

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**



**SECREÇÃO TEMPORAL DE PROTEÍNAS EM CULTURAS DE
ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. E SUAS INTERAÇÕES COM
ESPOROS E MICÉLIOS DE *Aspergillus clavatus***

THAÍS CORREIA MAGALHÃES

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2018

THAÍS CORREIA MAGALHÃES

**SECREÇÃO TEMPORAL DE PROTEÍNAS EM CULTURAS DE
ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. E SUAS INTERAÇÕES COM
ESPOROS E MICÉLIOS DE *Aspergillus clavatus***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular

Orientador: Dr. Leandro Lopes Loguercio

Co-orientador: Dr. Ronaldo Costa Argôlo Filho

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2018

THAÍS CORREIA MAGALHÃES

**SECREÇÃO TEMPORAL DE PROTEÍNAS EM CULTURAS DE
ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. E SUAS INTERAÇÕES COM
ESPOROS E MICÉLIOS DE *Aspergillus clavatus***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Ilhéus, 22 de fevereiro de 2018

Prof. Dr. Leandro Lopes Loguercio
(Orientador-UESC)

Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza
(UFLA)

Prof. Dr. José Luiz Bezerra
(CEPLAC)

Dr. Valter Cruz Magalhães
(UESC)

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, sem o seu amor nada disso seria possível, Ele tem o poder e eu tenho a fé. Dedico as três pessoas que são meu alicerce: Painho, Mainha e Bê. Obrigada por sempre acreditarem em mim e embarcarem comigo nessa jornada em busca dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus, que me deu o dom da vida e que me permitiu a conclusão de mais uma etapa, sem o seu amor, nada disso seria possível. Obrigada por sempre estar comigo mesmo quando eu não mereço e por não desistir de mim. Deus nunca coloca um sonho em nosso coração se a gente não for capaz de realizá-lo, e graças a Ele eu dei mais um passo em rumo do meu. Obrigada meu Deus por sempre me ouvir e por atender minhas preces.

Agradeço a Maria, minha mãe, que sempre me protegeu com o seu manto, e sempre foi em minha frente para me livrar de todos os perigos. Sempre desatou todos os nós que apareceram no caminho e apazigou meu coração diante de todas as dificuldades.

Aos meus pais, Euvaldo e Cenira, por abrirem mão dos seus sonhos pelos meus, vocês são meus exemplos, minha inspiração e o meu aconchego de amor. Lembro do dia que perguntei a paiinho se Ilhéus ficava longe, e ele me perguntou qual das minhas amigas queria morar lá, então eu respondi que era eu e desde então embarcamos juntos nessa nova aventura. Atravessamos o estado nós 3 juntos e vocês não sossegaram até ter certeza que eu ficaria bem. Sempre foi assim, eu me sinto segura porque sei que tenho vocês dois para absolutamente tudo. Eu não tenho medo de sonhar alto porque sei que sempre terei vocês dois pra dar impulso aos meus sonhos. Sei que posso contar com vocês SEMPRE seja aqui, em Fortaleza, em São Carlos ou do outro lado do mundo, sei que vocês sempre farão o possível pra ir lá me levar e ter a certeza de eu ficarei bem. Vocês dois sempre estiveram presentes em todos os momentos e nessas horas eu me dou conta do quanto nossa família é abençoada. Obrigada por terem um zelo tão grande por mim e Lívia, espero um dia retribuir tudo isso. Amo vocês!

A minha bebezinha Lívia. Bê, desde pequenininha eu sempre quis ser igual a você, sempre me espelhei e quis seguir os seus passos, e hoje em dia não é diferente, você é a pessoa que é minha referência e meu orgulho. Você foi aquela que sempre quis que eu viesse ao mundo pra ser sua irmã e assim foi feita a vontade de Deus. Hoje somos irmãs, amigas, confidentes, parceiras e você é minha segunda mãe. Tenho uma admiração imensa pela pessoa que você é e que vem se tornando. Você sabe que o meu mundo tem um jeito que é todo seu, graças a você eu me tornei o que sou hoje. Amo você com um amor que é todinho seu.

Ao meu orientador, Leandro. Por ter me aceito e confiado em mim para executar esse trabalho mesmo sem me conhecer. Pelas reuniões que me fizeram crescer como cientista, pelos conselhos, palavras, ajudas, ideias e amizade. Por ser o melhor professor de genética molecular da vida. Você me fez me apaixonar ainda mais por essa área.

A Ronaldo, meu co favorito. Lembro da primeira vez que fui ao laboratório com você e me falaram: “Vai trabalhar com Ronaldo? Você tem sorte!”, e realmente, que sorte eu tenho! Eu só tenho a te agradecer por toda paciência desde o início. Por ter me ensinado do zero algo que eu não conhecia e por estar presente sempre que eu precisei. Por nunca me negar ajuda quando eu falava “Ronaldo, pode ir amanhã?”, por dividir comigo os seus conhecimentos, os seus métodos, as placas de germinação, os dias no laboratório, as caixas de ponteiras que eu juro que vou encher, as caminhadas até o CBG, as minhas lágrimas que não foram poucas e o principal: dividir comigo a sua história se tornando um grande amigo! Você é uma pessoa iluminada. E eu tenho certeza que tem muita gente precisando de sua luz por aí. Vou sentir falta da sua calma quando tudo pra mim parecia uma tempestade, e de suas soluções tão

simples para os problemas que eu achava que não teriam fim. Muuuuuuito obrigada!!!

A Valter por toda ajuda concedida durante esses 2 anos e por ter se tornado um amigo pra vida. Obrigada por ter pensando nesse projeto e por sempre me aconselhar (mesmo eu quase nunca escutando). Que bom que você não resistiu a minha amizade rs. Espero um dia me tornar metade do profissional que você é, sinto muito orgulho de você!!

A todos os integrantes do laboratório de Microbiologia Aplicada a Agroindústria (LABMA), pela ajuda, ensinamento, amizade e por não serem apenas um grupo de pesquisa e sim uma família. É maravilhoso poder trabalhar em um ambiente leve, divertido, engraçado e com pessoas sempre dispostas a te ajudar. É muito bom ter um ambiente em que você tem vontade de estar presente todos os dias. Cada um de vocês mora no meu coração, obrigada por me fazerem tão feliz.

Aos meus parceiros fiéis: Jona, Nat e Thay. Os mais “topa tudo” e que viveram comigo de perto toda essa variação de emoção chamada de mestrado. Desde o início vocês se fizeram presentes pra mim, vocês na verdade são presentes que eu quero levar pra vida. Como é bom ter amigos com a mesma paixão pela Genética que eu sinto. Pessoas pra sentar na cantina e começar a falar de *primers*, marcadores, fungos e bactérias. Pessoas que você sabe que estarão sempre ali pra te levantar, enxugar essas lágrimas e falar: “Bora pra Denilson”. Pessoas pra ir pra piscina em um dia de chuva ou pra sentar e estudar em um dia de sol, enfim, pessoas que estiverem sempre ali.

Um agradecimento mais que especial para aquela que foi tudo e mais um pouco nesses dois anos longe de casa. Natasha, minha eterna Flokinhu, obrigada por ter me acolhido tão bem e ter feito de sua casa a minha. Sei que hoje eu tenho uma família no Sul da Bahia e pessoas com quem eu posso contar. Desde o início você me acolheu de uma forma inexplicável e serei eternamente grata por isso. Eu não me sentia só porque eu tinha certeza que eu tinha você, e realmente, você sempre esteve ali, em todos os fins de semana, todos almoços, todos desesperos dentro do laboratório... Você sempre esteve presente até pra colocar letra pra rodar na estatística só pra tentar me ajudar (hehe), nas faxinas, nas praias, nos estudos, nas alegrias, nas tristezas... Sempre estávamos juntas, sempre nós duas, obrigada por ser meu porto seguro.

A minha parceira pra vida toda, Riani. Você sabe que esse mestrado só foi possível graças a você, afinal, quem é que vive procurando coisa na internet? rs. Lembro que você se preocupou mais com esse mestrado do que eu, você foi atrás, descobriu Ilhéus pra mim e viemos juntas pro curso de inverno de 2015. Você me cobrava os estudos e falava: “Me espere que vou pra lá morar com você”. Lembro que você mergulhou nisso tudo comigo e quando eu passei sua felicidade era igual a minha. Você tem uma admiração por mim tão grande que quando não acredito que sou capaz eu sempre lembro do que você me fala e consigo forças pra continuar. Você mais do que ninguém sabe dessa trajetória toda pois me acompanhou desde o início. Afinal, você conhece todas as pessoas daqui de tanto que eu falo pra você. Obrigada por não desistir de mim, por sempre acreditar e pela sua amizade.

Ao meu Cuncun, Henrique Cun, obrigada por sempre acreditar em mim e sempre ser aquela pessoa que me apoia, me incentiva e que sempre está cheio de ideias para o meu futuro. Eu sei que sempre posso contar com você para tudo e que você sempre estará disposto a me ajudar em qualquer situação. Saiba que você é o irmão que eu nunca tive.

Gostaria de agradecer imensamente a todos aqueles que me ajudaram com o coração aberto

mesmo tendo outras ocupações. Vocês acompanharam meu desespero em relação a estatística de perto e abraçaram a essa causa para me ajudar. Meu muito obrigada a Will, Lívia, Henrique, Natasha e Luana. E um agradecimento mais do que especial a Adrielle e Thâmara, que tiveram uma paciência enorme para me ensinar conceitos, me deram uma luz imensa, sentaram comigo e tentaram inúmeras vezes resolver os problemas que não foram poucos e mesmo tendo seus compromissos acadêmicos foram até o fim comigo. Agradecer também a Pavel por ter tirado um pouco do seu tempo em sentar e me direcionar na estatística. Adrielle, Thâmara e Pavel, sem vocês esse trabalho não estaria completo. Obrigada!

Aos integrantes do bonde QUALIS A da genética, que tornaram a caminhada mais leve, mais feliz e as leituras na sexta após o expediente muito mais divertidas. E todo fim de semana sempre me lembraram que eu não estou sozinha aqui no Sul da Bahia. E me ensinaram que todos os dias temos motivos pra comemorar e que a vida é muito curta pra não ser vivida da melhor maneira.

A UESC pela estrutura cedida. Ao PPGGBM em especial a Fabrícia e Mara sempre solícitas a tudo. A CAPES pela bolsa concedida durante dois anos e pelo incentivo a pesquisa. Obrigada a todos que de alguma maneira contribuíram para esse trabalho.

“Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento”.
Afinal: “A vida começa no fim da sua zona de conforto”.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Agricultura.....	3
2.2 Fungos fitopatógenos.....	4
2.3 Métodos de controle.....	6
2.3.1 Controle genético.....	6
2.3.2 Controle cultural.....	7
2.3.3 Controle químico.....	7
2.4 Controle Biológico.....	10
2.5 <i>Trichoderma</i> spp.....	12
2.5.1 Mecanismos de ação antagônica.....	13
2.5.1.1 Micoparasitismo.....	14
2.5.1.2 Antibiose.....	14
2.5.1.3 Competição.....	15
2.5.1.4 Indução de resistência em plantas.....	16
2.5.1.5 Promoção de crescimento de planta.....	16
2.5.2 Produção de ACBs utilizando <i>Trichoderma</i>	17
2.5.3 Potencial antagônico de proteínas de <i>Trichoderma</i>	18
2.6 <i>Aspergillus</i> spp.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Material biológico.....	21
3.1.1 Determinação da viabilidade de esporos de <i>Trichoderma</i>	21
3.1.2. Condições de germinação de esporos de <i>Aspergillus clavatus</i>	21
3.2 Extração de proteínas totais do sobrenadante.....	21
3.2.1 Preparação das amostras e precipitação das proteínas.....	21
3.2.2. Diálise das amostras.....	22
3.3 Quantificação e confirmação da extração de proteínas.....	22
3.3.1 Bradford.....	22
3.3.3 Desnaturação por aquecimento.....	22

3.4 Interação das proteínas sobre crescimento e germinação de <i>A. clavatus</i> ...	23
3.4.1 Avaliação da inibição do crescimento	23
3.4.2 Avaliação da inibição da taxa de germinação	23
3.4.3 Análise estatística	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Relação da massa seca com a concentração de proteínas	25
4.2 Testes de inibição da germinação com amostras desnaturadas por aquecimento.....	27
4.3 Inibição do crescimento de <i>A. clavatus</i>	28
4.4 Inibição da germinação de esporos de <i>A. clavatus</i>	31
5. CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAL TEÓRICO	39

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Produção total de proteína obtida pela razão entre a médias das concentrações de proteínas pela média das massas secas..... 26
- Figura 2.** Mapa de calor (*heatmap*) mostrando os diferentes perfis encontrados para o crescimento de *A. clavatus* quando colocado em contato com as proteínas extraídas dos 17 isolados de *Trichoderma*. Quanto mais forte a cor maior o crescimento de *A. clavatus* e quanto mais fraca menor o crescimento. 30
- Figura 3.** Resultado da análise de interação entre os fatores tempo e isolados. Onde * e ** representa significativo enquanto ns representa não-significativo..... 31
- Figura 4.** Comportamento dos 17 isolados ao longo do tempo na sua capacidade antagônica de inibir a germinação de esporos de *A. clavatus*..... 31
- Figura 5.** Mapa de calor (*heatmap*) mostrando os diferentes perfis encontrados para os 17 isolados de *Trichoderma* analisados na inibição da germinação de esporos de *A. clavatus*. Quanto mais forte a cor maior a inibição e quanto mais fraca menor a inibição dos esporos..... 33
- Figura 6.** Média do comportamento geral dos 17 isolados de *Trichoderma* analisados na inibição da germinação de esporos de *A. clavatus*..... 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxa de inibição (Ti) da germinação de <i>A. clavatus</i> por proteínas não aquecidas e aquecidas dos isolados de <i>Trichoderma</i>	27
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

SECREÇÃO TEMPORAL DE PROTEÍNAS EM CULTURAS DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. E SUAS INTERAÇÕES COM ESPOROS E MICÉLIOS DE *Aspergillus clavatus*

RESUMO

As plantas são acometidas por diversas doenças que causam prejuízos econômicos à agricultura. Essas doenças são causadas principalmente por fungos que habitam os solos. Todavia, alguns fungos possuem mecanismos antagônicos contra os fungos fitopatogênicos e são utilizados como Agentes de Controle Biológico (ACB). Dentre os ACBs, destacam-se espécies do gênero *Trichoderma*. Esse gênero possui mecanismos antagônicos que são mediados por uma série de genes e proteínas. Diferenças genotípicas entre isolados de *Trichoderma* podem gerar níveis de antagonismo distintos. Estratégias de bioprospecção por ACBs mais eficientes necessitam definir modelos experimentais fúngicos como alvos para se avaliar as interações antagônicas. Dentro dessa perspectiva, este projeto analisou padrões temporais de secreção de proteínas no sobrenadante das culturas de *Trichoderma* spp e sua ação antagônica direta sobre o crescimento e germinação de esporos de *Aspergillus clavatus*, usado como sistema modelo. As proteínas foram extraídas de 17 isolados de *Trichoderma* que foram inoculados em 5 diferentes tempos: 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h. A extração foi feita com sulfato de amônio (75%) e as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford. A massa seca do micélio foi utilizada para verificar a produção de proteínas por unidade de biomassa do fungo. A análise da inibição da germinação de *A. clavatus* pelas proteínas foi feita avaliando-se o número de esporos germinados. A avaliação da inibição do crescimento foi quali-quantitativa por observação do nível de ocupação do micélio aéreo de *A. clavatus* em placa e conversão em um escore percentual, para a geração de *heatmap*. Os isolados de *Trichoderma* apresentaram diferentes comportamentos temporais intra- e inter-espécies na inibição da germinação e crescimento de *A. clavatus*. A análise temporal mostrou que os isolados se comportam de diferentes formas. De maneira geral (com algumas exceções), no tempo de 48 h houve menor inibição da taxa de germinação e crescimento, enquanto nos tempos de 144 h ocorreu uma maior inibição da germinação e de 72 h uma maior inibição do crescimento. Na análise estatística para os experimentos de germinação, as espécies *T. rossicum*, *T. koningiopsis*, *T. harzianum* e *T. longibrachiatum* foram as únicas que apresentaram diferenças em todos os tempos analisados. Todos os isolados de

Trichoderma afetaram de maneiras distintas o crescimento, apresentando todos os possíveis resultados de efeito (inibição total, parcial e não inibição). Pode-se inferir que proteínas extraídas do sobrenadante mostraram potencial antagônico contra *Aspergillus clavatus*. Tomados em conjunto, os resultados demonstraram que os diferentes isolados de *Trichoderma* apresentaram variações no padrão de secreção proteica, tanto na velocidade quanto na quantidade, e no nível/eficiência do antagonismo, evidenciando assim as diferenças genotípicas inter- e intraespecíficas. Todos esses resultados servem como base para a caracterização de isolados de interesse biotecnológico.

