



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, FILOGENÉTICA E
ENZIMÁTICA DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp.**

FABYANO ALVARES CARDOSO LOPES

GOIÂNIA

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, FILOGENÉTICA E
ENZIMÁTICA DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp.**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás por Fabyano Alvares Cardoso Lopes para obtenção do grau de mestre em Biologia. Área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

GOIÂNIA

2012

BANCA EXAMINADORA

Titulares:

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa (Orientador) – Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Goiás.

Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho – Escola de Agronomia / Universidade Federal de Goiás.

Dr. Murilo Lobo Junior – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) / Arroz e Feijão.

Suplente:

Prof. Dr^a. Valdirene Neves Monteiro - Universidade Estadual de Goiás / UNUCET

"With great power there must come great responsibility"

Stan Lee

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a todos de uma forma geral que me ajudaram a chegar onde estou. Desde a zeladora da escola que frequentei na 1º fase do Ensino Fundamental até o motorista de ônibus da linha 105 (Pça A – Campus), todos que me ajudaram, de certa forma, me conduzindo onde cheguei. Independente do grau de escolaridade das pessoas todas tem algo para ensinar, espero ter aprendido um pouquinho com cada um que encontrei nessa jornada que realizei até aqui.

Agradeço a minha família, tão amada, tão carinhosa, tão amiga, tão paciente, tão... Poderia ficar páginas e páginas detalhando o que vocês representam para mim. Meu pai, Wanderlei, aquele que sempre quer estar interado no que eu estou fazendo, aquele que comemorou comigo quando aquela bendita árvore deu certo, aquele que me levou e buscou inúmeras vezes no ICB II, sem reclamar um segundo, apesar de andar feito uma “lesma”, rs! Eu te amo pai! Minha mãe, Silvinha “Pops”, linda mulher, uma das mais belas pessoas que conheço, não é porque é minha mãe! Quem a conhece sabe que estou falando a absoluta verdade... Sempre me ajudou com tudo que eu pedi, apesar de algumas vezes reclamar (Acho que puxei isso dela!), consultas com os médicos da clínica onde ela trabalha, remédios para dor de garganta, xarope para tosse e o principal, o que cura todas as doenças, me deu amor incondicional... Eu te amo minha “velha”! Meu irmão, Brunno, pessoa maravilhosa e chata, legal e enjoada ao extremo, agradeço tudo o que fez por mim nesse tempo do mestrado, ou melhor, na vida, agradeço até mesmo quando você liga a luz na minha cara em plena 2 horas da madrugada. Eu te amo “Gordim”. Minha nova amiga, que aos poucos está se transformando em irmã, Lali, que mudou meu irmão para melhor, rs, que proporciona tanta felicidade a ele. Isso é o que me deixa mais feliz...

Agradeço uma garota que me ajudou um pouquinho nessa caminhada, ela me acompanhou desde o meu primeiro vestibular, meu ano no cursinho, meu primeiro ano na UEG, meus quatro anos na UFG e esses dois anos no mestrado. Sinceramente eu não sei o que seria de mim sem a presença dessa mulher ao meu lado durante esses 8 anos. Amanda Rafaela Rodrigues, menina que amo tanto, não há como eu retribuir o que você fez por mim por todo esse período. Você foi tudo, secretária, babá, psicóloga, amiga, colega de laboratório (apesar de esse último resultar em alguns conflitos), enfermeira, contabilista. Você foi, é, será a minha vida, ou melhor, a “biduca” da minha vida. Eu te amo e obrigado!

Agradeço meus avôs e avós (Silvio & Divina e Edison & Lecivalda), por estarem sempre comigo nessa caminhada, fornecendo aquele café com leite, aquele almoço esperto, aquele pão com 2 ovos e, principalmente, carinho e compreensão por estar um pouco distante nesse período do mestrado.

Agradeço aos meus parentes por parte de pai, minha Madrinha Rosângela, Gerson, Jennifer, Julyelle, Gabriel “O Pequeno”, Tia Meire, Gledes, pessoas que estavam presentes sempre quando podiam, se reunindo aos domingos, me proporcionando momentos maravilhosos.

Agradeço aos meus parentes por parte de mãe, Tia Silvana (que sempre fica na janela quando eu chego), ao meu “rei” Cristiano, a Sergi, Tio Luiz, o Tio “mais liso do Brasil” Tião, Mary, a Bin-Bin Larissa, amo todos vocês!

Agradeço a família que me adotou como filho, pessoas que nem se eu quisesse conseguiria expressar toda a minha gratidão por elas, a Nilce, linda e jovial (não acredite no que Amanda fala!), Mauro, pessoa que sempre pude contar (só não posso falar bem do PT para ele, rs!), minha irmã Aline (sempre presente com as suas célebres frases), Paulo (sempre corrido, mas sempre com tempo para bater um PES ou FIFA), Tia Nilceia (Coisinha de Jesus... rs) e o Coração, Gildon ou Brener menino entojado que amo tanto.

Agradeço toda a equipe do laboratório de Enzimologia, pessoas que convivi boa parte do tempo. Nesse ambiente sei que cultivei vários colegas. Quero agradecer em especial algumas pessoas que se tornaram verdadeiros amigos, Marcelo Rabmada, ~~Salam~~ Andrei, Saulo Miguel, Vanessinha, JP meu pupilo, Mari, Sussu, Cris, Amanda Araújo, Thiago e James Brown.

Agradeço ao Prof. Dr. Cirano José Ulhoa por ter confiado em um rapaz barbudo, cabeludo e com cara de doido. Agradeço também por ter aguentado nesses quatro anos a minha redundância (estou tentando melhorar, rs!) e a minha afobação. Espero ter me tornado um décimo do que você é profissionalmente, pois você sempre será meu modelo de Pesquisador, cordial e justo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
RESUMO	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Cenário atual	14
1.2. <i>Rhizoctonia solani</i>	15
1.3. Gênero <i>Fusarium</i>	17
1.4. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	19
1.5. Agente de controle biológico: gênero <i>Trichoderma</i>	20
1.6. Classificação do gênero <i>Trichoderma</i>	24
1.6. Enzimas hidrolíticas.....	26
1.6.1. Enzimas decompositoras de parede celular.....	26
1.6.2. β -glicosidases	28
1.6.3. Fosfatases	28
2. OBJETIVOS.....	29
2.1. Objetivos gerais	29
2.2. Objetivos específicos	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1. Microrganismo e condição de cultura.....	30
3.2. Extração de DNA, amplificação do rDNA e sequenciamento.....	30
3.3. Identificação de isolados de <i>Trichoderma</i>	31

3.4. Análise filogenética das espécies de <i>Trichoderma</i>	31
3.5. Produção de Enzimas.....	32
3.6. Ensaio enzimáticos e concentração de proteína	33
4. Resultados e discussão	34
4.1. Identificação molecular e análise filogenética.....	34
4.2. Correlação de Pearson entre atividades específicas de enzimas hidrolíticas.....	40
4.2. Atividades das enzimas hidrolíticas em presença de fitopatógenos	44
4.2.1. NAGase	45
4.2.2. Fosfatase ácida	47
4.2.3. β -glicosidase.....	49
4.2.4. β -1,3-glicanase	51
4.2.5. Proteases.....	53
5. CONCLUSÕES	56
6. PERSPECTIVAS	57
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS.....	69
Anexo 1. Identificação, local de coleta e cultura de origem dos isolados de <i>Trichoderma</i> utilizados.	69
Anexo 2. Artigo formatado para a revista Fungal Biology.....	73
Anexo 3. Artigo publicado na Journal of Microbiological Methods.....	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Isolado de <i>Rhizoctonia solani</i> crescido em meio MYG.	16
Figura 2 - Isolados de <i>Fusarium solani</i> , à esquerda, e <i>Fusarium oxysporum</i> , à direita, crescido em meio MYG.....	18
Figura 3 - Isolado de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> crescido em meio MYG. A estrutura apontada pela seta vermelha é o escleródio.....	19
Figura 4 – Diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> . A – <i>T. harzianum</i> ALL-42; B – <i>T. asperellum</i> T-00; C – <i>T. tomentosum</i> 29/11; D – <i>T. koningiopsis</i> 11/06; E – <i>Trichoderma spp.</i> 11/09; F – <i>T. erinaceum</i> 19/03; G – <i>T. ghanense</i> 11/02; H – <i>T. virens</i> 301/01; I – <i>T. hamatum</i> 398/01; J – <i>T. brevicompactum</i> 55/01.....	22
Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura da ação micoparasítica de <i>T. harzianum</i> sobre <i>R. solani</i> . A, B, C e D correspondem a interação entre os isolados de <i>T. harzianum</i> ALL-23, ALL-40, ALL-41 e ALL-44 e o isolado de <i>R. solani</i> CNPAF-03, respectivamente (LIMA, 2002). Bar = 10 µm.....	23
Figura 6 – Esquema da região do rDNA contendo 18S, ITS 1, 5.8S, ITS2 e 28S e a localização dos primers utilizados para amplificar diferentes partes para inferência filogenética e identificação. As regiões que transcevem os rRNAs são altamente conservadas, enquanto as regiões espaçadoras dos transcritos de rRNA são variáveis (CLARRIDGE, 2004).....	25
Figura 7 - Esquema da região do gene <i>tef1</i> e a localização dos primers utilizados para amplificar diferentes partes para inferência filogenética (DRUZHININA & KUBICEK, 2005).....	25
Figura 8 – Estrutura da parede celular de fungo (MONTEIRO, 2008).....	27
Figura 9 – Percentual da quantidade de isolados de cada espécie de <i>Trichoderma</i> (N = 100 isolados).....	36
Figura 10 - Árvore filogenética consenso de 49.600 árvores obtidas por análise bayesiana a partir da região do rDNA nuclear, ITS1-5.8S-ITS2, com o modelo GTR +	

G. Os números sobre os braços indicam as probabilidades *a posteriori* (pp). Cada seção está delimitada por uma linha. A linha vermelha representa a linhagem única. 37

Figura 11 - Árvore filogenética consenso de 49.750 árvores obtidas por análise bayesiana a partir da sequência de *tef1* com o modelo GTR + G + I. Os números sobre os braços indicam as probabilidades *a posteriori* (pp). Cada clado está delimitado por uma linha. A marcação em vermelho indicava o agrupamento formado com os isolados desconhecidos. Isolados da seção *Longibrachiatum* foram adicionados na análise para enraizar a árvore. 39

Figura 12 - Atividade específica de NAGase (U.mg⁻¹) de isolados de *Trichoderma* em presença de parede celular dos fitopatógenos *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*. 46

Figura 13 - Atividade específica de Fosfatase ácida (U.mg⁻¹) de isolados de *Trichoderma* em presença de parede celular dos fitopatógenos *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*. 48

Figura 14 - Atividade específica de β-glicosidase (U.mg⁻¹) de isolados de *Trichoderma* em presença de parede celular dos fitopatógenos *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*. 50

Figura 15 - Atividade específica de β-1,3-glicanase (U.mg⁻¹) de isolados de *Trichoderma* em presença de parede celular dos fitopatógenos *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*. 52

Figura 16 - Atividades específicas de Protease ácida, neutra e básica (U.mg⁻¹) de isolados de *Trichoderma* em presença de parede celular dos fitopatógenos *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*. 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de espécies de <i>Trichoderma</i> encontradas por meio das ferramentas moleculares (TrichOkey e TrichoBLAST) e análise filogenética por meio de aproximação bayesiana.....	35
Tabela 2 - Correlação entre enzimas hidrolíticas em presença de parede celular de <i>F. oxysporum</i> . Os valores acima da diagonal principal são os p-values e os valores abaixo são os coeficientes de Pearson (r). Resultados de p-value significativos foram marcados em vermelho. Resultados de r significativos foram grifados em negrito.	41
Tabela 3 – Correlação entre enzimas hidrolíticas em presença de micélio de <i>F. solani</i> . Os valores acima da diagonal principal são os p-values e os valores abaixo são os coeficientes de Pearson (r). Resultados de p-value significativos foram marcados em vermelho. Resultados de r significativos foram grifados em negrito.	41
Tabela 4 - Correlação entre enzimas hidrolíticas em presença de micélio de <i>R. solani</i> . Os valores acima da diagonal principal são os p-values e os valores abaixo são os coeficientes de Pearson (r). Resultados de p-value significativos foram marcados em vermelho. Resultados de r significativos foram grifados em negrito.	42
Tabela 5 - Correlação entre enzimas hidrolíticas em presença de micélio de <i>S. sclerotiorum</i> . Os valores acima da diagonal principal são os p-values e os valores abaixo são os coeficientes de Pearson (r). Resultados de p-value significativos foram marcados em vermelho. Resultados de r significativos foram grifados em negrito.	43
Tabela 6 - Atividade específica de enzimas hidrolíticas (U.mg ⁻¹) provenientes de espécies de <i>Trichoderma</i> por cada parede celular estudada.	44
Tabela 7 - As maiores atividades específicas de NAGase provenientes de <i>Trichoderma</i> das quatro induções (FO = <i>F. oxysporum</i> , FS = <i>F. solani</i> , RS = <i>R. solani</i> , SS = <i>S. sclerotiorum</i>).	47
Tabela 8 - As maiores atividades específicas de Fosfatase ácida provenientes de <i>Trichoderma</i> das quatro induções (FO = <i>F. oxysporum</i> , FS = <i>F. solani</i> , RS = <i>R. solani</i> , SS = <i>S. sclerotiorum</i>).	49

Tabela 9 - As maiores atividades específicas de β -glicosidase provenientes de *Trichoderma* das quatro induções (FO = *F. oxysporum*, FS = *F. solani*, RS = *R. solani*, SS = *S. sclerotiorum*)..... 51

Tabela 10 - As maiores atividades específicas de β -1,3-glicanase provenientes de *Trichoderma* das quatro induções (FO = *F. oxysporum*, FS = *F. solani*, RS = *R. solani*, SS = *S. sclerotiorum*)..... 53

Tabela 11 - Atividades específicas de Protease ácida, neutra e básica (U.mg^{-1}) por parede celular de cada fitopatógeno: *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*..... 54

Tabela 12 - As maiores atividades específicas de protease básica provenientes de *Trichoderma* das quatro induções (FO = *F. oxysporum*, FS = *F. solani*, RS = *R. solani*, SS = *S. sclerotiorum*)..... 56

RESUMO

Devido aos efeitos danosos causados ao meio ambiente e à procura por métodos mais eficientes, o uso de agrodefensivos vem sendo gradualmente substituído pelo uso de agentes de controle biológico. A utilização do gênero *Trichoderma* tem sido satisfatória no controle de vários fitopatógenos em diversas culturas agrícolas por meio da competição por nutrientes, produção de antibióticos e do micoparasitismo. Esse gênero possui sua taxonomia bastante discutida, porém com o advento de técnicas moleculares o problema da identificação da espécie do isolado estudado vem sendo resolvido. Os objetivos desse trabalho foram identificar isolados de *Trichoderma* spp. provenientes de diversas espécies cultivadas, além de visualizar as relações filogenéticas, e realizar a avaliação da atividade específica de enzimas hidrolíticas frente aos fitopatógenos *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Dentro os 100 isolados, 96 isolados foram identificados, sendo 43 isolados da espécie *T. harzianum*, 33 isolados de *T. asperellum*, 6 isolados de *T. tomentosum*, 5 isolados de *T. koningiopsis*, 4 isolados de *T. erinaceum*, 2 isolados de *T. ghanense*, 1 isolado de *T. virens*, 1 isolado de *T. brevicompactum* e 1 isolado de *T. hamatum*. Quatro isolados não foram identificados por nenhuma ferramenta molecular ou por análise filogenética. No estudo feito com as enzimas em *F. oxysporum*, todas as correlações apresentadas entre as atividades específicas são significativas, possuíam valores elevados de coeficiente de Pearson e positivos. Em *F. solani*, os resultados foram bastante semelhantes aos encontrados em *F. oxysporum*. Na indução com parede celular de *R. solani*, foram observadas correlações entre enzimas que desempenham papel fundamental no processo de micoparasitismo. Em *S. sclerotiorum*, foram observadas correlações entre enzimas envolvidas no processo de micoparasitismo. Os isolados *T. asperellum* 356/01, que obteve destaque em todas as enzimas estudadas em parede celular de *F. oxysporum*, *T. asperellum* 40T/03 e *T. harzianum* 100T/01, se destacando em praticamente todas as enzimas em *F. solani*, *Trichoderma* spp. 55/03, que apresentou as maiores atividades em Fosfatase ácida e Proteases em parede celular de *R. solani*, e o isolado *T. erinaceum* 17/06, possuindo atividades expressivas em NAGase nas paredes celulares de *F. solani* e *R. solani* e em β -1,3-glicanase na parede celular de *R. solani*, são alguns organismos que possuem um grande potencial para um futuro uso biotecnológico. Todos esses resultados levantados propiciam um melhor entendimento do mecanismo de micoparasitismo do gênero *Trichoderma* frente a fitopatógenos de grande importância.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cenário atual

Pragas que devastam culturas agrícolas sempre foram uma das maiores preocupações do homem, sejam elas por microorganismos, como fungos ou bactérias, ou por insetos ou nematódeos. Com a necessidade de minimizar essas perdas causadas por essas pragas, a utilização de vários agrodefensivos foi a saída encontrada para controlar o prejuízo causado.

