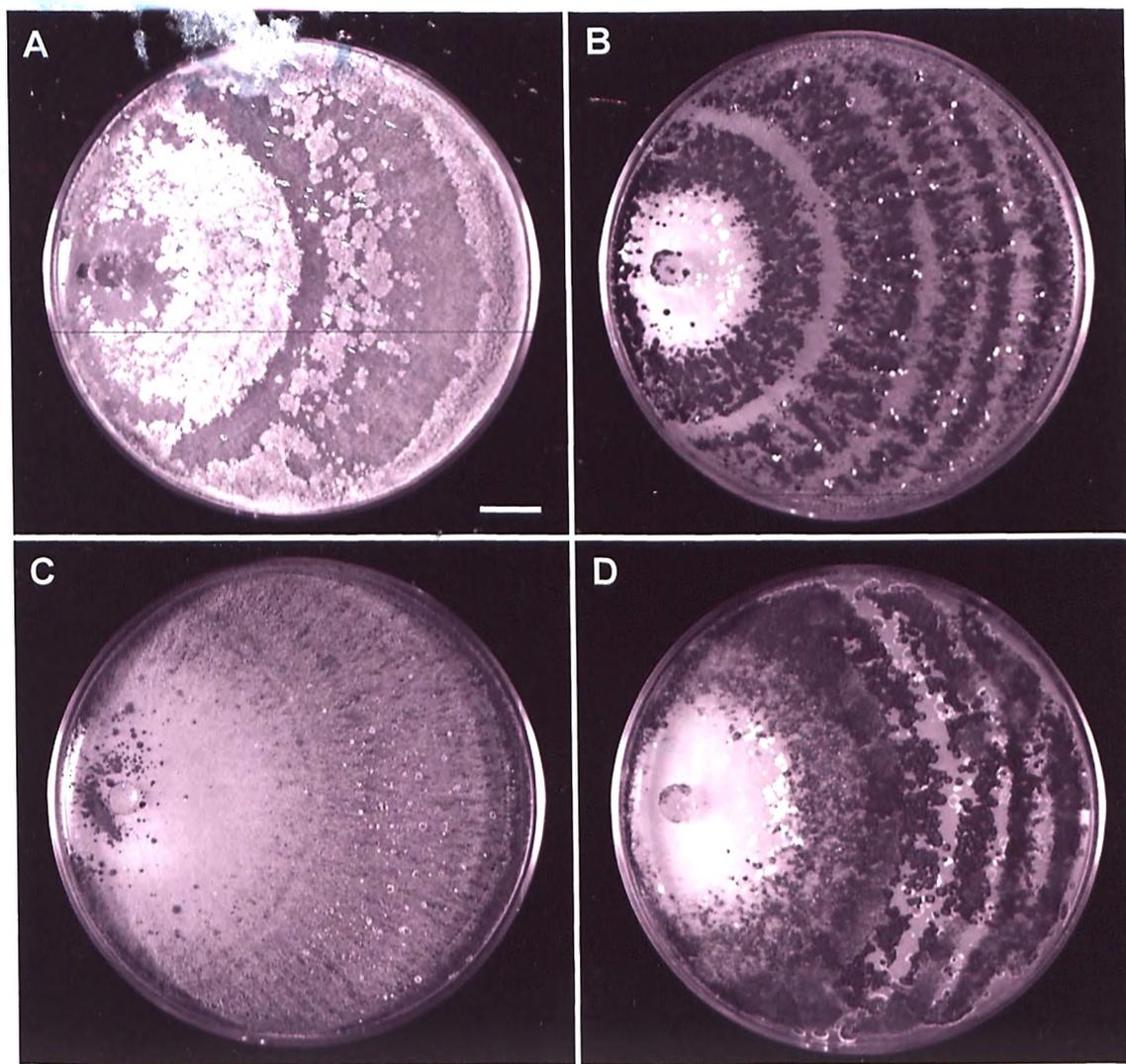
Figura 4. Variação no comprimento das fialides (A) e conídios (B) de isolados representativos de *T. harzianum*.

Essa espécie é considerada uma das mais importantes do gênero, uma vez que apresenta isolados freqüentemente utilizados no controle biológico de fungos fitopatogênicos (Hjeljord & Tronsmo, 1998); além de que os agressivos contaminantes encontrados em compostos comerciais de *Agaricus bisporus* também são classificados dentro desta espécie agregada, como *T. harzianum* grupo Th2 para isolados obtidos do Reino Unido e grupo Th4 para isolados americanos e canadenses (Seaby, 1996; Seaby 1998).

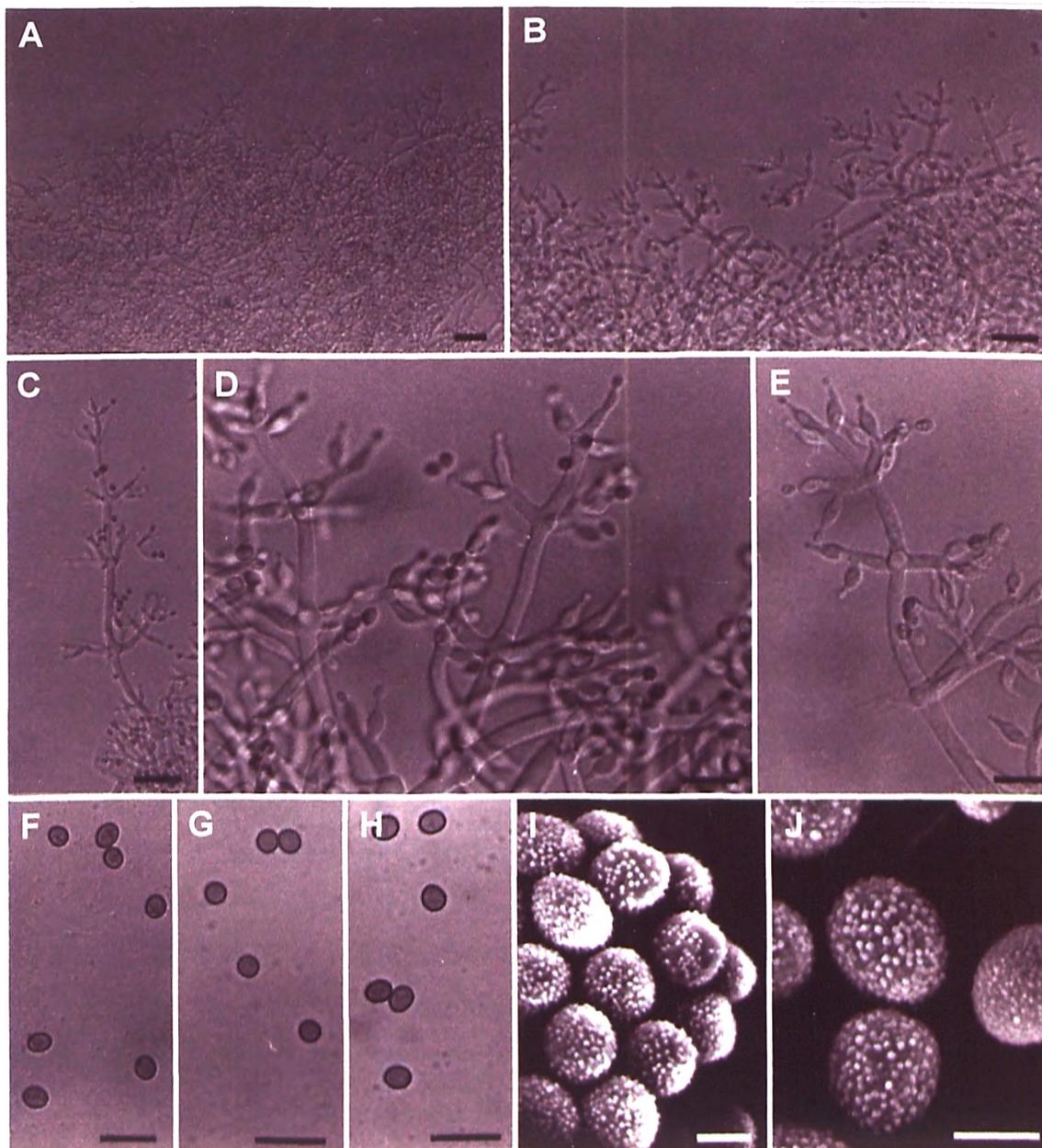


**Figura 5A-J.** *Trichoderma harzianum*. (A) Ramificação do conidióforo mostrando fiálides bastante ampuliformes (ALL-25.01). Bar = 20  $\mu\text{m}$ . (B) Terminação apical do conidióforo jovem, ainda relativamente estéril (UnB-1650). Bar = 20  $\mu\text{m}$ . (C) Porção do conidióforo com fiálides mais lageniformes (ALL-52.01). Bar = 10  $\mu\text{m}$ . (D) Idem a figura 2A, porém com maior aumento. Bar = 10  $\mu\text{m}$ . (E) Conidióforo com fiálides alongadas, tendendo a lageniforme (ALL-49.01). Bar = 10  $\mu\text{m}$ . (F) Ramificação lateral do conidióforo mostrando fiálides ampuliformes (ALL-50.01). Bar = 10  $\mu\text{m}$ . (G) e (H) Conídios subglobosos (ALL- 22.01). Bar = 10  $\mu\text{m}$ . (I) Conídios a elevada magnificação (MEV) mostrando a superfície lisa e porção basal truncada (ALL-08.01). Bar = 1  $\mu\text{m}$ . (J) Idem a figura 2I, porém com maior aumento. Bar = 1  $\mu\text{m}$ .

(1999), como rápido crescimento em cultura, com a formação de até cinco anéis concêntricos de densa conidiação e micélio aéreo praticamente ausente (Figura 6B). Conidióforo terminando em duas ou mais fiáldes (Figura 7A, B, C), as quais tem forma ampuliforme delgada, levemente alargadas na porção mediana, medindo  $6,0-10,5 \times 2,2-3,5 \mu\text{m}$  (Figura 7 D e E). Os conídios são de subglobosos a ovóides ( $4,0-5,2 \times 3,0-4,5 \mu\text{m}$ ) (Figura 7F, G e H) e, normalmente, firmemente ornamentados (Figura 7I e J).



**Figura 6A-D.** Características culturais de isolados de diferentes espécies de *Trichoderma*. (A) *T. spirale* (?). (B) *T. asperellum*. (C) *T. koningii*. (D) *Trichoderma* sp. (sp. nov. ?). Bar = 10 mm.



**Figura 7A-J. *Trichoderma asperellum*.** (A) Zona de intensa conidiação (pústula) (ALL-26.01). Bar = 30  $\mu\text{m}$ . (B) Idem a figura 7A, porém com maior aumento. Bar = 20  $\mu\text{m}$ . (C) Porção do conidióforo mostrando as fiálides relativamente ampuliformes (ALL-26.01). Bar = 20  $\mu\text{m}$ . (D) Parte apical do conidióforo mostrando fiálides pareadas, típicas da espécie (ALL-26.01). Bar = 10  $\mu\text{m}$ . (E) Outra porção do conidióforo evidenciando as fiálides pareadas e em verticilo de 3 (ALL-32.01). Bar = 10  $\mu\text{m}$ . (F), (G) e (H) Conídios de subglobosos a ovóides (ALL-32.01), (ALL-26.01) e (UnB-1700), respectivamente. Bar = 10  $\mu\text{m}$ . (I) e (J) Conídios a elevada magnificação (MEV), evidenciando o aspecto verrugoso dos mesmos (ALL-31.01) e (ALL-26.01). Bar = 5  $\mu\text{m}$  e Bar = 0,5  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

Embora *T. viride* seja a espécie de *Trichoderma* mais frequentemente referenciada por apresentar conídios verrugosos, *T. spirale* Bisset e *T. virens* (Miller, Giddens & Foster) von Arx também apresentam conídios de rugosos a tuberculados, quando observados através de MEV (Bisset, 1991b), bem como o anamorfo de *H. pachybasioides* Doi (Doi, 1972), principalmente quando jovens).

ISOLADOS IDENTIFICADOS COMO *T. asperellum*: UnB-1700; ALL-26.01; ALL-31.01; e, ALL-32.01.

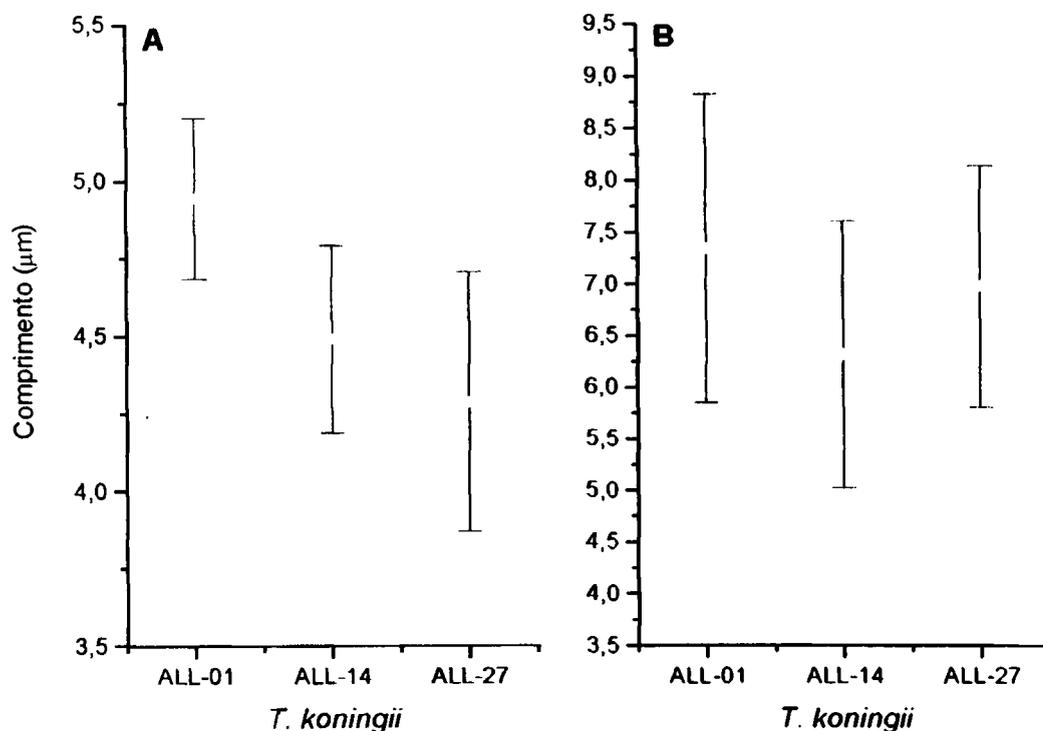
### 3.2.3- *Trichoderma koningii* Out.

*T. koningii* foi uma das nove espécies agregadas descritas por Rifai (1969). Bisset (1991a) aceitou a descrição da espécie estabelecida por Rifai (1969); porém, ao mesmo tempo, enfatizou a alta heterogeneidade desta, ao acrescentar que mais de 20 espécies morfologicamente distintas podem ser assinalados como *T. koningii* sensu Rifai, incluindo anamorfos de *Hypocrea*.

Esta espécie caracteriza-se por formar pústulas de conidiação compactas ou coalescentes (Gams & Bisset, 1998); embora isolados da localidade típica caracterizem-se por produzir conidiação difusa, cobrindo toda a placa (Lieckfeldt *et al.*, 1998). Os conidióforos variam de flexuosos a rígidos, com fiálides lageniformes ou mais ou menos ampuliformes, usualmente pareadas ou dispostas irregularmente em isolados com conidióforo flexuoso, ou em verticilo de 3-5 em isolados com conidióforo mais rígido e robusto, as quais medem 7,5-12 x 2,5-3,5  $\mu\text{m}$ , sendo que as terminais podem ser bastante alongadas. Os conídios são lisos, variando de subcilíndricos a elipsóides, medindo 3,0-5,5 x 1,9-3,2  $\mu\text{m}$  (Gams & Bisset, 1998).

No presente trabalho, todos os isolados identificados como *T. koningii* apresentaram conidiação com tendência difusa, cobrindo toda a superfície da placa (Figura 6C). Os conidióforos são típicos da seção *Trichoderma*, retos quando observados na zona de intensa conidiação (Figura 9A); porém, flexuosos quando observados individualmente (Figura 9B e C). Elevada variabilidade morfométrica também foi observada (Figura 8), principalmente em relação ao tamanho das fiálides (4,8-10,0 x 2,0-3,3  $\mu\text{m}$ ), bem como na forma e tamanho dos conídios (2,9-5,0 x 2,3-4,0  $\mu\text{m}$ ) (Figura 9D, E, F, G, H e I); embora

todas estejam dentro dos limites descritos para *T. koningii* sensu Rifai (Bisset 1991a).