Palavras-chave: Agente de Controle Biológico; Bioprospecção; Análise Temporal; *Aspergillus clavatus*.

TEMPORAL PROTEIN SECRETION IN CULTURES OF *Trichoderma* spp. STRAINS AND ITS INTERACTION WITH SPORES AND MYCELIA OF *Aspergillus clavatus*

ABSTRACT

The plants are affected by several pathologies that cause economic losses to agriculture. These diseases are mainly caused by fungi that inhabit the soil. However, some other fungi have antagonistic mechanisms against those phytopathogenic fungi and are used as Biological Control Agents (BCA) in agriculture. Among the BCAs, species of the genus *Trichoderma* are highlighted. This genus has antagonistic mechanisms that are mediated by a number of genes and proteins. Genotypic differences among *Trichoderma* isolates may generate distinct degrees of antagonism. Other experimental fungal models need to be defined by bioprospecting strategies for more efficient CBAs, as targets for evaluating antagonistic interactions. Within this perspective, this project analyzed temporal patterns of proteins secreted in the supernatant of *Trichoderma* spp. strains and their direct antagonistic action on growth and spore germination of *Aspergillus clavatus*, used as a model system. Proteins were extracted from 17 *Trichoderma* isolates that were inoculated at 5 different times: 48 h, 72 h, 96 h, 120 h and 144 h. The extraction was done with ammonium sulphate (75%) and the proteins were quantified by the Bradford method. The mycelium dry mass was used to verify the production of proteins per unity of fungal biomass. Inhibition analysis of *Aspergillus clavatus* germination by proteins was done by evaluating the number of spores germinated. The evaluation of growth's inhibition was qualitative by observing how many quadrants the mycelium of *A. clavatus* occupied in the plate and converting to a percentage score to generate a heatmap. The isolates presented different intra- and inter-species temporal behaviors in the inhibition of germination and growth of *A. clavatus*. The temporal analysis showed that the isolates behaved in different ways. In general (with some exceptions), there was a lower inhibition of the germination rate and growth in the time of 48 h, while in the times of 144 h there was a greater inhibition of the germination, and of 72 h, a greater inhibition of growth. In the statistical analysis for the germination experiments the species *T. rossicum*, *T. koningiopsis*, *T. harzianum* and *T. longibrachiatum* were the only ones that presented differences at all times analyzed. All *Trichoderma* isolates affected growth in different ways, presenting all possible resulting effects (total inhibition, partial inhibition and non-inhibition). It can be inferred that all proteins extracted from the supernatant showed antagonistic potential against *Aspergillus clavatus*. Taken together, the results showed that the different *Trichoderma* isolates presented variations in the protein secretion pattern,

both in speed and quantity, and in the level / efficiency of the antagonism, thus evidencing the inter and intraspecific genotypic differences. All these results can serve as a basis for the characterization of isolates of biotechnological interest.

Keywords: Biological Control Agent; Bioprospecting; Temporal Analysis;
Aspergillus clavatus

INTRODUÇÃO

Os fungos podem interagir com as plantas de forma maléfica ou benéfica. Quando a interação é maléfica, os fungos são considerados parasitas, se nutrem de matéria viva e agem produzindo toxinas que também causam doenças. Eles são os principais responsáveis pelas doenças que acometem as plantas, causando prejuízos na agricultura. Nas interações benéficas, o fungo retira seus nutrientes da matéria orgânica morta, auxiliando na decomposição, e também ajudam na manutenção/favorecimento dos serviços ecossistêmicos. Alguns fungos benéficos às plantas apresentam mecanismos de antagonismo contra fitopatógenos. Esses fungos podem ser utilizados como Agentes de Controle Biológico (ACB) e formam a base para o controle de doenças na agricultura. (BUENO; FISCHER. 2006; ELMQVIST et al., 2010; GOMES, 2013; HARMAN; BJORKMAN, 1998).

O gênero *Trichoderma* spp. é um dos ACBs mais utilizados no mundo. As espécies possuem mecanismos antagônicos diretos e indiretos que auxiliam no combate de fitopatógenos. Sabe-se que uma série de genes, que codificam proteínas, estão envolvidos nesses mecanismos (STEYAERT et al., 2003; HARMAN et al., 2004). Isolados de *Trichoderma* possuem a capacidade de recombinação sexual, o que pode favorecer o surgimento de genótipos diferentes. Essas diferenças genotípicas entre isolados de *Trichoderma* podem alterar os padrões de esporulação, produção de metabólitos de baixo peso e gerar intensidades de antagonismo distintos (BEZERRA et al., 2003; LOGUERCIO et al., 2009; MUKHEERJEE et al., 2013). Além disso, a ação de fatores ambientais (abióticos e bióticos) interfere nos fenótipos de biocontrole de distintos isolados de *Trichoderma*.

Estratégias de bioprospecção por ACBs mais eficientes necessitam definir outros modelos experimentais fúngicos como alvos para se avaliar as interações antagônicas, tanto do ponto de vista qualitativo (presença/ausência do fenótipo ou mecanismo) quanto do quantitativo (intensidade dos efeitos) (FEITOSA, 2016). Estudos com ACBs e suas interações são necessários, visto que os mecanismos

de antagonismo de *Trichoderma* com fungos fitopatógenos e organismos não-alvo são praticamente os mesmos. Portanto, obter um maior conhecimento sobre a base genética dos mecanismos de ação antagônica e suas interações com os fatores ambientais e os organismos, bem como sobre a regulação desses eventos no fungo, pode auxiliar a definir a variedade de ambientes e condições específicas em que essas funções de biocontrole podem ser exercidas mais eficientemente.

Dentro dessa perspectiva, este trabalho teve como objetivo analisar padrões temporais de secreção de proteínas totais no sobrenadante das culturas de diferentes isolados de *Trichoderma* e sua ação antagônica direta sobre o crescimento e germinação de esporos do modelo experimental *Aspergillus clavatus*.

1. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Agricultura

A agricultura e o agronegócio são atividades essenciais para a economia de diversos países (SOGLIO, 2009), sendo esse setor um dos poucos que resistiu a crise econômica mundial de 2007-2008. O crescimento da economia gera renda para os consumidores e isso, indiretamente, aumenta a demanda por alimentos, favorecendo a agricultura. Assim, essa atividade é uma das principais estratégias para combater a fome e a pobreza no mundo. (FAO, 2015).

No Brasil, durante as últimas três décadas, esse setor vem crescendo e desempenhando um importante papel na economia. O país ocupa a segunda posição no ranking mundial de exportação agrícola, sendo o maior fornecedor de açúcar, suco de laranja e café. No território brasileiro, a agricultura também é utilizada para obtenção de biomassa de cana de açúcar, que é a sua segunda maior fonte de energia. No ano de 2012, através do setor agrícola, foi possível empregar cerca de 13% da população. Em 2013 o agronegócio foi responsável por 36% total das suas exportações, totalizando mais de US\$ 86 bilhões. Essas exportações compensaram os *déficits* de outros setores da economia, fazendo com que moeda estrangeira entrasse no país. Entre os anos de 2005 e 2013 o produto interno bruto (PIB) teve um crescimento de 3,5% (OCDE –FAO, 2015; MME, 2017).

O agronegócio é economicamente importante para a geração de emprego e renda, de tal maneira que o plano agrícola e pecuário do Brasil de 2017/2018 está destinando R\$ 200 bilhões, com juros menores que os anos anteriores, para os produtores. Mesmo com a crise, o governo acredita que é de suma importância esse investimento no agronegócio para o crescimento econômico e, por isso, houve um aumento de 24,3% de investimento, em relação ao plano anterior (MAPA, 2017).

Todavia, existem obstáculos à expansão e intensificação da agricultura, a exemplo do grande número de doenças que afetam as plantas. Alguns autores

consideram que as doenças podem ter natureza não infecciosa e outros defendem que são exclusivamente causadas por agentes infecciosos. No primeiro caso, elas são causadas por condições ambientais desfavoráveis (temperatura, umidade, luz, oxigênio, poluição, entre outros) e deficiências/desequilíbrios nutricionais. No caso de doenças por agentes infecciosos, essas enfermidades são causadas por patógenos que atacam as plantas, (i) debilitando-as ou enfraquecendo-as pela absorção de seus nutrientes, (ii) consumindo o conteúdo de suas células, (iii) impedindo a passagem de nutrientes, alimentos e água pelos tecidos condutores e (iv) secretando toxinas, enzimas e substâncias que destroem ou causam distúrbios no metabolismo das células (MICHEREFF, 2001). Essas doenças reduzem a quantidade e qualidade de frutos, sementes, flores e podem tornar as plantas venenosas para o consumo humano ou animal (MICHEREFF, 2001). As doenças que acometem as plantas, principalmente as espécies exploradas economicamente, vêm causando graves danos, gerando a morte de milhares de pessoas por fome e prejuízos econômicos (BUENO; FISCHER, 2006). Segundo Monte (2001), essas perdas dos cultivares podem resultar em redução dos suprimentos alimentares, menor qualidade dos produtos agrícolas, dificuldades econômicas para os produtores e, conseqüentemente, o aumento dos preços. Essas enfermidades podem ser causadas por bactérias, vírus e principalmente por fungos que se encontram nos solos. Os fungos são responsáveis pela maior parte dessas doenças de plantas, propiciando a queda da produção e, por conseguinte, prejuízos significativos a economia (RIBEIRO, 2009).

2.2. Fungos fitopatógenos

Os fungos são organismos eucariontes, heterotróficos, que se reproduzem de forma assexuada e/ou sexuada, não possuem pigmentos fotossintéticos, possuem uma parede celular rica em quitina ou celulose, ou ambos, e são parasitas, simbioses ou saprófitas. Um organismo saprófita se alimenta por meio de enzimas que digerem a matéria orgânica morta para obtenção dos nutrientes. Os fungos podem realizar sua nutrição através de interações benéficas, onde retiram os seus nutrientes dessa matéria orgânica morta e auxiliam no seu

processo de decomposição, ou de forma maléfica, onde eles são considerados parasitas e se nutrem de matéria viva, como a das plantas (GOMES, 2013).

Os fungos fitopatógenos apresentam três ciclos de vida diferentes. Eles podem passar todo o seu ciclo na planta e ter seus esporos depositados no solo em estado de dormência até encontrar um hospedeiro. Vale ressaltar que esses fungos dependem exclusivamente do hospedeiro para sua alimentação. Outro grupo tem parte do seu ciclo de vida na planta e em outra parte eles vivem como saprófitas dos restos vegetais que se encontram no solo. O último grupo pode passar parte de sua vida nas plantas, nos restos mortais das plantas e também podem ser encontrados no solo na ausência dos seus hospedeiros. O que delimita a sobrevivência e atividade da maioria dos fungos que causam doenças são a temperatura, umidade e a disponibilidade da água (GOMES, 2013).

Fungos fitopatogênicos são responsáveis por cerca de dois terços das doenças que acometem as plantas, causando ferrugens, bolores, mofos, antracnoses, murchas, manchas, dessecamentos, tumores, tombamentos, etc., podendo atingir todas as partes da planta (raízes, caules, folhas, flores, frutos e sementes); frequentemente, estes sintomas podem ocasionar a morte do vegetal (RIBEIRO, 2009; FAO, 2015). Além disso, os produtos após a colheita também são alvos de infecções fúngicas (RIBEIRO, 2009). Todas as plantas são atacadas por alguma espécie de fungo, sendo que mais de 8 mil espécies fúngicas são fitopatógenos (MICHEREFF, 2001).

Os fungos patógenos de plantas podem agir absorvendo nutrientes diretamente dos tecidos vegetais ou produzindo toxinas que causam diversas enfermidades nos mesmos. Eles ocorrem nos principais grupos taxonômicos de fungos, sendo que os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Myrothecium*, *Rhizoctonia*, *Strachybotrys*, *Sclerotium*, *Fusarium*, *Phoma*, *Claviceps* e *Diplodia*, são os mais estudados (BUENO; FISCHER. 2006; TREMACOLDI; SOUZA FILHO, 2006). Esses fungos matam os cultivos ou tornam os seus produtos inviáveis. Exemplo disso é a vassoura-de-bruxa, relatada em condição epidêmica na região cacauera do sul da Bahia em 1989. Ela é causada pelo *Moniliophthora perniciosa* que infecta o cacauero (*Theobroma cacao* L.) causando fortes prejuízos econômicos e sócio-ambientais (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005; PEREIRA et al., 1989). As espécies vegetais podem ser afetadas por várias

doenças, como o tomate (*Solanum lycopersicum* L.) que pode sofrer doenças fúngicas como podridão de esclerotínia ou mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) e pinta preta (*Alternaria solani*) (AGUIAR, 2011). A mesma doença pode ser ocasionada por fungos diferentes que é o caso das podridões radiculares que são mais comumente causadas por *Rhizoctonia solani* Kuhn e *Fusarium Solani* (TOLÊDO-SOUZA, et al. 2009).

2.3. Métodos de controle

As doenças de plantas causadas por fungos causam enormes prejuízos. Como solução para este problema, existem diferentes metodologias de controle que visam diminuir os danos causados por essas doenças. Os métodos de controle são baseados em noções epidemiológicas, uma vez que apresentam como foco impedir/retardar o desenvolvimento da doença, diminuir o tempo da exposição da cultura ao patógeno e causar um decréscimo na taxa de enfermidades. Existem os seguintes tipos de controle: genético, físico, cultural, químico e biológico (GOMES, 2013).