A aplicação direta de agrodefensivos, como fungicidas, em plantas infectadas por uma determinada praga pode ser altamente eficiente, além de ser uma medida com uma resposta relativamente rápida (HIDE & CAYLEY, 1982). Porém esses produtos podem não ter uma ação efetiva contra um inóculo com estruturas de resistência, chamadas de escleródios no solo, principalmente se o solo estiver com um alto nível de infestação (BREWER & LARKIN, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2003; TSROR & PERETZ-ALON, 2005). Existem casos em que mesmo a aplicação de fungicida acompanhada de uma limpeza fitossanitária não é capaz de erradicar o patógeno na cultura-alvo (KUNIEDA-ALONSO *et al.*, 2005).

A perda anual de safras no globo, devido a doenças causadas por fungos pré e pós-colheita é superior a 200 bilhões de euros, somente os EUA gastam mais de 600 milhões de dólares anualmente com fungicidas (ARORA *et al.*, 2004), como exemplo. A fusariose causada pelo fungo *Fusarium graminearum* é a principal doença do trigo e resulta em severas perdas em varias áreas da China e no sul do Brasil (PANISSON *et al.*, 2003; LUZ *et al.* 2003; JIANXIN *et al.*; 2007). O uso contínuo do fungicida benzimidazol causou uma aparente resistência nas linhagens de *F. graminearum* e essa população resistente pode se tornar dominante (DAN *et al.*, 2007). Portanto, a utilização de agrodefensivos pode promover uma “seleção artificial involuntária”, propicia o surgimento de uma população ou, até mesmo, de uma comunidade resistente a vários tipos de agrodefensivos, o que eleva o grau de dificuldade no combate às diversas pragas.

Além disso, os agrodefensivos causam diversos danos irreparáveis à natureza, pois eles não são apenas tóxicos para os insetos e microorganismos causadores de problemas, mas também para o meio ambiente de forma geral, interferindo diretamente no equilíbrio da comunidade local, e tóxicos para os seres humanos (KOGAN, 1998). Assim, o controle dos fitopatógenos é o maior desafio na agricultura (LISS *et al.*, 1985; ALFENAS *et al.*, 2004; KUNEIDA-ALONSO *et al.*, 2005).

MONTE *et al.* (2001) relatam a necessidade de métodos que consigam reduzir perdas, que podem atingir até 100% da produção, em lavouras de feijão (*Phaseolus vulgaris*) causadas por fungos fitopatógenos de solo, como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

1.2. *Rhizoctonia solani*

Rhizoctonia solani (teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris*) é uma espécie de fungo fitopatógeno que possui distribuição em escala mundial (Figura 1), ataca diversas culturas, como repolho, couve-flor, batata, pepino, tabaco, erva-mate, feijão e eucalipto (CHET, 1987; KUNEIDA-ALONSO *et al.*, 2005; POLETTTO *et al.*, 2007) causando nessas o aparecimento de cancrios na superfície do caule, manchas negras e podridão radicular (BANVILLE *et al.*, 1996). São fungos saprófitas que podem viver sob forma de micélio ou escleródio.

A infecção de culturas por *R. solani* pode ser feita por meio do contato com propágulos ou escleródios levados pela água ou de partículas de solo infectado dispersas pelo vento (ALFENAS *et al.*, 2004). A grande variedade de espécies de plantas capazes de infectar aliada ao grande potencial patogênico faz com que a espécie *R. solani* tenha um papel de extrema importância na agricultura, consequentemente, se tornando alvo de diversos estudos.



Figura 1 - Isolado de *Rhizoctonia solani* crescido em meio MYG.

Esse fungo foi descrito pela primeira vez pelo micologista suíço A. P. De Candolle em 1815. Porém, somente anos mais tarde esse fungo obteve um maior destaque. Julius Kühn, em 1958, estudando doenças em batatas verificou a presença desse fungo em áreas afetadas pela doença, realizando uma breve descrição morfológica desse fitopatógeno (PARMERTER & WHITNEY, 1970).

Anos mais tarde, com o intuito de minimizar o erro de identificação que ocorria com outras espécies de fungos, devido a uma descrição muito superficial realizada por Kühn, uma nova descrição de *R. solani* foi realizada por DUGGAR (1915) e, tardiamente, por PARMERTER *et al.* (1967). Porém, mesmo com um maior nível de detalhamento sobre as características morfológicas, ainda não foi possível realizar uma separação bem delimitada desse gênero, por apresentar características semelhantes a outros gêneros de fungo.

Com o advento de técnicas moleculares, a espécie foi caracterizada através de análise da região ITS1-5,8S-ITS2 e categorizada em 14 subgrupos chamados de *grupos anastomoses* (AGs). Cada AG possui características específicas, como sintomas que causa a planta hospedeira e a família de plantas que infecta (SHARON *et al.*, 2008; PANNECOUCQUE & HÖFTE, 2009). Entre os subgrupos de *R. solani*, o AG-1 possui destaque no cenário nacional.

O subgrupo AG-1 de *R. solani* está vinculado a doenças causadas às famílias de plantas Fabaceae e Poaceae, ambas famílias com grande importância na agricultura brasileira (CIAMPI *et al.*, 2005). Dependendo do hospedeiro, os isolados desse

subgrupo possuem uma forma predominante de infecção. Quando atuam sobre membros da família Poaceae, a infecção se dá, predominantemente, através de estruturas geradas de reprodução assexuada, como escleródios e propágulos, enquanto sobre membros da família Fabaceae, como a soja e o feijão, acredita-se que a infecção se dá na sua forma sexuada, *T. cucumeris*, que é bastante frequente nas áreas infestadas (JONES *et al.*, 1989; NAITO, 2006; FENILLE *et al.*, 2003).

1.3. Gênero *Fusarium*

Os fungos do gênero *Fusarium*, também conhecidos como *Nectria* e *Gibberella* (formas teleomorfas), possuem uma distribuição global, prevalecendo em regiões mais próximas dos trópicos, estando presentes tanto em solos cultiváveis quanto em solos não-cultiváveis. Os componentes desse gênero podem ser não-patogênicos ou patogênicos, sendo que ambos são colonizadores de rizosfera (GORDON & MARTYN, 1997). Podem persistir por vários anos no solo sem estar associados a algum hospedeiro, vivendo saprofiticamente.

A sua grande capacidade patogênica é bastante conhecida e estudada. Esse sucesso está relacionado às inúmeras estratégias de infecção que esse gênero *Fusarium* possui (DESJARDINS, 2003; GOSWAMI & KISTLER, 2004). Esse gênero tem em seu histórico ataques a diversas culturas de grande relevância econômica, como tomate, banana, pimenta, berinjela, feijão, girassol, trigo, milho (AVRDC, 2005; NTG, 2006; BETTIOL & MORANDI, 2009; ARA *et al.*, 1996; TOLÊDO-SOUZA *et al.*, 2009; LOGRIECO *et al.*, 2007; PERALDI *et al.*, 2011) e, mais recentemente, ao organismo modelo *Arabidopsis thaliana* (MICHIELSE & REP, 2009). Relatos de incidência sobre humanos também foram descritos, sendo causadores de micoses oportunistas (DAY *et al.*, 2009).

Uma das estratégias do gênero *Fusarium* para a colonização do hospedeiro é a produção de uma grande variedade de metabólitos secundários tóxicos e bioativos, como fumonisinas, beauvericina, eniatinas, fusaproliferina, ácido fusárico, fusarinas, ácido giberélico, moniliformina e deoxinivalenol. Dentre as toxinas destacadas, as fumonisinas são as mais perigosas, pois elas induzem inúmeras micotoxicoses. Há

relatos da ocorrência de câncer em experimentos com roedores e de câncer de esôfago em humanos após o consumo de fumonisina (DESJARDINS, 2006).



Figura 2 - Isolados de *Fusarium solani*, à esquerda, e *Fusarium oxysporum*, à direita, crescido em meio MYG.

As espécies *Fusarium solani* (teleomorfo: *Nectria hematococca*) e *Fusarium oxysporum* são causadoras das doenças podridão radicular e murcha em plantas (Figura 2). Em estágio inicial, acontece o amarelecimento da folhagem e o murchamento das folhas, seguido do amarelecimento do caule. Após esse estágio inicial, as folhas adquirem uma coloração mais escura se ressecando, tanto as raízes superficiais quanto as profundas se apodrecem.

Em casos mais avançados da podridão radicular e murcha, essas doenças levam à morte da planta. O desenvolvimento da doença se deve à colonização do xilema pelo fungo, o que impede a passagem da seiva para os outros tecidos. O desenvolvimento dessas doenças se dá em ambientes com temperatura entre 27° - 28°C, tempo seco e com solos mais ácidos (pH 5,0 - 5,6) (AVRDC, 2005; POLETTTO *et al.*, 2006).

Ambas as espécies possuem os seus genomas anotados, *F. solani* em 2009 (COLEMAN *et al.*, 2009) e *F. oxysporum* em 2007 pelo Broad Institute (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/fusarium_group/MultiHome.html), o que pode facilitar na compreensão do processo de parasitismo sobre as plantas.

1.4. *Sclerotinia sclerotiorum*

Outra espécie de fungos que possui uma grande importância econômica é *Sclerotinia sclerotiorum* (Figura 3). Essa espécie é capaz de infectar plantas de 75 famílias, 278 gêneros e 408 espécies, entre elas culturas de grande relevância na agricultura como feijão, soja e algodão, em todos os estágios de crescimento e após a colheita (BOLAND & HALL, 1994). Essa espécie possui uma distribuição mundial, presente em regiões temperadas, tropicais e subtropicais, visto que ela possui um bom desenvolvimento à temperatura mais amena (11° - 25°C) sob uma alta umidade, tanto do solo quanto do ar (PURDY, 1979; LEITE, 2005).

Há relatos de perdas de 5-100% de culturas causadas por *S. sclerotiorum* (MANITOBA AGRICULTURE, 2002). No estado de Goiás, o mofo branco, doença causada por *S. sclerotiorum*, foi responsável por um prejuízo de até 20% no rendimento dos grãos de soja de algumas lavouras na safra de 2005/2006 (BETTIOL & MORANDI, 2009). O mofo branco, chamado também de podridão branca, é doença que causa lesões encharcadas nos órgãos afetados, com coloração parda e consistência mole. A ocorrência do micélio branco de *S. sclerotiorum*, de aspecto cotonoso, cobrindo porções dos tecidos é característico dessa doença (BOLTON *et al.*, 2006).



Figura 3 - Isolado de *Sclerotinia sclerotiorum* crescido em meio MYG. A estrutura apontada pela seta vermelha é o escleródio.

O combate a esse fungo fitopatígeno é extremamente difícil, pois além de ser um polífago (possuir vários hospedeiros), ele produz estruturas de resistência, denominada escleródios, que podem permanecer viáveis por mais de 10 anos. Os escleródios são um conjunto de hifas com uma casca escura composta de várias camadas de células contendo melanina. A parte interna do escleródio é preenchida por uma matriz composta por carboidratos, principalmente β -1,3-glicanas, e proteínas.

O tamanho do escleródio pode variar de acordo com o hospedeiro. No caso do girassol, o escleródio pode cobrir a camada onde ficam as sementes, podendo ter 1cm de espessura e excedendo 35cm de diâmetro. No caso do feijão, os escleródios são globosos e possuem 2-10mm de diâmetro (LEITE, 2005; HENSON *et al.*, 1999, BOLTON *et al.*, 2006). Quando o ambiente for favorável, ocorre a germinação do escleródio e a formação de micélio que pode infectar outras plantas ou produzir os ascósporos através do desenvolvimento dos apotécios (SUN & YANG, 2000).

1.5. Agente de controle biológico: gênero *Trichoderma*

Devido aos efeitos danosos causado ao meio ambiente e à procura por métodos mais eficientes que sejam acessíveis, lucrativos e que aumentem a produção de alimentos, o uso de agrodefensivos vem sendo substituído pelo o uso de agentes de controle biológico (ACB), principalmente quando se trata de doenças causadas por fungos fitopatógenos de solo (PARRA *et al.*, 2002).

A utilização do gênero *Trichoderma* tem sido satisfatória no controle de vários fitopatógenos (fungos, invertebrados ou bactérias) em diversas culturas agrícolas, conseguindo se destacar como ACB (EAPEN *et al.*, 2005; HANSON & HOWELL, 2002; COTXARRERA *et al.*, 2002) além de promover a resistência de certas plantas à esses fitopatógenos (BIGIRIMANA, 1997; DE MEYER *et al.*, 1998; HARMAN *et al.*, 2004 b).

O gênero *Trichoderma* é um dos principais ACBs para fungos fitopatogênicos (Figura 4), detendo quase 50% do mercado (WHIPPS *et al.*, 2001). Ele também é utilizado na biorremediação do solo, contribuindo na degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos que estão presentes em agrotóxicos, o que se deve à produção de

um grande arsenal de hidrolases, peroxidases e outras enzimas líticas (AZCBN-AGUILAR & BAREA, 1997; KATAYAMA & MATSUMURA, 1991).

No Brasil, foram utilizados cerca de 550 t de produtos à base de *Trichoderma*, quantia equivalente para tratar uma área de 600.000 ha de lavoura, no ano de 2007 (BETTIOL & MORANDI, 2009). POMELLA (2008) relata que o custo médio para o tratamento de uma cultura de feijão com mofo branco utilizando *Trichoderma* é de R\$ 92,00/ha, enquanto utilizando fungicidas é de R\$ 150,00/ha.

Uma das principais características de *Trichoderma* é produzir conídios em abundância a partir de conidióforos que se originam diretamente das hifas, os quais originam colônias caracteristicamente esverdeadas. O gênero *Trichoderma* é natural do solo, especialmente os orgânicos, podendo viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos, havendo poucos relatos sobre ocorrência de doenças de plantas causadas por esse gênero (KUBICEK *et al.*, 2001). Além disso, são fungos mesófilos, sensíveis a temperaturas e pH extremos, apesar de desenvolverem melhor em condições ácidas (MELO, 1996), e são sensíveis à presença de íons metálicos em alta concentração, principalmente de Ca^{2+} (KÜÇÜK *et al.*, 2008).