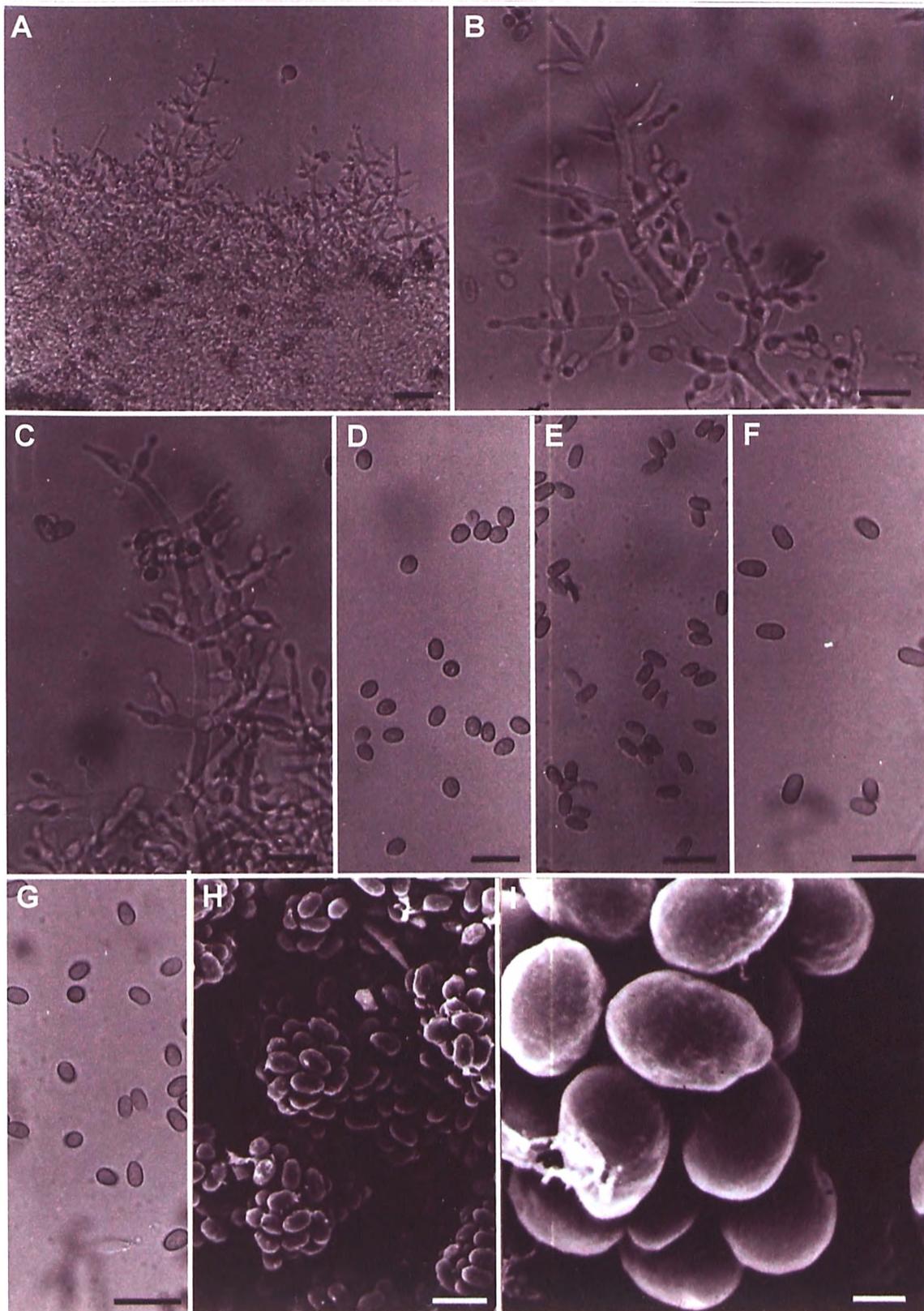


**Figura 8.** Variação no comprimento dos conídios (A) e fiálides (B) de isolados de *T. koningii*.

ISOLADOS IDENTIFICADOS COMO *T. koningii*: ALL-01.01; ALL-14.01; e, ALL-27.01.

### 3.2.4- *Trichoderma* sp. (sp. nov.) (?)

Três isolados (ALL-13, ALL-34, E, ALL-45) desprovidos de micélio aéreo e com alta tendência de conidiação pustular (Figura 6 D) foram isolados de solo de cerrado utilizado para fins agrícolas. Esses isolados apresentaram conidióforos flexuosos, característicos da seção *Trichoderma* (Figura 10A e B), fiálides intermediárias entre ampuliformes e lageniformes (4,0-8,5 x 2,5-3,7 µm) (Figura 10C) e conídios elipsóides lisos (3,5-4,8 x 2,8-3,4 µm) (Figura 10 D, E, F, G, e H). Também apresentaram uma peculiaridade de exalar um intenso odor de coco. Existe a possibilidade de que tais características ainda não tenham sido descritas para táxons atualmente definidos de *Trichoderma*, uma



**Figura 9 A-I.** *Trichoderma koningii*. (A) Conidióforos a partir de área de conidiação (ALL-14.01). Bar = 20  $\mu$ m. (B) e (C) Conidióforos flexuosos com fiáldes com tendência a lageniformes (ALL-14.01). Bar = 10  $\mu$ m. (D) Conídios com tendência a elipsóides

(ALL-27.01). Bar = 10  $\mu\text{m}$ . (E) e (F) Conídios subcilíndricos (ALL-01.01). Bar = 10  $\mu\text{m}$ . (G) Conídios intermediários entre elipsóides e subcilíndricos (ALL-14.01). Bar = 10  $\mu\text{m}$ . (H) Conídios agregados, entre elipsóides e cilíndricos (ALL-14.01). Bar = 5  $\mu\text{m}$ . (I) Conídios lisos e elipsóides, com a base conspícua (ALL-27.01). Bar = 1  $\mu\text{m}$ .

---

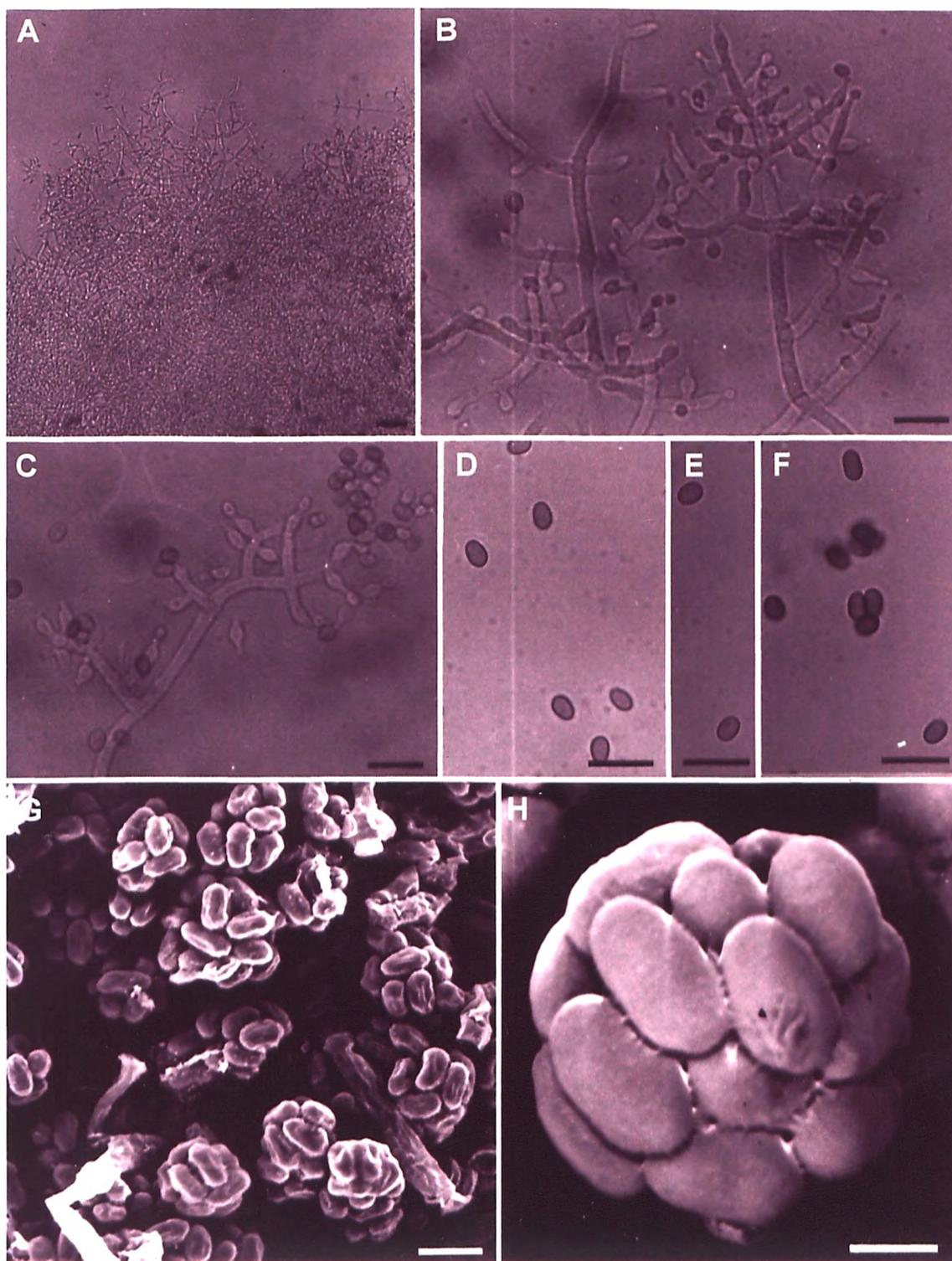
vez que as espécies freqüentemente referenciadas por produzir intenso odor de coco são *T. viride* e *T. atroviride* P. Karsten (Gams & Bisset, 1998), as quais produzem conídios de globosos a subglobosos e verrugosos (*T. viride*) ou lisos (*T. atroviride*). *T. koningii* possui conidióforo característico da seção *Trichoderma* e pode produzir conídios elipsóides. Entretanto, em recente neotificação de *T. koningii*, Lieckfeldt *et al.*, (1998) não chamaram a atenção para o fato da produção de intenso odor de coco por parte dos isolados analisados, ressaltando que nenhuma cultura produziu essa característica, nem sequer o neótipo (CBS 457.96).

De acordo com Collins & Halin (1972), citados por Howel (1998), o constituinte responsável pelo odor de coco proveniente de culturas de *T. viride* é o 6-pentil-pirona, o qual é um antibiótico de elevada atividade contra uma série de patógenos de plantas, como *Botrytis cinerea* Pers. : Fr, *Rhizoctonia solani* Kuhn e *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (Claydon *et al.*, 1987). Esse composto tem sido isolado a partir de *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii* e *T. hamatum* (Simon *et al.*, 1988; Guisalberti & Sivasithamparam, 1991); porém, a exceção de *T. koningii*, os isolados referenciados no presente estudo não possuem compatibilidade morfológica com os mesmos, o que torna ainda mais provável que esses isolados possam constituir-se em uma espécie ainda não descrita.

ISOLADOS IDENTIFICADOS COMO *Trichoderma* sp. (sp. nov. ?): ALL-13.01; ALL-34.01; e, ALL-45.01.

### 3.2.5- *Trichoderma spirale* Bisset (?)

A partir de solo de mata nativa obteve-se dois isolados com alta compatibilidade com *T. spirale* Bisset (Bisset, 1991b), uma vez que formam pústulas de conidiação inicialmente brancas que, posteriormente, evoluem para verde-azuladas (6A). Conidióforos com prolongamento apical em espiral estéril



**Figura 10(A-H).** *Trichoderma* sp. (sp. nov. ?). (A) Pústulas de conidiação mostrando a presença de conidióforos flexuosos (ALL-45.01). Bar = 30  $\mu\text{m}$ . (B) e (C) Conidióforos flexuosos com fiáides relativamente ampuliformes (ALL-13.01). Bar = 10  $\mu\text{m}$ . (D), (E) e (F), conídios elipsóides (ALL- 45.01), (ALL-34.01) e (ALL-13.01), respectivamente. Bar

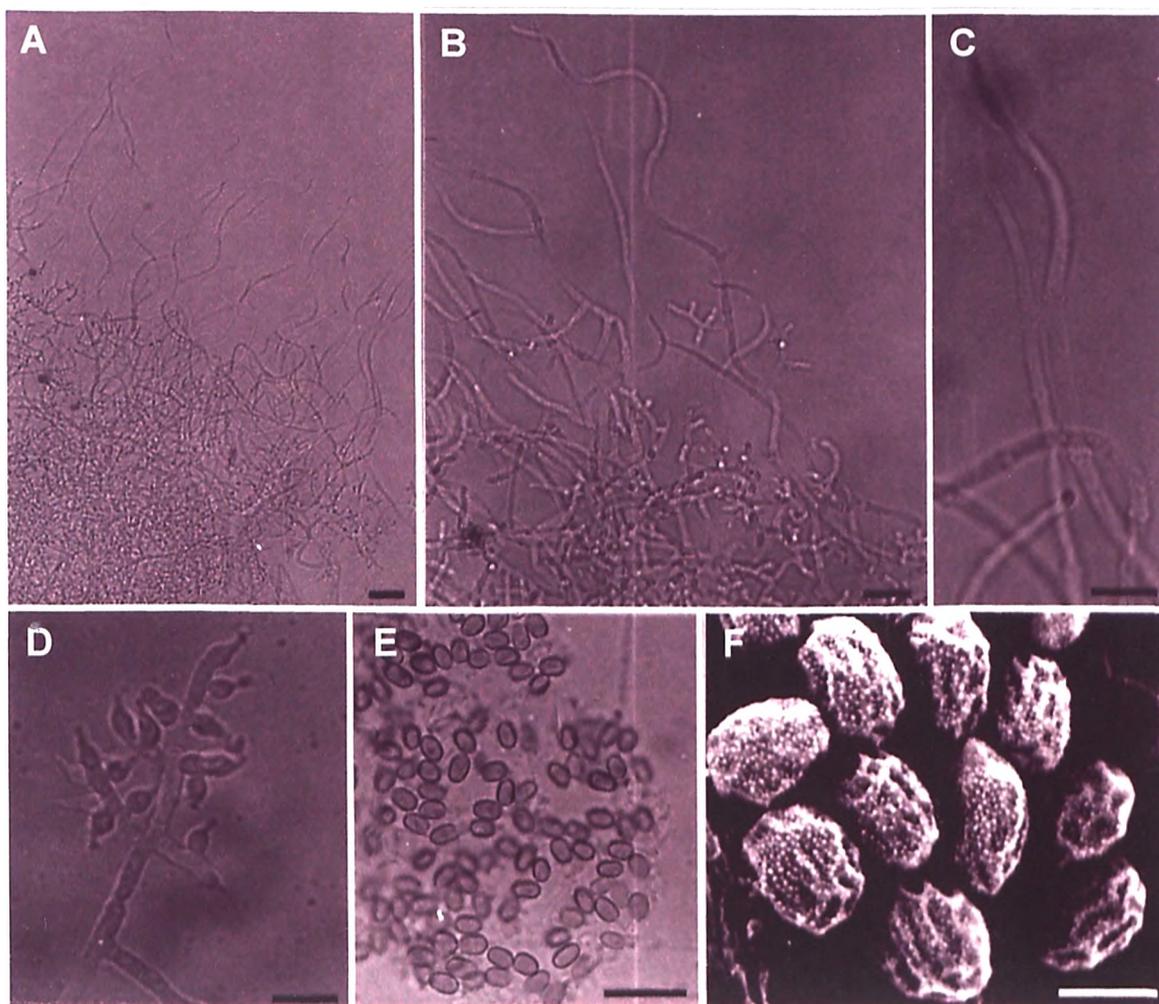
= 10  $\mu\text{m}$ . (G) Conídios elipsóides e agregados (ALL-13.01). Bar = 5  $\mu\text{m}$ . (H) Conídios elipsóides e lisos a elevada magnificação (MEV) (ALL-13.01). Bar = 1  $\mu\text{m}$ .

---

(Figura 11A e B), os quais freqüentemente sofrem anastomose (Figura 11C). Fiálides de ampuliformes a subglobosas (4,0-6,0 x 3,1-4,0  $\mu\text{m}$ ) (Figura 11D) e conídios relativamente elipsóides (3,8-5,0 x 2,3-3,3  $\mu\text{m}$ ), os quais apresentam-se persistentemente agregados em mucilagem (Figura 11E), bem como, diminutamente rugosos (Figura 11F).

*T. polysporum* (Link: Fr.) Rifai (Seção *Pachybasium*) também apresenta o ápice do conidióforo espiral estéril, fiálides predominantemente ampuliformes e conídios elipsoidais; entretanto, seus conídios são lisos, mesmo a elevada magnificação (Bisset, 1991b). Por outro lado, *H. pachybasioides* foi considerada o teleomorfo de *T. polysporum* (Gams & Bisset, 1998); porém, como esta espécie produz uma anamorfo com conídios diminutamente rugosos, principalmente quando jovens, deve-se questionar o fato de *H. pachybasioides* ser o anamorfo de *T. polysporum*, já que esse apresenta conídios lisos a elevada magnificação (MEV), mesmo quando jovens (Bisset, 1991b)

ISOLADOS IDENTIFICADOS COMO *Trichoderma spirale* (?): ALL-03.01 e ALL-04.01.