2.3.1. Controle genético

O controle genético é um dos maiores avanços tecnológicos da agricultura. Ele consiste no uso de cultivares resistentes e mais produtivas nas plantações. É um método eficiente que, quando manejado da maneira correta, propicia alta produtividade. Para esse tipo de controle, é possível obter cultivares resistentes a determinadas doenças, por exemplo, por meio da incorporação de um gene exógeno por transgenia, ou pela via genética clássica, através de cruzamentos direcionados e seleção de indivíduos. Com isso, as modificações feitas geneticamente podem aumentar o valor nutritivo dos alimentos e o torná-los resistentes a condições ambientais hostis, incluindo patógenos. Apesar dos alimentos transgênicos já serem bastante difundidos, há muita controvérsia em torno de sua utilização. Muitos afirmam que é necessário obter um maior conhecimento sobre a manipulação genética e ter mais estudos voltados a entender se esses alimentos podem causar algum dano ao meio ambiente ou a saúde humana. Para a obtenção de linhagens transgênicas

resistentes a patógenos, algumas etapas devem ser levadas em consideração. Primeiro é necessário pesquisar fontes que possuam genes de resistência ao patógeno de interesse. Após isso, esse gene de interesse é incorporado a planta desejada pela tecnologia do DNA recombinante. Por fim, é necessário realizar testes a fim de verificar se o gene foi incorporado e se ele está exercendo a função de interesse para que a resistência persista no cultivo (BUENO; FISCHER, 2006; GOMES, 2013, MMA, 2005). Por outro lado, o controle feito por melhoramento genético clássico, apesar de eficiente e de ter historicamente garantido a existência de cultivares/variedades resistentes e produtivas para a agricultura moderna, ainda é uma prática demorada (ROBERTS et al. 2014; SIVASAKTHI; USHARANI; SARANRAJ, 2014). Ainda assim, assegura funcionamento fisiológico pleno da planta, pois utiliza a troca de informações genéticas pela via reprodutiva, intra-específica e normal das plantas.

2.3.2. Controle cultural

Para o controle cultural, ter um conhecimento básico sobre o ciclo de vida de um fitopatógeno leva ao entendimento do lugar e do tempo que o fungo sobrevive sem estar parasitando a planta e, com isso, ele pode ser controlado. Nesse tipo de controle, o objetivo é reduzir o contato da planta com o patógeno e assim diminuir a taxa e propagação da doença. O controle cultural utiliza práticas tais como a eliminação de plantas vivas doentes, uso de fertilizantes, queima de restos de cultura, propagação de plantas saudáveis, entre outros. Uma dessas práticas é a rotação de culturas que se destaca por ser a mais antiga e mais eficiente no controle de doenças. A rotação consiste em cultivar alternativamente espécies de plantas diferentes em um mesmo local e na mesma estação de ano em anos distintos. Com isso, haverá uma redução ou eliminação do substrato apropriado para o fungo já que eles são geralmente dependentes dos nutrientes de uma planta específica. Enquanto que, sem a realização desse rodízio de espécies, os fitopatógenos seriam estimulados a crescer já que teriam nutrientes suficientes para continuar o seu ciclo biológico e assim se propagar. O problema desse método de controle é que ele só é eficiente contra algumas espécies de fungos. Características desses fungos suscetíveis ao efeito da rotação de culturas

são a ausência de estruturas de resistências, esporos que são dispersos pelo vento a distâncias curtas, não possuem hospedeiros secundários ou possuem poucos e sua nutrição é exclusiva do seu hospedeiro específico (MICHEREFF, 2001).

2.3.3. Controle químico

Pesticidas químicos sintéticos (agrotóxicos) vêm sendo utilizados há décadas para realizar o controle de doenças e pragas. Esses compostos são normalmente utilizados em concentrações maiores do que o cultivo necessita e esse desequilíbrio pode tornar o cultivo ainda mais vulnerável ao ataque de patógenos. Apesar dos agrotóxicos conseguirem combater os patógenos, seu uso inadequado e/ou excessivo vem ocasionando inúmeros problemas para a saúde humana e ambiental, como, por exemplo, a contaminação de alimentos, água, animais e do solo; indução de resistência dos patógenos ao princípio ativo; desequilíbrios biológicos na ciclagem de nutrientes, entre outros.. Muitos compostos químicos apresentam em sua formação metais pesados, como o cádmio, que pode se acumular nos seres humanos, especialmente no fígado e rins, favorecendo o aparecimento da osteoporose. O período que esses compostos permanecem no meio ambiente pode variar, alguns são tão tóxicos que, mesmo sendo utilizados em pequenas quantidades, geram danos irreversíveis. Os agrotóxicos mais utilizados nas plantações são os herbicidas, fungicidas e os inseticidas (BETTIOL; MORANDI, 2009; MMA, 2005). Os fungicidas são utilizados na agricultura para combater os fungos fitopatógenos, todavia o seu uso intenso vem provocando um grave problema de desenvolvimento de resistência (BRENT; HOLLON, 2007; RODRIGUES, 2006). Além disso, a relação entre os fungicidas e os micro-organismos presentes no meio ambiente é bastante complexa e imprevisível, visto que existem inúmeros fungicidas com modos de ação diferentes, alguns específicos, outros de amplo espectro. É importante entender como esses compostos agem sobre os micro-organismos do ambiente e os efeitos que eles provocam, uma vez que existe um *feedback* dessa comunidade microbiana para o solo e para as plantas, e isso pode afetar negativamente a agricultura. Um bom controle sobre patógenos deve propiciar uma alta produtividade (já que conseguiu

impedir a manifestação da doença) e conservar organismos benéficos. Esses compostos podem ter impactos negativos sobre micro-organismos não-alvo (GOMES, 2013; YANG et al. 2011). Esses organismos não-alvo vivem no meio ambiente, como em solos e até sob a superfície das plantas. Eles podem trazer benefícios ao solo, realizando a decomposição de resíduos, a ciclagem de nutrientes, conferindo resistência às plantas as enfermidades, degradando pesticidas e poluentes, e causando a estabilidade do solo (VAN-ZWIETEN et al., 2004).

Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (SINDIVEG) (2016) as vendas de agrotóxicos caíram 22% de 2014 a 2016 e um dos fatos que ocasionou esse decréscimo foram as novas tecnologias utilizadas no controle. Uma alternativa ambientalmente segura, eficaz e rápida é o controle biológico que vem se expandindo desde meados do século XX (LACEY; GOETTEL, 1995) e se tornou necessário devido ao aumento da população nas zonas urbanas e a diminuição das áreas rurais para o plantio (BUENO; FISCHER, 2006).

2.4. Controle Biológico

O controle biológico utiliza organismos vivos e/ou seus subprodutos para manejar as populações de pragas e as doenças, mantendo-as em níveis economicamente aceitáveis e auxiliando na conservação do meio ambiente. Esses organismos são chamados de 'agentes de controle biológico' (ACBs), aplicados às culturas com o objetivo de reduzir a quantidade de inóculo dos patógenos ou pragas, e inviabilizar/dificultar a proliferação e surtos epidêmicos, conferindo proteção ao plantio (FAO, 2015; LACEY; GOETTEL, 1995). Dessa forma o controle biológico é uma ferramenta importante no desenvolvimento de sistemas agrícolas mais sustentáveis econômica e ambientalmente (MONTE, 2001).

Existem diferentes espécies que realizam o controle biológico através de diferentes mecanismos de antagonismo. A escolha da espécie que será utilizada depende do patógeno que se deseja combater. Alguns desses ACBs também

trazem benefícios para as culturas como a proteção das raízes contra patógenos e a potencialização da absorção de nutrientes. Estes são micro-organismos benéficos antagônicos aos agentes causais das fitopatologias e eles têm sido a base para o controle biológico de doenças na agricultura (HARMAN; BJORKMAN, 1998). Um ACB apresenta algumas características importantes como conseguir sobreviver em condições hostis, consumir requerimentos nutricionais básicos, ser eficiente contra mais de um tipo de patógeno, entre outras. As bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* e os fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Gliocladium*, são exemplos de ACBs que são comumente utilizados (MICHEREFF, 2001).

Os ACBs utilizam diferentes mecanismos para atingir o patógeno (RIBEIRO, 2009) como (i) a competição por nutrientes, fazendo com que o ACB cresça mais rápido e impeça o crescimento do patógeno, (ii) a antibiose, em que o ACB libera substâncias tóxicas ao patógeno reduzindo o seu número ou causando a sua morte, (iii) a resistência induzida em plantas, que faz com que estas acionem respostas de defesa contra o ataque de fitopatógenos, (iv) o micoparasitismo, onde o ACB retira nutrientes após penetração de suas hifas nas hifas do patógeno e consumo do conteúdo intracelular, e (v) a hipovirulência que consiste em introduzir uma linhagem do patógeno menos virulenta que possa transmitir essa característica para linhagens altamente virulentas. Alguns agentes de controle biológico utilizam apenas uma dessas estratégias contra o patógeno, todavia, agentes mais bem-sucedidos tendem a utilizar vários desses mecanismos simultaneamente (MICHEREFF, 2001; MONTE, 2001).

Em alguns casos o controle biológico sozinho não é suficiente para combater os patógenos, com isso se torna necessário combinar os métodos dos diferentes tipos de controle para conseguir combater as pragas e doenças com eficiência e menos efeitos deletérios. Isso é chamado de Manejo Integrado de Pragas (MIP), que é um conjunto de medidas voltadas para beneficiar a cultura, evitando perdas na produção, possibilitando o controle de patógenos e visando a proteção do meio ambiente (KARAM, 2006). No Brasil, por exemplo, a resistência que os patógenos adquiriram aos produtos químicos exige o uso integrado desses métodos, incluindo biológico, genético, químico e cultural. Nesse tipo de manejo é realizado o monitoramento dos locais de cultivos, indução de resistência nas plantas e identificação das pragas que as acometem. As técnicas utilizadas são

selecionadas de acordo com os parâmetros econômicos, sociológicos e ecológicos, e o uso integrado desses métodos se torna bastante eficiente para controlar os patógenos (FILHO; RODRIGUES, 2015; LORINI, 2005). Nesse manejo é levada em conta a conservação do meio ambiente e por isso o uso de produtos químicos sintéticos é reduzido. Graças ao MIP o uso de agrotóxicos foi reduzido em mais de 80% na cultura de feijão no Brasil. Um dos seus métodos é a prática de rotação de cultivo, ou seja, a plantação de diferentes cultivos em uma mesma área, mas em épocas diferentes. Além disso, são necessários bons ACBs para realizar o controle populacional de propágulos infectivos, mantendo-as abaixo do nível de dano econômico (MMA, 2005). Dentre estes ACBs, destacam-se espécies fúngicas do gênero *Trichoderma*, que são os agentes antagonistas mais utilizados no biocontrole de fungos no mundo e são estudados há muitos anos (MACHADO et al., 2015; HARMAN; BJORKMAN, 1998; BENÍTEZ et al., 2004; BETTIOL, 2008).

2.5. *Trichoderma* spp.

O gênero *Trichoderma* é composto por fungos pertencentes ao filo Ascomycota que apresentam grande potencial industrial e biotecnológico e, por isso, é um dos gêneros mais estudados (SILVA, 2016). *Trichoderma* spp. possuem vida livre, são filamentosos e comumente encontrados em solos e raízes, podendo também ser encontrados na forma endofítica. Eles podem ser saprófitos, pois se alimentam de matéria orgânica em decomposição, e também possuem estratégias nutricionais biotróficas, pois podem se alimentar de células vivas do hospedeiro (DRUZHININA et al., 2011). Esse gênero possui reprodução assexuada, ou anamórfica, e sexuada, ou teleomórfica, a qual antigamente era denominada *Hypocrea* (MUKHERJEE et al., 2013); atualmente, as duas fases sexuais possuem o mesmo nome já que se referem ao mesmo fungo.

Já foram relatados casos de espécies que possuem a capacidade de recombinação sexual, o que pode favorecer o surgimento de novos genótipos (BEZERRA et al., 2003). Diferenças genotípicas entre isolados de *Trichoderma* podem alterar os padrões de esporulação, produção de metabólitos de baixo

peso, antagonismo, etc (LOGUERCIO et al., 2009; MUKHEERJEE et al., 2013). Até o momento, foram descritas ~256 espécies de *Trichoderma* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Normalmente, as sequências utilizadas para identificação de fungos são oriundas da região *ITS* (*Internal Transcribed Spacer*) que corresponde uma região do DNA ribossômico. Porém, algumas pesquisas apontam ineficiência na identificação em nível de espécie, sendo importante a utilização de outras sequências adicionais para maior especificidade e confiabilidade na identificação, tais como a do fator de alongação da tradução *tef1* α (CHAVERRI et al., 2015).

Espécies deste gênero possuem capacidade de interação/associação com plantas, tendo como resultado efeitos benéficos de promoção de crescimento e indução de resistência sistêmica (MUKHERJEE et al., 2013), os quais indiretamente auxiliam no controle de fitopatógenos. Fungos que promovem o crescimento vegetal têm mecanismos específicos, cujos efeitos variam de acordo com o ambiente, a disponibilidade de nutrientes e a interferência dos demais micro-organismos (HARMAN; BJORKMAN, 1998; MACHADO et al., 2015). A espécie *T. asperellum* induziu a um aumento do número de folhas, brotos, da taxa de clorofila, da absorção de fósforo, das atividades de fosfatase ácida e da altura da planta na espécie *Theobroma cacao* L.. Além disso, ela conseguiu reduzir os efeitos de *Phytophthora megakarya* sobre o cacau e aumentou o conteúdo de aminoácidos e componentes fenólicos das folhas da planta, mecanismos estes que estão envolvidos na defesa das plantas (TCHAMENI et al., 2017).

Esses fungos têm um papel relevante na manutenção/favorecimento dos serviços ecossistêmicos (serviços ambientais), que são os benefícios que os seres humanos adquirem do meio ambiente. Esses benefícios são gerados através dos processos ecossistêmicos que resultam de processos vitais de várias espécies e suas interações com o meio ambiente (ELMQVIST et al., 2010), ou seja, a medida que os organismos interagem uns com os outros e com seu ambiente físico é que eles vão produzindo esses serviços. Esses recursos são divididos em quatro tipos: serviços de produção, de regulação, culturais e os de suporte. O gênero *Trichoderma* atua na ciclagem de nutrientes e na decomposição que são serviços de suporte necessários para a produção de

todos os demais serviços (CHAPIN, 1997; MEA, 2003; WHATELY et al., 2008). Além dos seres vivos, a agricultura também se beneficia desses serviços. Essa prática faz uso de serviços de provisão e de regulação e suporte, quando utilizam, por exemplo, recursos dos solos e recursos hídricos. Se não fosse possível obter esses serviços ecossistêmicos naturalmente, o custo da produção agrícola seria muito mais elevado (PARRON et al., 2015; ANTONIAZZI, 2008)

2.5.1. Mecanismos de ação antagônica

Trichoderma exerce o controle biológico por meio de mecanismos diretos ou indiretos. Os mecanismos diretos são o micoparasitismo, antibiose e competição, e os indiretos são a promoção de crescimento, indução de resistência e alívio de estresse nas plantas. Eles podem atuar em conjunto com outros micro-organismos e sua eficiência depende da cepa de *Trichoderma*, do fungo fitopatógeno, da planta e das condições ambientais (disponibilidade de nutrientes, temperatura e pH, por exemplo). A ativação de cada mecanismo implica na produção de metabólitos e de compostos específicos (BENÍTEZ et al. 2004; REINO et al. 2008; RIBEIRO, 2009; WAGHUNDE; SHELAKÉ; SABALPARA, 2016).

2.5.1.1. Micoparasitismo

No micoparasitismo, *Trichoderma* ataca diretamente as hifas de outro fungo em um evento bastante complexo que envolve sinalização, quimiotropismo, reconhecimento, enrolamento e penetração das hifas de *Trichoderma* e subsequente morte do fungo antagonizado. Este gênero pode exercer esta ação numa variedade de fungos que infectam as plantas (BENÍTEZ et al, 2004).

Antes do *Trichoderma* entrar em contato com o fungo alvo, há liberações de compostos e enzimas. Quando ocorre o contato, as hifas de *Trichoderma* se enrolam no fungo parasitado e formam apressórios. Antigamente, achava-se que estas estruturas formavam-se pela ligação de carboidratos da parede celular de *Trichoderma* a lectinas presentes no fitopatógenos. Todavia, descobriu-se depois que, apesar de mediarem esse reconhecimento, as lectinas não são determinantes para essa fixação e que o enrolamento pode não estar

correlacionado com o micoparasitismo. Para acontecer de fato esse antagonismo, *Trichoderma* começa a produzir enzimas que degradam a parede celular do fungo alvo e então são produzidos buracos em suas superfícies pelos quais as hifas de *Trichoderma* penetram e tem acesso ao lúmen (DRUZHININA et al., 2011; HARMAN et al., 2004).