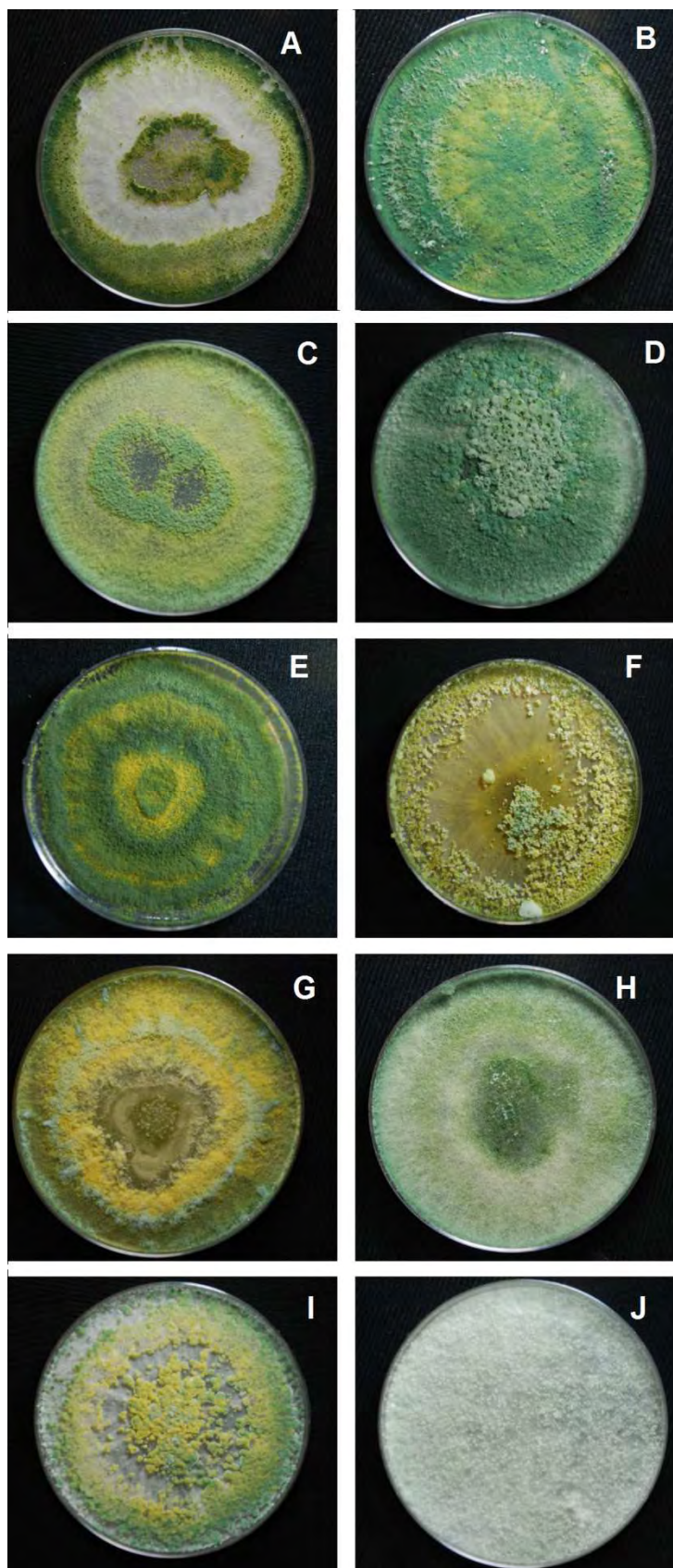


Figura 4 – Diferentes isolados de *Trichoderma*. A – *T. harzianum* ALL-42; B – *T. asperellum* T-00; C – *T. tomentosum* 29/11; D – *T. koningiopsis* 11/06; E – *Trichoderma* spp. 11/09; F – *T. erinaceum* 19/03; G – *T. ghanense* 11/02; H – *T. virens* 301/01; I – *T. hamatum* 398/01; J – *T. brevicompactum* 55/01.

O controle do crescimento dos fitopatógenos utilizando *Trichoderma* pode ocorrer por vários mecanismos: competição por nutrientes, produção de antibióticos voláteis e não voláteis e produção de enzimas capazes de hidrolisar a parede celular do hospedeiro (SILVAN & CHET, 1989). O último mecanismo é chamado de micoparasitismo, mecanismo bastante estudado que possui uma grande importância no processo de controle biológico por *Trichoderma*. No processo de micoparasitismo (Figura 5), a interação de *Trichoderma* com alguns fungos patogênicos se dá por enovelamentos, se prendendo à hifa hospedeira por meio de ganchos, e penetração da parede celular através da secreção de enzimas líticas (KUBICEK, 2001).

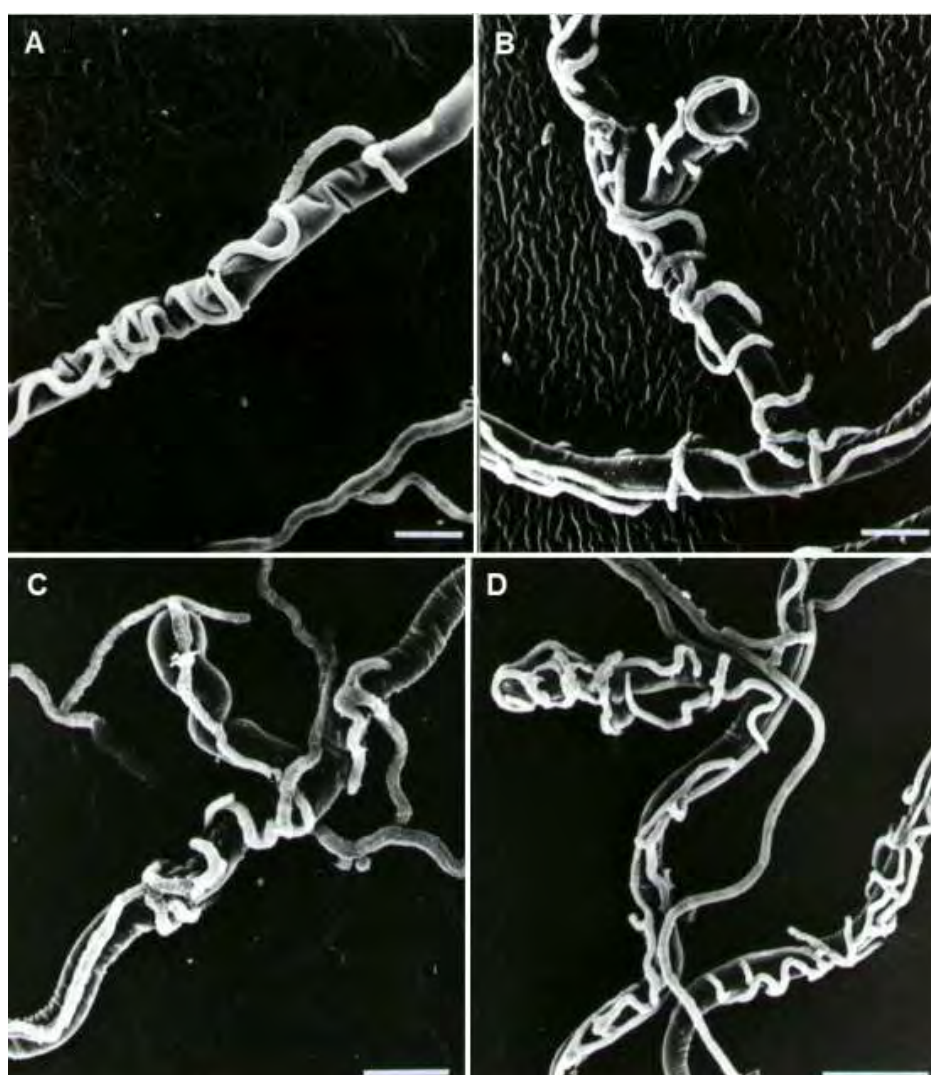


Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura da ação micoparasítica de *T. harzianum* sobre *R. solani*. A, B, C e D correspondem a interação entre os isolados de *T. harzianum* ALL-23, ALL-40, ALL-41 e ALL-44 e o isolado de *R. solani* CNPAF-03, respectivamente (LIMA, 2002). Bar = 10 μ m.

1.6. Classificação do gênero *Trichoderma*

De acordo com o Index Fungorum (ver www.indexfungorum.org) esse gênero pertence ao Domínio Eucaryota, “Grupo” Fungi/Metazoa, Reino Fungi, Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Sordariomycetes, Subclasse Hypocreomycetidae, Ordem Hypocreales, “Família” Hypocreales mitospóricos (ou Família Hypocreaceae), Gênero *Hypocrea* na forma teleomórfica. Este Index, organizado por diferentes e renomadas instituições (CAB Biosciences – Inglaterra, CBS - Holanda, e Landcare Research – Nova Zelândia), é constantemente revisado e atualizado, constituindo uma fonte de referência bastante confiável para fins acadêmicos.

Buscando entender o gênero *Trichoderma*, várias revisões foram realizadas baseadas em caracteres morfológicos e se mostraram insatisfatórias (DRUZHININA *et al.*, 2006a), pois não indicavam o suposto grau de divergência genética entre as espécies. Isso acontece devido à sobreposição de diversos caracteres distintivos (CHAVERRI & SAMUELS, 2003). Assim, a taxonomia baseada somente em observações morfológicas não é suficiente para identificar uma espécie de forma segura.

Com o advento das técnicas moleculares esse cenário foi mudado, o que levou a um aumento no número de espécies de *Trichoderma* identificadas. Vários genes foram utilizados para esse fim. O primeiro estudado foi o espaçador interno da transcrição (ITS) (KINDERMANN *et al.*, 1998) (Figura 6), seguido de vários outros como o fator de alongamento da transcrição (*tef*) (exons e introns, sendo que esse último tem um alto poder de resolução dentro dos clados) (Figura 7), endoquitinase (*chit*), Subunidade 2 da RNA polimerase (*rpb2*), calmodulina (*cal*) e actina (*act*) (KULLNIG-GRADINGER, *et al.* 2002; CHAVERRI *et al.*, 2003; SAMUELS *et al.*, 2006; JAKLITSCH *et al.*, 2006; JAKLITSCH *et al.*, 2009).

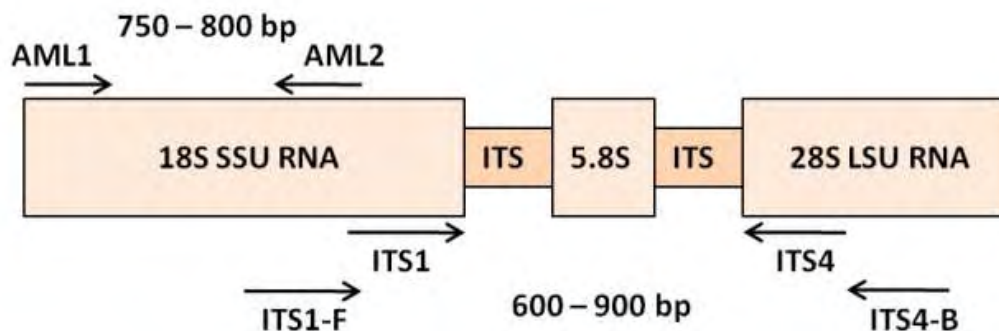


Figura 6 – Esquema da região do rDNA contendo 18S, ITS 1, 5.8S, ITS2 e 28S e a localização dos primers utilizados para amplificar diferentes partes para inferência filogenética e identificação. As regiões que transcrevem os rRNAs são altamente conservadas, enquanto as regiões espaçadoras dos transcritos de rRNA são variáveis (CLARRIDGE, 2004).

A partir das sequências de ITS, foi desenvolvida uma ferramenta molecular com o intuito de identificar a espécie de *Trichoderma* por meio do *barcode* de oligonucleotídeos, chamado TrichOkey (DRUZHININA *et al*, 2005), disponível em www.isth.info. Essa identificação se baseia na combinação de cinco âncoras presentes nas sequências de ITS1 e 2 confrontadas com o banco de dados do International Subcommittee on *Trichoderma* and *Hypocrea* (ISTH) que é altamente confiável na comunidade científica. Porém, a identificação da seção *Trichoderma* é praticamente inviável utilizando a região ITS, pois essa região é altamente conservada.

Dessa forma, para a identificação de isolados que não foram identificados ou com identificação duvidosa pelo TrichOkey foi desenvolvida uma ferramenta molecular que realiza uma procura de similaridade com o banco de sequências local baseado em sequências de ITS, *tef1* e *rbp2*, chamado TrichoBLAST (KOPCHINSKIY *et al.*, 2005), também disponível em www.isth.info.

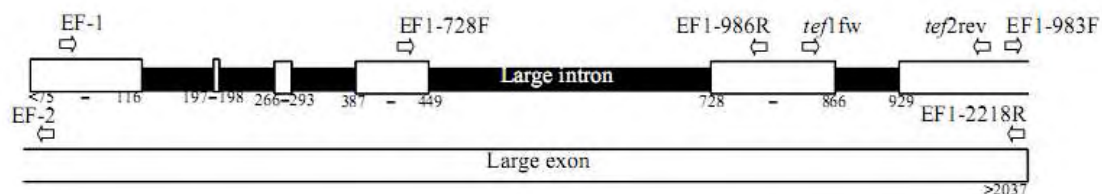


Figura 7 - Esquema da região do gene *tef1* e a localização dos primers utilizados para amplificar diferentes partes para inferência filogenética (DRUZHININA & KUBICEK, 2005).

Apesar da eficiência das ferramentas moleculares citadas, ainda é necessário uma análise filogenética para confirmação dos resultados. Além disso, novas análises moleculares e metabólicas vêm sendo desenvolvidas, como a utilização de caracteres metabólicos, análise de microarranjo de fenótipo (DRUZHININA *et al.*, 2006b), que consegue observar diferenças nos genótipos por meio da variação do fenótipo, a análise de metabólitos secundários que podem dar suporte à filogenia (SAMUELS & ISMAEL, 2009).

1.6. Enzimas hidrolíticas

No processo de micoparasitismo, o isolado de *Trichoderma* penetra a parede celular por meio da secreção de enzimas líticas. Dessa forma, a secreção dessas enzimas necessárias para a degradação da parede celular do hospedeiro é dependente da composição do alvo. Além dessas enzimas que estão envolvidas no processo de micoparasitismo, o fungo *Trichoderma* libera no solo outras enzimas que participarão em outros processos, como na nutrição de plantas, na competição por nutrientes com outros fungos e na degradação de biomassa, por exemplo (KUBICEK *et al.*, 2001).

1.6.1. Enzimas decompositoras de parede celular

A parede celular da maioria dos fungos fitopatógenos é constituída por um esqueleto estrutural de quitina disposto em camadas ordenadas e β -1,3-glicanas entre essas camadas, formando uma matriz inter-territorial (Figura 8). Na sua composição também há presença de proteínas, lipídeos e, em alguns casos, substanciais conteúdos de pigmentos (melanina), fosfatos, íons inorgânicos entre outros (BARTNICKI-GARCIA, 1968). Dessa forma, o sistema quitinolítico, principalmente as quitinases e a N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAGase), as β -1,3-glicanases e proteases são fundamentais no processo de micoparasitismo (KUBICEK *et al.*, 2001).

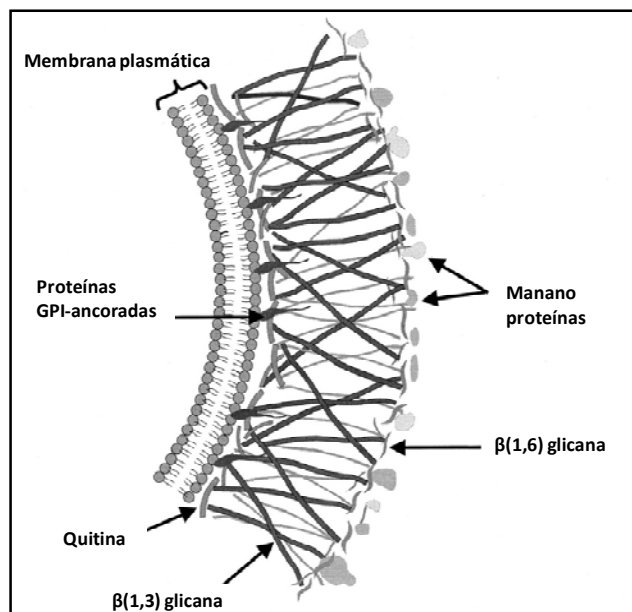


Figura 8 – Estrutura da parede celular de fungo (MONTEIRO, 2008).