**Figura 11A-F.** *T. spirale* (?). (A) Pústula evidenciando ápices de conidióforos estéreis e em espiral (ALL-03.01). Bar = 30 $\mu$ m. (B) Ápice do conidióforo em espiral com ramificações laterais curtas (ALL-03.01). Bar = 20  $\mu$ m. (C) Anastomose entre ápices de conidióforo estéreis (ALL-03.01). Bar = 10  $\mu$ m. (D) Ramificação lateral do conidióforo mostrando fiálides de ampuliformes a subglobosas (ALL-04.01). Bar = 10  $\mu$ m. (E) Conídios elipsóides agregados em mucilagem (ALL-04.01). Bar = 10  $\mu$ m. (F) Conídios diminutamente rugosos a alta magnificação (MEV) (ALL-03.01). Bar = 1 $\mu$ m.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BETINA, V. & FARKAS, V. Sporulation and light-induced development in *Trichoderma*. In: KUBICEK, P. & HARMAN, G. E. (eds.). *Trichoderma* and

*Gliocladium*: basic biology, taxonomy and genetics, vol. 1, Taylor & Francis, London, p.3-34, 1998.

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. Can. J. Bot. 62:924-931, 1984.

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. Can. J. Bot. 69:2357-2372, 1991a

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. Can. J. Bot. 69:2373-2417, 1991b.

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. Can. J. Bot. 69:2418-2420, 1991c.

BISSETT, J. *Trichoderma atroviride*. Can. J. Bot. 70:639-641, 1992.

CBS Course of Mycology, 4<sup>th</sup> ed., Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands, 165 pp., 1998.

CLAYDON, N.; ALLAN, M.; HANSON, J. R. & AVENT, A. G. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. Trans. Br. Mycol. Soc. 88(4):503-513, 1987.

DANIELSON, R. M. & DAVEY, C. B. The abundance of *Trichoderma* propagules and distribution of species in forest soils. Soil Biology and Biochemistry 5:485-494, 1973.

DAVET, P. Technique pour l'analyse des populations de *Trichoderma* et de *Gliocladium virens* dans le sol. Ann. Phytopathol. 11:529-533, 1979.

DOI, N. & DOI, Y. Notes on *Trichoderma* and its allies 1. A list of teleomorphic species with *Trichoderma* or its allied anamorphs hitherto known. Bull. Natl. Sci. Mus. Tokyo 5:117-123, 1979.

- DOI, Y. A revision of Hypocreales with cultural observations. I. Some Japanese species of *Hypocrea* and *Podostroma*. Bull. Natl. Sci. Mus. Tokyo 9:354-357, 1966.
- DOI, Y. Revision of the Hypocreales with cultural observations. IV. The genus *Hypocrea* and its allies in Japan. I. General part. Bull. Natl. Sci. Mus. Tokyo. 12:693-724, 1969.
- DOI, Y. Some species of the genus *Hypocrea*. In Mycological reports from New Guinea and Solomon Islands. 2. Edited by Y. Kobayashi. Bull. Natl. Sci. Mus. Tokyo 14:387-400, 1971.
- DOI, Y. Revision of the Hypocreales with cultural observations. IV. The genus *Hypocrea* and its allies in Japan. 2. Enumeration of the species. Bull. Natl. Sci. Mus. Tokyo 15:649-751, 1972.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W. & ANDERSON, T-H. Compendium of Soil Fungi. Academic Press, London, p.794-809, 1980.
- GAMS, W. & MEYER, W. What exactly is *Trichoderma harzianum* Rifai? Mycologia 90:904-915, 1998.
- GAMS, W. & BISSET, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: KUBICEK, P. & HARMAN, G. E. (eds.) *Trichoderma* and *Gliocladium*: basic biology, taxonomy and genetics, vol. 1. Taylor & Francis, London, p.3-34, 1998.
- GUISALBERTI, E. L. & SIVASITHAMPARAM, K. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. Soil Biol. Biochem. 11:1011-1020, 1991.
- HERMOSA, M. R.; GRONDONA, I.; ITURRIAGA, E. A., DIAZ-MIGUEZ, J. M.; CASTRO, C.; MONTE, E. & GARCIA-ACHA, I. Molecular characterization

and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp.. Applied and Environmental Microbiology 66(5):1890-1898, 2000.

HJELJORD, L. & TRONSMO, A. *Trichoderma and Gliocladium* in biological control: an overview. In: KUBICEK, P. & HARMAN, G. E. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium: basic biology, taxonomy and genetics*, vol. 2. Taylor & Francis, London, p.131-151, 1998.

HOWEL, C. R. The role of antibiosis in biocontrol. In: KUBICEK, P. & HARMAN, G. E. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium: basic biology, taxonomy and genetics*, vol. 2. Taylor & Francis, London, p.173-184, 1998.

LIECKFELDT, E.; SAMUELS, G. J.; BÖRNER, T. & GAMS, W. *Trichoderma koningii*: neotypification and Hypocrea teleomorph. Can. J. Bot. 76:1507-1522, 1998.

LIECKFELDT, E.; SAMUELS, G. J.; NIRENBERG, H. I. & PETRINI, O. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species? Applied and Environmental Microbiology 65(6):2418-2428, 1999.

MEYER, R. J. PLASKOWITZ, J. S. Scanning electron microscopy of conidia and conidial matrix of *Trichoderma*. Mycologia 81(2):312-317, 1989.

MEYER, R. J. Mitochondrial DNAs and plasmids as taxonomic characteristics in *Trichoderma viride*. Applied and Environmental Microbiology 57(8):2269-2276, 1991.

MICROCAL SOFTWARE, Inc., Northampton, MA, 1997.

PERSOON, C. H. Dpositio methodica fungorum. Römer's Neues Magazin Botanische 1:81-128, 1794.

RIFAI, M. A. A revision of the genus *Trichoderma*. Mycol. Pap. 116:1-56, 1969.

- ROIGERS, D. J.; JEFFERS, S. N. & CALDEWELL, R. W. 1991. Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soils. *Soil Biol. Biochem.* 23(4):353-359, 1991.
- SAMUELS, G. J. & REHNER, S. A. Toward a concept of genus and species in *Trichoderma*. In: LUMSDEN, R.D. & VAUGHN, J.L. (eds.). *Pest Management: Biologically based technologies*. American Chemical Society, Washington, District of Columbia, p.186-188, 1993.
- SAMUELS, G.J. & SEIFERT, K.A. The impact of molecular characters on systematics of filamentous ascomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:37-67, 1995.
- SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol. Res.* 100(8): 923-935, 1996.
- SAMUELS, G. J.; LIECKFELDT, E. & NIRENBERG, H. I. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. *Sydowia* 51(1):71-88, 1999.
- SEABY, D. A. Differentiation of *Trichoderma* taxa associated with mushroom production. *Plant Pathology* 45:905-912, 1996.
- SEABY, D. A. *Trichoderma* as a weed mould or pathogen in mushroom cultivation. In: KUBICEK, P. & HARMAN, G. E. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium: basic biology, taxonomy and genetics*, vol. 2. Taylor & Francis, London, p.267-28, 1998.
- SIMON, A.; DUNLOP, R. W.; GUIALBERTI, E. L. & SIVASITHAMPARAM. *Trichoderma koningii* produces a pyrone compound with antibiotic properties. *Soil Biol Biochem.* 20:263-264, 1988.

SMITH, V. L.; WILCOX, W. F. & HARMAN, G. E. Potential for biological control of Phytophthora root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp.. *Phytopathology* 80:880-885, 1990.

STATSOFT, Inc.. Electronic statistics text book. Tulsa, OK, 1999.

## CAPÍTULO 2

### ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES DE *TRICHODERMA* SPP. ATRAVÉS DE MARCADORES DE rDNA e RAPD

## INTRODUÇÃO

O gênero do fungo *Trichoderma* apresenta espécies de relevada importância econômica para agricultura, especialmente em virtude de sua capacidade de atuar como agentes de controle biológico de fitopatógenos (Papavizas, 1985; Melo, 1996). Algumas espécies dentro deste gênero tem se mostrado eficientes principalmente contra fungos veiculados pelo solo, como *Gaeumannomyces graminis* Arx & D. L. Oliver, *Pythium ultimum* Trow, *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröt, *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Botrytis cinerea* Pers. : Fr. e *Sclerotium rolfsii* Sacc. (Maas & Kotze, 1987; Lumsden & Locke, 1989; Roigers *et al.*, 1991; Beagle-Ristaino & Papavizas, 1985; Knudsen *et al.*, 1991; Zimand *et al.*, 1996; Lewis & Fravel, 1996). Trabalhos recentes também tem evidenciado o potencial de espécies de *Trichoderma* na solubilização de nutrientes na rizosfera, tornando-os mais disponíveis à absorção pelas raízes e, conseqüentemente, promovendo o crescimento das plantas (Altomare *et al.*, 1999; Harman, 2000).

Apesar da importância deste gênero, sua taxonomia ainda permanece indefinida e estudos baseados somente em características morfológicas tem provado serem insuficientes, principalmente devido a aparente maleabilidade destas (Samuels, 1996; Turner *et al.*, 1997). Tal maleabilidade faz com que o limite entre algumas espécies seja quase imperceptível, fazendo com que confusões na identificação sejam freqüentes, principalmente quando se trabalha com um número elevado de isolados (Kuhls *et al.*, 1995; Lieckfeldt *et al.*, 2001; Kullnig *et al.*, 2001). Além disso, tendo em vista que a maioria das espécies de *Hypocrea* tem anamorfos em *Trichoderma* (Doi & Doi, 1979), é de se esperar que o número de espécies dentro deste gênero seja tão grande quanto o número de espécies de *Hypocrea* (Kindermann *et al.*, 1998). Análises filogenéticas também não tem resultado em definições monofiléticas correspondentes a espécies morfológicas pertencentes as seções *Trichoderma* e *Pachybasium* (Kindermann *et al.*, 1998; Lieckfeldt *et al.*, 1998; Gams & Meyer, 1998); ou seja, existem evidências que táxons morfológicamente definidos sejam polifiléticos (por exemplo: *T. harzianum*; Muthumeenakshi *et al.* 1994). Tais constatações talvez possam explicar a elevada diversidade

genética de alguns táxons alocados dentro das seções anteriormente referidas, mesmo quando considera-se somente a variabilidade intraespecífica (Zamir & Chet, 1985; Zimand, *et al.*, 1994; Arisan-Atac *et al.*, 1995; Turóczy *et al.*, 1996; Gómez *et al.*, 1997). Isso sugere que não existem características culturais e morfológicas suficientes para definição de espécies com segurança, especialmente dentro das seções *Trichoderma* e *Pachybasium*, as quais acomodam a maioria dos isolados habitantes do solo (Lieckfeldt *et al.*, 1998).

Em virtude dos problemas referentes a falta de características morfológicas suficientes para o estabelecimento de espécies individuais, bem como a elevada diferença na produção de metabólitos, distribuição e ecologia de determinados táxons, faz-se necessário um sistema de classificação mais estável, uma vez que a correta classificação de espécies utilizadas na pesquisa aplicada é fundamental para que se obtenha alta reprodutibilidade de resultados entre diferentes laboratórios, além de ser essencial para fins de registro legal (Samuels & Rehner, 1993). Tal sistema deve combinar técnicas morfológicas clássicas e técnicas moleculares, bem como, se possível, análise da conexão entre anamorfo-teleomorfo (holomorfo) (Samuels, 1996; Rossman, 1996).

O objetivo do presente trabalho foi determinar as relações genéticas entre as espécies de *Trichoderma* caracterizadas morfológicamente no capítulo 1, utilizando-se inicialmente a análise do perfil de restrição do produto da amplificação da região correspondente aos espaços transcritos internos ITS1 e ITS2 e o gene 5,8S do DNA ribossomal (rDNA). A fim de verificar se realmente existe elevada variabilidade genética dentro de táxons morfológicamente definidos, isolados identificados como *T. harzianum* tiveram sua variabilidade genética determinada através de marcadores RAPD.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1- ISOLADOS UTILIZADOS

Os isolados utilizados no presente trabalho estão listados na Tabela 1 (Capítulo 1).

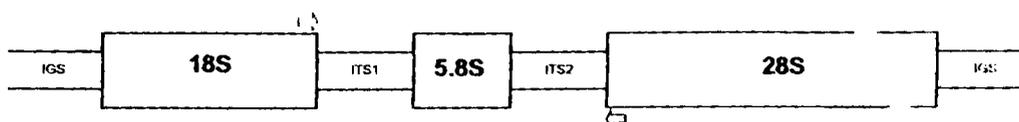
## 2.2- EXTRAÇÃO DE DNA

Frascos contendo 50 mL de meio MYG líquido foram inoculados com uma solução de esporos suficiente para obter-se uma concentração de  $1 \times 10^7$  conídios/mL. A incubação foi realizada em Shaker regulado para 120 rpm e 28°C, por 7-8 dias. Após o tempo de crescimento o micélio foi coletado por filtração e o DNA extraído de acordo com metodologia proposta por Zolan & Pukilla (1986). A quantificação do DNA, após a extração, foi efetuada visualmente em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etideo (Sambrook *et al.*, 1989) e, confirmada em espectrofotômetro Ultrospect 2000 (Pharmacia Biotech, Cambridge, England).

## 2.3- AMPLIFICAÇÃO E DIGESTÃO DOS PRODUTOS DO rDNA

A amplificação da região do rDNA (incluindo espaçador transcrito interno (ITS) 1 e 2 e, o gene 5.8S) dos isolados de *Trichoderma* foi efetuada utilizando-se os oligonucleotídeos específicos ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Figura 1). Os parâmetros utilizados na reação de amplificação da região correspondente ao rDNA foram os seguintes: a amplificação foi efetuada em 30  $\mu$ L de reação, incluindo 0,25 mM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Gibco BRL, Inc., Bethesda, MD), tampão da enzima *Taq* DNA polimerase 1X, contendo  $MgCl_2$ , *Taq* DNA polimerase (2,5 U) (Amersham International, UK); oligonucleotídeos 10 ng, DNA genômico 10 ng. A reação foi efetuada em um termociclador PTC-100<sup>TM</sup> (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA), programado para uma desnaturação inicial à 94°C, por 3 min.; 40 ciclos de desnaturação à 92°C, por 1,5 min., anelamento à 44°C, por 1,5 min. e, extensão à 72°C, por 2 min.; seguido por uma extensão final à 72°C, por 5 min. Após a amplificação, a fase aquosa foi transferida para tubos estéreis e o DNA precipitado com acetato de amônio 0,3 M e 2,5 volumes de etanol (Zolan & Pukilla, 1986). Posteriormente, o DNA foi ressuspendido em TE, para uma concentração final de 100 ng/ $\mu$ L e submetido a reação de digestão com 4 enzimas de restrição (*Eco* RI, *Bam* HI, *Hha* I e *Msp* I) (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY), respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante.

Após a digestão, o produto de reação foi separado em gel de agarose 1,5%, utilizando-se tampão TEB 1X (TBE: 0,45 M de Tris-borato, 0,001 M de EDTA [pH 8,0]). Para estimar a massa molecular dos produtos de digestão foi utilizado 1,0 µg do marcador 100 bp DNA ladder (Gibco BRL, Inc., Bethesda, MD). Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) (Sambrook *et al.*, 1989) e fotografado utilizando-se um transluminador de luz UV.



**Figura 1.** Esquema da região do rDNA com a localizações dos oligonucleotídeos ITS5 (seta amarela) e ITS4 (seta vermelha). O ápice de cada seta indica a porção 3' do oligonucleotídeo. Na figura a subunidade maior do rDNA (28S) apresenta-se truncada (Adaptado de White *et al.*, 1990).

#### 2.4- PCR-RAPD

A análise da variabilidade entre isolados de *T. harzianum* foi efetuada utilizando-se o DNA genômico dos isolados listados na Tabela 2.

Quatro oligonucleotídeos do Sistema Operon (Operon Technologies Inc., Alameda, CA) foram utilizados para a obtenção dos marcadores RAPD (Williams *et al.*, 1990), OPE-04 (5'-GTGACATGCC-3'), OPE-15 (5'-ACGCACAACC-3'), OPE-18 (5'-GGACTGCAGA-3') e, OPE-19 (5'-ACGGCGTATG-3'). Os parâmetros utilizados na reação de PCR-RAPD foram os seguintes: a amplificação foi efetuada em 30 µL de reação, incluindo 0,25 mM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Gibco BRL, Inc., Bethesda, MD), tampão da enzima *Taq* DNA polimerase 1X, contendo MgCl<sub>2</sub>; *Taq* DNA polimerase (2,5 U) (Amersham International, UK); oligonucleotídeos 10 ng; DNA genômico 10 ng. A reação foi efetuada em um termociclador PTC-100<sup>IM</sup> (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA), programado para uma desnaturação inicial à 94 °C, por 3 min.; 40 ciclos de desnaturação à 92 °C, por

1,5 min., anelamento à 37°C, por 1,5 min. e, extensão à 72°C, por 2 min.; seguido por uma extensão final à 72°C, por 5 min.