2.5.1.2. Antibiose

Segundo revisão feita por Howell (2003), o sucesso do biocontrole feito com espécies de *Trichoderma* se deve aos mecanismos de micoparasitismo e antibiose. A antibiose é a interação por meio de compostos de baixo peso molecular (voláteis ou não) ou antibióticos (que atuam sinergicamente com enzimas). Esses compostos de baixo peso molecular e voláteis são aromáticos simples, não polares e que possuem uma pressão de vapor alta (REINO, 2008). Os *peptaibols* são exemplos desses metabólitos e possuem uma forte atividade contra fungos e bactérias (BENÍTEZ et al., 2004). Eles são uma classe de peptídeos lineares que atuam sinergicamente com enzimas, degradando a parede celular de outros fungos. Além disso, provocam resistência a patógenos nas plantas. Essa junção de enzimas hidrolíticas com antibióticos aumentam a eficiência do efeito antagônico mais do que qualquer um dos outros mecanismos.

Vários estudos têm mostrando a importância da antibiose para o gênero. Por exemplo, mutantes de *Trichoderma* que eram incapazes de sintetizar algum tipo de antibiótico mostraram que o gênero perdia a capacidade de realizar biocontrole. Outros estudos demonstraram que o biocontrole foi realizado apenas pela produção de um produto tóxico que matava o patógeno, sem haver contato direto entre *Trichoderma* e o fitopatógeno (HOWELL, 2003).

2.5.1.3. Competição

Na competição por nutrientes, que são necessários para a germinação de patógenos do solo, muitos micro-organismos que crescem próximos a *Trichoderma* morrem. Isso ocorre devido à escassez de nutrientes, visto que esse gênero, não somente apresenta taxas maiores de crescimento que os micróbios circundantes, mas também possui genes e proteínas que o torna capaz de imobilizar os outros micro-organismos e, assim, absorver os nutrientes do solo de

forma mais eficiente (WAGHUNDE; SHELAKE; SABALPARA, 2016). Espécies de *Trichoderma* produzem sideróforos altamente eficientes para a absorção de ferro no solo. Isto é um forte mecanismo de biocontrole visto que a maioria dos fungos precisam de ferro para a sua sobrevivência. Quando esse gênero lança os sideróforos no ambiente, estes se ligam ao ferro promovendo sua absorção por *Trichoderma*, impedindo o crescimento de outros fungos. A falta de nutrientes é o tipo de morte mais comum entre micro-organismos (EISENDLE et al., 2004).

A competição também pode ocorrer por disputa de espaço físico entre *Trichoderma* e outros micro-organismos. Em ambos os tipos de competição, *Trichoderma* consegue resistir a condições adversas onde possam estar presentes metabólitos que impedem a germinação de esporos ou matam as células, por isso esses fungos conseguem crescer rapidamente (BENÍTEZ et al., 2004; VOS et al., 2015). Para que ocorram as competições por nutrientes e espaço com o fitopatógenos é necessário que o ACB consiga crescer no ambiente em que é aplicado (HOWELL, 2003; HARMAN, 2006).

2.5.1.4. Indução de resistência em plantas

Este é um mecanismo de antagonismo indireto em que *Trichoderma*, ao entrar em contato com a planta, ativa um conjunto de respostas de defesa desta contra outros fungos. Ele pode induzir a uma resistência sistêmica ou localizada a diferentes agentes patogênicos. Nesse mecanismo antagônico, ocorre a ativação de fatores de transcrição presentes da planta e a consequente expressão de genes ligados à defesa. Existem também outras respostas que podem incluir a síntese de metabólitos secundários, produção de proteínas antimicrobianas, acúmulo de espécies de oxigênio reativas, entre outras. Essa resistência também pode ser ativada em plantas suscetíveis, ela é denominada de resistência sistêmica adquirida (SAR). Essa ativação está associada a diversos genes envolvidos na defesa. A SAR vem sendo demonstrada em diferentes tipos de interações hospedeiro-patógeno sendo efetiva contra doenças causadas por diferentes fitopatógenos. A sua indução restringe o crescimento de fitopatógenos na planta e conseqüentemente leva a diminuição dos sintomas da doença (HAMMERSCHMIDT; METRAUX; VAN LOON, 2001; HARMAN et al., 2004; RYALS et al., 1996; SCHENK et al., 2000).

2.5.1.5. Promoção de crescimento de plantas

Os micro-organismos endofíticos vivem dentro das plantas sem causar danos e podem estimular o crescimento, prevenir estresses fisiológicos (como seca ou alta salinidade), ~~dormência~~, ou obstruir a entrada de agentes patogênicos. *Trichoderma* spp. produzem fitormônios e alguns metabólitos secundários que podem promover o crescimento das plantas. Ocorre uma solubilização de nutrientes que pode melhorar o desempenho das plantas em condições que a disponibilidade de nutrientes é baixa (MUKHERJEE et al., 2013; PIOTROWSKI; VOLMER, 2006). Os isolados de *Trichoderma* que colonizam as raízes das plantas envolvem suas hifas e formam apressórios, penetrando no córtex radicular e crescendo dentro das células. Com isso, as células vegetais depositam substâncias em suas paredes celulares e produzem compostos fenólicos para limitar o crescimento desse fungo na raiz. Então *Trichoderma* tem acesso aos exsudatos (fluido rico em proteínas) da raiz e em correspondência melhora o crescimento de todas as partes da planta (SHORESH et al., 2010).

2.5.2. Produção de ACBs utilizando *Trichoderma*

Em 1960 surgiram os primeiros produtos biológicos comerciais para o controle de doenças vegetais. No Brasil a partir da década de 90 começaram a produção e comercialização de produtos utilizando como base isolados de *Trichoderma* (LOPES, 2009). Esse gênero tem como característica uma alta diversidade genética, a partir da qual é possível a obtenção de uma gama de produtos com finalidade agrícola, industrial e ambiental. Além disso, apresenta diferentes mecanismos antagônicos o que o torna bastante utilizado como base de produtos para combater patógenos (HARMAN et al., 2004; COLLA et al., 2008; ZUGAIB et al, 2013). Os biofungicidas a base de *Trichoderma* estão crescendo na agricultura, possuindo mais de 50 formulações e sendo vendidos em diferentes países (WOO et al., 2006). As principais espécies do gênero utilizadas são *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma stromaticum* e *Trichoderma viride*, todavia, alguns produtos só identificam nos rótulos o gênero (MORANDI; BETTIOL, 2009).

No Brasil, vários estados já possuem empresas especializadas na comercialização de *Trichoderma* como ACB, sendo que os respectivos produtos

biológicos são produzidos à base de conídios vivos (razão pela qual, efeitos específicos na conidiação são importantes de serem estudados nas etapas de pesquisa prévia ao desenvolvimento tecnológico). Estes bioprodutos têm demonstrado eficiência técnica e econômica contra diversas doenças causadas por fitopatógenos, tais como *Botrytis*, *Fusarium*, *Moniliophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Sclerotium* e outros, que afetam culturas de alta relevância econômica como soja, café, feijão, algodão, cacau, tomate etc. A qualidade desses produtos é avaliada pela contagem de esporos (mínimo de 1×10^8 conídios/g), a taxa de germinação (>85%) e a taxa de viabilidade (> $8,5 \times 10^7$ UFC/g). Esses produtos têm validade de 30-180 dias em temperatura ambiente (25 °C) e 180-360 dias sob refrigeração (LOPES, 2009; MORANDI E BETTIOL, 2009; POMELLA e RIBEIRO, 2009).

A Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico (ABCBio), surgiu em 2007 a fim de reduzir os custos de registro dos bio defensivos (MORANDI; BETTIOL, 2009). Segundo a ABCBio (2017), existem sete produtos registrados contendo em sua formulação *Trichoderma asperellum*. A primeira empresa privada que comercializou *Trichoderma* no Brasil foi a BIOAGRO ALAM LTDA em 1992 no Rio Grande do Sul. Atualmente, muitas empresas surgiram pelo país e produzem diferentes produtos à base de *Trichoderma* (MORANDI E BETTIOL, 2009). No Sul da Bahia, por exemplo, os esporos de *Trichoderma stromaticum* formam a base do produto “Tricovab”, um fungicida microbiológico produzido pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC). Esse foi o primeiro fungicida biológico para combater o fitopatógeno *M. perniciosa* em lavouras de cacau, sendo um poderoso aliado para a cultura de Cacau na Bahia. O Tricovab é um produto natural, com embalagem biodegradável e não causa danos ao meio ambiente e aos seres humanos (CEPLAC, 2013).

Uma problemática da comercialização de ACBs no Brasil é a legislação que impõe que esses produtos sigam o modelo comercial dos agrotóxicos, já que suas finalidades são semelhantes. Além disso, esses ACBs são produtos de empresas de pequeno e médio porte que possuem pouco recurso financeiro para comercializar produtos que exigem condições de armazenamento e transportes especiais (LOPES, 2009). E, há a escassez de programas que financiem e incentivem a pesquisa com esses organismos (MORANDI; BETTIOL, 2009).

2.5.3. Potencial antagônico de proteínas de *Trichoderma*

O interesse específico pelo mecanismo de micoparasitismo revelou uma variedade de proteínas e genes envolvidos nesse processo; alguns estudos já demonstraram aspectos genéticos e bioquímicos que regulam o micoparasitismo e, portanto, o potencial de biocontrole (STEYAERT et al., 2003; HARMAN et al., 2004). Há cerca de 30 genes conhecidos, proteínas e outros metabólitos, que estão diretamente envolvidos no micoparasitismo (HARMAN et al. 2004). Sabe-se que muitos desses genes são expressos antes e durante o contato direto das hifas de *Trichoderma* com o fungo alvo, e esses genes codificam proteases (sendo a maioria do grupo das serinas) e transportadores de oligopeptídios. Durante o contato no micoparasitismo, a transcrição de genes envolvidos no catabolismo lipídico e na osmorregulação aumentam. Estudos mostram que a deleção de genes, como *tmkA*, envolvidos no micoparasitismo, resultam na perda do antagonismo contra alguns fitopatógenos enquanto o mesmo gene deletado pode melhorar o controle biológico em outras espécies (DRUZHININA et al., 2011).

Abordagens proteômicas têm permitido identificar diferentes proteínas envolvidas nas relações planta-patógeno-ACBs (MARRA et al., 2006). Essas proteínas presentes em *T. atroviride*, por exemplo, atuam como sensores para detectar o fitopatógeno e esse sinal ocorre através de uma cascata de sinalização (DRUZHININA et al., 2011). Proteínas envolvidas na colonização de raízes, presentes em *Trichoderma*, intensificam a sua capacidade antagonista de competição com outros micro-organismos (BROTMAN et al. 2008).

2.6. *Aspergillus* spp.

Os mecanismos antagônicos são bastante eficazes no controle biológico, porém, eles podem apresentar riscos a espécies não-alvo. Exemplos disso são os distúrbios causados em cogumelos comestíveis, o micoparasitismo em micorrizas e sua conseqüente redução. Algumas espécies do gênero *Trichoderma* também está associado a distúrbios respiratórios em humanos, fato que torna necessário maiores estudos sobre impactos biológicos e ambientais que os ACBs podem

causar a espécies não-alvo (BRIMNER; BOLAND, 2003).

Espécies/isolados do gênero *Aspergillus* aparecem como boas opções para ensaios laboratoriais devido à (i) relativa facilidade de cultivo/esporeação *in vitro*, (ii) relevância científica e prática do gênero, e (iii) relevância econômica em agricultura, indústria e saúde. Este gênero está inserido na Divisão Ascomycota, e família Trichocomaceae (MELO, 2013). Ele é composto de espécies que são patógenos multi-taxa de vegetais, insetos, animais e humanos. Espécies do gênero *Aspergillus* estão envolvidas na deterioração de sementes e grãos armazenados, sendo a produção de metabólitos secundários tóxicos (micotoxinas) para vertebrados uma das consequências mais graves. Esses fungos, por exemplo, afetam amendoins durante o seu processamento e armazenamento, tornando o produto inapropriado para a alimentação, afetando sua qualidade e comercialização. As 'aflatoxinas' (uma classe de micotoxinas produzidas por este gênero) são substâncias imunossupressoras, cancerígenas e teratogênicas. Já foi demonstrado que alguns isolados de espécies do gênero *Trichoderma* possuem ação antagônica contra as espécies *A. flavus* e *A. niger* conseguindo reduzir a incidência de doenças em plantas, como por exemplo podridões em amendoim e feijão (*Phaseolus vulgaris*) (SRILAKSHMI, 2001; DESAI, 2000; BENICIO et al., 2003; ANDRADE; LIMA, 2010).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico

O projeto foi executado na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), no Laboratório de Microbiologia Aplicada à Agroindústria (LABMA) e no Centro de Biotecnologia e Genética (CBG). Uma seleção de 17 isolados de diferentes espécies de *Trichoderma* foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza (UFLA). O estoque foi feito com os isolados cultivados em BDA (Batata, Dextrose-Ágar) e incubados em estufa BOD a 25°C com fotoperíodo de 24 h de luz durante 5 dias. Os esporos foram retirados com auxílio de alças de Drigalski após a adição de 10 mL de água destilada estéril e posteriormente filtrados em papel filtro estéril para posterior congelamento a -80°C em glicerol estéril a 50%. Esses isolados foram previamente caracterizados e taxonomicamente identificados por meio de sequenciamento das regiões ITS e *tef-1α* (FEITOSA, 2016). O isolado do gênero *Aspergillus* foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Ana Paula Uetanabaro (UESC). Todos os isolados encontram-se depositados no acervo microbiológico do Laboratório de Microbiologia Aplicada à Agroindústria da UESC.

3.1.1. Determinação da viabilidade de esporos de *Trichoderma*

Para padronizar a concentração dos inóculos nos experimentos com base em número de esporos viáveis, foi feita a determinação da taxa de germinação de esporos dos estoques dos isolados sob estudo. Para isso, 10 µL dos isolados em estoque foram diluídos em 990 µL de água Mili-Q. Após isso, foram misturados em vórtex e uma alíquota de 10 µL foi colocada na câmara de Neubauer onde foram contados todos os esporos presentes nos 5 quadrados centrais. Posteriormente a viabilidade foi feita colocando 200 µL de meio BD (Batata e Dextrose) líquido em placas de 96 poços e adicionado 10⁶ esporos totais de cada isolado de *Trichoderma*. A placa foi incubada em estufa BOD a 25°C por

16 h. Os esporos foram avaliados em microscópio óptico (objetiva de 40x) diretamente da câmara de Neubauer; aqueles que apresentaram o tubo germinativo com pelo menos o dobro do diâmetro do esporo foram considerados germinados, e computados em relação ao total de esporos no campo visual. Foram contados no mínimo 100 esporos no total.

3.1.2. Condições de germinação de esporos de *Aspergillus clavatus*

Para verificar quais as melhores condições *in vitro* para germinação de esporos de *A. clavatus*, foi realizado teste de germinação com $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{3}$ de concentração de caldo Batata e Dextrose (BDC). O inóculo foi colocado em estufa BOD a 25° por 16 h e após isso realizada a contagem de esporos utilizando a câmara de Neubauer. Esporos que apresentaram o tubo germinativo com pelo menos o dobro do tamanho do diâmetro do esporo foi considerado germinado, caso contrário, foi considerado não germinado. Foram contados no mínimo 100 esporos no total em cada amostra, e comparadas as condições entre si para verificar potenciais diferenças estatísticas entre os meios.