As enzimas que degradam o polímero de quitina foram divididas por SAHAI & MANOCHA (1993) em três grupos: (1) β -1,4-N-acetilglicosaminidases: quebram a quitina liberando monômeros de N-acetil-D-glicosamina; (2) endoquitinases: clivam aleatoriamente a molécula de quitina em sítios internos, liberando oligossacarídeos; (3) exoquitinases: catalisam a liberação progressiva de diacetilquitobiose, sem a liberação de mono e oligossacarídeos. Essas enzimas citadas são induzidas por quitina e parede celular de fungos, enquanto são reprimidas em presença de glicose, glicosamina ou N-acetilglicosamina (ULHOA & PEBERDY, 1992; HARAN *et al.*, 1995).

As β -1,3-glicanases, de acordo com o modo de ataque ao substrato, são classificadas como exo ou endo- β -1,3-glicanases. Estes dois mecanismos de ação são identificados pelos produtos de hidrólise (PITSON *et al.*, 1993). As exo- β -1,3-glicanases hidrolisam o substrato, β -1,3-glicana, pela clivagem sequencial de resíduos de glicose a partir da extremidade não redutora. O principal produto de hidrólise é glicose podendo gerar também dissacarídeos e outros oligossacarídeos. As endo- β -1,3-glicanases clivam o substrato aleatoriamente liberando cadeias menores.

Apesar de possuírem diferentes mecanismos de atuação, as exo e endo- β -1,3-glicanases podem agir simultaneamente na hidrólise de β -glicanas de uma forma sinérgica. DE LA CRUZ *et al.* (1995) relatam que as β -1,3-glicanases são

importantes no mecanismo de micoparasitismo, pois são expressas na presença de quitina e parede celular de fungos fitopatogênicos.

As proteases podem participar na degradação de proteínas celulares estruturais desestabilizando a integridade celular do fitopatógeno e facilitando a penetração e colonização pelo *Trichoderma*. Essas enzimas também estão envolvidas na inativação de enzimas produzidas por patógenos durante o processo de infecção de plantas (HOWELL, 2003).

1.6.2. β -glicosidases

As β -glicosidases constituem o maior grupo de enzimas glico-hidrolíticas, catalisando especificamente a clivagem das ligações glicosídicas β -1,4 (HENRISSAT *et al.*, 1989). Essas celobíases degradam a celobiose (dímeros de glicose com ligação β -1,4) e celulo-oligossacarídeos (trímeros de glicose com ligação β -1,4), originados após a ação das exo e endo- β -1,4-glicanases, à glicose. As enzimas do sistema celulolítico têm papel fundamental no sistema degradação da celulose e possuem uma grande importância econômica, sendo utilizadas em suplementos comerciais de celulose (aumentando a hidrólise da celulose), na produção do bioetanol proveniente de material celulolítico, na indústria de papel e têxtil ASHADI *et al.*, 1996; LYND *et al.*, 2002; KUMAR *et al.*, 2008; BUCHERT *et al.*, 1998; GALANTE *et al.*, 1998).

Sabe-se que essas enzimas também são expressas no controle biológico dos fungos do gênero *Pythium*, visto que a celulose é o principal componente da parede celular dos Oomycetes. Porém, neste caso, essas enzimas parecem ter pouca relevância no processo de micoparasitismo (SEIDL *et al.*, 2006).

1.6.3. Fosfatases

As fosfatases são enzimas que conseguem hidrolisar ésteres e anidridos de ácido fosfórico em fosfato inorgânico (BECK *et al.*, 1989; GUIMARÃES *et al.*, 2004), participando de vários processos biológicos, tais como assimilação de fósforo pela planta (TATE, 1984), metabolismo intermediário e sinalização celular. De acordo com o

pH estas enzimas são divididas em dois grupos: fosfatases alcalinas, com pH ótimo igual ou superior a 8,0 e fosfatases ácidas, com pH ótimo de atuação igual ou inferior a 6,0 (GUIMARÃES *et al*, 2004.).

As fosfatases ácidas são enzimas que catalisam a hidrólise de uma variedade de compostos fosfatados monoésteres, com a produção de fósforo solúvel, contribuindo para o metabolismo energético e mecanismos de sinalização celular (DICKMAN & YARDEN, 1999). Sabe-se que essa enzima participa da aquisição de fósforo com propósito nutricional (WALSH *et al.*, 1994) e que ela é secretada quando o fungo *Trichoderma* entra em contato com a parede celular do fitopatógeno *R. solani* (LIMA, 2006), o que leva a pensar que essa enzima pode conferir uma certa vantagem a *Trichoderma* no processo de competição desse nutriente com outros fungos. Além disso, a liberação de fosfato inorgânico através da atuação da fosfatase ácida secretada por *Trichoderma* favorece diretamente o desenvolvimento das plantas presentes, visto que as plantas terão acesso ao fosfato orgânico mais facilmente (SHARPLEY, 1985).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Os objetivos desse trabalho foram identificar em nível de espécie filogenética isolados de *Trichoderma* spp. provenientes de diversas espécies cultivadas no Brasil e realizar a avaliação da atividade específica de enzimas hidrolíticas frente a parede celular dos fitopatógenos *F. solani*, *F. oxysporum*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar isolados do gênero *Trichoderma*, utilizando a região ITS1-5,8S-ITS2 e o gene *tef 1*;
- Visualizar as relações filogenéticas através de análises utilizando ferramentas moleculares;

- Avaliar as atividades específicas das enzimas: NAGase, fosfatase ácida, β -glicosidase, β -1,3-glicanase, proteases ácidas, proteases neutras, proteases básicas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismo e condição de cultura

Foram utilizados 100 isolados de *Trichoderma* spp. provenientes de várias regiões do Brasil (Anexo 1) e os fitopatógenos: *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani* e *S. sclerotiorum* pertencentes a coleção de fungos e microrganismo da EMBRAPA Arroz e Feijão. Os fungos foram mantidos em placas contendo meio MYG a 28°C.

3.2. Extração de DNA, amplificação do rDNA e sequenciamento

O fungo foi cultivado em meio MYG a 180 rpm, 28°C por 48 h para a obtenção de micélio. O DNA fúngico foi extraído a partir de micélio congelado e liofilizado através da metodologia proposta por RAEDER & BRODA (1985) acrescida de tampão CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide). A região ITS1-5.8S-ITS2 foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando a combinação dos primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') seguindo o protocolo descrito por WHITE *et al.* (1990). A porção do fator de alongamento da transcrição (*tef1*) foi amplificada usando os primers *tef1*-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') e *tef1*rev (5'-GCCATCCTTGGAGACCAGC-3') seguindo o protocolo proposto por KULLNIG-GRADINGER *et al.* (2002).

Após amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2 % e purificados utilizando o protocolo baseado em precipitação por PEG (Polietileno glicol) - 20% PEG, 2,5 M NaCl, 80% etanol e etanol puro. Os produtos da purificação foram usados na reação de sequenciamento utilizando DYEnamic™ ET

Terminator Cycle Sequencing kit e os primers ITS1 e ITS4, para ITS, e os primers tef1-728F e tef1rev, para *tef1*. O sequenciamento foi realizado no ABI Prism 3100.

3.3. Identificação de isolados de *Trichoderma*

As sequências de DNA foram alinhadas utilizando o programa Clustal X v2.0.12 (THOMPSON et al. 1997). As regiões terminais com alinhamento duvidoso foram retiradas manualmente usando BioEdit v7.0.5.3. Primeiramente, as sequências amplificadas de ITS foram confrontadas com um banco específico para *Trichoderma*, disponibilizado pela International Subcommittee on *Trichoderma* and *Hypocrea* (ISTH, www.isth.info) utilizando TrichOkey 2.0 (DRUZHININA et al. 2005; DRUZHININA & KOPCHINSKIY, 2006). Quando não havia o reconhecimento da espécie, as sequências de ITS e *tef1* eram submetidas ao TrichoBLAST (KOPCHINSKIY et al., 2005).

3.4. Análise filogenética das espécies de *Trichoderma*

Para confirmar a identificação realizada pelo TrichOkey e pelo TrichoBLAST foi realizada uma reconstrução filogenética. A reconstrução filogenética foi realizada com a região do rDNA nuclear ITS1-5,8S-ITS2 para todos os isolados e com o gene *tef1* para os isolados pertencentes à seção *Trichoderma* utilizando a aproximação bayesiana de acordo com JAKLITSCH et al. (2006), a metodologia foi modificada utilizando o software Mr. Bayes v3.1.2.

O melhor modelo proposto pelo Mr. Modeltest v2.3 baseado em AIC para ITS foi Generalized Time Reversible (GTR) + Gamma Distribution (G) e para *tef1* foi GTR + G + sítios invariantes (I). A amostragem foi através do parâmetro de cadeia de Markov Monte Carlo (mcmc) realizada com 5×10^6 gerações. As probabilidades *a posteriori* para a árvore obtida da sequência ITS foram obtidas a partir do consenso de 49.600 árvores (uma árvore amostrada a cada 100 gerações) após a remoção das 400 primeiras árvores no processo de *burnin*. As probabilidades *a posteriori* para a árvore obtida da sequência de *tef1* foram obtidas a partir do consenso de 49.750 árvores (uma

árvore amostrada a cada 100 gerações) após a remoção das 250 primeiras árvores no processo de *burnin*.

A árvore filogenética para ITS foi enraizada com a sequência de rDNA, ITS1, 5.8S e ITS 2, CBMAI 1012 (FJ986607.1) proveniente da espécie *T. longibrachiatum*. As sequências de GJS 04-187 (JN133553.1) e GJS 99-6 (DQ315464.1), ambas de *T. asperelloides*, foram adicionadas para verificar se alguma sequência estudada iria se agrupar a elas.

A árvore filogenética para *tef1* foi enraizada com a sequência de *tef1* OY6607 (FJ619248.1) proveniente da espécie *T. longibrachiatum*. As sequências de GJS 04-116 (GU248412.1) e GJS 99-6 (DQ109550.1), ambas de *T. asperelloides*, foram adicionadas para verificar se alguma sequência estudada iria se agrupar a elas.

3.5. Produção de Enzimas

Para a produção de enzimas hidrolíticas, discos de 3 mm de diâmetro originados das placas dos isolados de *Trichoderma* spp. foram colocados em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 10 mL de meio TLE [$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g L⁻¹, KH_2PO_4 2,0 g L⁻¹, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,4 g L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g L⁻¹, Uréia 0,3 g L⁻¹, Peptona 1,0 g L⁻¹ e solução elementos traços (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}) 0,1%] e parede celular do fitopatógeno (0,5%). Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 28°C e velocidade de 120 rpm. Após 48 horas de incubação, o sobrenadante de cultura foi coletado, através de uma filtração a vácuo, e utilizado como fonte das enzimas hidrolíticas.

A parede celular de cada fitopatógeno foi obtida após o inóculo de discos de 3 mm de diâmetro originados das placas dos fitopatógenos colocados em frascos de Erlenmeyer de 1L contendo 500mL de meio MYG. Esses frascos foram incubados em agitador rotatório a 28°C e velocidade de 180 rpm por 120 h com o intuito de obter massa micelial. O micélio foi lavado, liofilizado e macerado. Após o processo de maceração, o conteúdo foi lavado exaustivamente com água destilada, resultando em uma parede celular parcialmente purificada.

3.6. Ensaios enzimáticos e concentração de proteína

As atividades de NAGase, fosfatase ácida e β -glicosidase foram determinadas usando os substratos pnp-derivados: *p*-nitrofenil- β -N-acetilglicosamina (ρ -NPNAG) (5 mM), *p*-nitrofenilfosfato (ρ -NPP) (5 mM) e *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (ρ -NPGluc) (5 mM), respectivamente. As misturas de ensaio continham 10 μ L da amostra, 40 μ L de solução de pnp-derivado e 100 μ L de tampão. A molaridade e os pHs dos tampões foram: tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0, 4,8 e 5,5, para NAGase, fosfatase ácida e β -glicosidase, respectivamente. Após incubação da mistura a 37 °C por 15 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 100 μ L de NaOH 0,1 M. A quantidade de ρ -nitrofenol (ρ -NP) foi determinada espectrofotometricamente a 405nm. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para produzir 1 μ mol de ρ -NP por minuto. Os ensaios foram realizados em duas repetições e somente resultados com coeficiente de variação inferiores a 20% foram aceitos.

A atividade de β -1,3-glicanase foi determinada usando laminarina como substrato a 0,75% (p/v) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 (RAMADA *et al.*, 2010). A mistura de ensaio continha 10 μ L da amostra e 20 μ L de solução de laminarina 0,75%. Após incubação da mistura a 50 °C por 10 minutos, adicionou-se 100 μ L de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). As amostras foram fervidas por 5 minutos. Em seguida, a leitura das amostras foi realizada em um comprimento de onda de 540 nm. Uma unidade de enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para produzir 1 μ mol de açúcar redutor por minuto. Os ensaios foram realizados em duas repetições e somente resultados com coeficiente de variação inferiores a 20% foram aceitos.

A atividade de proteases foi determinada usando azocaseína como substrato a 0,25% (p/v) preparado em tampão fosfato/citrato 50mM, pH 5,0 e pH 7,0 e Tris-HCl 50mM, pH 8,5 para proteases ácida, neutra e básica respectivamente como proposto por CABRAL *et al.* (2004). A mistura de ensaio continha 20 μ L da amostra, 40 μ L de solução de azocaseína e 40 μ L de tampão. Após incubação da mistura a 37 °C por 30 minutos, adicionou-se 100 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 10% e incubou-a a 4°C por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 30 minutos, 100 μ L do sobrenadante foi misturado com 100 μ L de NaOH 1M. A leitura foi determinada espectrofotometricamente a 450 nm. Uma unidade de enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para aumentar 1 abs por minuto. Os ensaios foram realizados

em duas repetições e somente resultados com coeficiente de variação inferiores a 20% foram aceitos.

A concentração de proteínas foi determinada pela metodologia de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

Os resultados enzimáticos por cada parede celular estudada foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo post-teste Scott-Knott ($\alpha = 0,05$) por meio do software SISVAR. As correlações entre enzimas hidrolíticas foram avaliadas através do coeficiente de correlação de Pearson utilizando o software R v2.14.1. A significância do teste ($\alpha = 0,05$) foi ajustada seguindo a correção de Bonferroni (RICE, 1989).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação molecular e análise filogenética

Os isolados de *Trichoderma* foram identificados utilizando ferramentas moleculares baseadas nas sequências de ITS1-5.8S-ITS2 e *tef1*: TrichOkey 2.0 e TrichoBLAST (Anexo 1). Dentro dos 100 isolados estudados, foram encontrados 43 isolados da espécie *T. harzianum*, 33 isolados de *T. asperellum*, seis isolados de *T. tomentosum*, cinco isolados de *T. koningiopsis*, quatro isolados de *T. erinaceum*, dois isolados de *T. ghanense*, um isolado de *T. virens*, um isolado de *T. brevicompactum* e um isolado de *T. hamatum*, sendo que quatro isolados não foram identificados por essas ferramentas (Tabela 1).