Após a reação, metade do produto da amplificação foi separado em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo, utilizando-se tampão TEB 1X (TBE: 0,45 M de Tris-borato, 0,001 M de EDTA [pH 8,0]). O marcador  $\lambda$  Eco RI/Hind III DNA ladder (Promega, Madison, WI, USA) (0,5  $\mu$ g) foi utilizado para estimar a massa molecular dos produtos da amplificação. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5  $\mu$ g/mL) (Sambrook *et al.*, 1989) e fotografado para análise posterior.

**Tabela 2.** Identificação inicial e origem dos isolados de *T. harzianum* utilizados para análise de RAPD.

<b>Taxon</b>	<b>Identificação Inicial</b>	<b>Origem</b>
<i>T. harzianum</i>	UnB-1642	Formosa, DF
<i>T. harzianum</i>	UnB-1644	Pipiripau, DF
<i>T. harzianum</i>	UnB-1645	Sobradinho, DF
<i>T. harzianum</i>	UnB-1647	ND, DF
<i>T. harzianum</i>	ALL-05.01	Goiânia, GO
<i>T. harzianum</i>	ALL-11.01	Goiânia, GO
<i>T. harzianum</i>	ALL-16.01	Orizona, GO
<i>T. harzianum</i>	ALL-18.01	Orizona, GO
<i>T. harzianum</i>	ALL-19.01	Orizona, GO
<i>T. harzianum</i>	ALL-20.01	Orizona, GO
<i>T. harzianum</i>	ALL-21.01	Orizona, GO
<i>T. harzianum</i>	ALL-22.01	Orizona, GO
<i>T. harzianum</i>	ALL-23.01	Orizona, GO
<i>T. harzianum</i>	ALL-24.01	Orizona, GO
<i>T. harzianum</i>	ALL-25.01	Brazabranes, GO
<i>T. harzianum</i>	ALL-28.01	Goianira, GO
<i>T. harzianum</i>	ALL-38.01	Rio Verde, GO
<i>T. harzianum</i>	ALL-40.01	Rio Verde, GO
<i>T. harzianum</i>	ALL-41.01	Rio Verde, GO
<i>T. harzianum</i>	ALL-42.01	Rio Verde, GO
<i>T. harzianum</i>	ALL-43.01	Rio Verde, GO
<i>T. harzianum</i>	ALL-44.01	Rio Verde, GO
<i>T. harzianum</i>	ALL-47.01	Rio Verde, GO
<i>T. harzianum</i>	ALL-48.01	Rio Verde, GO
<i>T. harzianum</i>	ALL-49.01	Rio Verde, GO
<i>T. harzianum</i>	ALL-51.01	Rio Verde, GO
<i>T. harzianum</i>	ALL-52.01	Rio Verde, GO

ND- Não Determinada

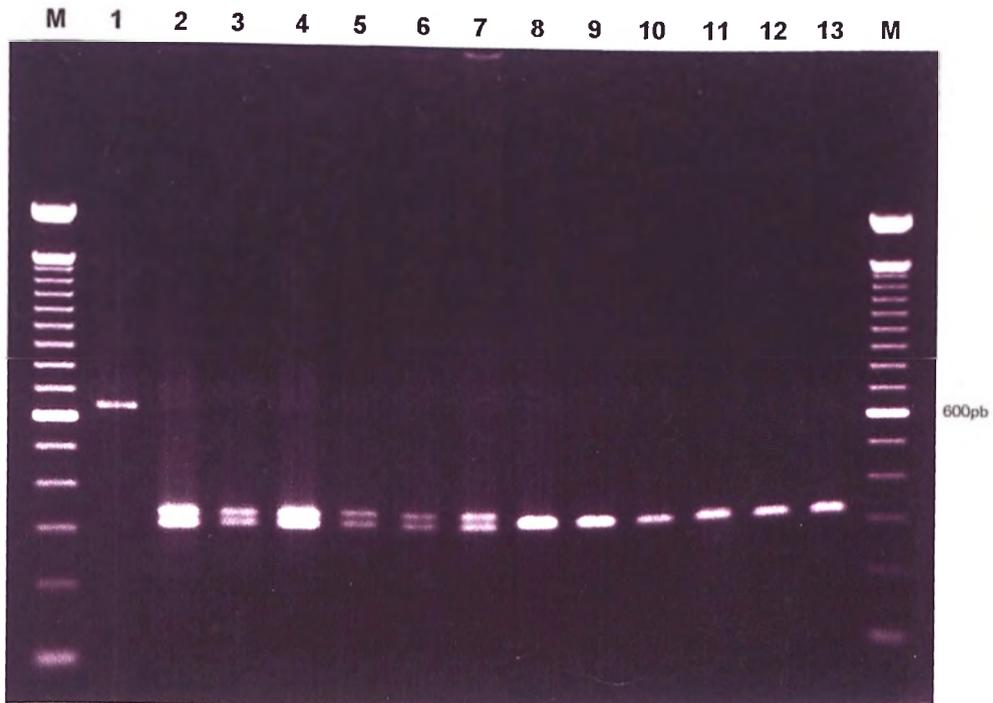
## 2.5- ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ISOLADOS DE *TRICHODERMA* SPP.

Para análise de RAPD, somente as bandas claramente detectáveis foram consideradas. Tanto as bandas geradas por RAPD como as produzidas pela digestão do rDNA foram analisadas a partir de duas possibilidades, presença (1) ou ausência (0). O coeficiente de Jaccard foi utilizado para computar os dados, gerando uma matriz de similaridade, utilizando-se para isso o programa SIMQUAL, contido no pacote NTSYS-pc, versão 1.8 (Rohlf, 1993). A análise de agrupamento foi efetuada pelo método UPGMA (*unweighted pair-group method using an arithmetic average*) (Sneath & Sokal, 1973), através do programa SAHN, também do NTSYS-pc, versão 1.8 (Rohlf, 1993).

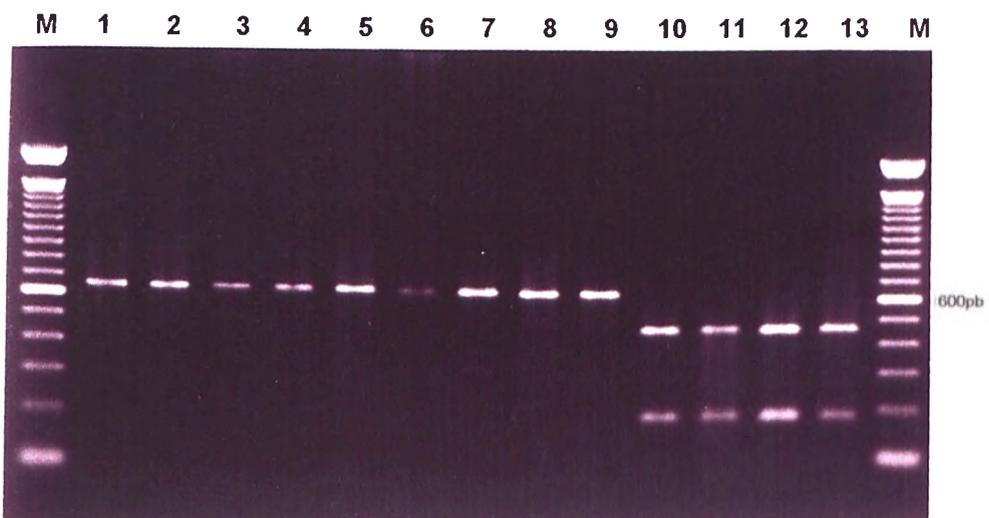
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1- DIVERSIDADE GENÉTICA BASEADA NO PERFIL DE DIGESTÃO DO RDNA

De acordo com os resultados obtido no presente trabalho, a amplificação das regiões ITS 1 e 2 e, o gene 5,8S com os oligonucleotídeos ITS5 e ITS4 produziu um fragmento de aproximadamente 640 pares de bases (pb) (Figura 2A e B e Figura 3A e B (não digeridos nas colunas 1). As enzimas de restrição *Eco* RI, *Bam* HI e *Hha* I foram capazes de produzir dois padrões distintos de digestão na população analisada (Figura 2A e B e, Figura 3A), enquanto que *Msp* I produziu três padrões de digestão (Figura 3B). A enzima de restrição *Eco* RI digeriu o produto da amplificação da região correspondente aos espaços transcritos internos (ITS) 1 e 2 e o gene 5.8S produzindo dois padrões, o primeiro com dois fragmentos de 310 e 330 pares de bases (pb), respectivamente e, o segundo também com dois fragmentos de aproximadamente 320 pb (Figura 2A). A digestão com a enzima *Bam* HI também produziu dois padrões, sendo o primeiro aquele em que o fragmento submetido a digestão não foi digerido e, o segundo aquele que o produto da digestão gerou dois fragmentos com tamanhos aproximados de 460 pb e 180 pb (Figura 2B). Dois padrões de digestão também foram obtidos quando o produto da amplificação correspondente aos espaços transcritos internos (ITS) 1 e 2 e o gene 5.8S foram digeridos com a enzima de restrição *Hha* I, sendo que o primeiro produziu quatro fragmentos (dois com tamanho aproximado de

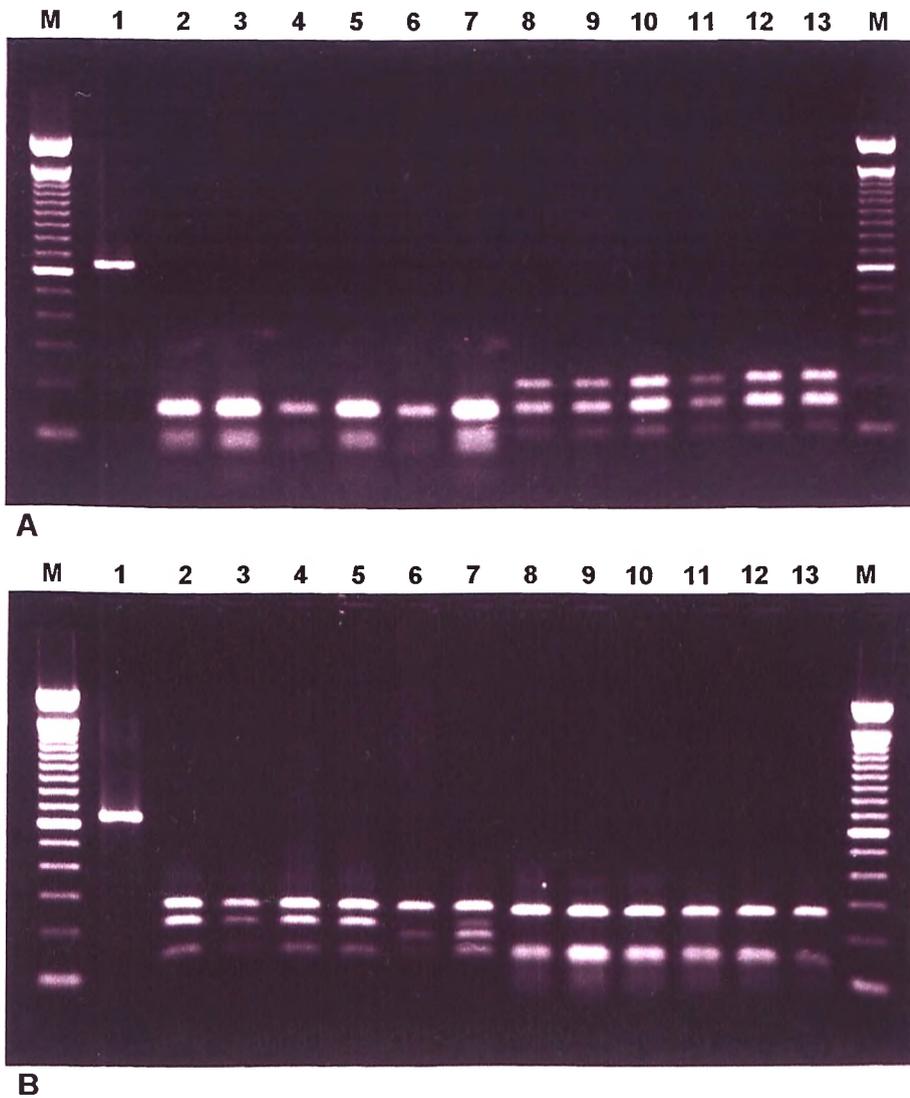


A



B

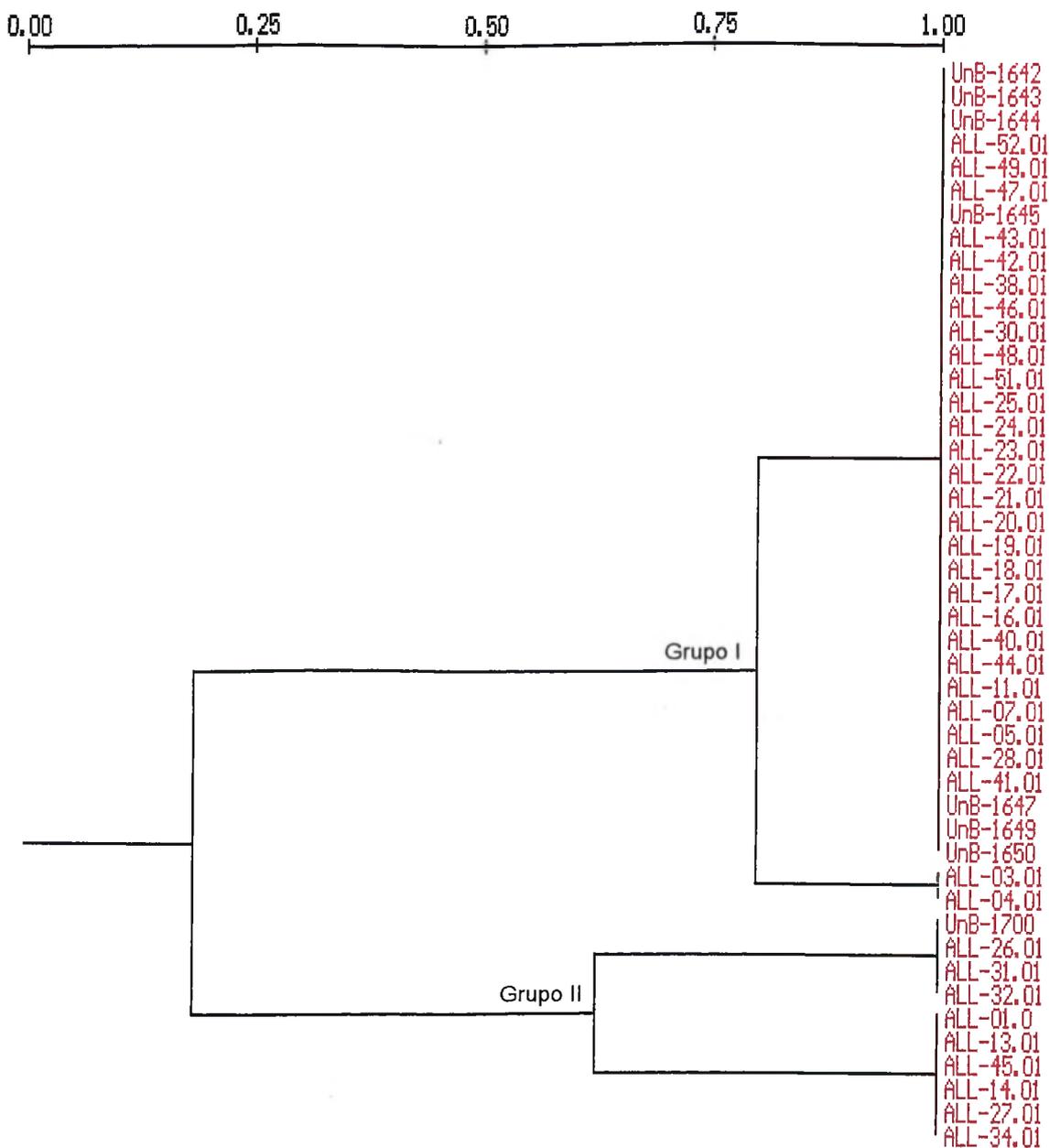
**Figura 2.** Padrões de RFLP gerados pela digestão da região do rDNA de espécies de *Trichoderma* com as enzimas de restrição *EcoR* I (A) e *Bam* HI (B). Coluna 1, *T. harzianum* (ALL-19.01) (não digerido); coluna 2, *T. harzianum* (ALL-19.01); coluna 3, *T. harzianum* (ALL-11.01); coluna 4, *T. harzianum* (ALL-40.01); coluna 5, *T. harzianum* (ALL-49.01); coluna 6, *T. spirale* (?) (ALL-03.01); coluna 7, *T. spirale* (?) (ALL-04.01); coluna 8, *T. asperellum* (ALL-26.01); coluna 9, *T. asperellum* (ALL-31.01); coluna 10, *T. koningii* (ALL-14.01); coluna 11, *T. koningii* (ALL-27.01); coluna 12, *Trichoderma* sp. (sp nov.) (?) ALL-13.01); e, coluna 13, *Trichoderma* sp.(sp. nov.) (?) (ALL-45.01). M = marcador de massa molecular (100 bp DNA ladder).