3.2. Extração de proteínas totais do sobrenadante

3.2.1. Preparação das amostras e precipitação das proteínas

Os isolados foram inoculados em frascos com 100 mL de meio BDC, nas mesmas concentrações (10^5 esporos viáveis/mL), e incubados sob agitação, a 25°C em 5 diferentes tempos: 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h. Após estes tempos, cada cultura (isolado/tempo) foi filtrada (32-33 mL) para tubos falcon e foi adicionado sulfato de amônio (75%) para precipitação das proteínas e incubados sob agitação a 4°C *overnight*. O micélio foi pesado para verificar correlação da massa com a produção de proteínas e foi obtido através da filtragem com pressão negativa e secagem em estufa a 60°C por 48 h. O filtrado foi centrifugado a 30.000 x g por 20 min a 4°C para obtenção do *pellet* de proteínas. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuspensão em tampão fosfato-salino 1x (PBS).

3.2.2. Diálise das amostras

Para remoção do sulfato foi realizada uma diálise das proteínas utilizando membrana semipermeável contra água destilada. Foram realizadas 3 trocas na diálise em intervalos de 1 h e o último de 2 h, totalizando 4 horas a 4 °C. Após isso as amostras foram colocadas em microtubos de 1,5 mL a 4 °C por no máximo 24 h.

3.3. Quantificação e confirmação da extração de proteínas

3.3.1. Método *dye-binding* de Bradford

A quantificação pelo método de Bradford foi feita em placa de 96 poços. Para a curva padrão foi utilizada Albumina do Soro Bovino (BSA) 0,1 mg/mL, onde 150 µL foram adicionados nos poços A1 ao A3. Em seguida foram adicionados 50 µL de água Mili-Q nos poços B1 ao H3. Após isso foi feita uma diluição seriada aplicando-se 100 µL do A ou G. As proteínas extraídas (10 µL da amostra + 40 µL de H2O Mili-Q) foram adicionadas em triplicata. Posteriormente 200 µL (1:4) do reagente de Bradford foram colocados em todos os poços e a placa foi incubada no escuro por 10 minutos para posterior leitura em leitor de placas a 595 nm.

3.3.3. Desnaturação por aquecimento

Para confirmação da extração de proteínas e não de outros metabólitos celulares, as amostras dos isolados crescidos por um mesmo tempo de cultura foram desnaturadas por meio de banho-maria (~100°C). Após isso essas amostras foram utilizadas nos testes de inibição da germinação de *A. clavatus*. A taxa de inibição (Ti) da germinação foi medida por meio da fórmula:

$$Ti = \frac{(\% \text{ germinação Controle} - \% \text{ germinação Tratamento})}{\% \text{ germinação Controle}} \times 100$$

3.4 Ação das proteínas sobre crescimento e germinação de *A. clavatus*

3.4.1. Avaliação da inibição do crescimento

Para avaliar se as proteínas extraídas dos diferentes isolados de *Trichoderma* possuíam ação inibitória sobre o crescimento de *A. clavatus* foi colocado, em uma placa de 96 poços, 100 µL das proteínas a 1 mg/mL em 100 µL de meio BDC. Após isso, foi inoculado uma quantidade de 10^5 esporos viáveis de *Aspergillus clavatus* nos poços e a placa foi incubada em estufa BOD a 25°C durante 5 dias com luz contínua. A placa foi observada através de registro fotográfico em mesa estativa escura por meio de uma haste de acoplamento que permitia a câmera ficar posicionada na mesma altura em todos os experimentos. A fotodocumentação ocorreu a cada 24 h durante 5 dias e a avaliação foi feita por notas de acordo com os quadrantes que o micélio aéreo ocupava nos poços da placa. Quando não havia micélio aéreo era atribuído nota 0; quando o micélio ocupava $\frac{1}{4}$ do poço da placa era atribuído a nota 1, $\frac{1}{2}$ era atribuído a nota 2, $\frac{3}{4}$ a nota era 3 e se o micélio ocupasse todo o poço era atribuída a nota máxima 4. Para visualização da inibição do crescimento, os dados obtidos de todos os isolados em todos os tempos (médias) foram utilizados para construção de gráficos do tipo *heatmap* com o auxílio do programa Excel.

3.4.2. Avaliação da inibição da germinação

Para avaliar se as proteínas extraídas dos diferentes isolados de *Trichoderma* possuíam ação inibitória na taxa de germinação de esporos de *A. clavatus* foi colocado, em uma placa de 96 poços, 100 µL das proteínas a 1 mg/mL em 100 µL de meio BDC. Após isso foi inoculado uma quantidade de 10^5 esporos viáveis de *Aspergillus clavatus* nos poços e a placa foi incubada em estufa BOD a 25°C durante 16h com luz contínua. Após homogeneização, 10 µL da cultura foram transferidos para a câmara de Neubauer e analisados em microscópio óptico (objetiva de 40x) para avaliação da taxa de germinação através da contagem dos esporos germinados e não germinados. Foram considerados germinados os esporos que apresentaram tubo germinativo com comprimento maior que duas vezes o tamanho do esporo. O controle foi feito

utilizando meio BDC com 10^5 esporos totais de *Aspergillus clavatus* para todos os tratamentos analisados. A taxa de inibição (Ti) da germinação foi medida utilizando a fórmula acima (ver tópico 3.3.3).

O valor do controle utilizado foi o mesmo para todos os isolados e foi obtido a partir da média das repetições dos controles de todos os experimentos. O valor utilizado como controle foi 29 (26,34; 24,5; 32,67; 24,83; 37,5), $\sigma = 5,7$. Para visualização da inibição da germinação, os dados obtidos de todos os isolados em todos os tempos (médias) foram utilizadas para construção de gráficos do tipo *heatmap* com o auxílio do programa Excel.

3.4.3. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Cada tratamento (isolado) foi composto por três repetições em cada experimento de tempo e extração de proteínas. Os dados de germinação foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Os dados apresentaram distribuição normal e com isso foi realizada uma ANOVA fatorial seguida por um teste de médias paramétrico (Tukey) com 5% de significância. Foram feitas análises para avaliar se havia interação entre os fatores tempos e isolados e foram feitas análises com os dois fatores individuais. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa R Studio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Espécies do gênero *Trichoderma* são frequentemente utilizadas para realização de biocontrole no mundo (MACHADO et al., 2015; HARMAN; BJORKMAN, 1998; BENÍTEZ et al, 2004; BETTIOL. 2008). No entanto, a maioria dos estudos não leva em consideração a caracterização e comportamento dos isolados ao longo do tempo de cultura *in vitro*. Essa caracterização importa para a escolha dos isolados e pode influenciar nos resultados de bioprospecção, por potencialmente subestimar isolados/espécies com alto potencial biotecnológico. Isto pode ocorrer e levar ao descarte prematuro de isolados por não apresentarem atividade antagônica satisfatória em um tempo pré-determinado, eventualmente não ideal para suas atividades. Diante do exposto, a realização deste estudo apresenta resultados relevantes nesse sentido, podendo atuar como base para o desenvolvimento de bioprodutos, bem como fornecer informações relevantes para estudos posteriores na área.

4.1. Relação da massa seca com a concentração de proteínas

Entre os 17 isolados sob estudo, alguns pertenciam à mesma espécie, o que permitiu analisar variações intraespecíficas entre os isolados. A produção total de proteínas por isolado, por tempo de cultura foi obtida pela razão entre a média do somatório das *concentrações* de proteínas produzidas (mg/mL) pela média do somatório das respectivas *massas secas* (g) (Figura 1):

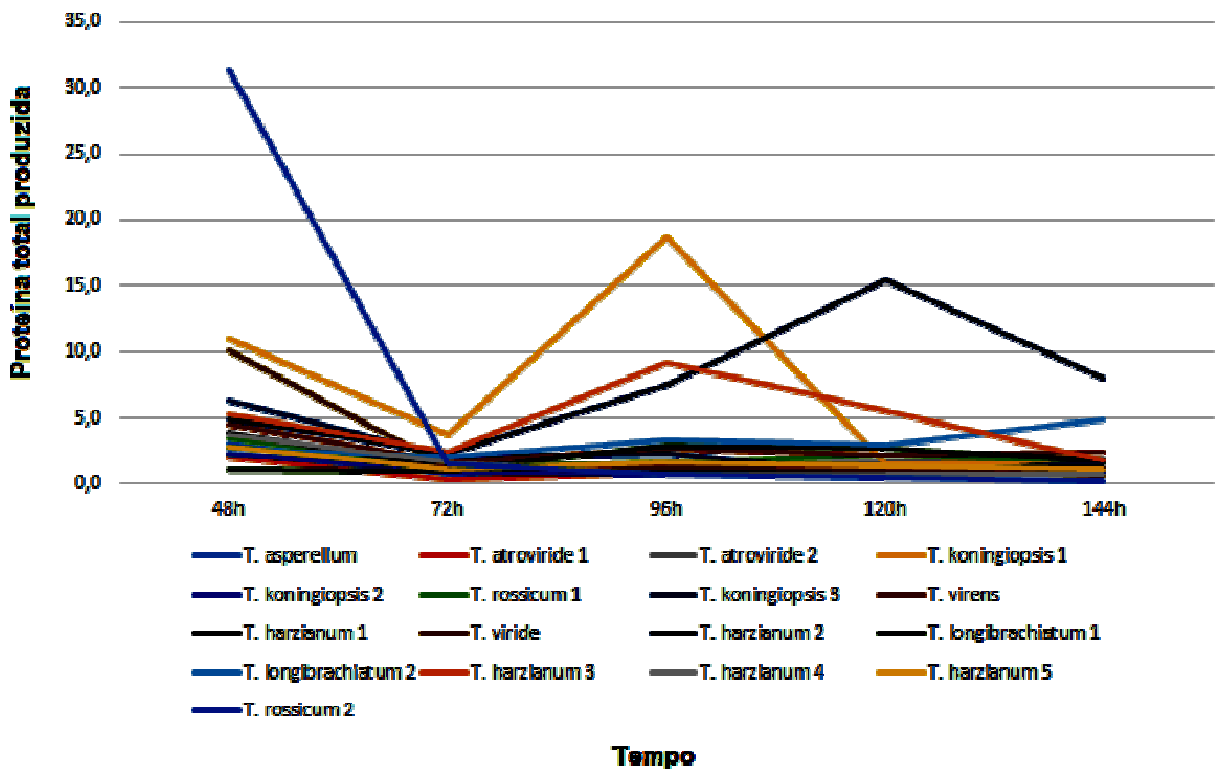


Figura 1. Produção total de proteína ($\text{mg mL}^{-1} \text{g}^{-1}$) obtida pela razão entre as médias das concentrações de proteínas pela média das massas secas nas três repetições de cada ponto de tempo, por cada isolado.

Diferentes genes estão envolvidos com os mecanismos de controle biológico (STEYAERT et al., 2003; HARMAN et al., 2004; TROIAN et al., 2014). Uma maneira de se entender melhor o funcionamento dos genes é através das proteínas resultantes da tradução das informações genéticas do DNA (DE SOUZA; FONTES; RICART, 2003). Neste estudo, pôde-se observar que os isolados nas mesmas condições de cultura e inoculados na mesma concentração apresentaram crescimento e secreção de proteínas de formas diferentes. Este fato pode estar correlacionado com as características fisiológicas únicas de cada isolado, que geralmente estão associadas a genótipos diferentes (GRIFFITHS et al., 2009). A produção de proteínas da maioria dos isolados concentrou-se em uma faixa estreita de valores ($0 \text{ a } 5 \text{ mg mL}^{-1} \text{g}^{-1}$), apresentando em seguida um padrão mais constante ao longo de todos os tempos analisados. Alguns isolados se destacaram nesse gráfico produzindo proteínas acima da faixa observada como *T. rossicum-2*, *T. koningiopsis-1*, e *T. harzianum-2* e *-3*.

4.2. Testes de inibição da germinação de *A. clavatus* com amostras de proteínas de *Trichoderma* desnaturadas por aquecimento

As amostras de proteínas secretadas nos sobrenadantes de isolados de *Trichoderma* e extraídas por precipitação com sulfato de amônio (ver Métodos) foram aquecidas (~100 °C) e colocadas junto com meio BD onde foi inoculado *A. clavatus*. A concentração de 1/2 do meio BD se mostrou mais eficiente para promover a germinação de *A. clavatus*, de modo que essa concentração foi selecionada para os experimentos subsequentes. Apesar de não ser considerado como patógeno de plantas, a escolha de *A. clavatus* como modelo experimental baseou-se em que os mecanismos de antagonismo de *Trichoderma* tanto com fungos fitopatógenos quanto com organismos não-alvo são praticamente os mesmos. Esse teste teve como intuito comprovar que o processo de extração de proteínas de *Trichoderma* utilizado neste estudo efetivamente permitiu o isolamento dessa fração de compostos secretados nos sobrenadantes das culturas. Considerando que ao serem aquecidas as proteínas perdem a sua função biológica, a não-inibição ou uma menor inibição da germinação de *A. clavatus* pelos extratos aquecidos é indicativo da presença e ação das proteínas. Os isolados de *Trichoderma* para este teste de germinação de *A. clavatus* foram escolhidos aleatoriamente (Tabela 1):

Tabela 1. Taxa de inibição (Ti) da germinação de *A. clavatus* por extratos de proteínas não-aquecidas e aquecidas dos isolados de *Trichoderma*.

PROTEÍNAS	TAXA DE INIBIÇÃO DA GERMINAÇÃO (%)	
	SEM AQUECIMENTO	COM AQUECIMENTO
<i>T. atroviride</i> 1	100	19
<i>T. atroviride</i> 2	3	0
<i>T. koningiopsis</i> 1	100	-2
<i>T. koningiopsis</i> 2	100	-3
<i>T. rossicum</i> 1	82	28
<i>T. koningiopsis</i> 3	84	29
<i>T. virens</i>	99	17
TOTAL	568	93

Com o aquecimento das proteínas, as taxas de inibição da germinação tiveram um drástico decréscimo para todos os isolados, que variou entre 65 e 100% (Tabela 1), com exceção do isolado *T. atroviride-2*, o qual não apresentou inibição, mesmo com suas proteínas não-aquecidas. Em outras palavras, a germinação de esporos de *A. clavatus* foi fortemente inibida pela ação antagônica das proteínas secretadas e extraídas dos diferentes isolados de *Trichoderma*, porém essa ação praticamente desapareceu após o aquecimento, o que sugere fortemente que o processo de obtenção das proteínas por precipitação com sulfato de amônio foi eficiente. É interessante ressaltar que nos dois isolados analisados de *T. koningiopsis* as proteínas tiveram uma taxa de inibição de 100%, e, quando aquecidas, além de não inibirem, os resultados negativos sugerem que este tratamento propiciou ao *A. clavatus* germinar mais do que no controle. A desnaturação das proteínas tende a mudar suas conformações ativas e, quando suas estruturas tridimensionais estiverem diretamente relacionadas às suas funções (LEHNINGER et al., 2000), as respectivas atividades serão inibidas ou anuladas. O aquecimento é um dos principais procedimentos que altera a estrutura das proteínas e as suas propriedades funcionais. As mudanças na conformação proteica reversíveis ocorrem até 60°C, sendo que temperaturas maiores ocasionam mudanças irreversíveis e, conseqüentemente, a perda da atividade biológica (RELKIN; LAUNAY, 1990). Portanto, através desses testes foi possível comprovar que a extração das proteínas utilizando sulfato de amônio a 75% de concentração final foi eficiente, e que foram, de fato, as proteínas secretadas no sobrenadante das culturas de *Trichoderma* as responsáveis pelos efeitos inibitórios na germinação de esporos de *A. clavatus*. Segundo Silva et al. (2012), a precipitação de proteínas com sulfato de amônio é um método bastante eficiente, demonstrando um perfil eletroforético mais limpo, sem rastros e com melhor visualização de bandas.