Portanto, foi observada uma diversidade de espécie de *Trichoderma*, sendo que entre os 100 isolados observados, a maioria é das espécies *T. harzianum* e *T. asperellum*, seguido de *T. tomentosum* e *T. koningiopsis* (Figura 9). Esse perfil já foi visualizado em outros estudos em regiões neotropicais (KUBICEK *et al.*, 2008; HOYOS-CARVAJAL *et al.*, 2009).

A presença maciça das espécies *T. harzianum* e *T. asperellum* pode ser explicada pela capacidade em degradar inúmeros substratos, podendo ir de compostos mais

simples, como D- α -glicose, D-frutose, até compostos mais complexos, como ácido γ -hidroxi-butírico e o Tween-80, o que pode ser constatado em uma análise de microarranjo de fenótipo, facilitando a colonização de diversos ambientes, possibilitando o sucesso evolutivo dessa espécie. (LOPES *et al.*, submetido). HOYOS-CARVAJAL *et al.* (2009) observou esse mesmo perfil em isolados de *T. asperellum* provenientes de regiões tropicais, como o Brasil.

Tabela 1 - Lista de espécies de *Trichoderma* encontradas por meio das ferramentas moleculares (TrichOkey e TrichoBLAST) e análise filogenética por meio de aproximação bayesiana.

SEÇÃO	Clado	Espécie	Quantidade
LONGIBRACHIATUM	Longibrachiatum	<i>T. ghanense</i>	2
PACHYBASIIUM	Harzianum	<i>T. harzianum</i>	43
		<i>T. tomentosum</i>	6
	Virens	<i>T. virens</i>	1
TRICHODERMA	Hamatum	<i>T. asperellum</i>	33
		<i>T. hamatum</i>	1
	Viride	<i>T. koningiopsis</i>	5
		<i>T. erinaceum</i>	4
LINHAGENS ÚNICAS	Lutea	<i>T. brevicompactum</i>	1
DESCONHECIDO			4
TOTAL			100

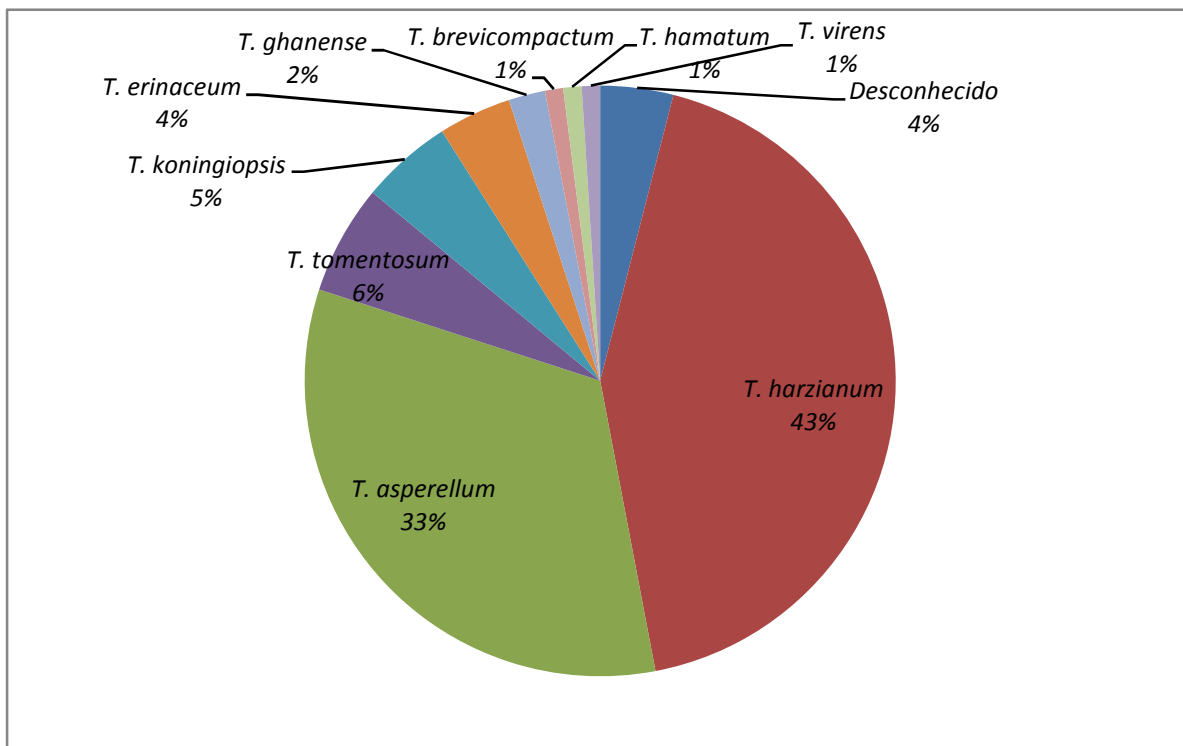


Figura 9 – Percentual da quantidade de isolados de cada espécie de *Trichoderma* (N = 100 isolados).

Na análise filogenética bayesiana (Figura 10), as seções de *Trichoderma* foram agrupadas de forma bem consistente, com valores de probabilidade *a posteriori* (pp) de 1, o que já é bem descrito na literatura (HOYOS-CARVAJAL *et al.*, 2009; DRUZHININA & KUBICEK, 2005). Apesar da análise filogenética ter sugerido que a espécie *T. brevicompactum* e a seção *Trichoderma* compartilham um ancestral comum imediato, essa sugestão é suportada por uma pp de 0,75. DRUZHININA & KUBICEK (2005) propuseram a possibilidade do Clado Lutea ser ancestral das seções *Pachybasium* e *Trichoderma*, porém esse fato ainda não é bem entendido. Atualmente esse Clado está inserido dentro da Seção Linhagens Únicas, com espécies que ainda não se associam a outras espécies, formando um clado contendo apenas ele como componente.

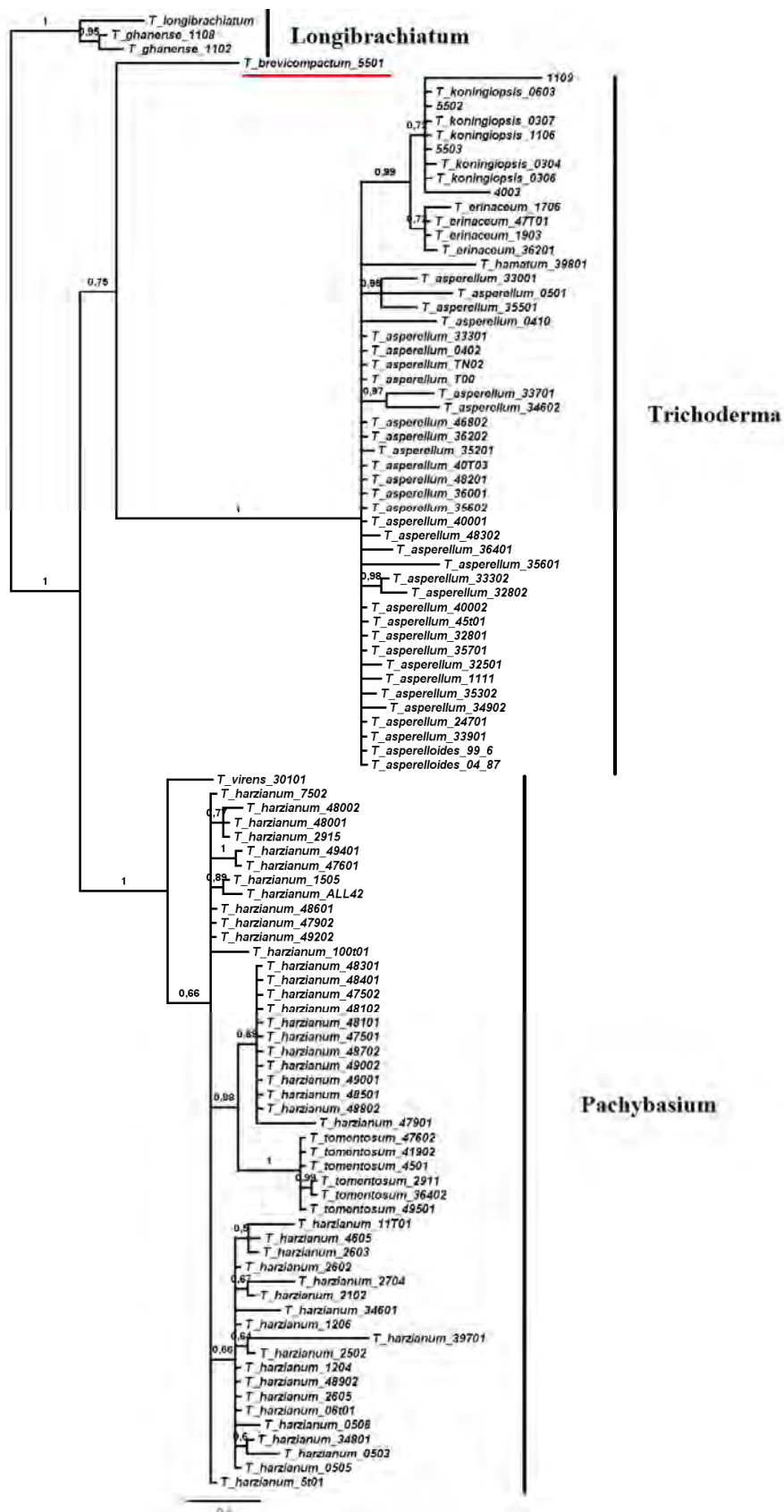


Figura 10 - Árvore filogenética consenso de 49.600 árvores obtidas por análise bayesiana a partir da região do rDNA nuclear, ITS1-5.8S-ITS2, com o modelo GTR + G. Os números sobre os braços indicam as probabilidades *a posteriori* (pp). Cada seção está delimitada por uma linha. A linha vermelha representa a linhagem única.

Dentro da Seção Pachybasium, pode-se observar a segregação dos clados Harzianum e Virens com um valor de pp de 1,00. O clado Harzianum, apesar de ser sugerido pela árvore filogenética, não obteve valor de pp alto. Esse resultado se deve ao não agrupamento de isolados identificados como *T. harzianum*. Um agrupamento em especial foi fortemente assegurado por uma pp de 0,98. Sendo esse agrupamento subdividido em dois grupos, um composto de isolados de *T. tomentosum* (pp de 1,00) e outro composto de isolados de *T. harzianum* (0,89). Os demais agrupamentos formados não são confiáveis, apresentando pp abaixo de 0,85.

Esse não agrupamento observado, também foi descrito por DRUZHININA *et al.* (2010), onde eles relatam que a espécie *T. harzianum* se trata de um complexo de espécies, corroborando com os resultados encontrados por LOPES *et al.* (submetido) onde, por meio da análise de microarranjo de fenótipo, eles visualisaram uma diferença metabólica entre isolados identificados como *T. harzianum*.

Na Seção Trichoderma houve apenas a formação do clado Viride, suportado com uma pp de 1, enquanto o isolados das espécies *T. asperellum*, *T. asperelloides* (sequências obtidas no GenBank) e *T. hamatum* (componentes do clado Hamatum) não se agruparam. Dois grupos foram formados dentro do clado Viride, um formado apenas por isolados de *T. erinaceum* e outro grupo contendo isolados de *T. koningiopsis* e isolados não identificados, ambos suportado por uma pp de 0,72.

SAMUELS *et al.* (2010) descreve a existência da espécie *T. asperelloides*, sendo que essa espécie é críptica à espécie *T. asperellum*, com a utilização de várias metodologias, porém, eles relatam que para segregar essas duas espécies é necessário realizar uma análise filogenética utilizando a sequência do gene *tef1*, pois o ITS é bastante conservado, ocorrendo apenas uma mudança de base na região do ITS-2 para distinguir as duas espécies. Dessa forma, foi necessária a construção de uma nova árvore filogenética baseada na sequência do gene *tef1*, pois o seu poder de resolução dentro dessa seção é maior que o do ITS, conseguindo diferenciar espécies dentro de clados.

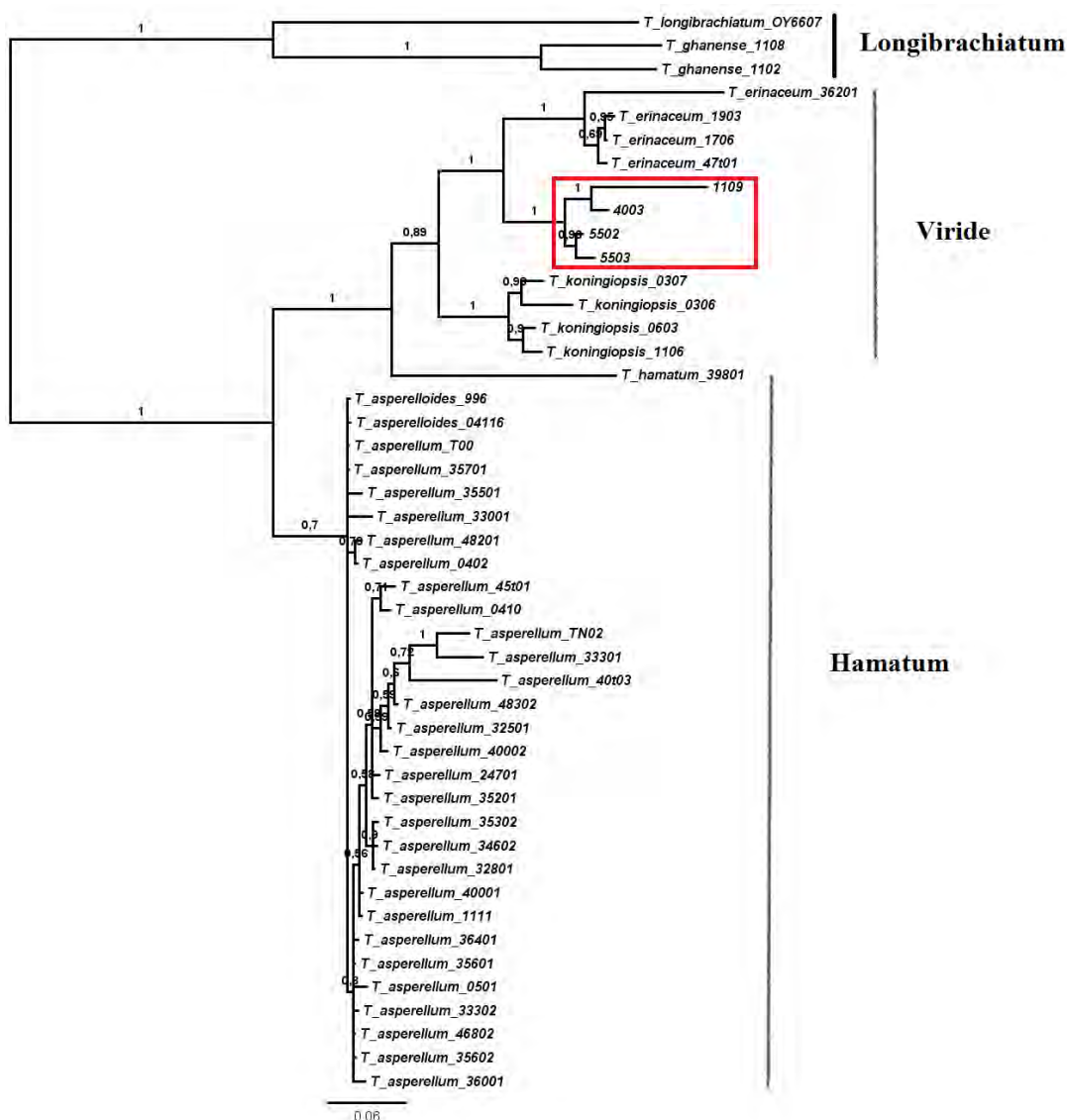


Figura 11 - Árvore filogenética consenso de 49.750 árvores obtidas por análise bayesiana a partir da sequência de *tef1* com o modelo GTR + G + I. Os números sobre os braços indicam as probabilidades *a posteriori* (pp). Cada clado está delimitado por uma linha. A marcação em vermelho indicava o agrupamento formado com os isolados desconhecidos. Isolados da seção Longibrachiatum foram adicionados na análise para enraizar a árvore.