**Figura 3.** Padrões de RFLP gerados pela digestão da região do rDNA de espécies de *Trichoderma* com as enzimas de restrição *Hha* I (A) e *Msp* I (B). Coluna 1, *T. harzianum* (ALL-24) (não digerido); coluna 2, *T. harzianum* (ALL-24); coluna 3, *T. harzianum* (ALL-11); coluna 4, *T. harzianum* (ALL-40); coluna 5, *T. harzianum* (ALL-49); coluna 6, *T. spirale* (?) (ALL-03); coluna 7, *T. spirale* (?) (ALL-04); coluna 8, *T. asperellum* (ALL-26); coluna 9, *T. asperellum* (ALL-31); coluna 10, *T. koningii* (ALL-14); coluna 11, *T. koningii* (ALL-27); coluna 12, *Trichoderma* sp. (sp. nov.) (?) (ALL-13); e, coluna 13, *Trichoderma* sp. (sp. nov.) (?) (ALL-45). M = marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder).

150 pb, e dois de aproximadamente 100 e 80 pb aproximadamente) e o segundo três fragmentos de aproximadamente 210, 150 e, 110 pb, respectivamente (Figura 3A). Com a enzima de restrição *Msp* I obteve-se três padrões de digestão, o primeiro produzindo três fragmentos com tamanho aproximado de 270, 220 e, 150 pb, respectivamente; o segundo com três fragmentos de aproximadamente 270, 210 e, 160 pb, respectivamente; e, o terceiro também com três fragmentos (um com 260 pb e dois com 150 pb aproximadamente) (Figura 3B). Fragmentos com tamanho inferior a 80 pb foram obtidos principalmente quando as enzimas de restrição *Hha* I e *Msp* I foram utilizadas (Figura 3A e B); entretanto, devido a dificuldade de visualização e quantificação, estes não foram computados para análise posterior. A variação gerada, a partir da digestão da região do rDNA, foi utilizada para computar a diversidade genética entre as espécies analisadas (Figura 4).

A diversidade genética baseada na análise de RFLP da região correspondente aos espaços transcritos internos (ITS) 1 e 2 e, o gene 5,8S gerou dois grupos distintos (Figura 4). O primeiro e maior grupo contém isolados *T. harzianum* (≈ 74%) e *T. spirale* (?) (ALL-03.01 e ALL-04.01), os quais pertencem a seção *Pachybasium*. Já o segundo grupo é representando por isolados de *T. asperellum* (UnB-1700, ALL-26.01, ALL-31.01 e ALL-32.01), *T. koningii* (ALL-01.01, ALL-14.01 E ALL-27.01) e *Trichoderma* sp. (sp. nov. ?) (ALL-13.01, ALL-34.01 E ALL-45.01) (Figura 4). *T. koningii* e *Trichoderma* sp. não apresentaram variação no perfil de digestão da região do rDNA com as enzimas utilizadas, sugerindo que esses isolados (*Trichoderma* sp.) podem ser geneticamente relacionados com espécies pertencentes a essa seção *Trichoderma*. A relação dos isolados de *Trichoderma* sp. com espécies pertencentes a seção de mesmo nome já foi observada principalmente a nível de características culturais (Capítulo 1), uma vez que a produção de intenso odor de coco é comum a espécies desta seção, como *T. viride* e *T. atroviride*; além das características do conidióforo de *Trichoderma* sp. também serem mais compatíveis com espécies pertencentes a seção *Trichoderma*.



**Figura 4.** Dendrograma mostrando as relações genéticas entre 46 isolados de *Trichoderma* spp., baseado na análise do perfil polimórfico de 15 bandas geradas a partir da digestão do produto da amplificação da região do DNA ribossomal (rDNA).

Castle *et al.*, (1998) agruparam espécies pertencentes as seções *Pachybasium*, *Longibrachiatum* e *Trichoderma* com base no perfil de digestão da região correspondente aos espaços transcritos internos (ITS) 1 e 2 e, o gene 5,8S do rDNA. Das sete enzimas (*Hind* III, *Kpn* I, *Bgl* II, *Xba* I, *Pst* I, *Sma* I e *Eco* RI) utilizadas, somente *Bam* HI foi capaz de produzir perfil polimórfico, sendo que as espécies que não apresentaram o produto de amplificação do rDNA digerido foram consideradas como fenótipo 1 e pertenciam a seção *Pachybasium*, como *T. harzianum*, *T. hamatum* e *T. spirale*. Isolados de *T. longibrachiatum* e *T. citrinoviride*, os quais pertencem a seção *Longibrachiatum*, tiveram o produto da amplificação do rDNA digerido, produzindo dois fragmentos, um de 560 e outro 140 pb, aproximadamente. Essas espécies foram considerados como fenótipo 2. O fenótipo 3 foi apresentado por *T. koningii* e *T. atroviride*, os quais também sofreram digestão e produziram dois fragmentos, um de 480 e outro de 220 pb. Os resultados obtidos no presente trabalho, com respeito a digestão com enzima de restrição *Bam* HI (Figura 1B), concordam com os referidos anteriormente uma vez que os isolados pertencentes a seção *Pachybasium* (*T. harzianum* e *T. spirale*) não foram digeridos, enquanto os pertencentes a seção *Trichoderma* (*T. koningii* e, possivelmente *Trichoderma* sp.) apresentaram produtos de digestão semelhantes aos obtidos por Castle *et al.*, (1998).

*T. asperellum* também não sofreu digestão com a enzima *Bam* HI, embora seja uma espécie estreitamente relacionada com *T. hamatum*, a qual é uma espécie geneticamente mais próxima da seção *Trichoderma* (Hermosa *et al.*, 2000), apesar de suas características morfológicas serem típicas da seção *Pachybasium* (Bisset, 1991b). Por outro lado, a digestão com as enzimas *Eco* RI, *Hha* I *Msp* I, respectivamente (Figura 2A e Figura 3A e B) fizeram com que os isolados de *T. asperellum* agrupassem juntamente com os de *T. koningii* e *Trichoderma* sp., evidenciando que as espécies *T. asperellum* e *T. hamatum* realmente estão geneticamente mais próximas das espécies alocadas dentro da seção *Trichoderma* e não da seção *Pachybasium*, como acreditava-se anteriormente (Lübeck & Samuels, 1999; Hermosa *et al.* 2000).

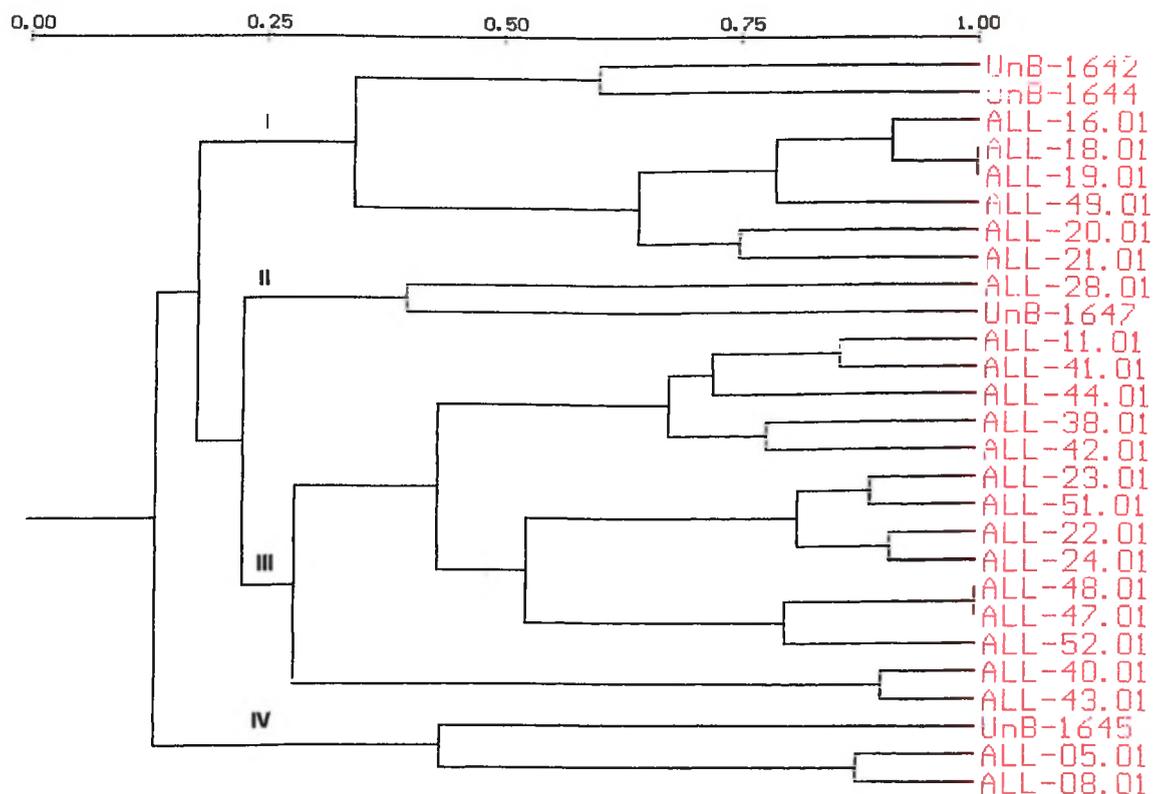
Gams & Meyer (1998), ao neotificarem recentemente a espécie *T. harzianum*, também utilizaram o perfil de digestão da região correspondente aos espaços transcritos internos (ITS) 1 e 2 e, o gene 5,8S do rDNA, com a

finalidade de agrupar isolados provenientes de diferentes origens. Esses autores tiveram o cuidado de incluir nesse trabalho isolados de *T. harzianum* utilizados em controle biológico, como por exemplo *T. harzianum* CBS 244.03 (TRICHODEX™), bem como isolados responsáveis por epidemias de mofo verde ("green mould") em *Agaricus bisporus* (Seaby, 1996). De acordo com os resultados obtidos por esses autores, *T. harzianum* s. l. é dividido em dois grupos principais, sendo o primeiro grupo (*T. harzianum* s. s.) formado pelo neótipo (CBS 226.95), bem como importantes isolados utilizados em controle biológico. O segundo grupo compreendeu isolados do complexo *T. viride-atroviride*. Tais resultados concordam com os obtidos no presente estudo. A partir da digestão com a enzima de restrição *Hha* I obteve-se um perfil praticamente idêntico ao obtido pelos autores anteriormente referidos para o grupo de isolados identificados como *T. harzianum* e, além disso, os tornam candidatos potencial para utilização em controle biológico, já que agruparam juntamente com outros isolados utilizados para esse fim.

A digestão com a enzima de restrição *Msp* I foi a única a proporcionar três perfis polimórficos, permitindo assim a separação de isolados de *T. spirale* (?) (ALL-03.01 e ALL-04.01) dos demais isolados de *T. harzianum* (Figura 3A e Figura 4).

### 3.2- DIVERSIDADE GENÉTICA BASEADA EM MARCADORES RAPD

Com o objetivo de avaliar a diversidade genética entre isolados de *T. harzianum* foram utilizados 42 marcadores RAPD polimórficos. A análise de agrupamento através do método UPGMA proporcionou a separação dos isolados analisados em quatro grupos (Figura 5), confirmando a elevada diversidade genética encontrada dentro desta espécie agregada (Zamir & Chet, 1985; Zimand, *et al.*, 1994; Gómez *et al.*, 1997), o que pode explicar os diferentes níveis de atividade biológica encontrados quando trabalha-se com isolados pertencentes a esta espécie (Grondona *et al.*, 1997); embora grupos altamente homogêneos também possam ocorrer, como observado para biótipos causadores do mofo verde em cultura de cogumelo (*Agaricus bisporus*) comercial na Europa (*Th* 2) e América do Norte (*Th* 4) (Ospina-Giraldo *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999), indicando que grupos pertencentes a esses dois biótipos podem ser de origem clonal (Chen *et al.*, 1999).



**Figura 5.** Dendrograma mostrando a variabilidade genética entre 27 isolados de *Trichoderma* spp., baseado na análise do perfil polimórfico de 42 marcadores RAPD. Os números dos grupos encontram-se acima da inserção ramos (nós).

Os resultados obtidos no presente trabalho não demonstram, a princípio, correlação entre variabilidade genética e distribuição geográfica (Capítulo 1). No entanto, isolados com elevada capacidade de enrolamento (micoparasitismo) (Capítulo 3) demonstraram uma certa tendência a homogeneidade, uma vez que aparecem dentro de uma mesmo grupo (Grupo III) (Figura 5).

Através do presente trabalho fica claro que isolados de *T. harzianum* obtidos de solo do cerrado brasileiro apresentam uma elevada diversidade genética (Figura 5), o que também já foi evidenciado para características culturais e morfológicas (Capítulo 1) e bioquímicas (Capítulo 3). Considerável variabilidade genética é freqüentemente relatada para isolados desta espécie pertencentes ao grupo Th1 (*Trichoderma harzianum* s. s., Gams & Meyer, 1998) (Chen *et al.*, 1999). Possivelmente, todos os isolados de *T. harzianum* analisados neste trabalho também possam ser relacionados a *Trichoderma harzianum* s. s. (Gams & Meyer, 1998), uma vez que apresentaram perfil de

digestão da região do rDNA, com a enzima de restrição *Hha* I, idêntico ao obtido para a espécie por Gams & Meyer (1998) (Figura 3A e Figura 4).

Com base na alta variabilidade genética apresentada por isolados de *T. harzianum* nesse trabalho, constata-se que esta espécie apresenta uma ampla base genética, a qual deve ser explorada sob o ponto de vista biotecnológico, tanto para o desenvolvimento de agentes de controle biológico de patógenos de plantas (biofungicidas) como para produção de compostos biológicos úteis, como enzimas e antibióticos.

Por outro lado, apesar da elevada variabilidade genética encontrada entre isolados de *T. harzianum*, deve-se ressaltar que o número de oligonucleotídeos empregados no presente trabalho, para acessar a variabilidade desta espécie, deve ser aumentado a fim de verificar se não ocorre uma redução na diferença genética e aumento da similaridade entre os isolados, para assim, afirmar tal constatação com mais confiabilidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTOMARE, C.; NORVELL, W. A.; BJÖRKMAN, T. & HARMAN, G. E. Solubilization of phosphates and micronutrientes by the plant-growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2926-2933, 1999.
- ARISAN-ATAC, I.; HEIDENREICH, E. & KUBICEK, C. P. Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting identifies subgroups of *Trichoderma viride* and other *Trichoderma* sp. capable of chestnut blight biocontrol. *FEMS Microbiology Letters* 126:249-256, 1995.
- BEAGLE-RISTAINO, J. E. & PAPAIVIZAS, G. C. Biological control of *Rhizoctonia* stem canker and black scurf of potato. *Phytopathology* 75:560-564, 1985.
- BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can. J. Bot.* 69:2357-2372, 1991a.

- BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. Can. J. Bot. 69:2373-2417, 1991b.
- CASTLE, A.; SPERANZINI, D.; RGHEI, N.; ALM, G.; RINKER, D. & BISSETT, J. Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on North American mushroom farms. Appl. Environ. Microbiol. 64:133-137, 1998.
- CHEN, X.; ROMAINE, C. P. TAN, B.; SCHLAGNHAUFER, B.; OSPINA-GIRALDO, M. D.; ROYSE, D. J. & HUFF, D. R. PCR-based genotyping of epidemic and preepidemic *Trichoderma* isolates associated with green mold of *Agaricus bisporus*. Applied and Environmental Microbiology 65(6):2674-2678, 1999.
- DOI, N. & DOI, Y. Notes on *Trichoderma* and its allies 1. A list of teleomorphic species with *Trichoderma* or its allied anamorphs hitherto known. Bull. Natl. Sci. Mus. Tokyo 5:117-123, 1979.
- GAMS, W. & MEYER, W. What exactly is *Trichoderma harzianum* Rifai? Mycologia 90:904-915, 1998.
- GÓMEZ, I.; CHET, I. & HERRERA-ESTRELA, A. Genetic diversity and vegetative compatibility among *Trichoderma harzianum* isolates. Mol. Gen. Genet. 256:127-135, 1997.
- GRONDONA, I.; HERMOSA, R.; TEJADA, M.; GOMIS, M. D.; MATEOS, P. F.; BRIDGE, P. D.; MONTE, E. & GARCIA-ACHA, I. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. Applied and Environmental Microbiology 63(8): 3189-3198, 1997.

- HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.* 84:377-393, 2000.
- HERMOSA, M. R.; GRONDONA, I.; ITURRIAGA, E. A.; DIAZ-MIGUEZ, J. M.; CASTRO, C.; MONTE, E. & GARCIA-ACHA, I. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp.. *Applied and Environmental Microbiology* 66(5):1890-1898, 2000.
- KINDERMANN, J.; EL-AYOUTI, Y.; SAMUELS, G. J. & KUBICEK, C. P. Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA cluster. *Fungal Genetics and Biology* 24:298-309, 1998.
- KNUDSEN, G. R., ESCHEN, D. J., DANDURAND, L. M. & BIN, L. Potential for biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* through colonization of sclerotia by *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis.* 75:466-470, 1991.
- KUHLS, K.; LIECKFELDT, E. & BÖRNER, T. PCR-fingerprint used for comparison of ex types strains of *Trichoderma* species deposited in different culture collections. *Microbiol. Res.* 150:363-371, 1995.
- KUHLS, K.; LIECKFELDT, E.; SAMUELS, G. J.; BÖRNER, T.; MEYER, W. & KUBICEK, C. P. Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia* 89:442-460, 1997.
- KULLNIG, C. M.; KRUPICA, T.; WOO, S. L.; MACH, R. L.; REY, M.; BENITEZ, T.; LORITO, M. & KUBICEK, C. P. Confusions abounds over identities of *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycol. Res.* 105:769-772, 2001.
- LEWIS, J. A. & FRAVEL, D. R. Influence of Pyrax/biomass of biocontrol fungi on snap bean damping-off caused by *Sclerotium rolfsii* in the field and on germination of sclerotia. *Plant Dis.* 80:655-659, 1996.

- LIECKFELDT, E.; KUHL, K. & MUTHUMEENAKSHI, S. Molecular taxonomy of *Trichoderma* and *Gliocladium* and their teleomorphs. In: KUBICEK, P. HARMAN, G. E. (eds.). *Trichoderma* and *Gliocladium*, vol. 1: Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor & Francis, London, p.35-56, 1998.
- LIECKFELDT, E.; KULLNIG, C. M.; KUBICEK, C. P.; SAMUELS, G. J. & BÖRNER, T. *Trichoderma aureoviride*: phylogenetic position and characterization. *Mycol. Res.* 105:313-322, 2001.
- LÜBECK, M. & SAMUELS, G. J. Current status of taxonomy of *Trichoderma* and *Gliocladium*. 6<sup>th</sup> international *Trichoderma-Gliocladium* Workshop. p. 8-11, Espoo, Finland, 1999.
- LUMSDEN, R. D. & LOCKE, J. C. Biological control of damping-off caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* with *Gliocladium virens* in soilless mix. *Phytopathology* 79:361-366, 1989.
- MAAS, E. & KOTZE, J. M. *Trichoderma harzianum* and *T. Polysporum* as biocontrol agents of take-all of wheat in the greenhouse. *Phytophylactica* 19:65-367, 1987.
- MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 4:415, 1996.
- MUTHUMEENAKSHI, S.; MILLS, P. R.; BROWN, A. E. & SEABY, D. A. Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in British Isles. *Microbiology* 140:769-777, 1994.
- OSPINA-GIRALDO, M. D., ROYSE, D. J., CHEN, X. & ROMAINE, C. P. Molecular phylogenetic analysis of biological control strains of *Trichoderma harzianum* and other biotypes of *Trichoderma* spp. associated with mushroom green mold. *Phytopathology* 89:308-313, 1998.

- PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23:23-54, 1985.
- ROHLF, F. J. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.8 manual. Applied Biostatistics, Setauket, 1993.
- ROIGERS, D. J.; JEFFERS, S. N. & CALDEWELL, R. W. Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soils. *Soil Biol. Biochem.* 23(4):353-359, 1991.
- ROSSMAN, A. Y. Morphological and molecular perspectives on systematics of the Hypocreales. *Mycologia* 88(1):1-19, 1996.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; & MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- SAMUELS, G. J.; PARDO-SCHULTHESIS, R.; HEBBAR, K. P.; LUMSDEN, R. D.; BASTOS, C. N.; COSTA, J. C. & BEZERRA, J. L. *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. *Mycol. Res.* 104(6):760-764, 2000.
- SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol. Res.* 100:923-935, 1996.
- SAMUELS, G. J. & REHNER, S. A. Toward a concept of genus and species in *Trichoderma*. In: LUMSDEN, R.D. & VAUGHN, J.L. (eds.). *Pest Management: Biologically based technologies*. American Chemical Society, Washington, District of Columbia, p.186-188, 1993.
- SEABY, D. A. Differentiation of *Trichoderma* taxa associated with mushroom production. *Plant Pathology* 45:905-912, 1996.

- SNEATH, P. H. A. & SOKAL, R. R. Numerical taxonomy. W. H. Freeman and Co., San Francisco, 1973.
- TURNER, D.; KOVACS, W.; KUHL, K.; LIECKFELDT, E.; PETER, B.; ARISAN-ATAC, I.; STRAUSS, J.; SAMUELS, G. J.; BÖRNER, T. & KUBICEK, C. P. Biogeography and phenotypic variation in *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* and associated *Hypocrea* species. Mycol. Res. 101:449-459, 1997.
- TURÓCZI, G.; FEKETE, C.; KERÉNYI, Z.; NAGY, R.; POMÁZI, A. & HORNOK, L. Biological and molecular characterization of potential biocontrol strains of *Trichoderma*. J. Basic Microbiol. 36:63-72, 1996.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. & TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J. & WHITE, T. J. (eds.). PCR Protocols, a guide to methods and amplifications. Academic Press, San Diego, p. 315-322, 1990.
- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, J., RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18:6331-6535, 1990.
- ZAMIR, D. & CHET, I. Application of enzyme electrophoresis for the identification of isolates in *Trichoderma harzianum*. Can. J. Microbiol. 31:578-580, 1985.
- ZIMAND, G.; VALINSKY, L.; ELAD, Y.; CHET, I. & MANULIS, S. Use of the RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* strains. Mycol. Res. 98:531-534, 1994.
- ZIMAND, G.; ELAD, Y. & CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. Phytopathology. 86:1225-1260, 1996.

ZOLAN, M. E. & PUKILLA, P. J. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Mol. Cel. Biol.* 6:195-200, 1986.

## **CAPÍTULO 3**

### **AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DE *TRICHODERMA HARZIANUM* QUANTO A CAPACIDADE MICOPARASÍTICA E PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS**

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero de fungo *Trichoderma* contém espécies que despertam interesse econômico crescente, principalmente devido a sua capacidade de produção de enzimas líticas, como quitinases, glucanases e proteases (Ulhoa & Peberdy, 1992; Lorito *et al.*, 1993; Haran *et al.*, 1996) e antibióticos (Dennis & Webster, 1971), os quais estão diretamente relacionados com sua atuação como efetivos agentes de biocontrole (antagonistas) de fitopatógenos de solo, especialmente fúngicos (Papavizas, 1985; Chet, 1987). O mecanismo que envolvem a ação de enzimas hidrolíticas é denominado de micoparasitismo e, é considerado um dos mais importantes quando se trata da utilização de isolados de *T. harzianum* para fins de controle biológico (Chet, 1987).

Dependendo do tipo de interação que estabelecem com o hospedeiro os micoparasitas podem ser classificados em biotróficos ou necrotróficos (Baker, 1987). Os primeiros caracterizam-se por utilizarem nutrientes metabolizados pelo hospedeiro (ectoparasitismo) sem a colonização interna (parasitismo direto). Os necrotróficos são mais agressivos e a interação com o hospedeiro envolve parasitismo direto como competição e ectoparasitismo, levando a destruição e morte da hifa hospedeira.

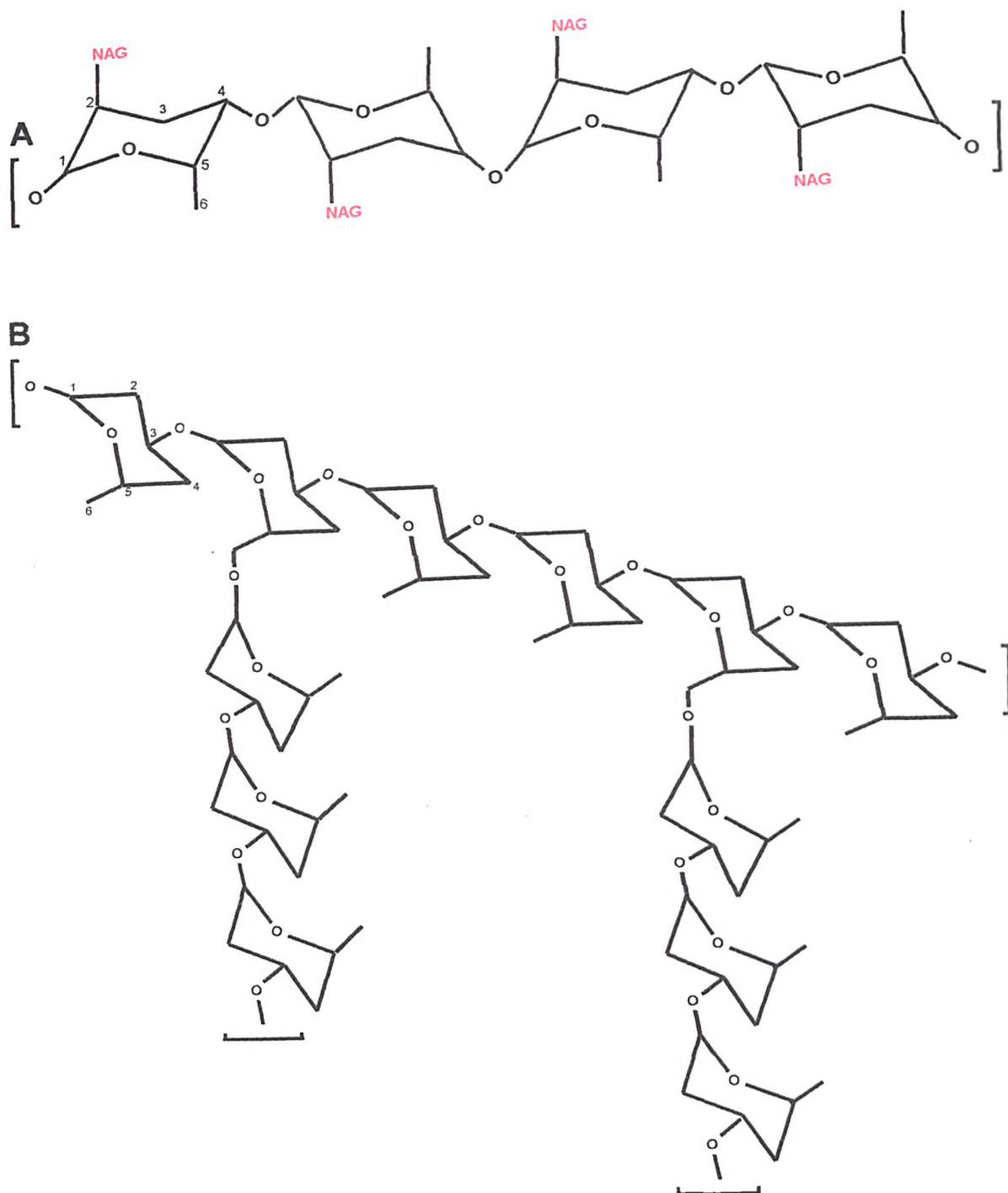
A interação inicial entre espécies de *Trichoderma* e o fitopatógeno hospedeiro é caracterizada por crescimento quimiotrófico da hifa do antagonista em direção a do hospedeiro. Quando o antagonista atinge o hospedeiro, suas hifas freqüentemente enrolam-se e são fixadas a do hospedeiro através de estruturas semelhantes a ganchos (Elad *et al.*, 1982). Após esta interação inicial, o antagonista penetra na hifa do hospedeiro, aparentemente, por degradação parcial de sua parede celular, sendo que a hifa hospedeira rapidamente mostra sinais de vacuolização, paralisa seu crescimento e, finalmente, desintegra-se (Benhamou & Chet, 1993).

Experimentos posteriores demonstram que o enovelamento que ocorre na hifa hospedeira não ocorre apenas por um estímulo gerado pelo contato físico, mas também pela participação de algumas proteínas resentes na parede celular dos hospedeiros caracterizadas como lectinas (Inbar & Chet, 1997). Lectinas são proteínas ligadas a açúcares ou glicoproteínas de ação não imune, com capacidade de aglutinar células ou glicoconjugados (Goldstein *et*

*al.*, 1980). Vários tipos de lectinas, que diferem na especificidade aos resíduos glicosídicos que se ligam, foram isoladas da parede celular dos fitopatógenos *Sclerotium rolfii* e *Rhizoctonia solani* (Barak *et al.*, 1985; Barak *et al.*, 1986; Inbar & Chet, 1992). Inbar & Chet (1992), demonstraram a participação destas lectinas no mecanismo de micoparasitismo, utilizando fibras de nylon embebidas ou não com estas proteínas. Os autores observaram que *T. harzianum* era capaz de enrolar e crescer em volta apenas das fibras contendo lectinas, simulando o processo observado durante a interação *in vivo* observado por Dennis & Webster (1971). Estes dados sugerem que estas proteínas tem um papel importante no reconhecimento do hospedeiro pelo micoparasita.

Os principais agentes fúngicos causadores de doenças de plantas possuem parede celular constituída principalmente por quitina e  $\beta$ -1,3-glucanas, possuindo em menor quantidade proteínas,  $\beta$ -1,6-glucanas e outros polissacarídeos (Griffin, 1994). Quitina e  $\beta$ -glucanas estão embebidas na matriz de material amorfo, de maneira que a degradação da parede celular dependerá da atividade de mais de uma enzima. A quitina parece estar protegida pelas  $\beta$ -glucanas, dificultando o acesso das enzimas quitinases (Chérif & Benhamou, 1990). Assim, é provável que a atuação de quitinases seja precedida ou até mesmo coincida com a atuação de  $\beta$ -1,3-glucanases (Mauch *et al.*, 1988). Portanto, as enzimas do sistema quitinolítico e as  $\beta$ -1,3-glucanases produzidas por *Trichoderma* spp. tem sido consideradas como as principais hidrolases envolvidas no processo de micoparasitismo. A Figura 1 mostra a estrutura molecular da quitina e  $\beta$ -1,3-(1,6)-glucana, os principais polissacarídeos estruturais encontrados na parede celular de fungos superiores.

A quitina (Figura 1A) é um polímero linear insolúvel formado por unidades de  $\beta$ -1,4-N-acetilglicosamina e encontrada em diferentes organismos. Na grande maioria dos fungos, este polissacarídeo está presente como um importante componente da parede celular, conferindo proteção a célula (Sahai & Manocha, 1993). Fungos produzem enzimas do sistema quitinolítico, que podem estar envolvidas na modelagem da quitina enquanto componente estrutural e, eventualmente, na sua utilização como



**Figura 1.** Estrutura molecular da quitina (NAG = N-acetil) (A) e  $\beta$ -1,3-(1,6) glucana (B) (Extraído de Griffin, 1994).

fonte de carbono e nitrogênio. Dois tipos principais de enzimas fazem parte deste sistema: as N-acetilglucosaminidases (E.C. 3.2.1.30) e as quitinases (E.C. 3.2.1.14). Como enzimas do sistema quitinolítico são de fundamental importância para o processo de micoparasitismo, vários trabalhos foram

conduzidos com o objetivo de elucidar o papel dessas enzimas nesse processo tem sido realizados nos últimos anos (Tabela 1).

**Tabela 1. Resumo das enzimas quitinolíticas purificadas de *Trichoderma harzianum*.**

Enzima	Massa Molecular (kDa)	Atividade	Referência
CHIT 102	102-118	N-acetylglicosaminidase	Ulhoa & Peberdy (1992)
CHIT 73	73	N-acetylglicosaminidase	Haran <i>et al.</i> (1995) Lorito <i>et al.</i> (1994)
CHIT 40	40	Exoquitinase	Harman <i>et al.</i> (1993)
CHIT 52	52	Endoquitinase	Haran <i>et al.</i> (1995)
CHIT 42	40-42	Endoquitinase	De La Cruz <i>et al.</i> (1992) Ulhoa & Peberdy (1992) Harman <i>et al.</i> (1993)
CHIT 33	33-37	Endoquitinase	De La Cruz <i>et al.</i> (1992) Haran <i>et al.</i> (1995)
CHIT 31	31-33	Endoquitinase	De La Cruz <i>et al.</i> (1992) Haran <i>et al.</i> (1995)
CHIT 46	46	Endoquitinase	Lima <i>et al.</i> (1997)

As  $\beta$ -1,3-glucanas são polímeros de D-glicose unidos por ligações na configuração  $\beta$ . Algumas são moléculas relativamente simples consistindo de cadeias lineares de resíduos glicosil unidos por ligações glicosídicas, outras são mais complexas e podem ser constituídos por vários tipos de ligações nas cadeias lineares e/ou nas ramificações. Estes polissacarídeos são classificados de acordo com sua configuração e os tipos de ligações predominante (Figura1B). A Tabela 2 mostra as características de  $\beta$ -1,3-glucanases purificadas a partir de *T. harzianum*.