Com estes resultados, prosseguiu-se com o estudo para caracterização temporal dos 17 isolados de *Trichoderma* quanto a capacidade de inibição da germinação e do crescimento de *A. clavatus*, a partir da fração protéica secretada no sobrenadante das culturas, coletados em diferentes tempos de cultivo.

4.3. Inibição do crescimento de *A. clavatus*

O crescimento de *A. clavatus* foi analisado qualitativamente, verificando os níveis de ocupação de seus micélios nos poços da placa. Um 'mapa de calor' (*heatmap*) foi construído com base em escores atribuídos em relação a esta ocupação do micélio (ver Métodos); quanto mais clara a cor no mapa, menor a germinação de *A. clavatus*, portanto, maior o efeito inibitório das proteínas sobre seu crescimento. Os resultados mostraram que todos os isolados de *Trichoderma* afetaram o crescimento de *A. clavatus*, porém de maneiras distintas, apresentando todos os possíveis resultados de inibição (total, parcial e não inibição) (Figura 2).

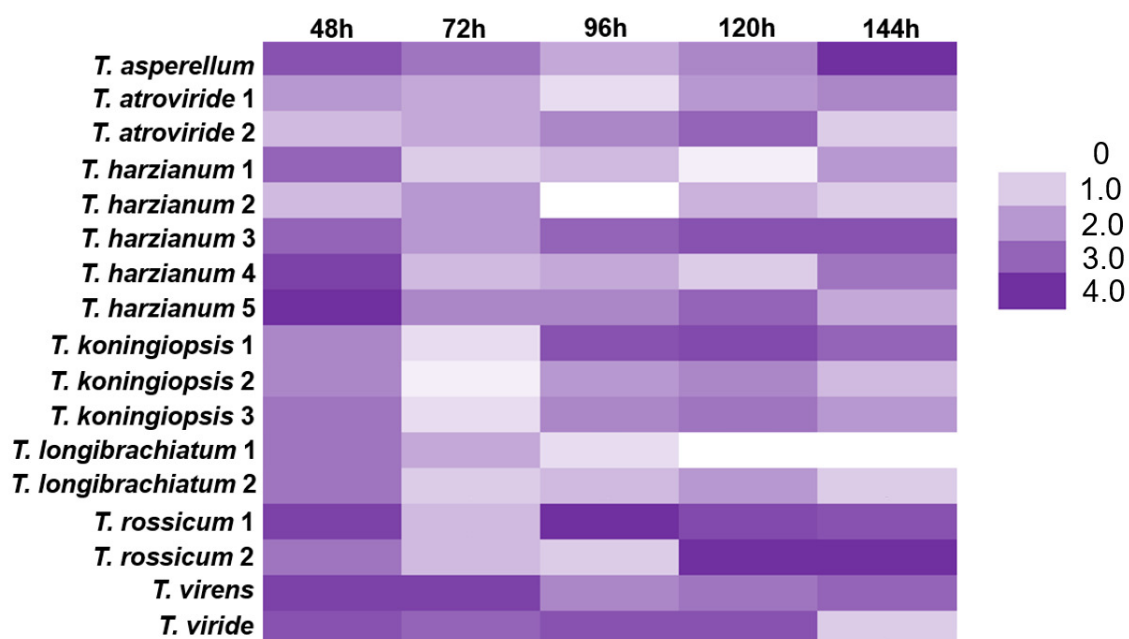


Figura 2. Mapa de calor (*heatmap*) mostrando os diferentes perfis encontrados para o crescimento de *A. clavatus* quando colocado em contato com as proteínas extraídas dos 17 isolados de *Trichoderma* nos diferentes tempos de cultura. Quanto mais forte a cor dos retângulos, maior o escore atribuído para o crescimento de *A. clavatus* e, portanto, menor o efeito de inibição; o contrário é válido para um maior efeito inibitório.

Foi observado que, no tempo de 48 h, houve um maior crescimento geral de *A. clavatus* entre as amostras e, portanto, uma menor inibição geral pelas proteínas dos isolados de *Trichoderma*. Já no tempo de 72 h, foi observada a ocorrência de um menor crescimento de *A. clavatus* para grande parte dos isolados, ou seja, maiores efeitos gerais de inibição por parte dos isolados. Com o passar do tempo (96, 120 e 144h), a inibição foi variável entre os isolados

estudados (Figura 2), com efeitos de oscilação neste fenótipo. A esporulação é um evento chave no ciclo biológico de alguns fungos porque ela é um tipo de reprodução assexuada, além disso, ela auxilia na manutenção da viabilidade das espécies nas variações do meio ambiente (TORTORA; FUNKE; CASE, 2002). Inibir a esporulação, então, é um mecanismo para realizar o biocontrole de algumas espécies fúngicas. No presente estudo, considerando a média de notas de todos os 5 tempos de cultura, o isolado *T. harzianum*-3 foi o que mais se destacou na inibição do crescimento de *A. clavatus*, com uma média de 3,17, enquanto o isolado *T. longibrachiatum*-1 foi o que menos mostrou atividade antagônica no crescimento com uma média de somente 1,0. Em um estudo feito por Marques et al. (2016) a espécie *T. harzianum* juntamente com *T. koningiopsis* e *T. brevicompactum* foram os isolados com maior potencial de inibição. Contudo, esse estudo comparou os isolados num único tempo de cultura. Conforme a Figura 2, os isolados da espécie *T. koningiopsis* foram os que mais se assemelharam na análise intraespecífica. Os outros isolados analisados não apresentaram nenhum padrão temporal comum de inibição, evidenciando diferenças genotípicas intraespecíficas. Grondona et al. (1997) apoiam a existência de “espécies crípticas com morfologias similares” e “espécies baseadas em DNA” no gênero *Trichoderma*, visto que a variabilidade desse gênero é enorme. Como o conceito de espécie se torna amplo para situações práticas de uso em controle biológico, esses autores sugerem que se façam diferenciações para definir populações específicas dentro de uma mesma espécie.

4.4. Inibição da germinação de esporos de *A. clavatus*

Os efeitos das proteínas de *Trichoderma* secretadas nos sobrenadantes das respectivas culturas foram também testados quanto à inibição da germinação de esporos de *A. clavatus*. Uma análise de variância (teste *F*) para os fatores de variação ‘tempo de cultura’ e ‘isolados’ mostrou que não houve significância estatística para interação entre eles; todavia, cada um desses fatores considerado separadamente mostrou interferir significativamente na inibição da germinação de *A. clavatus* (Figura 3).

> summary(m0)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
TREATMENT	16	69289	4619	1.836	0.03300*
PERIODO	4	40458	10115	4.020	0.00382**
TREATMENT:PERIODO	64	151282	2521	1.002	0.48203 ^{ns}

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Figura 3. Recorte do resultado da análise estatística para efeitos individuais e interação entre os fatores ‘tempo de cultura’ e ‘isolados de *Trichoderma*’. Na figura, o fator ‘tempo’ é descrito como ‘*periodo*’ e o fator ‘isolado’ como ‘*treatment*’, em que ‘*’ e ‘**’ representam significância estatística para as diferenças entre médias (valor de *F*), enquanto ‘ns’ representa diferenças não-significativas.

Com essa informação, as análises foram feitas de modo independente para as variáveis ‘isolados’ e ‘tempos’. As proteínas extraídas dos 17 isolados de *Trichoderma* foram diluídas para a concentração de 1 mg/mL e colocadas junto com meio BD líquido onde, posteriormente, foi inoculado *A. clavatus* em mesmas quantidades de esporos entre os tratamentos. A análise da inibição da germinação de *A. clavatus* mostrou que os isolados apresentaram padrões temporais diferentes, tanto intra- quanto inter-espécies (Figura 4).

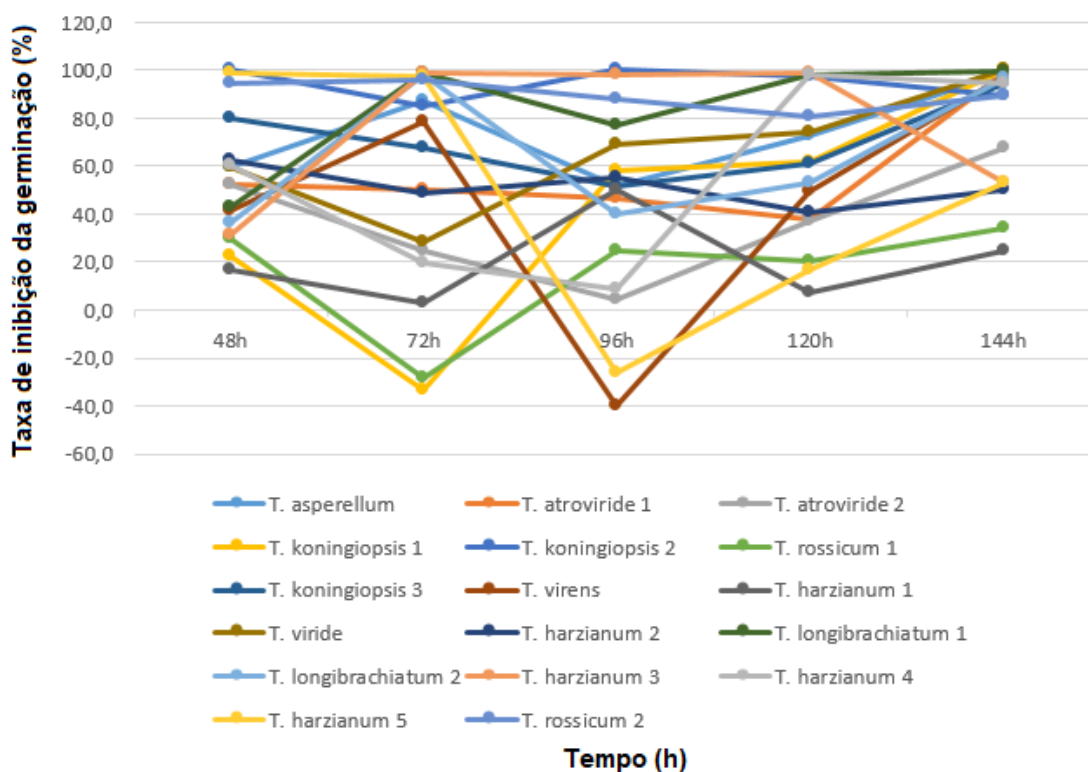


Figura 4. Comportamento dos 17 isolados de *Trichoderma* ao longo do tempo de cultura na capacidade antagônica de suas proteínas secretadas nos sobrenadantes quanto à inibição da germinação de esporos de *A. clavatus*.

Como pode ser observado, os tempos de 72 e 96 h foram os que tiveram uma maior variação entre os isolados quanto às taxas de inibição da germinação de esporos de *A. clavatus* (Figura 4). Além disso, de forma semelhante aos efeitos no crescimento dos micélios (Figura 2), os isolados apresentaram perfis variáveis de oscilação no fenótipo, ao longo do tempo. Para a maioria dos isolados testados (11 de 17), com o passar do tempo suas capacidades inibitórias da germinação foram se estabilizando nas maiores taxas, ficando entre 80 e 100% no maior tempo analisado no estudo (144 h). Isto sugere que os componentes protéicos dos sobrenadantes com efeito inibitório parecem tender a se acumular no meio de cultura. Alguns isolados, contudo, apresentaram fenótipos diferentes; por ex., *T. harzianum*-5, no primeiro tempo analisado, apresentava inibição quase máxima (98,9%) e, com o passar do tempo, foi perdendo esse potencial, principalmente nos tempos de 96 e 120h. Outros isolados mantiveram sua atividade de inibição aproximadamente constante ao longo do tempo, tanto em relação à alta inibição (ex. *T. koningiopsis*-2) quanto à baixa ou nula inibição (ex. *T. rossicum*-1, *T. harzianum*-1) da germinação de *A. clavatus* (Figura 4). Interessantemente, 4 isolados nos tempos de 72 ou 96h (*T. rossicum*-1, *T. koningiopsis*-1, *T. harzianum*-5 e *T. virens*) apresentaram um fenótipo de estimulação da germinação dos esporos de *A. clavatus*, pois as taxas de inibição foram negativas. Em outros tempos, estes isolados retormaram os efeitos inibitórios, salientando fortemente a existência de padrões temporais oscilatórios para este fenótipo (Figura 4). Estudos desta natureza mostram como isolados, sejam eles da mesma espécie ou de espécies diferentes, apresentam respostas temporais distintas; com isso, podem antagonizar-se mais ou menos com a espécie alvo, dependendo do tempo de cultura usado para as avaliações (DE SOUZA et al. 2006; ARGÔLO-FILHO et al. 2011; 2014).

Para uma visualização alternativa desses resultados de inibição da germinação de esporos de *A. clavatus* ao longo do tempo (análise temporal), foi gerado um 'mapa de calor' (*heatmap*), conforme mostrado na Figura 5.

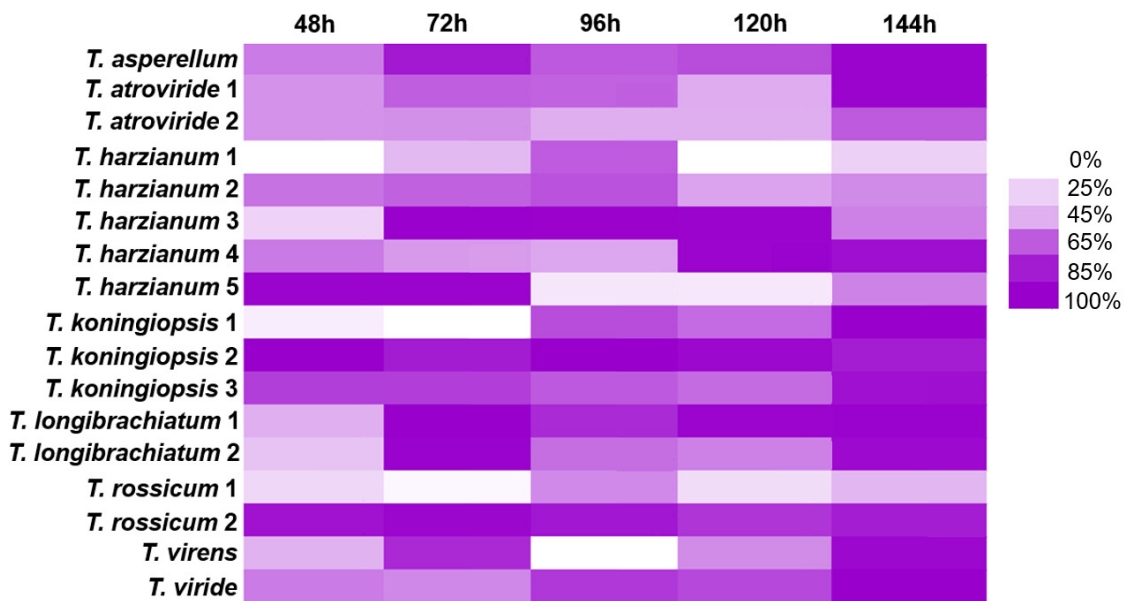


Figura 5. Mapa de calor (*heatmap*) mostrando os diferentes perfis encontrados para os 17 isolados de *Trichoderma* analisados na inibição da germinação de esporos de *A. clavatus*. Quanto mais intensa a cor, maior a inibição da germinação dos esporos.