A seção *Trichoderma* segregou nos clados Hamatum e Viride com um suporte de 0,89 de pp (Figura 11). Dentro do clado Hamatum, ocorreu a diferenciação entre a espécie *T. hamatum* e a espécie *T. asperellum* (pp de 1,00). O agrupamento da espécie *T. asperellum* apresentou uma pp de 0,7. Dentro desse agrupamento, verificou-se a presença de um subgrupo com a maioria dos isolados identificados como *T. asperellum* por uma pp de 0,8, enquanto os isolados *T. asperellum* T00, 357/01, 355/01, 330/01 e os isolados *T. asperelloides* 99-6 e 04-116 não se agruparam com nenhuma sequência.

Dentro do subgrupo citado acima, verificou-se a existência de vários subgrupos de *T. asperellum* suportados por pp altas, como 0,9 e 0,99 por exemplo.

O clado Viride foi subdividido em três grupos fortemente assegurados por uma pp de 1,00. Um grupo formado com isolados de *T. erinaceum*, um grupo formado com isolados de *T. koningiopsis* e um grupo formado com isolados de espécie(s) desconhecida(s). Dessa forma, é necessário sequenciar outros genes, como o da subunidade 2 da RNA polimerase (*rbp2*) e actina (*act*) e realizar uma árvore filogenética para cada gene para essa seção, para confirmar se trata de um agrupamento consistente. Por fim, também se deve realizar uma análise multilocus dessa seção, para confirmar esse fato. Esse procedimento foi o mesmo adotado por SAMUELS *et al.* (2010) e JAKLITSCH *et al.* (2006) quando descobriram uma nova espécie de *Trichoderma*.

4.2. Correlação de Pearson entre atividades específicas de enzimas hidrolíticas

Ao se verificar a possível correlação entre as atividades específicas das enzimas estudadas para cada tipo de parede celular, observou-se que nas condições com o gênero *Fusarium*, a maioria das correlações estimadas foram significativas. Vale lembrar que o nível de significância do teste foi ajustado pela correção de Bonferroni, pois se trata de uma análise de múltiplas comparações, o que aumenta a probabilidade de ocorrência do erro tipo I.

Para *F. oxysporum*, verificou-se que todas as correlações entre as atividades específicas foram significativas, além disso, as correlações possuíam valores elevados de coeficiente de Pearson (*r*) e positivos (Tabela 2). Esse resultado leva à conclusão de que se um isolado possuir um valor elevado de atividade específica para uma determinada enzima, esse mesmo isolado terá altíssima chance de possuir valores elevados de atividades específicas para todas as enzimas estudadas para essa parede celular.

Tabela 2 - Correlação entre enzimas hidrolíticas em presença de parede celular de *F. oxysporum*. Os valores acima da diagonal principal são os p-values e os valores abaixo são os coeficientes de Pearson (r). Resultados de p-value significativos foram marcados em vermelho. Resultados de r significativos foram grifados em negrito.

Enzimas	NAGase	Fosfatase ácida	β - glicosidase	β -1,3- glicanase	Protease ácida	Protease neutra	Protease básica
NAGase		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Fosfatase ácida	0,9859		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
β - glicosidase	0,8511	0,8266		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
β -1,3- glicanase	0,9883	0,9895	0,8568		0,0001	0,0001	0,0001
Protease ácida	0,9635	0,9705	0,8342	0,9705		0,0001	0,0001
Protease neutra	0,9664	0,9702	0,8168	0,9712	0,9893		0,0001
Protease básica	0,9211	0,9416	0,7891	0,9367	0,9089	0,9047	

Os resultados encontrados na indução com parede celular de *F. solani* foram bastante semelhantes aos encontrados em *F. oxysporum*, a maioria das correlações apresentaram valores elevados de r positivos (Tabela 3). Apenas duas correlações não foram significativas, entre NAGase x Protease neutra e β -glicosidase x Protease neutra.

Tabela 3 – Correlação entre enzimas hidrolíticas em presença de micélio de *F. solani*. Os valores acima da diagonal principal são os p-values e os valores abaixo são os coeficientes de Pearson (r). Resultados de p-value significativos foram marcados em vermelho. Resultados de r significativos foram grifados em negrito.

Enzimas	NAGase	Fosfatase ácida	β - glicosidase	β -1,3- glicanase	Protease ácida	Protease neutra	Protease básica
NAGase		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,8227	0,0001
Fosfatase ácida	0,5038		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
β - glicosidase	0,7981	0,5576		0,0001	0,0001	0,0527	0,0001
β -1,3- glicanase	0,8257	0,6459	0,8516		0,0001	0,0001	0,0001
Protease ácida	0,6807	0,7448	0,7686	0,8537		0,0001	0,0001
Protease neutra	-0,0159	0,5333	0,1365	0,2799	0,6073		0,0001
Protease básica	0,5090	0,6050	0,5450	0,7067	0,7662	0,5397	

Na indução com parede celular de *R. solani*, foram observadas correlações entre algumas enzimas, a maioria entre enzimas que desempenham papel fundamental no processo de micoparasitismo, como NAGase x β -1,3-glicanase, Protease ácida x β -1,3-glicanase e Protease neutra x β -1,3-glicanase. A correlação entre β -glicosidase x Fosfatase ácida e entre as proteases também foram observadas (Tabela 4).

Tabela 4 - Correlação entre enzimas hidrolíticas em presença de micélio de *R. solani*. Os valores acima da diagonal principal são os p-values e os valores abaixo são os coeficientes de Pearson (r). Resultados de p-value significativos foram marcados em vermelho. Resultados de r significativos foram grifados em negrito.

Enzimas	NAGase	Fosfatase ácida	β -glicosidase	β -1,3-glicanase	Protease ácida	Protease neutra	Protease básica
NAGase		0,0280	0,0576	0,0001	0,0311	0,0568	0,0500
Fosfatase ácida	0,1546		0,0001	0,9584	0,0075	0,0785	0,8575
β -glicosidase	0,1338	0,4184		0,5438	0,0610	0,0143	0,5020
β -1,3-glicanase	0,3213	-0,0037	0,0430		0,0001	0,0001	0,0020
Protease ácida	0,1517	0,1876	0,1321	0,3162		0,0001	0,0001
Protease neutra	0,1342	0,1241	0,1721	0,2910	0,8502		0,0001
Protease básica	0,1381	0,0127	0,0475	0,2161	0,6335	0,5623	

Em *S. sclerotiorum*, foram observadas correlações entre as atividades de algumas enzimas, parte das correlações observadas são de enzimas envolvidas no processo de micoparasitismo, como entre β -1,3-glicanase x Protease neutra e β -1,3-glicanase x Protease básica. Também foi observado correlações entre outras enzimas e entre as proteases (Tabela 5).

Tabela 5 - Correlação entre enzimas hidrolíticas em presença de micélio de *S. sclerotiorum*. Os valores acima da diagonal principal são os p-values e os valores abaixo são os coeficientes de Pearson (r). Resultados de p-value significativos foram marcados em vermelho. Resultados de r significativos foram grifados em negrito.

Enzimas	NAGase	Fosfatase ácida	β -glicosidase	β -1,3- glicanase	Protease ácida	Protease neutra	Protease básica
NAGase		0,4258	0,1179	0,2417	0,3199	0,2545	0,5605
Fosfatase ácida	-0,0563		0,0001	0,1018	0,0001	0,0001	0,0222
β - glicosidase	0,1104	0,4370		0,0001	0,0001	0,0001	0,0138
β -1,3- glicanase	0,0828	0,1155	0,5295		0,0362	0,0001	0,0001
Protease ácida	0,0703	0,5003	0,2813	0,1475		0,0001	0,0001
Protease neutra	0,0805	0,3305	0,2888	0,2797	0,8293		0,0001
Protease básica	0,0412	0,1609	0,1731	0,3007	0,3952	0,5857	

A maioria das correlações significativas encontradas foi entre as atividades de enzimas que possuem papel fundamental no processo micoparasitismo, como NAGase, β -1,3-glicanase e protease, o que já era esperado, pois no processo de micoparasitismo as enzimas trabalham de forma sinérgica, o que otimiza esse mecanismo, aumentando a chance de obter sucesso no parasitismo de outros fungos, inclusive os fitopatogênicos (HOWELL, 2003).

Correlações entre as atividades de enzimas que desempenham funções tão diferentes, como entre Fosfatase ácida e β -glicosidase encontrada em todas as paredes celulares, também foram descritas, porém é possível relacioná-las. As fosfatases ácidas irão solubilizar o fosfato inorgânico do solo, o que propicia a obtenção do fósforo e ser utilizado no seu metabolismo, porém esse mecanismo de retirada do fosfato no solo pode gerar uma competição por esse nutriente, lembrando que há relatos da eficiência do gênero *Trichoderma* nesse tipo de mecanismo (SIVAN & CHET, 1987). As β -glicosidases são enzimas que degradam celobiose e celulo-oligossacarídeos prioritariamente, porém há relatos que essa enzima também apresenta atividade quitinolítica, tendo um papel no processo de degradação da parede celular (MUCHA *et al.*, 2006). Portanto, essas duas enzimas também contribuem no controle dos fitopatógenos.

4.2. Atividades das enzimas hidrolíticas em presença de fitopatógenos

Em geral, os isolados apresentaram atividades das enzimas estudadas: NAGase, Fosfatase ácida, β -glicosidase, β -1,3-glicanase, protease ácida, protease neutra e protease básica, nas quatro condições trabalhadas: em presença de parede celular de *F. oxysporum* (FO), *F. solani* (FS), *R. solani* (RS) e *S. sclerotiorum* (SS), porém em proporções diferentes, sendo que a atividade específica de cada enzima é dependente da parede celular induzida (Tabela 6). Essa dependência da parede celular inoculada é explicada por cada parede celular possuir uma composição característica.

Tabela 6 - Atividade específica de enzimas hidrolíticas (U.mg⁻¹) provenientes de espécies de *Trichoderma* por cada parede celular estudada.

Parede celular	NAGase	Fosfatase ácida	β -glicosidase	β -1,3-glicanase	Protease ácida	Protease neutra	Protease básica
<i>F. oxysporum</i>	2,3 a	0,6 c	0,2 c	14,5 b	61,7 c	87,2 b	101,0 b
<i>F. solani</i>	0,9 b	2,3 b	0,6 b	131,3 a	126,9 b	175,8 a	282,7 a
<i>R. solani</i>	1,2 b	3,4 a	0,8 a	120,3 a	149,3 b	181,8 a	226,5 a
<i>S. sclerotiorum</i>	0,7 b	0,9 c	0,5 b	151,4 a	195,6 a	193,9 a	208,0 a

A parede de RS se apresentou como a melhor indutora de Fosfatase ácida e β -glicosidase. JONES *et al.* (1972) relatam que existe a probabilidade da presença de pequenos aglomerados de celulose na composição da parede celular de RS, o que pode explicar o por quê dessa parede ser a melhor indutora de β -glicosidase entre as analisadas.

Dentre as sete enzimas analisadas, a parede de FO se apresentou como a pior indutora em seis enzimas e como a melhor para indução de NAGase. SILVAN & CHET (1989) relataram que a parede celular de FO é envolta por uma camada mucilaginosa de origem protéica, o que protegeria a parede celular do ataque de enzimas hidrolíticas. Essa camada protéica é formada por glicoproteínas contendo manose, galactose e glicose, além de apresentar ácido urônico em sua composição. Abaixo dessa camada protéica, existe uma camada formada apenas de quitina, seguida pela parede celular propriamente dita. A parede celular é composta basicamente por quitina, β -1,3-glicanas e glicoproteínas (SCHOFFELMEER *et ali.*, 1999). Portanto, a camada mucilaginosa impede o contato do *Trichoderma* com as camadas internas, porém com a atuação das

proteases ocorre a degradação dessa camada mucilaginosa, o que possibilita o contato com a camada, subsequente, de quitina levando à indução das enzimas do sistema quitinolítico. Dessa forma, a atividade específica de NAGase é dependente da atividade proteolítica em FO, dado corroborado pela fortíssima correlação encontrada entre essas enzimas (Tabela 2).

4.2.1. NAGase

Os isolados de *Trichoderma* apresentaram perfis diferenciados nas atividades específicas de NAGase (Figura 12) entre as condições trabalhadas, sendo que a parede celular de FO se apresentou como o melhor indutor dessa enzima (Tabela 6), enquanto as outras paredes não apresentaram diferenças entre seus resultados gerais. A maior atividade específica de NAGase foi encontrada na indução *T. asperellum* 356/01 em presença de FO (105,76 U.mg⁻¹), seguido da indução *T. asperellum* 40T/03 em presença de FS (23,8 U.mg⁻¹), *T. harzianum* 12/06 em presença de FO (20,0 U.mg⁻¹), *T. asperellum* T00 em presença de FO (14,3 U.mg⁻¹) e *T. harzianum* 12/06 em presença de SS (10,0 U.mg⁻¹) (Tabela 7).

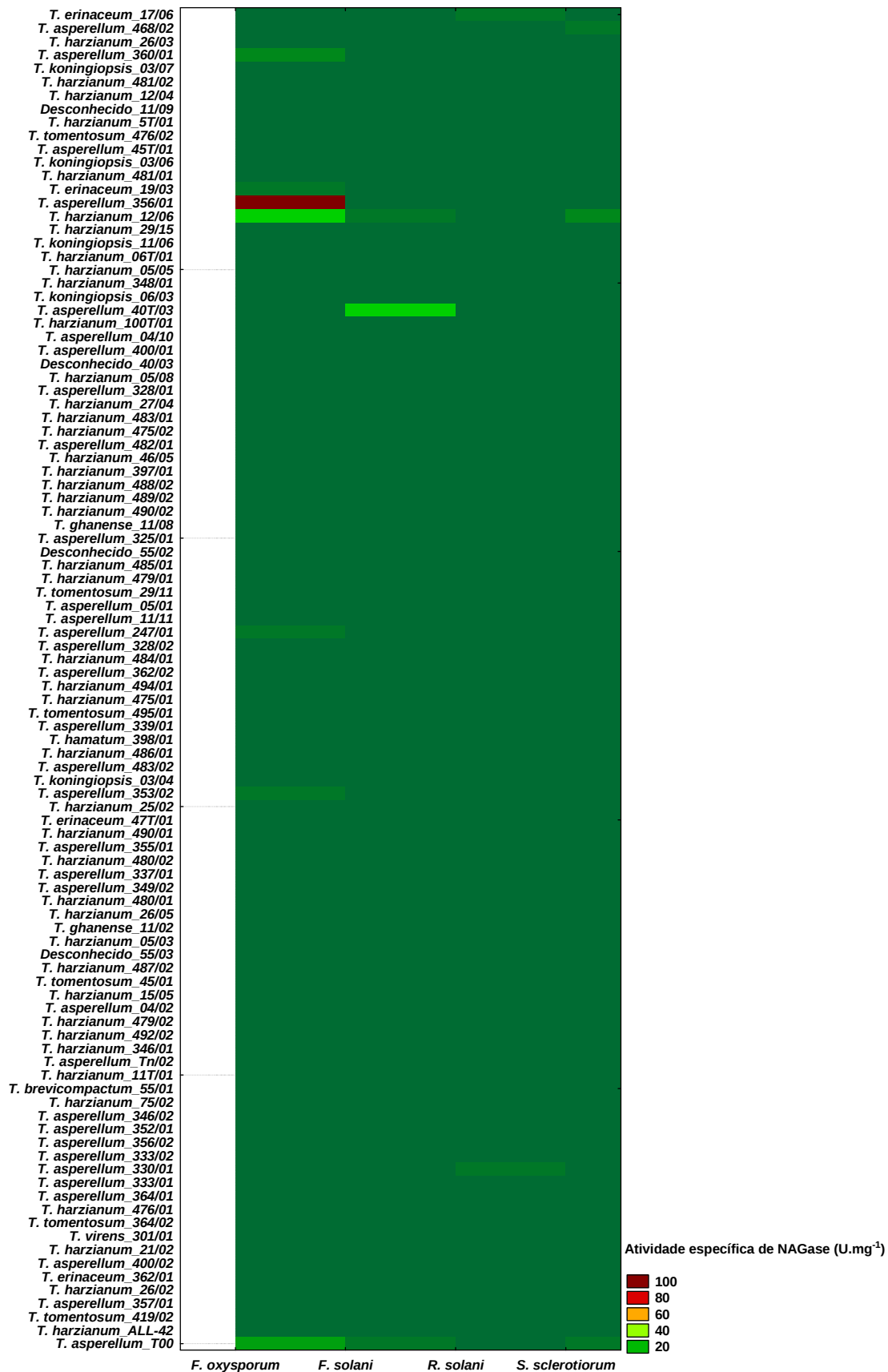


Figura 12 - Atividade específica de NAGase (U.mg⁻¹) de isolados de *Trichoderma* em presença de parede celular dos fitopatógenos *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*.