As glucanas possuem função na biologia do fungo de forma variável e isso dependerá do tamanho, estrutura, propriedades físico-químicas e principalmente a sua localização. Quando presentes na parede celular atuam na rigidez e proteção, como polímeros estruturais da célula, ou como fonte de nutrientes nas modificações que ocorrem na parede celular durante a

**Tabela 2.** Resumo de  $\beta$ -1,3-glucanases purificadas de *T. harzianum*

Designação	Massa Molecular (KDa)	Tipos de $\beta$ -1,3-glucanase	Referência
GLUC 29	29	Exo-1,3- $\beta$	Noronha & Ulhoa (2000)
GLUC 31	31	Exo-1,3- $\beta$	Kitamoto <i>et al.</i> (1987)
GLUC 40	40	Exo-1,3- $\beta$	Duboudieu <i>et al.</i> (1985)
GLUC 110	110	Exo-1,3- $\beta$	Cohen-Kupiec <i>et al.</i> (1999)
GLUC 36	36	Exo-1,3- $\beta$	Noronha & Ulhoa (2000)
GLUC 78	78	Exo-1,3- $\beta$	De La Cruz <i>et al.</i> (1995)
GLUC 76	76	Exo-1,3- $\beta$	Lorito <i>et al.</i> , (1994)

morfogênese. Quando localizadas no citoplasma, possuem a função de fonte de carbono facilmente metabolizada, além de estarem envolvidas na proteção das células contra desidratação (Pitson *et al.*, 1993).

As  $\beta$ -1,3-glucanases podem ser classificadas como exo (EC 3.2.1.58) ou endo- $\beta$ -1,3-glucanases (EC 3.2.1.39), de acordo com os produtos de hidrólise liberados da molécula de  $\beta$ -1,3-glucana (Pitson *et al.*, 1993). As exo- $\beta$ -1,3-glucanases hidrolisam o substrato pela clivagem seqüencial de resíduos de glicose a partir da extremidade não redutora gerando como principal produto de hidrólise a glicose, podendo gerar também dissacarídeos e outros oligossacarídeos. As endo- $\beta$ -1,3-glucanases clivam o substrato aleatoriamente ao longo da cadeia liberando principalmente oligossacarídeos. Considerando que os fungos produzem estas duas classes de  $\beta$ -1,3-glucanases, acredita-se que estas enzimas agem de forma sinérgica durante a hidrólise completa das  $\beta$ -1,3-glucanas (Cherif & Benhamou, 1990).

Como é de conhecimento que o processo de micoparasitismo envolve a utilização de enzimas hidrolíticas para penetração do antagonista na hifa hospedeira, assume-se que isolados de *T. harzianum* com elevada produção deste tipo de enzima possam ser mais efetivo na degradação do hospedeiro, aumentando assim sua capacidade antagônica (Elad, 1996). Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade micoparasítica de isolados

de *T. harzianum*, bem como sua habilidade em produzir enzimas hidrolíticas diretamente envolvidas nesse processo (micoparasitismo).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1- AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ENROLAMENTO DE *T. HARZIANUM*

Como a capacidade de enrolamento na hifa hospedeira é uma condição essencial para que isolados de *T. harzianum* candidatos a agentes de biocontrole sejam efetivos, analisou-se esse parâmetro através do pareamento de culturas entre o agente de biocontrole (*T. harzianum*) e o fitopatógeno *R. solani*. Para esta avaliação, discos de cultura (5 mm) foram tomados da margem de crescimento ativo do antagonista (*T. harzianum*) e do patógeno (*R. solani*) (CNPAF- 03), crescidos em meio BDA, e submetidos ao pareamento em placa contendo meio seletivo para *R. solani* (Ko & Hora, 1971). Após 24 horas do início da interação, a avaliação foi realizada através da visualização da frequência de enrolamento do antagonista sobre a hifa hospedeira na zona de interação, com o auxílio de microscópio ótico. A documentação desse processo foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), seguindo-se os parâmetros de preparo do material descrito no capítulo 1.

### 2.2- AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE *R. SOLANI* DURANTE O PROCESSO DE MICOPARASITISMO

A viabilidade de *R. solani* durante o processo de micoparasitismo foi avaliada com a utilização de diacetato de fluoresceína (DFA), um substrato não fluorescente que penetra na célula e é hidrolisado por diversas enzimas, produzindo fluorescência (Rotman & Papermaster, 1966).

Para esse experimento, membranas de papel celofane foram depositadas sobre placas contendo meio seletivo para *R. solani* (Ko & Hora, 1971). Posteriormente, discos de cultura (5 mm) tomados da margem de crescimento ativo das colônias de *T. harzianum* (ALL-23) e *R. solani* (CNPAF-03) foram depositados nas extremidades opostas da membrana e, a interação entre monitorada às 0, 24, 48, 72 e 96 horas após o seu início.

A solução de diacetato de fluoresceína (DFA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) foi preparada dissolvendo-se  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  de DFA em acetona (solução estoque), a qual foi estocada a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização. A partir da solução estoque, fez-se diluições para uma concentração final de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , em tampão fosfato  $10 \text{ mM}$  (pH 7,0) (solução de trabalho) (Barak & Chet, 1985). Para análise, a membrana contendo a antagonista e patógeno, nos tempos de interação correspondentes a 0, 24, 48, 72 e 96 horas foram suspensos em solução de DFA por 3 minutos, montadas em lâminas e imediatamente fotografadas com o auxílio de um microscópio Zeiss, modelo Axiophot (W. Germany), equipado com aparato para microscopia de fluorescência, utilizando um filtro de transmissão de 390–490 nm.

## 2.3- ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

### 2.3.1- Produção de $\beta$ -1,3-glucanases e quitinases em meio líquido

Conídios ( $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ ) dos isolados de *Trichoderma harzianum* foram inoculados em frascos de 250 mL contendo 25 mL de meio TLE { $\text{CaCl}_2$   $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $7,0 \text{ g L}^{-1}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0,1 \text{ g L}^{-1}$ , glicose  $3,0 \text{ g L}^{-1}$  e  $0,1 \text{ mL}$  de solução elementos traços} contendo quitina (0,5%) como fonte de carbono. Os frascos foram incubados em agitador rotatório à  $28^{\circ}\text{C}$  e velocidade de 120 rpm. Após 96 horas de incubação o sobrenadante de cultura foi coletado e utilizadas como fonte de enzimas hidrolíticas.

### 2.3.2- Quitinase

A atividade de quitinase foi determinada utilizando-se o método descrito por Molano *et al.* (1977), modificado por Ulhoa & Peberdy (1992). A mistura de reação continha  $0,5 \text{ mL}$  de quitina regenerada 0,5% (suspendida em tampão acetato  $50 \text{ mM}$ , pH 5,2) e  $0,5 \text{ mL}$  da solução enzimática. A mistura de reação foi incubada por 12 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após centrifugação a 4000 rpm, por 5 minutos, aliquotas de  $250 \mu\text{l}$  foram coletadas e transferidas para tubos de ensaio contendo  $50 \mu\text{l}$  de tetraborato de potássio (0,8M). A mistura foi então fervida por 3 minutos. Em seguida  $1,5 \text{ mL}$  de  $p$ -dimetilaminobenzaldeído (DMAB) foi adicionado, e após incubação a  $37^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, a quantidade

de N-acetilglucosamina liberada, foi determinada espectrofotometricamente a 585 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1  $\mu\text{mol}$  de N-acetilglucosamina por minuto de reação.

### 2.3.1- $\beta$ -1,3- Glucanase

A atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase foi determinada utilizando-se laminarina como substrato na concentração de 0,5%, em tampão acetato de sódio 50  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 5,0 (Santos *et al.*, 1977). Amostras de 50  $\mu\text{L}$  da enzima dos isolados analisados foram incubadas com 100  $\mu\text{L}$  de substrato a 40°C, por 60 minutos e a concentração de açúcar redutor foi determinada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), conforme descrito por Miller (1959). A quantidade de açúcar redutor liberado foi determinada por espectrofotometria a 550 nm, utilizando glicose como padrão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor em um minuto de reação.

### 2.3.4 - Dosagem de proteínas

A concentração de proteína nas amostras foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) como padrão. Amostras de 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cultura foram misturadas a 1,0 mL da solução C [90% de A (carbonato de sódio 2%, tartarato de sódio 0,05%, diluídos em hidróxido de sódio 0,1 N) e 10% da solução B (sulfato de cobre 0,1%)]. Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin 1N e, após 45 minutos de incubação a temperatura ambiente, a absorbância das amostras foi lida a 750 nm.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

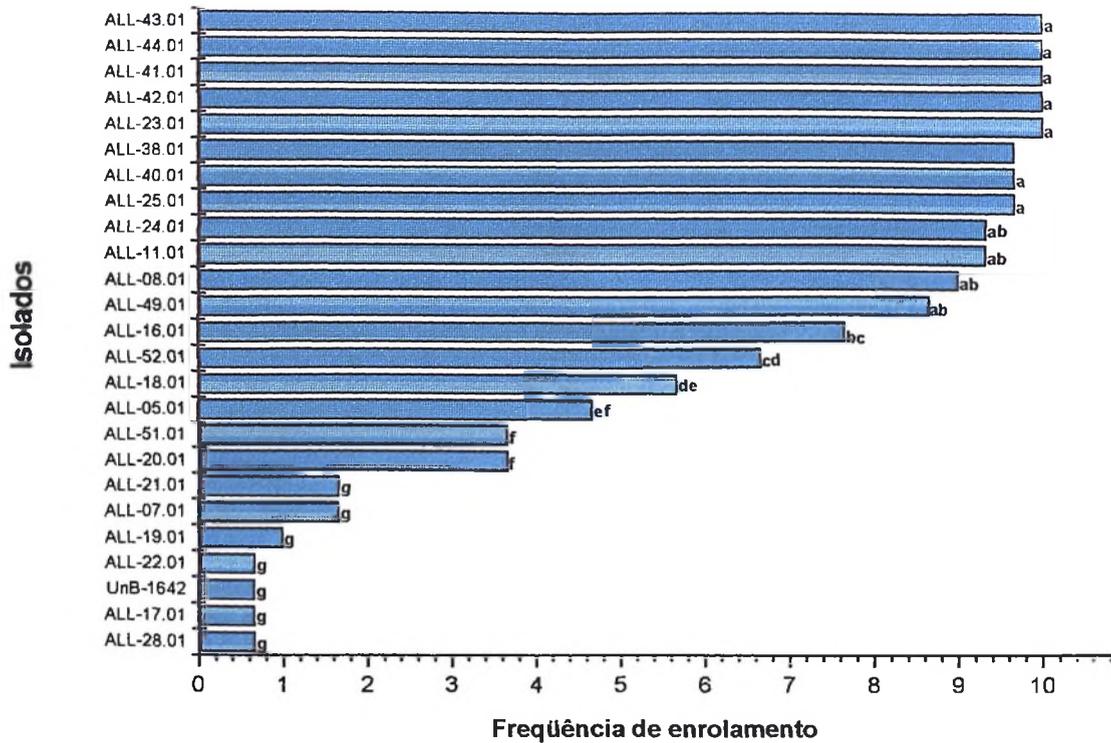
### 3.1- AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ENROLAMENTO

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que o início da interação se dá dentro de dois dias após a inoculação e, que hifas de isolados

de *T. harzianum* diferem significativamente ( $P = 0,05$ ) em sua habilidade de enrolar sobre hifas de *R. solani* (Figura 2).

Os isolados de *T. harzianum* ALL-23.01, ALL-43.01, ALL-44.01, ALL-41.01 e, ALL-42.01 foram os antagonistas mais efetivos, uma vez que produziram enrolamento em todos os campos, nas três repetições analisadas; enquanto que os isolados ALL-28.01, ALL-17.01, UnB-1642, ALL-22.01, ALL-19.01, ALL-07.01 e AL-20.01 foram os menos efetivos (Figura 2). Isolados com capacidade de enrolamento intermediária também foram observados (Figura 2). A figura 3 mostra a capacidade de enrolamento de alguns dos isolados mais eficiente nesse parâmetro.

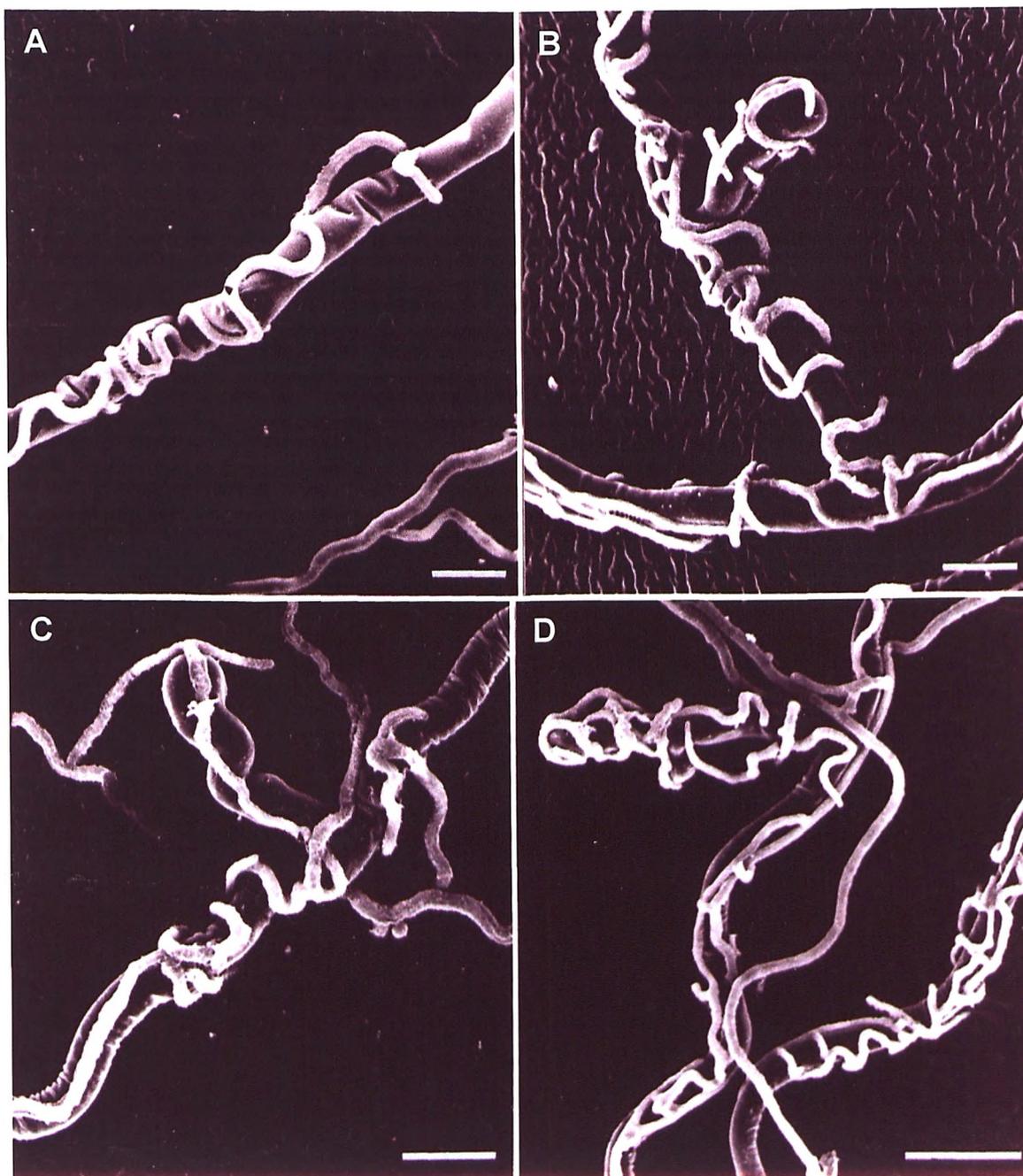
Apesar do crescente interesse da pesquisa na busca de isolados de *Trichoderma* eficientes para fins de controle biológico, especialmente no que diz respeito a capacidade micoparasítica (Chet, *et al.*, 1981; Elad *et al.*, 1982; Benhamou & Chet, 1993), não foi encontrado na literatura nenhum ensaio envolvendo a avaliação da frequência de enrolamento. Desta maneira, tal ensaio pode constituir-se em uma ferramenta valiosa para avaliação rápida e prática da capacidade micoparasítica de isolados de *Trichoderma* candidatos a agentes de controle biológico, principalmente quando se trabalha com um elevado número de isolados.



**Figura 2.** Freqüência de enrolamento de *T. harzianum* sobre *R. solani*. A freqüência de enrolamento foi avaliada microscopicamente a partir da análise de 10 campos, na zona de interação antagonista/patógeno (com 3 repetições). Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem estatisticamente pelo teste de Tukey HSD ( $P = 0,05$ ).