Os resultados confirmaram que, no geral, para o conjunto de isolados testados, o tempo de 144 h foi o que apresentou maiores taxas de inibição (acima de 80%) para os 11 isolados indicados na Figura 4. Isso provavelmente foi devido ao fato de que os isolados em geral tiveram um maior tempo para crescer e, com isso, produzir maiores quantidades e/ou mais tipos de proteínas com efeito inibitório na germinação dos esporos de *A. clavatus*. Cabe lembrar que a inibição nula nos tempos de 72 ou 96 h para os 4 isolados indicados (cor branca, 0% inibição) corresponderam, em verdade, à estimulação da germinação dos esporos (Figura 4).

Isolados da espécie *T. harzianum* vem sendo bastante utilizados na fabricação de bioprodutos, mostrando-se eficientes no controle de fungos fitopatogênicos (VECHIATO, 2013). Os cinco isolados analisados para essa espécie mostraram comportamentos bem distintos ao longo do tempo, ainda que semelhanças para alguns deles possam ser observadas nos pontos de tempo individuais (por ex., 1 e 3, 2 e 4 em 48h; 3 e 5 em 72h; 3 e 4 em 120h; 2, 3 e 5 em 144h; etc.). Ou seja, todos apresentaram algum efeito inibitório, porém, em tempos específicos. Isso pode ser explicado pelo fato de que existem variantes dentro da espécie *T. harzianum* que foram agrupadas devido a atributos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos. Esses grupos são genotipicamente

distintos, podendo ser identificados por marcadores moleculares, e podem apresentar níveis diferentes de atividade de biocontrole. Já foi verificado que o comportamento de antagonismo de diferentes isolados de *T. harzianum* varia conforme o fungo alvo, tornando-se então necessário selecionar isolados de acordo com suas especificidades (GRONDONA et al., 1997; CASTLE et al., 1998). Pelos estudos aqui mostrados, e com base na literatura, podemos inferir que, mesmo pertencendo a uma mesma espécie, isolados de *Trichoderma* possuem constituições genéticas específicas (genótipos). Esse aspecto sugere que existem condições específicas para cada isolado exercer a ação de biocontrole, sendo uma dessas condições relacionadas aos tempos de melhor secreção das atividades antagonísticas (Figuras 3 – 5). Portanto, dependendo do tempo de cultura utilizado para as análises comparativas, alguns isolados (genótipos) com potencial biotecnológico podem ser descartados prematuramente, caso não seja realizada avaliação temporal em cultura (e.g. ARGÔLO-FILHO et al. 2011; 2014).

Os isolados *T. koningiopsis-2* e *T. rossicum-2* apresentaram maiores taxas de inibição de forma consistente e estável ao longo do tempo, isto é, mantiveram níveis altos do efeito em todos os tempos avaliados (Figuras 4 e 5). Porém, isso não significa necessariamente que essas espécies/isolados são melhores para serem utilizadas em biocontrole, pois outros aspectos relacionados a espécies-alvo e contextos específicos de utilização e aplicação precisam ser investigados. De qualquer forma, suas altas taxa de inibição dos esporos de *A. clavatus* através da secreção de proteínas ativas ao longo de 6 dias de cultura sugere ser interessante utilizá-las de modo preferencial (prioritário) em estudos posteriores, principalmente se fungos-alvo pertencerem ao gênero *Aspergillus* (ver mais abaixo). As espécies do gênero *Trichoderma* mais utilizadas no desenvolvimento de bioprodutos são *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. stromaticum* e *T. viride* (MORANDI; BETTIOL, 2009). *T. viride* era a espécie mais encontrada em todos os tipos de solos em um estudo feito por Miller e colaboradores (1957). Todavia, existem isolados específicos pertencentes às espécies mais utilizadas em bioprodutos que são, na realidade, incapazes de atuar como ACBs efetivos (GRONDONA et al., 2000). Nesse estudo, apenas uma espécie de *T. harzianum* conseguiu uma forte inibição em três tempos analisados, *T. asperellum* nos tempos de 72h e 144h e *T. viride* apenas em 144h. Conforme discutido acima,

isso provavelmente se deve ao fato de existirem variações morfofisiológicas e genéticas entre isolados, mesmo em nível intraespecífico (DE SOUZA et al. 2006; STEYAERT et al. 2010).

Espécies do gênero *Aspergillus* possuem micotoxinas que representam elevado risco à saúde de humanos e animais (BENICIO et al., 2003). Teste de ACBs que, de alguma maneira, antagonizem *Aspergillus* spp. é um método promissor para o biocontrole dessas espécies (ZUCCHI; MELO, 2009). Isolados que tenham a capacidade de inibir a germinação de esporos de *Aspergillus* spp. podem ser boas opções como possíveis agentes de biocontrole. Estudos demonstram que o gênero *Trichoderma* tem potencial de biocontrole sobre espécies do gênero *Aspergillus*, conseguindo reduzir a incidência de doenças em plantas, como por exemplo podridões diversas em amendoim (*Arachis hypogaea*) e feijão (*Phaseolus vulgaris*) (SRILAKSHMI, 2001). Portanto, estudos com isolados/espécies de *Trichoderma*, utilizando o gênero *Aspergillus* como modelo de organismo-alvo, podem servir como base para a caracterização preliminar de isolados em relação aos seus potenciais antagônicos em programas de bioprospecção e desenvolvimento de bioprodutos.

Buscando aprofundar a avaliação comparativa dos isolados quanto aos seus fenótipos de antagonismo, condensou-se a avaliação temporal num comportamento médio por isolado, comparando-se suas inibições de germinação de esporos somente com base na variável genotípica ('isolado'). A análise estatística univariada demonstrou diferença significativa nas taxas de inibição de germinação de esporos de *A. clavatus* para os isolados com fenótipos extremos entre si: *T. rossicum-1* e *T. harzianum-1*, como representantes dos menores níveis de inibição temporal média, e *T. longibrachiatum-1*, *T. koningiopsis-2*, e *T. rossicum-2*, como representantes das inibições máximas obtidas neste estudo, para este grupo de isolados testados (Figura 6). Os altos valores de desvio-padrão obtidos para a maioria dos isolados são reflexo direto dos padrões oscilatórios ao longo do tempo de cultura revelados previamente (Figuras 2, e 3 – 5).

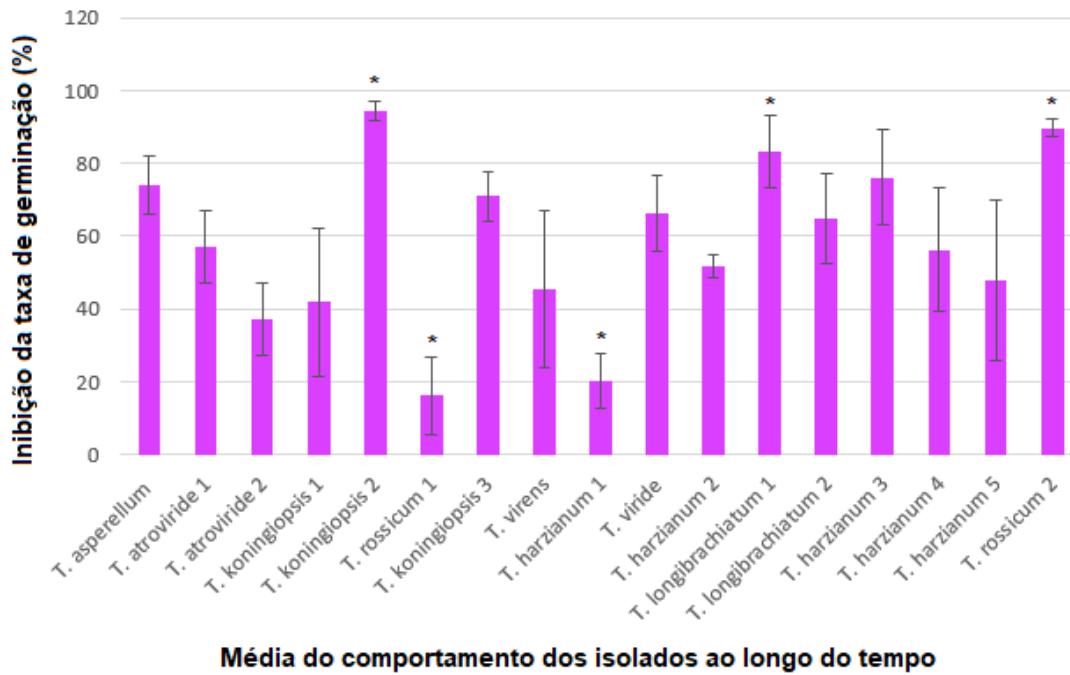


Figura 6. Comparação das médias temporais de inibição da germinação de esporos de *A. clavatus* para os 17 isolados de *Trichoderma* analisados.

Os isolados de *Trichoderma* avaliados neste estudo possuem genótipos distintos (FEITOSA et al. 2016) e isso tenderá a gerar diferentes níveis e características de antagonismo. Além disso, Bezerra e colaboradores (2003) sugeriram que a espécie *Trichoderma stromaticum* possui capacidade de recombinação sexual (BEZERRA et al., 2003), o que provavelmente pode ocorrer com as outras espécies de *Trichoderma*, sendo uma característica do gênero e podendo ocasionar o surgimento de novos isolados genotipicamente diferentes e com níveis de antagonismos diferentes.

Os mecanismos de controle biológico são controlados por diferentes genes (STEYAERT et al., 2003; HARMAN et al., 2004; TROIAN et al., 2014) e o gênero *Trichoderma* possui muita variabilidade genotípica inter e intraespecíficas (DE SOUZA et al. 2006; STEYAERT et al. 2010; FEITOSA et al. 2016). Esses genes relacionados com o biocontrole podem estar presentes apenas em alguns isolados, ou podem ter sua expressão maior em outros isolados, ou podem ser mais expressos em condições favoráveis exclusivas do isolado, que podem se manifestar de formas distintas ao longo do tempo de cultura. Tudo isso pode levar

a diferentes mecanismos de biocontrole e diferentes níveis de antagonismos por parte das espécies de *Trichoderma*, principalmente em diferentes tempos de análise (ARGÔLO-FILHO et al. 2011; 2014).

Os diferentes isolados de *Trichoderma* podem utilizar diferentes mecanismos de biocontrole e esses mecanismos podem ser usados de forma sinérgica quando bioprodutos são desenvolvidos buscando explorar consórcios benéficos de isolados. O uso de um agente de controle biológico requer um direcionamento cuidadoso com base em uma caracterização apropriada para permitir uma seleção eficaz. Como o gênero *Trichoderma* possui uma alta variabilidade morfofisiológica e genética em nível de espécie, tornam-se necessários estudos que agrupem populações dentro de uma mesma espécie (GRONDONA et al., 1997; CASTLE et al., 1998; LOGUERCIO et al. 2009). Inclusive nas principais espécies de *Trichoderma* utilizadas no controle biológico existem altos níveis de variação inter e intraespecíficas. Portanto, é importante caracterizar os isolados de acordo com o seu potencial antagônico, expresso por diferentes genótipos individuais. É necessário levar em conta as condições específicas que cada isolado requer para realizar o biocontrole, incluindo análises que comparem os padrões temporais de ação ou atividade de interesse por isolado. A falta de informações sobre isolados/espécies desse gênero leva a comercialização de fungos *Trichoderma* como fertilizantes de solos não registrados. A comercialização de produtos tendo como base espécies deste gênero deve seguir pré-requisitos importantes, tais como uma identificação precisa, formulação adequada, pesquisas sobre os efeitos sinérgicos de seus mecanismos antagônicos, e magnitude dos efeitos em organismos não-alvo (GRONDONA et al., 1997; HERMOSA et al., 2000; SAMUELS et al 2002; HERMOSA et al. 2004; DE SOUZA et al. 2006; VERMA et al., 2007; STEYAERT et al. 2010).

Todos os resultados deste estudo, portanto, servem como suporte para a caracterização de germoplasma tropical de *Trichoderma*, com interesses direcionados para aspectos biotecnológicos relativos ao biocontrole de doenças de plantas.

5. CONCLUSÕES

- Os efeitos de inibição de crescimento e germinação de esporos de *Aspergillus clavatus* observado neste estudo é resultado da ação das proteínas extraídas dos diferentes isolados de *Trichoderma*.
- Diferentes isolados apresentaram variações temporais quali- e quantitativas nos respectivos padrões de secreção proteica ao longo das culturas, com diferenças na intensidade e na eficiência do antagonismo.
- Aliados a informações prévias, os resultados fenotípicos deste estudo confirmaram a existência de diferenças genotípicas (individuais), inter e intraespecíficas para isolados distintos dentro do gênero *Trichoderma*.
- Os efeitos fenotípicos das proteínas secretadas nos sobrenadantes das culturas de *Trichoderma* que são causados pelos fatores de variação 'tempo de cultura' e 'isolados' são independentes entre si.
- O gênero *Trichoderma* possui alta variabilidade temporal inter- e intraespecífica em relação à inibição do crescimento e da germinação de esporos de *A. clavatus*, via proteínas secretadas nos respectivos sobrenadantes.

REFERÊNCIAL TEÓRICO

AGUIAR, R. A. **Manejo do Mofo Branco (*Sclerotinia sclerotiorum* L.) em tomateiro industrial**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Goiás. Goiânia-GO, 2011

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

ANDRADE, J. M. S.; LIMA, M. L. P. Aspectos gerais e morfológicos de *Aspergillus flavus*. **Estudos em doenças de plantas**. IFGoiano, 2010.

ANTONIAZZI, L. B. Agricultura como provedora de serviços ambientais para proteção de bacias hidrográficas. **Revista Tecnologia e Inovação Agropecuária**, 2008.

ARGÔLO FILHO, R. C.; GOMES JR, R. A.; BARRETO, M. R.; LANA, U. G. P.; VALICENTE, F. H.; LOGUERCIO, L. L. Growth variation among *Bacillus thuringiensis* strains can affect screening procedures for supernatant-secreted toxins against insect pests. **Pest Management Science**, 2011. v.67, n.9, p. 1184-1192.

ARGÔLO FILHO, R. C.; COSTA, R. L.; PINHEIRO, D. H.; CORRÊA, F. M.; VALICENTE, F. H.; POMELLA, A. W. V.; LOGUERCIO, L. L. Requirement of Simultaneous Assessment of Crystal- and Supernatant-Related Entomotoxic Activities of *Bacillus thuringiensis* Strains for Biocontrol-Product Development. **Toxins**, 2014. v.6, n.5, p.1598-1614.

BENICIO, V. et al. Identificação e Características Culturais de Espécies do Gênero *Aspergillus* Isoladas de Sementes de Feijão no Estado da Paraíba. **Fitopatologia Brasileira**, 2003, v.28, 180-183 p.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**. 2004. v.7, 249–260 p.

BETTIOL, W. et al. Controle biológico de doenças de plantas na América Latina. **Embrapa Meio Ambiente**. 2008.

BEZERRA, J. L.; et al. *Hypocrea stromatica* sp. nov. teleomorfo de *Trichoderma stromaticum*. **Fitopatologia Brasileira**. 2003, v. 28., n. 4.

BRENT, K.J.; HOLLOMON, D. W. Fungicide resistance: the assessment of risk. **Fungicide Resistance Action Committee**. 2007. 52p.

BRIMNER, T. A.; BOLAND, G. J. A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. 2003. V. 100, 3-16 p.

BUENO, C. J.; FISCHER, I. H. Manejo de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Pesquisa & Tecnologia**. 2006. VI. 3, n.2.

CASTLE, A. et al; Morphological and Molecular Identification of *Trichoderma* Isolates on North American Mushroom Farms. **Applied and environmental microbiology**. 1998. V. 64, n. 1, 133-137 p.