Tabela 7 - As maiores atividades específicas de NAGase provenientes de *Trichoderma* das quatro induções (FO = *F. oxysporum*, FS = *F. solani*, RS = *R. solani*, SS = *S. sclerotiorum*).

Espécie	Isolado	Indução	Atividade específica de NAGase (U.mg ⁻¹)
<i>T. asperellum</i>	356/01	FO	105,8 ^a
<i>T. asperellum</i>	40T/03	FS	23,8 ^b
<i>T. harzianum</i>	12/06	FO	20,0 ^c
<i>T. asperellum</i>	T00	FO	14,3 ^d
<i>T. harzianum</i>	12/06	SS	10,0 ^e
<i>T. asperellum</i>	360/01	FO	8,6 ^f
<i>T. asperellum</i>	353/02	FO	7,0 ^g
<i>T. harzianum</i>	12/06	FS	6,8 ^g
<i>T. erinaceum</i>	17/06	RS	6,5 ^g
<i>T. asperellum</i>	468/02	SS	6,1 ^g
<i>T. erinaceum</i>	19/03	FO	5,8 ^h

ALMEIDA *et al.* (2007) observaram uma atividade específica de 4,5 U.mg⁻¹, dentro de isolados de *T. harzianum* em presença de parede celular de RS, como sendo a maior atividade encontrada, isso indica que tais resultados encontrados são promissores.

4.2.2. Fosfatase ácida

Em relação à fosfatase ácida, os isolados de *Trichoderma* apresentaram diferentes perfis de atividade específica (Figura 13). A parede celular de RS se apresentou como o melhor indutor dessa enzima, seguido da parede celular de FS (Tabela 6), enquanto as paredes celulares de FO e SS não apresentaram diferenças entre seus resultados gerais. A maior atividade específica de fosfatase ácida foi encontrada na indução *T. asperellum* 356/01 em presença de FO (35,9 U.mg⁻¹), seguido da indução *T. harzianum* 100T/01 em presença de FS (26,9 U.mg⁻¹), *T. asperellum* 40T/03 em presença de FS (24,4 U.mg⁻¹), *Trichoderma* spp. 55/03 em presença de SS (17,7 U.mg⁻¹) e *T. harzianum* 480/01 em presença de RS (14,9 U.mg⁻¹) (Tabela 8).

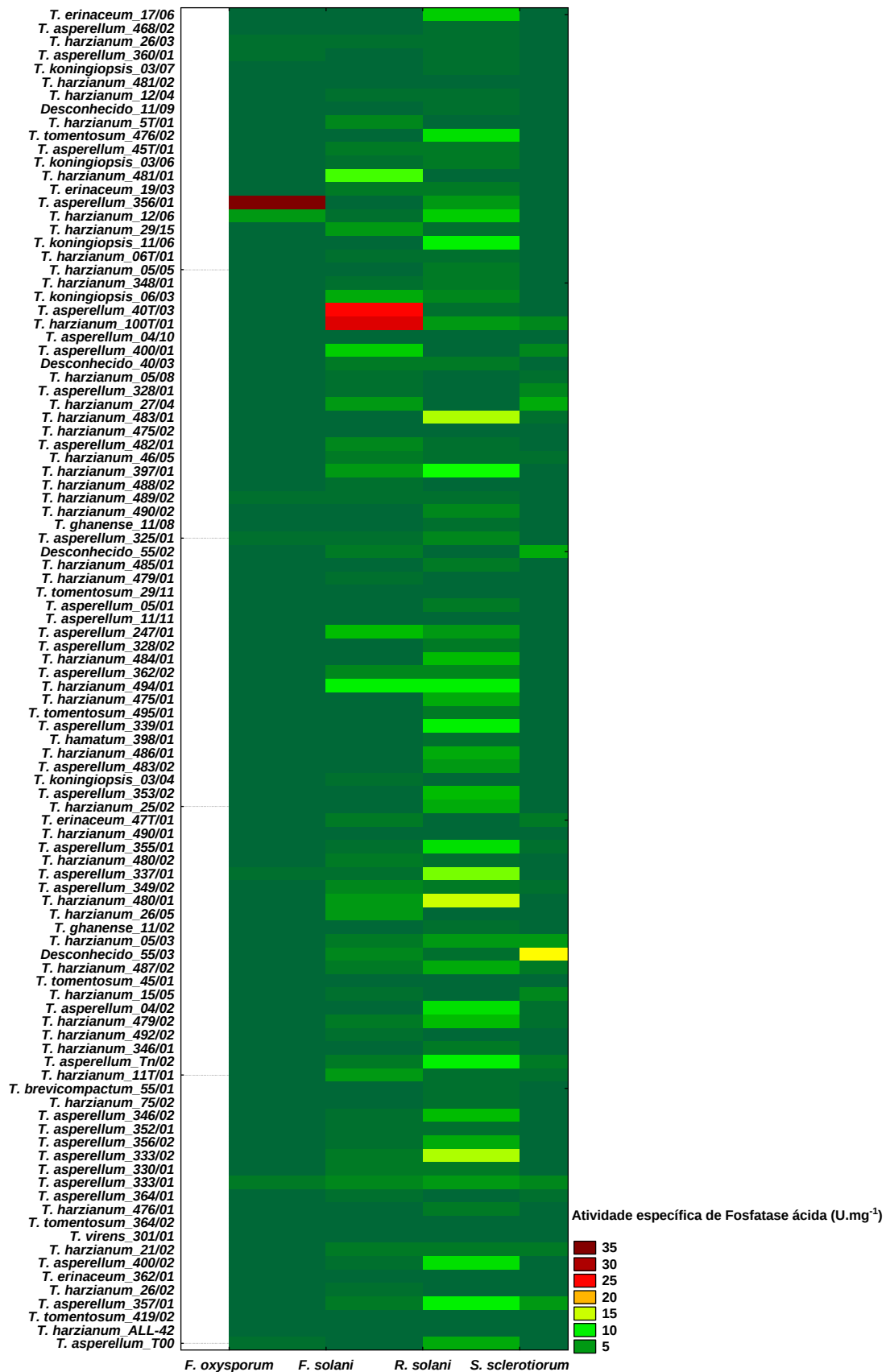


Figura 13 - Atividade específica de Fosfatase ácida (U.mg⁻¹) de isolados de *Trichoderma* em presença de parede celular dos fitopatógenos *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*.

Tabela 8 - As maiores atividades específicas de Fosfatase ácida provenientes de *Trichoderma* das quatro induções (FO = *F. oxysporum*, FS = *F. solani*, RS = *R. solani*, SS = *S. sclerotiorum*).

Espécie	Isolado	Indução	Atividade específica de Fosfatase ácida (U.mg ⁻¹)
<i>T. asperellum</i>	356/01	FO	35,9 ^a
<i>T. harzianum</i>	100T/01	FS	26,9 ^b
<i>T. asperellum</i>	40T/03	FS	24,4 ^c
<i>Trichoderma spp.</i>	55/03	SS	17,7 ^d
<i>T. harzianum</i>	480/01	RS	14,9 ^e
<i>T. harzianum</i>	483/01	RS	13,2 ^e
<i>T. asperellum</i>	333/02	RS	13,0 ^e
<i>T. asperellum</i>	337/01	RS	12,1 ^e

SOUZA (2011) encontrou uma atividade específica de 0,81 U.mg⁻¹ no seu extrato bruto em meio de cultura otimizado para a produção de fosfatase ácida pelo isolado *T. harzianum*, os resultados encontrados abrem novas possibilidades para a produção dessa enzima, além de possuírem um extrato bruto puro, por indicarem atividades específicas mais elevadas, o que facilita no processo de purificação dessa enzima.

4.2.3. β -glicosidase

Em geral, os isolados de *Trichoderma* apresentaram atividades específicas de β -glicosidase (Figura 14). De acordo com as paredes celulares trabalhadas, a parede celular de RS se apresentou como o melhor indutor dessa enzima, seguida da parede celular de FS e SS, sendo que a parede celular de FO se apresentou como o pior substrato analisado (Tabela 6). A maior atividade específica de β -glicosidase foi encontrada na indução *T. asperellum* 40T/03 em presença de FS (10,6 U.mg⁻¹), seguido da indução *T. koningiopsis* 11/06 em presença de RS (5,7 U.mg⁻¹), *T. asperellum* 362/02 em presença de RS (5,4 U.mg⁻¹), *T. harzianum* 397/01 em presença de FS (4,8 U.mg⁻¹) e *T. harzianum* 480/01 em presença de RS (4,4 U.mg⁻¹) (Tabela 9).

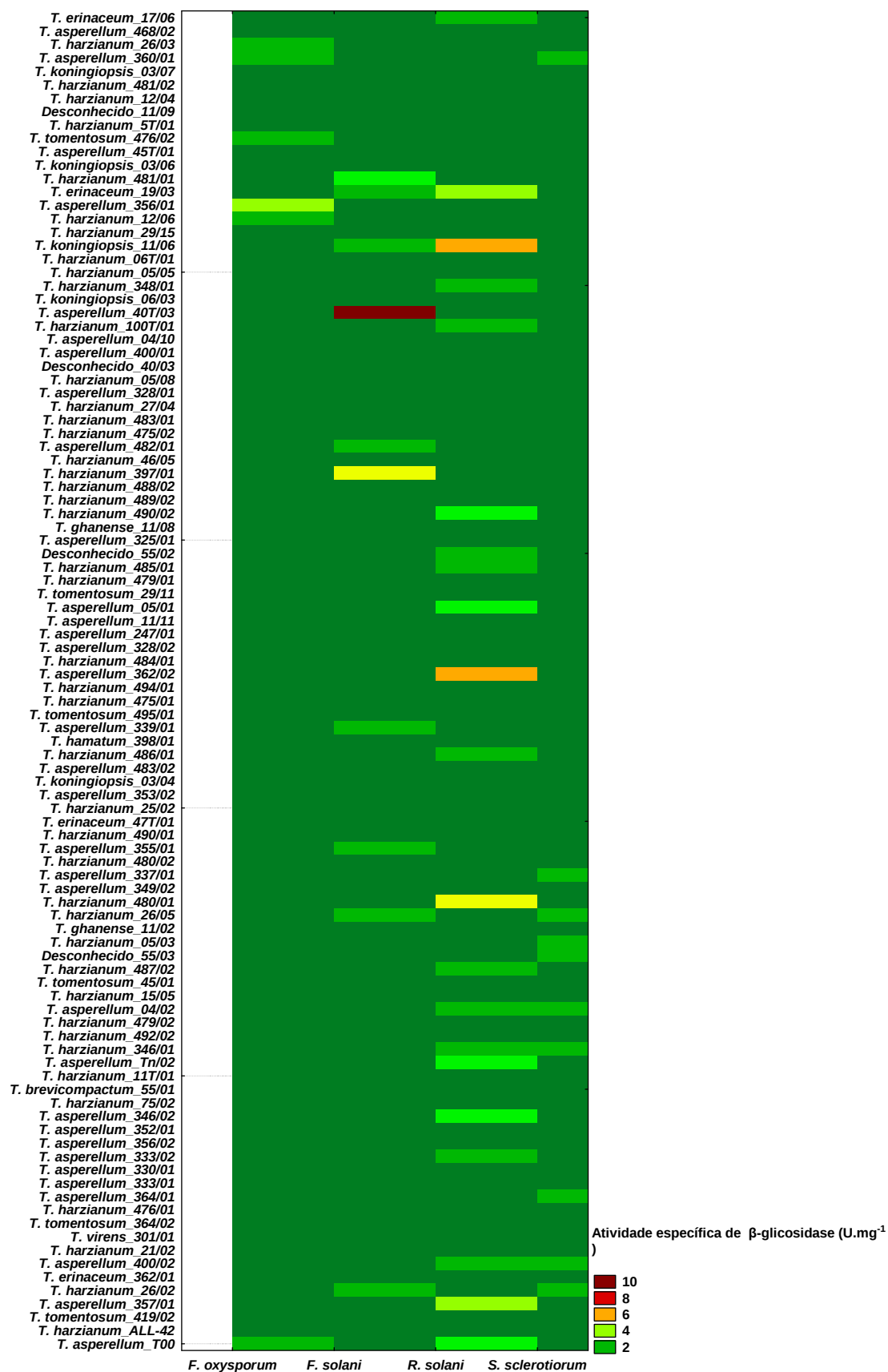


Figura 14 - Atividade específica de β -glicosidase (U.mg⁻¹) de isolados de *Trichoderma* em presença de parede celular dos fitopatógenos *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*.

Tabela 9 - As maiores atividades específicas de β -glicosidase provenientes de *Trichoderma* das quatro induções (FO = *F. oxysporum*, FS = *F. solani*, RS = *R. solani*, SS = *S. sclerotiorum*).

Espécie	Isolado	Indução	Atividade específica de β -glicosidase (U.mg ⁻¹)
<i>T. asperellum</i>	40T/03	FS	10,6 ^a
<i>T. koningiopsis</i>	11/06	RS	5,7 ^b
<i>T. asperellum</i>	362/02	RS	5,4 ^c
<i>T. harzianum</i>	397/01	FS	4,8 ^d
<i>T. harzianum</i>	480/01	RS	4,4 ^e
<i>T. asperellum</i>	357/01	RS	3,9 ^f
<i>T. asperellum</i>	356/01	FO	3,3 ^g
<i>T. erinaceum</i>	19/03	RS	3,0 ^h
<i>T. asperellum</i>	05/01	RS	2,9 ^h
<i>T. asperellum</i>	TN/02	RS	2,7 ⁱ
<i>T. harzianum</i>	481/01	FS	2,6 ⁱ

MONTEIRO (2008) encontrou a parede celular de *F. solani* (± 75 U.mg⁻¹) como a melhor indutora dessa enzima, seguida parede celular de *R. solani* (± 50 U.mg⁻¹) utilizando um único isolado de *T. harzianum*.

4.2.4. β -1,3-glicanase

Para a indução dessa enzima, praticamente todas as paredes celulares se mostraram competentes na indução dessa enzima (Figura 15). Somente a parede celular de FO apresentou resultados mais baixos em relação ao encontrado nas outras condições (Tabela 6). A maior atividade específica de β -1,3-glicanase foi encontrada na indução *T. asperellum* 40T/03 em presença de FS (2070,0 U.mg⁻¹), seguido da indução *T. harzianum* 100T/01 em presença de FS (601,2 U.mg⁻¹), *T. erinaceum* 19/03 em presença de FS (578,8 U.mg⁻¹), *T. erinaceum* 362/01 em presença de RS (520,3 U.mg⁻¹) e *T. erinaceum* 17/06 em presença de RS (520,0 U.mg⁻¹) (Tabela 10).