### 3.2- AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE *R. SOLANI*

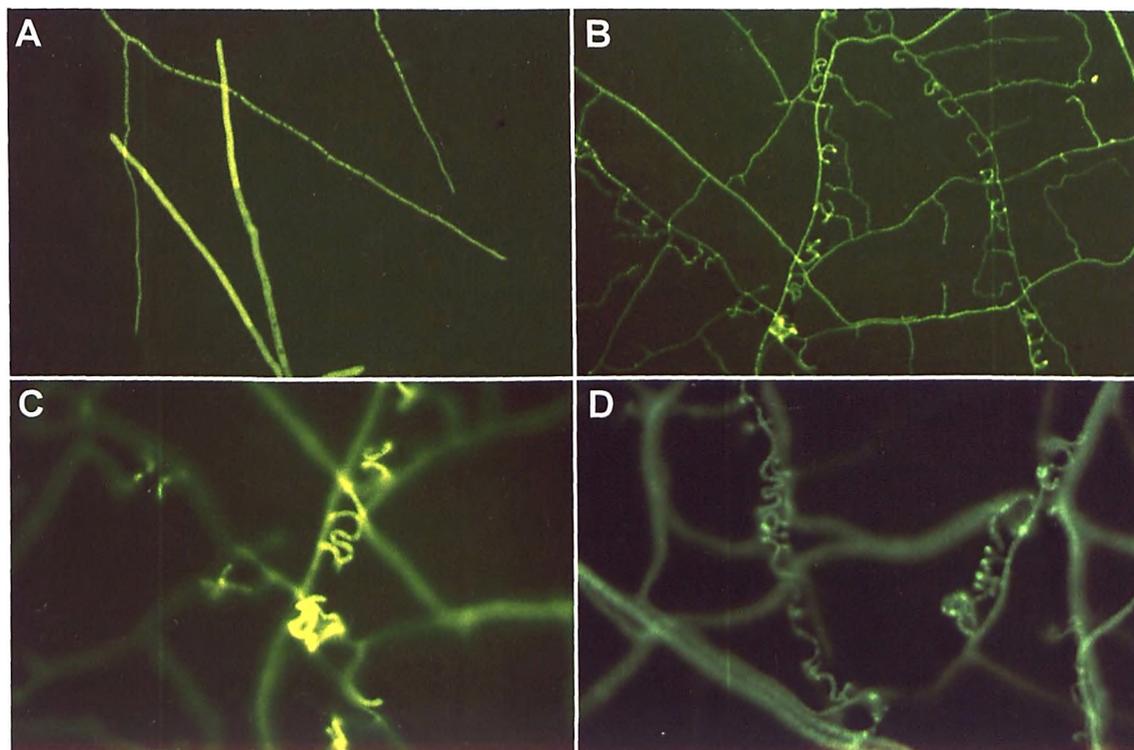
Nesse ensaio foi possível monitorar as mudanças na intensidade de fluorescência de hifas de *R. solani*, principalmente. As hifas de *R. solani* antes do início do processo de interação mostraram excelente fluorescência, logo após serem suspendidas em diacetato de fluoresceína (DFA); da mesma forma que hifas de *T. harzianum* (Figura 4A); entretanto, logo após 48 horas de interação a intensidade de fluorescência das hifas de *R. solani* já era bastante inferior a intensidade das hifas de *T. harzianum* (Figura 4B e C). Essa redução na intensidade de fluorescência das hifas de *R. solani* permaneceu até o final do ensaio (72 e 96 horas), demonstrando a redução de sua viabilidade. Por outro lado, as hifas de *T. harzianum* permaneceram com alta intensidade de fluorescência (Figura 4D), indicando a alta atividade enzimática destas. Esses



**Figura 3A-D.** MEV da ação micoparasítica de *T. harzianum* sobre *R. solani*. A, B, C e D correspondem a interação entre os isolados de *T. harzianum* ALL-23.01, ALL-40.01, ALL-41.01 e ALL-44.01 e o isolado de *R. solani* CNPAF-03, respectivamente. Bar = 10  $\mu\text{m}$ .

resultados concordam com os obtidos por Barak & Chet (1985), indicando que a utilização de diacetato de fluoresceína (DFA) é um método válido para monitorar o nível de atividade celular durante o processo de micoparasitismo.

A figura 4B, C e D também demonstram o enrolamento de hifas de *T. harzianum* sobre *R. solani*, evidenciando, como na figura 3A, a alta capacidade micoparasítica deste isolado de *T. harzianum* (ALL-23.01).



**Figura 4A-D.** Análise da ação micoparasítica de *T. harzianum* sobre *R. solani*, através de microscopia de fluorescência. (A) Início da interação entre *T. harzianum* (ALL-23.01) (hifas finas) e *R. solani* (CNPAF-03) (hifas mais grossas), x 200. (B) e (C) segundo dia de interação, x 200 e x 400, respectivamente. (D) Terceiro dia de interação, x 400.

### 3.3- ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS POR *T. HARZIANUM*

Como uma das etapas do mecanismo de micoparasitismo envolve a participação de enzimas hidrolíticas tais como quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases (Inbar & Chet 1995; Haran *et al.*, 1996a; Haran *et al.*, 1996b), foi nosso interesse fazer uma avaliação da produção de enzimas por isolados de *T. harzianum*, aqui caracterizados. Vários trabalhos tem utilizado como critério de escolha de um bom agente de controle biológico a avaliação preliminar da

produção de enzimas hidrolíticas (Lorito *et al.* 1993; Lorito *et al.*, 1994; Vasseur *et al.*, 1995; Lorito *et al.*, 1996). Entretanto, os resultados obtidos no presente trabalho não demonstraram uma relação direta entre produção de enzimas hidrolíticas (Tabela 3) e capacidade micoparasítica (Figura 2), nos diferentes isolados avaliados; embora, com exceção dos isolados ALL-21.01 e ALL-25.01, todos tenham produzido quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases (Tabela 3), quando crescidos em meio TLE contendo quitina como fonte de carbono.

Essa ausência de correlação pode ser exemplificada se analisarmos os isolados ALL-42.01, ALL-43.01 e ALL-44.01, os quais apresentam alta capacidade micoparasítica (Figura 2 e 3D), bem como elevada produção de enzimas hidrolíticas (Tabela 3) e o isolado AL-23.01, o qual é um excelente micoparasita (Figuras 2, 3A e 4) e produtor de quitinases (Tabela 3), apresentando, porém, uma baixa atividade  $\beta$ -1,3-glucanases (Tabela 3). Os presentes resultados sugerem que o papel das enzimas hidrolíticas no processo de micoparasitismo ainda permanece indefinido, uma vez que, embora sejam componentes importantes desse processo e, conseqüentemente, na habilidade de *T. harzianum* parasitar o hospedeiro, isolados de elevada atividade enzimática podem não ser bons antagonistas, como já evidenciado anteriormente (Elad, 2000). Nesse caso, a combinação de outros mecanismo de ação devem ser avaliados, já que que o processo de micoparasitismo, exclusivamente, pode não ser o único responsável pela capacidade de biocontrole de isolados de *T. harzinaum* (Elad, 2000).

Embora não haja uma relação direta entre capacidade de produção de enzimas hidrolíticas e micoparasitismo por parte de isolados de *T. harzianum*, observou-se que os isolados ALL-42.01, ALL-43.01 e ALL-44.01, os quais são altamente relacionados quanto a características morfológicas e fisiológicas, tendem a apresentar uma relação direta entre produção de enzimas e capacidade micoparasítica (Figuras 2 e 3D e Tabela 3). Tais isolados devem ser analisados quanto a outros parâmetros, principalmente no que diz respeito a outros bioensaios de laboratório, casa-de-vegetação e campo, já que podem constituir-se em promissores agentes de biocontrole para o desenvolvimento de biofungicidas.

**Tabela 3.** Atividade de quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases de isolados de *T. harzianum*.

Isolados	Atividade Específica (U/mg proteína)	
	Quitinase	$\beta$ -1,3-glucanase
UnB- 1642	1,92 $\pm$ 0,01	1,15 $\pm$ 0,02
UnB-1645	14,94 $\pm$ 0,926	1,61 $\pm$ 0,05
UnB-1647	2,68 $\pm$ 0,01	3,05 $\pm$ 0,27
ALL-05.01	2,75 $\pm$ 0,28	1,86 $\pm$ 0,12
ALL-11.01	3,20 $\pm$ 0,14	3,46 $\pm$ 0,06
ALL-16.01	16,64 $\pm$ 0,39	3,21 $\pm$ 0,14
ALL-18.01	5,01 $\pm$ 0,91	1,48 $\pm$ 0,03
ALL-19.01	10,46 $\pm$ 0,18	1,28 $\pm$ 0,04
ALL-20.01	1,70 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,07
ALL-21.01	0,00	0,74 $\pm$ 0,07
ALL-22.01	2,88 $\pm$ 0,0	0,86 $\pm$ 0,03
ALL-23.01	2,59 $\pm$ 0,0	0,77 $\pm$ 0,15
ALL-24.01	1,67 $\pm$ 0,0	0,50 $\pm$ 0,14
ALL-25.01	0,00	3,29 $\pm$ 0,26
ALL-28.01	3,22 $\pm$ 0,19	0,36 $\pm$ 0,03
ALL-40.01	2,49 $\pm$ 0,25	1,05 $\pm$ 0,07
ALL-41.01	2,19 $\pm$ 0,17	0,97 $\pm$ 0,05
ALL-42.01	11,40 $\pm$ 0,44	1,34 $\pm$ 0,07
ALL-43.01	10,79 $\pm$ 1,23	2,32 $\pm$ 0,05
ALL-44.01	21,23 $\pm$ 1,71	1,56 $\pm$ 0,06
ALL-47.01	10,66 $\pm$ 1,12	1,17 $\pm$ 0,04
ALL-48.01	2,88 $\pm$ 0,24	2,05 $\pm$ 0,17
ALL-49.01	1,19 $\pm$ 0,01	0,56 $\pm$ 0,01
ALL-51.01	1,28 $\pm$ 0,15	0,51 $\pm$ 0,07

ND = Não Determinada

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER, R. Mycoparasitism: ecology and physiology. *Can. J. Plant. Pathol.* 9:370-379, 1987.
- BARAK, R. & CHET, I. Determination, by fluorescein diacetate staining, of fungal viability during mycoparasitism. *Soil Biol Biochem.* 18(3):315-319, 1985.
- BARAK, R.; ELAD, Y.; MIRELMAN, D & CHET, I. Lectins: a possible basis for specific recognition in the interaction of *Trichoderma harzianum* and *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 75(4):485-462, 1985.
- BARAK, R.; ELAD, Y. & CHET, I. The properties of L-fucose binding agglutinin associated with the cell wall of *Rhizoctonia solani* *Archives Microbiology* 144:346-349, 1986.
- BENHAMOU, N. & CHET, I. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. *Phytopathology* 83:1062-1071, 1993.
- CHERIF, M. & BENHAMOU, N. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersi*. *Phytopathology* 80:1406-1414, 1990.
- CHET, I. *Trichoderma*: application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. *In*: CHET, I. (ed.), *Innovative Approaches to Plant Disease Control*. Wiley, New York, p. 137-160, 1987.
- CHET, I., HARMAN, G. E. & BAKER, R. *Trichoderma hamatum*: its interaction with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microbiol. Ecol.* 7:29-38, 1981.

- COHEN-KUPIEK, R.; BROGLIE, K. E.; FRIESEM, D.; BROGLIE, R. M. & CHET, I. Molecular characterization of a novel  $\beta$ -1,3-exoglucanase related to mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *Gene* 226:147-154, 1999.
- DE LA CRUZ, J.; HIDALGO-GALLEGO, A.; LORA, J. M.; BENITEZ, T.; PINTOR-TORO, J. A. & LLOBEL, A. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *Eur. J. Biochem.* 206:859-867, 1992.
- DE LA CRUZ, J.; PINTOR-TORO, J. A.; BENITEZ, T.; LLOBEL, A. & ROMERO, L. C. A novel endo- $\beta$ -glucanase, BGN13.3, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Bacteriology* 177(23):6937-6945, 1995.
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 57:25-39, 1971.
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. Antagonistic properties of species group of *Trichoderma* III: hyphal interaction. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57:363-369, 1971.
- DUBOURDIEU, D.; DESPLANQUES, C.; VILLETIZ, J. C. & RIBEREAU-GAYTON, P. Investigation of an industrial  $\beta$ -D-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Carbohydrate Research* 144:277-287, 1985.
- ELAD, Y. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection* 19:709-714, 2000.
- ELAD, Y. ; CHET, I.; BOYLE, P. & HENIS, Y. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* - SEM studies and fluorescence microscopy. *Phytopathology* 73:85-88, 1983.

- ELAD, Y. Bacterial and fungal cell-wall hydrolytic enzymes in relation to biological control of *Rhizoctonia solani*. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S. & DIJST, G. (eds.). *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, p. 455-462, 1996.
- GOLDSTEIN, I. J.; HUGHES, R. C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, M. & SHARON, N. What should be called a lectin? *Nature* 285:66, 1980.
- GRIFFIN, D. H. *Fungal Physiology* 2<sup>nd</sup> ed. Wiley-Liss, New York, 1994. 458 pp.
- HARAN, S.; SCHICKELER, H.; OPPENHEIM, A. & CHET, I. New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. *Mycol Res.* 99:441-446, 1995.
- HARAN, S., SCHICKLER, H., CHET, I. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 142:2321-2331, 1996a.
- HARAN, S.; SCHICKLER, H.; OPPENHEIM, A. & CHET, I. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology* 86:980-985, 1996b.
- HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; LORITO, M.; BROADWAY, R. M.; Di PIETRO, A.; PETERBAUER, C. & TRONSNO, A. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*, purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* 83:313-318, 1993.
- INBAR, J. & CHET, I. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 141:2823-2829, 1995.
- INBAR, J. & CHET, I. Lectins and biocontrol. *Critical Reviews in Biotechnology* (17) 1:1-20, 1997.

- INBAR, J. & CHET, I. Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon fibers. *Journal of Bacteriology* 174(3):1055-1059, 1992.
- KITAMOTO, Y.; KONO, R.; SHIMOTORI, A.; MOTI, N. & ICHIKAWA, Y. Purification and some properties of an exo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Agric. Biol. Chem.* 51:3385-3386, 1987.
- KO, W. & HORA, F. K. A selective medium for the quantitative determination of *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology* 61:707-710, 1971.
- LIMA, L. H. C.; ULHOA, C. J.; FERNANDES, A. P. & FELIX, C. R. Purification of a chitinase from *Trichoderma* sp. and its action on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* cell walls. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 43:31-37, 1997.
- LORITO, M.; FARKAS, V.; REBUFFAT, S.; BODO, S. & KUBICEK, C. P. Cell-wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol.* 178:63-82, 1996.
- LORITO, M.; HAYES, C. K.; DI PIETRO, A.; WOO, S. L. & HARMAN, G. E. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan-1,3- $\beta$ -glucosidase and N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 84:398-405, 1994.
- LORITO, M., HARMAN, G.E., HAYES, C.K., BROADWAY, R.M., TRONSNO, A., WOO, S.L., DI PIETRO, A. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitinase. *Phytopathology* 83:302-307, 1993.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A. & RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry* 193:265-275, 1951.

- MAUCH, F.; MUCH-MANI, b. & BOLLER, T. Antifungal hydrolases in pea tissue II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase. *Plant Phys.* 88:936-942, 1988.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31:426-428, 1959.
- MOLANO, J.; DURAM, A. & CABIB, E. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. *Anal. Biochem.* 83:648-656, 1977.
- NORONHA, E. F. & ULHOA, C. J. Characterization of a 29-Kda  $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol. Rev.* 183:119-123, 2000.
- PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 23:23-54, 1985.
- PITSON, S. M.; SEVIOUR, R. J. & McDOUGALL, B. M. Noncelulolytic fungal  $\beta$ -glucanases: their physiology and regulation. *Enzyme Microbiol. Technology* 15:178-192, 1993.
- ROTMAN, B. & PAPERMASTER, B. W. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proceedings of the National Academy of Science* 43:1256-1261, 1966.
- SAHAI, A. S. & MANOCHA, M. S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microb. Rev.* 1:317-338, 1993.
- SANTOS, T.; VILLANUEVA, J. R.; & NOMBELA, C. Production and catabolite repression of *Penicillium italicum*  $\beta$ -glucanases. *J. Bacteriol.* 129:52-58, 1977.

- ULHOA, C.J. & PEBERDY, J. Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microb. Technol.* 14:236-240, 1992.
- VASSEUR, V.; VAN MONTAGU, M. & GOLDMAN, G. H. *Trichoderma harzianum* genes induced during growth on *Rhizoctonia solani* cell wall. *Microbiology* 141:767-774, 1995.
- YABUKI, M.; MIZUSHIMA, K.; AMATATOU, T.; ANDO, A.; FUJI, I.; SHIMADA, M. & YAMASHIDA, M. Purification and characterization of chitinase and a chitobiase produced by *Aeromonas hydrophila* subsp. *Anaerogenes* A52. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 32:25-32, 1986.