CEPLAC. **Jornal do Cacau**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2013, v. 09, 8-15 p.

CHAPIN, F.S.; et al. Biotic Control over the Functioning of Ecosystems. **Science**. 1997. V. 277.

CHAVERRI, P.; BRANCO-ROCHA, F.; JAKLITSCH, W.; GAZIS, R.; DEGENKOLB, T.;SAMUELS, G. J. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and thereidentification of commercial biocontrol strains. **Mycologia**. 2015. v. 107, n. 3, 558–590 p.

COLLA, L. M. et al. Isolamento e seleção de fungos para a biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciências Agrotecnicas**. 2008, 32:809-813 p.

DESAI, S. et al. Against *Aspergillus flavus* Infection in Groundnut. **Ian**. 2000, 57-59 p.

DE SOUZA, J.T.; et al. Genetic and Biological Diversity of *Trichoderma stromaticum*, a Mycoparasite of the Cacao Witches' Broom Pathogen. **Phytopathology**. 2006. v. 96, 61-67 p.

DE SOUSA, M. V.; FONTES, W.; RICART, C. A. A Análise de proteômas: o despertar da era pós-genômica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. 2003. V. 2, n.7, 12-14 p.

DRUZHININA, I. S.; et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**. 2011. v. 9, 749–759 p.

EISENDLE, M.; OBEREGGER, H.; BUTTINGER, R; ILLMER, P.; HAAS, H. Biosynthesis and Uptake of Siderophores Is Controlled by the PacC-Mediated Ambient-pH Regulatory System in *Aspergillus nidulans*. **Eukaryotic cell**. 2004. v.3, n.2, 561–563 p.

ELMQVIST, T. et al. **The Economics of Ecosystems and Biodiversity: The Ecological and Economic Foundations** (TEEB D0), 2010.

FAO. Statistical Pocketbook World Food and Agriculture. **Food and Agriculture Organization of United Nations**. 2015.

FAO. Training manual for organic agriculture. **Food and Agriculture Organization of United Nations**. 2015.

FEITOSA, Y. B. **Avaliação de fatores bióticos e abióticos no crescimento e esporulação de genótipos tropicais de *Trichoderma* spp.** Dissertação de

Mestrado. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, 2016.

FILHO, I. A. P.; RODRIGUES, J. A. S. Sorgo. O produtor pergunta, a Embrapa responde. **EMBRAPA**. 2015.

GAO, L.; XINGZHONG, L.; Nutritional requirements of mycelial growth and sporulation of several biocontrol fungi in submerged and on solid culture. **Microbiology**. 2010. v.79, 612-619 p.

GOMES, G. **Fitopatologia**. Instituto Formação. 2013.
(<http://www.ifcursos.com.br/sistema/admin/arquivos/14-39-41-apostilafitopatologia.pdf>)

GRIFFITHS, A. J. F.; et al. **Introdução à genética**. 9ª edição. Rio de Janeiro, (RJ): Ed. Guanabara Koogan, 2009.

GRONDONA, I.; et al. Physiological and Biochemical Characterization of *Trichoderma harzianum*, a Biological Control Agent against Soilborne Fungal Plant Pathogens. **Applied and environmental microbiology**. 1997. V. 63, n.8, 3189-3198 p.

HAMMERSCHMIDT, R.; METRAUX, J.P.; VAN LOON, L.C. Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases, Corfu, May 2000. **European Journal of Plant Pathology**. 2011. v. 107, 1-6 p.

HARMAN, C. E.; BJORKMAN, T. Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. **Trichoderma and Gliocladium**. 1998. v. 2, 229-265 p.

HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews**. 2004. v. 3, 43-56 p.

HARMAN, G. E. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**. 2006. v. 96, n. 2, 190-194 p.

HERMOSA, M. R. et al; Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* spp.. **Applied and environmental microbiology**. 2000. V. 66, n. 5, 1890-1898 p.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**. 2003. v. 87, n. 1, 4–10 p.

KARAM, D. **manejo integrado de plantas daninhas**. Simpósio sobre manejo de plantas daninhas no semi-árido. 2008

LACEY, L.A., GOETTEL, M., Current Developments in Microbial Control of Insect Pests and Prospects for The Early 21st Century. **Entomophaga**. 1995, vol. 40., 1–25 p.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 839p.

- LOGUERCIO, L.L.; CARVALHO, A.C.; NIELLA, G.R.; SOUZA, J.T.; POMELLA, A,W.V. Selection of *Trichoderma stromaticum* isolates for efficient biological control of witches' broom disease in cacao. **Biological Control**. 2009. v. 51, 130-139 p.
- LOPES, R. B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no brasil. In: BETTIOL, W. & MORANDI, M. A. B. (Eds.). Biocontrole de doenças de plantas: usos e perspectivas. Jaguariúna, SP: **Embrapa Meio Ambiente**. 2009. 15–28 p.
- LORINI, I. Manual técnico para o Manejo Integrado de Pragas de Grãos de Cereais Armazenados. **Embrapa**. 2005.
- MACHADO, D. F. M. et al. *Trichoderma* spp. na emergência e crescimento de mudas de Cambará (*Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera). **Revista Árvore**. 2015, 39:167-176 p.
- MAPA. Plano Agrícola e Pecuário (PAP) 2017/2018. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 2017.
- MARRA, R. et al. Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. **Current Genetics**. 2006, 50:307-321 p.
- MARQUES, E. et al. New isolates of *Trichoderma* antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biota Neotropica**. 2016. V. 16, n. 3, 1-7 p.
- MEA (Millennium Ecosystem Assessment). **Ecosystem and Human Well-Being: a framework for assessment**. 2003.
- MELO, J. M. B. T. **Deteção e identificação de espécies de *Aspergillus* em passeriformes cativos do centro de triagem de animais silvestres de Petrolina - Pernambuco**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina-PE, 2013.
- MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de Fitopatologia**. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2001.
- MILLER, J. H.; GIDDENS, J. E.; FOSTER, A. A. A survey of the fungi of forest and cultivated soils of georgia. **Mycologia**. 1957. v. 49, n. 6, 609-778 p.
- MMA. Manual de Educação para o Consumo Sustentável. **Ministério do Meio Ambiente**. 2005
- MME. Boletim Mensal de Energia. **Ministério de minas e energia**. 2017
- MONTE, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. **International Microbiology**. 2001, 4:1-4 p.
- MORANDI, M. A. B; BETTIOL, W. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W. & MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: usos e perspectivas**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 7–14 p.

MUKHERJEE, P. K.; HORWITZ, B. A.; SINGH, U. S.; MUKHERJEE, M.; SCHMOLL, M. *Trichoderma* in agriculture, industry and medicine: an overview. In: MUKHERJEE, P. K. et al. (Eds.). **Trichoderma: biology and applications**. CAB International, 2013. p. 1–9.

OCDE-FAO. Perspectivas Agrícolas no Brasil: desafios da agricultura brasileira 2015-2024. **Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico and Food and Agriculture Organization of United Nations**. 2015

PARRON, L. M.; et al. Serviços Ambientais em Sistemas Agrícolas e Florestais do Bioma Mata Atlântica. **EMBRAPA**. 2015

PEREIRA, J. L. et al. **Primera ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil**. *Agrotropica (Brasil)*. 1989. v. 1, n. 1 79-81p.

PIOTROWSKI, M.; VOLMER, J. J. Cyanide metabolism in higher plants: cyanoalanine hydratase is a NIT4 homolog. **Plant Molecular Biology**. 2006. v.61, 111-122 p.

POMELLA, A. W. V. & RIBEIRO, R. T. S. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas – Uma visão empresarial. In: BETTIOL, W. & MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: usos e perspectivas**. Jaguariúna, SP:Embrapa Meio Ambiente, 2009. p.239–244.

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

RELKIN, P.; LAUNAY, B. Concentration effects on the kinetics of β -lactoglobulin heat denaturation: a differential scanning calorimetric study. **Food Hydrocolloids**. 1990. v.4, n.1, 19- 32 p.

RIBEIRO, T. S. **Tecnologias Inovadoras no Manejo Integrado de Pragas e Doenças de Plantas**. 2009. Monografia (Especialização) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2009.

ROBERTS, D. P. et al. Control of damping-off of organic and conventional cucumber with extracts from a plant-associated bacterium rivals a seed treatment pesticide. **Crop Protection**. 2014. v. 65, 86–94 p.

RODRIGUES, M. A. T. **Classificação de fungicidas de acordo com o mecanismo de ação proposto pelo FRAC**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP, 2006.

RYALS, J. A.; et al. Systemic Acquired Resitence. **The plant Cell**. 1996. v.8, 1809-1819 p.

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

SILVA, B. A.; et al. Influência da concentração de NaCl e pH na extração de

ricina em torta de mamona (*Ricinus communis* L.) e sua caracterização por eletroforese. **Ciência Rural**. 2012. v.42, n.7.

SILVA, J. C. A. **Produção de enzimas holocelulolíticas acessórias pelo fungo mutante *Trichoderma atroviride* 102C1 em sub-produtos agrícolas**. XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC, 2016

SINDIVEG. **Setor de defensivos agrícolas registra queda nas vendas em 2016**. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. Disponível em: <<http://sindiveg.org.br/wp-content/uploads/2017/06/Release-03abr2017-FINAL.pdf>> acesso em: 15 de Novembro de 2017.

SIVASAKTHI, S.; USHARANI, G.; SARANRAJ, P. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) - *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. **African Journal of Agricultural Research**. 2014. v. 9, n. 16, 1265–1277 p.

SCHENK, P.M; et al. Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 2000. v. 97, n. 21, 11655-11660 p.

SOGLIO, F. D.; KUBO, R. R. **Agricultura e Sustentabilidade**. Editora UFRGS. 1ª edição, 2009, 152p.

SRILAKSHMI, P. et al. Identification of *Trichoderma* Species and their Antagonistic Potential Against *Aspergillus flavus* in Groundnut. **IAN**, 2001, 40-43p.

STEYAERT, J. M. et al. Genetic basis of mycoparasitism: a mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. **NewZealand Journal of Crop and Horticultural Science**, 2003, v31:281–291 p.

TCHAMENI, S. N.; et al. Antagonism of *Trichoderma asperellum* against *Phytophthora megakarya* and its potential to promote cacao growth and induce biochemical defence. **Mycology**. 2017. v.8, n. 2, 84–92 p.

TOLÊDO-SOUZA, E. D.; JUNIOR, M. L.; SILVEIRA, P. M.; FILHO, A. C. C. Interações entre *Fusarium solanif. sp. Phaseoli* e *Rhizoctonia solanina* severidade da podridão radicular do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. 2009. v. 39, n. 1, 13-17 p.

TREMACOLDI, C. R.; SOUZA FILHO, A. P. S. Toxinas Produzidas por Fungos Fitopatógenos: Possibilidades de Uso no Controle de Plantas Daninhas. **Embrapa**, 2006.

TROIAN, R. F.; et al. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: evaluation of antagonism and expression of cell wall-degrading enzymes genes. **Biotechnology Letters**. 2014. V. 36, 2095-2101 p.

VAN-ZWIETEN, L.; MERRINGTON, G.; VAN-ZWIETEN, M. Review of impacts on soil biota caused by copper residues from fungicide application. **SuperSoil**. 2004, 1-8 p.

VECHIATO, M.H.; PARISI, J.J.D. Importância da qualidade sanitária de sementes de florestais na produção de mudas. **Biológico**. 2013. v.75, n.1 27-32 p.

VERMA, M.; et al. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. **Biochemical Engenery Journal**. 2007. v. 3, 1–20 p.

VOS, C.M.F.; et al. The toolbox of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease. **Molecular plant pathology**. 2015. v. 16, n. 4, 400-12 p.

WAGHUNDE. R. R.; SHELAK, R.M.; SABALPARA, A.N. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. 2016. **African Journal of Agricultural Research**. 2016. v.11, n.22, 1952-1965 p.

WHATELY, M.; HERCOWITZ, M. **Serviços ambientais: conhecer, valorizar e cuidar: subsídios para a proteção dos mananciais de São Paulo**, 2008

WITTIG, O. E.; CAT, I.; KASTING, G. Meningencefalite a *Aspergillus*. **Arquivo Neuro-Psiquiatria**, 1973, 31:220-224p.

WOO, S.L.; SCALA, F.; RUOCCO, M.; LORITO, M. The Molecular Biology of the Interactions Between *Trichoderma* spp., Phytopathogenic Fungi, and Plants. **Phytopathology**. 2006. v. 96, n.2, 181-185 p.

YANG, C.; et al. Fungicide: Modes of Action and Possible Impact on Nontarget Microorganisms. **International Scholarly Research Network Ecology**. 2011. 8p.

ZUCCHI, T. D.; MELO, T. S. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W. & MORANDI, M. A. B. (Eds.). Biocontrole de doenças de plantas: usos e perspectivas. Jaguariúna, SP: **Embrapa Meio Ambiente**. 2009. 7–14 p.

ZUGAIB et al.; **Estudo-projeto para instalação do parque tecnológico em área específica a ser determinada na sede da superintendência de desenvolvimento da região cacauera da Bahia**. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento comissão executiva do plano da lavoura cacauera, 2013

ANEXO 1

Géis de poliacrilamida SDS-PAGE das proteínas extraídas

A análise qualitativa da integridade das proteínas está sendo avaliada através de testes do SDS-PAGE. O gel foi feito com um gradiente de acrilamida (6~14%) em cuba vertical de eletroforese com tampão de migração eletroforética 1x (Tris 0,25M, glicina 1,92M, SDS 1%) para passagem de corrente elétrica. Ao término da corrida as bandas referentes as proteínas presentes no gel foram visualizadas pela coloração com Azul de Coomassie (Figura A1) e com Nitrato de Prata (Figura A2) de acordo com Blum et al. (1987):

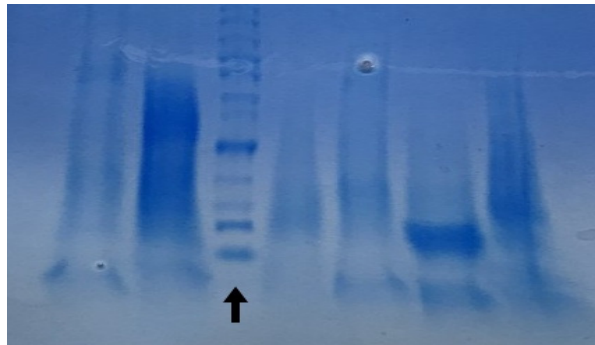


Figura A1. Gel com gradiente de acrilamida (6~14%) corado com Azul de Coomassie. A seta aponta para o marcador de peso molecular de 97kDa.

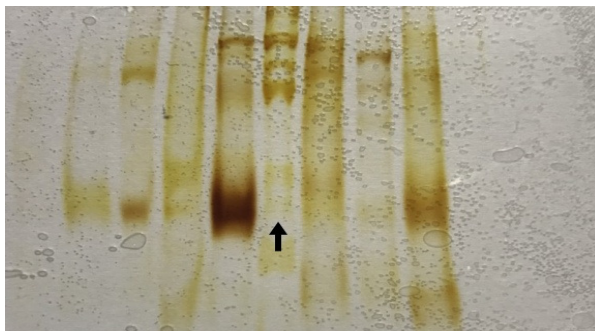


Figura 2. Gel com gradiente de acrilamida (6~14%) corado com Nitrato de Prata. A seta aponta para o marcador de peso molecular de 97 kDa.

Os géis ainda estão sendo padronizados para melhor visualização das bandas correspondente ao total de proteína extraída dos 17 isolados nos tempos de 48, 72, 96, 120 e 144h.