KUBICEK *et al.* (2001) destacou a grande importância dessa enzima no processo de micoparasitismo. ALMEIDA *et al.* (2007) apresentaram uma atividade específica de 2,5 U.mg⁻¹ como a maior atividade observada entre isolados de

Trichoderma inoculados com parede celular de *R. solani*, o que ressalta os resultados obtidos nesse trabalho.



Figura 15 - Atividade específica de β -1,3-glicanase (U.mg⁻¹) de isolados de *Trichoderma* em presença de parede celular dos fitopatógenos *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*.

Tabela 10 - As maiores atividades específicas de β -1,3-glicanase provenientes de *Trichoderma* das quatro induções (FO = *F. oxysporum*, FS = *F. solani*, RS = *R. solani*, SS = *S. sclerotiorum*).

Espécie	Isolado	Indução	Atividade específica de β -1,3-glicanase (U.mg ⁻¹)
<i>T. asperellum</i>	40T/03	FS	2070,0 ^a
<i>T. harzianum</i>	100T/01	FS	601,2 ^b
<i>T. erinaceum</i>	19/03	FS	578,8 ^c
<i>T. erinaceum</i>	362/01	RS	520,3 ^d
<i>T. erinaceum</i>	17/06	RS	520,0 ^d
<i>T. asperellum</i>	356/01	FO	517,4 ^d
<i>T. harzianum</i>	05/05	RS	499,6 ^e
<i>T. asperellum</i>	40T/03	RS	451,8 ^f
<i>T. asperellum</i>	328/02	RS	448,2 ^f
<i>T. erinaceum</i>	17/06	FS	434,4 ^g

MONTEIRO (2008) observou uma atividade específica de 40 U.mg⁻¹ para parede celular tratada de *R. solani* e de 27 U.mg⁻¹ para parede celular tratada de *F. solani* para o isolado ALL-42.

4.2.5. Proteases

No caso das proteases, os três grupos analisados (protease ácida, neutra e básica) apresentaram perfis visualmente semelhantes (Figura 16), além disso, foram observadas nas quatro condições fortes correlações entre esses três grupos de forma positiva (Tabelas 2, 3, 4 e 5). Dessa forma, esses resultados levaram à realização de uma ANOVA entre os resultados dessas enzimas para cada parede para verificar se existe diferença entre os valores obtidos por cada enzima (Tabela 11).

Tabela 11 - Atividades específicas de Protease ácida, neutra e básica (U.mg⁻¹) por parede celular de cada fitopatógeno: *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*.

Enzimas	<i>F. oxysporum</i>		<i>F. solani</i>		<i>R. solani</i>		<i>S. sclerotiorum</i>	
Protease ácida	61,686	^a	195,55	^b	149,316	^b	126,945	^c
Protease neutra	87,215	^a	193,933	^b	181,278	^b	175,763	^b
Protease básica	101,043	^a	282,748	^a	226,534	^a	207,979	^a

A ANOVA não demonstrou diferença entre as atividades proteolíticas na condição com parede celular de FO, enquanto os outros micélios apresentaram valores maiores na atividade de protease básica, esse efeito pode ser devido a esse grupo de proteases secretado ter um pH ideal de trabalho mais elevado, o que ocasionou na elevação dos valores de atividade específica.

Outro ponto para o resultado acima foi a utilização de apenas um tipo de substrato, no caso a azocaseína, sendo que as enzimas responsáveis em sua degradação por possuírem pH mais básicos como ideal elevaram os valores de atividade, tal resultado poderia ser diferente se o substrato fosse a hemoglobina, por exemplo. A hemoglobina é mais utilizada na doseagem de atividade enzimática para proteases ácidas, dessa forma, os valores das atividades desse grupo poderiam ser maiores, visto que seria utilizado um substrato mais específico.

VIRTEBO *et al.* (2002) descreveram que proteases alcalinas e as neutras são induzidas, provavelmente, por fontes de carbono mais complexos, de difícil metabolização, como micélios de fitopatógenos utilizados, o que também poderia explicar a ocorrência das maiores atividades em proteases básicas, seguida de proteases neutras, em algumas paredes no caso do último grupo. Dessa forma, optou-se por trabalhar somente com os dados de protease básica.

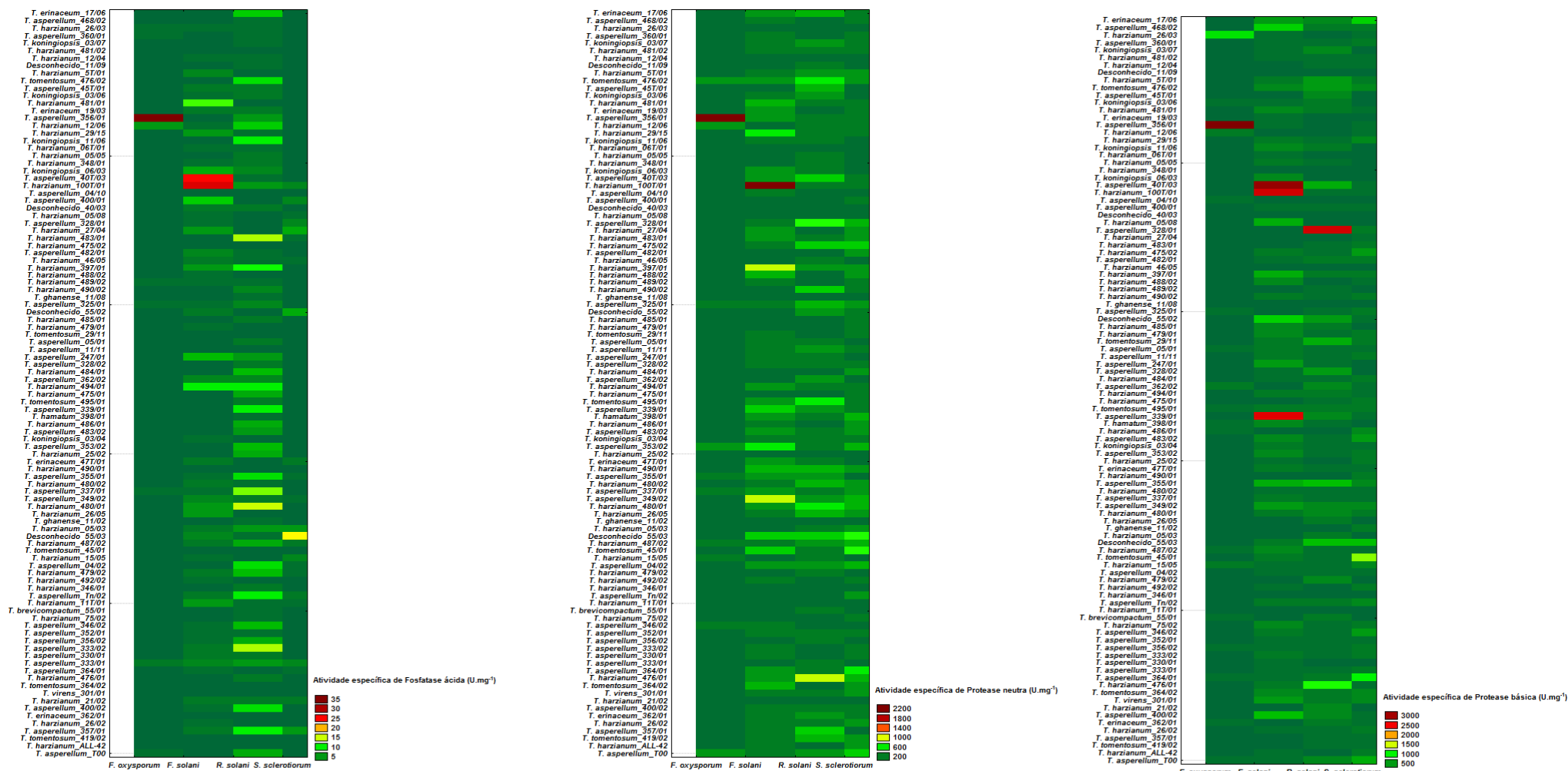


Figura 16 - Atividades específicas de Protease ácida, neutra e básica (U.mg⁻¹) de isolados de *Trichoderma* em presença de parede celular dos fitopatógenos *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*.

Os micélios de FS, RS e SS se mostraram como bons indutores de protease básica, enquanto o micélio de FO não mostrou essa qualidade (Tabela 6). A maior atividade específica de protease básica foi encontrada na indução *T. asperellum* 356/01 em presença de FO (3499,8 U.mg⁻¹), seguido da indução *T. asperellum* 40T/03 em presença de FS (3055,0 U.mg⁻¹), *T. asperellum* 328/01 em presença de RS (2654,5 U.mg⁻¹), *T. harzianum* 100T/01 em presença de FS (2651,1 U.mg⁻¹) e *T. asperellum* 339/01 em presença de FS (2585,7 U.mg⁻¹) (Tabela 12).

Tabela 12 - As maiores atividades específicas de protease básica provenientes de *Trichoderma* das quatro induções (FO = *F. oxysporum*, FS = *F. solani*, RS = *R. solani*, SS = *S. sclerotiorum*).

Espécie	Isolado	Indução	Atividade específica de Protease básica (U.mg ⁻¹)
<i>T. asperellum</i>	356/01	FO	3499,8 ^a
<i>T. asperellum</i>	40T/03	FS	3055,0 ^b
<i>T. asperellum</i>	328/01	RS	2654,5 ^c
<i>T. harzianum</i>	100T/01	FS	2651,1 ^c
<i>T. asperellum</i>	339/01	FS	2585,7 ^c
<i>T. tomentosum</i>	45/01	SS	1294,4 ^d
<i>T. harzianum</i>	476/01	RS	1093,2 ^d

Os resultados foram comparados por ANOVA e utilizou o teste Scott-Knott ($\alpha=0,05$) para os distinguiem.

5. CONCLUSÕES

- A maioria dos isolados identificados são das espécies *T. harzianum* e *T. asperellum*;
- As atividades de algumas enzimas são correlacionadas dependendo do indutor;
- A atividade de uma enzima é dependente da parede celular;
- Isolados destaques:
 - *T. asperellum* 356/01 - em todas as enzimas estudadas em parede celular de *F. oxysporum*;

- *T. asperellum* 40T/03 e *T. harzianum* 100T/01, - praticamente em todas as enzimas em *F. solani*;
- *Trichoderma spp.* 55/03 - apresentou as maiores atividades em Fosfatase ácida e Proteases em parede celular de *R. solani*;
- *T. erinaceum* 17/06 - atividades expressivas em NAGase, nas paredes celulares de *F. solani* e *R. solani*, e em β -1,3-glicanase, na parede celular de *R. solani*.

6. PERSPECTIVAS

- Caracterização do isolados:
 - Avaliação do antagonismo frente aos fitopatógenos;
 - Cruzamento entre dados enzimáticos x dados de potencial antagonístico;
 - Teste em campo dos isolados eficientes *in vitro*;
- Sequenciamento dos genes:
 - Subunidade 2 da RNA polimerase (rpb2);
 - Actina (act);
- Construção de uma árvore filogenética para cada gene;
- Construção de uma árvore filogenética a partir de uma análise multilocus;
- Descrição morfológica (se constatado que se trata de uma nova espécie).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por se tratar de um ACB amplamente utilizado em diversos tipos de lavouras, é necessária a procura de novos isolados ou, até mesmo, de espécies de *Trichoderma* que possuam um grande potencial para ser aplicado no campo.

O levantamento do perfil enzimático é fundamental na decisão da escolha do isolado a ser utilizado em uma possível aplicação no campo, pois cada isolado se comporta de modo único dependendo da situação em que ele se encontra, contribuindo mais ou menos para o crescimento das plantas, secretando mais ou menos enzimas que estão envolvidas com o processo de micoparasitismo. Os isolados que foram destacados possuem um enorme potencial para serem aplicados em campo no controle de pragas agrícolas, para a produção em larga escala de uma determinada enzima, por fim, em uso biotecnológico.

Essa caracterização propicia um melhor entendimento do mecanismo de micoparasitismo do gênero *Trichoderma* frente a fitopatógenos de grande importância econômica, *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V., MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2004.

ALMEIDA, F.B.; CERQUEIRA, F.M.; SILVA, R.N.; ULHOA, C.J. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology Letters**. v.29. p. 1189-1193. 2007

ANEES, M.; TRONSMO, A.; EDEL-HERMANN, V.; HJELJORD, L.G.; HÉRAUD, C.; STEINBERG, C. Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. **Fungal Biology**. v.114. p. 691-701. 2010.

ARA, J.; EHTESHAMUL-HAQUE, S.; SULTANA,V.; QASIM, R & GHAFAR, A. Effect of Sargassum seaweed and microbial antagonists in the control of root rot disease of sunflower. **Pakistan Journal of Botany**. v. 28. p. 219-223. 1996.

ARORA, D. K.; BRIDGE, P. D.; BHATNAGAR, D. **Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications**. NewYork: MarcelDekker, 2004.

ASHADI, R.W.; SHIMOKAWA, K.; OGAWA, K. The mechanism of enzymatic cellulose degradation. 2. Mode of action of cellulose hydrolyzing enzyme from *Aspergillus niger* UC. **Journal of General and Applied Microbiology**. v. 42. p.103 – 108. 1996.

AVRDC. **Tomato diseases: Fusarium Wilt**. Shanhua: AVRDC Publication Number 05-627. 2005. Disponível em : < <http://www.avrdc.org/pdf/tomato/fusarium.pdf>>. Acesso em 16 out. 2011.

AZCBN-AGUILAR, C.; BAREA, J.M. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. **Scientia Horticulturae**. v.68 p. 1–24. 1997.

BANVILLE, G.J.; CARLING, D.E.; OTRYSKO, B.E. *Rhizoctonia* disease on potato. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. ***Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p. 321-330.

BARTNICKI-GARCIA, S. Cell Wall Chemistry, Morphogenesis, and Taxonomy of Fungi. **Annual Review Microbiology**. v.22, p. 87-108, 1968.

BENÍTEZ, T.; RINCON, A. M.; LIMON, M. C.; CODON, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**. v.7. p. 249-260. 2004.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009.

- BIGIRIMANA, J. Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. **Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.** v. 62. p. 1001–1007. 1997.
- BISSETT, J.; SZACAKS, G.; NOLAN, C. A.; DRUZHININA, I.; GRANDIGER, C.; KUBICEK, C. New species of *Trichoderma* from Asia. **Canadian Journal of Botany.** v. 81. p. 570–586. 2003.
- BOLAND, G.J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology.** v. 16. p. 93–108. 1994.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology.** v.7. p. 1-16. 2006.
- BUCHERT, J.; OKSANEN, T.; PERE, J.; SIIKA-AHO, M.; SUURNÄKKI, A.; VIIKARI, L. Applications of *Trichoderma reesei* enzymes in the pulp and paper industry. In: HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. *Trichoderma and Gliocladium.* v. 2. London: Taylor and Francis, London, 1998. p. 343–363.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry.** v. 72. p. 248-254. 1976.
- BREWER, M.T.; LARKIN, R.P. Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. **Crop Protection.** v. 24. p. 939-950. 2005.
- CABRAL, C. M.; CHERQUI, A.; PEREIRA, A.; SIMÕES, N. Purification and Characterization of Two Distinct Metalloproteases Secreted by the Entomopathogenic Bacterium *Photorhabdus* sp. Strain Az29. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 70 (7). p. 3831-3838. 2004.
- CHAVERRI, P.; SAMUELS, G. J. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. **Studies in Mycology.** v. 48. p. 1–116. 2003.
- CHAVERRI, P.; CASTLEBURY, L.A.; OVERTON, B.E.; SAMUELS, G.J. *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. **Mycologia.** v. 95. p. 1100–1140. 2003.
- CHET, I. *Trichoderma* – application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soil borne plant pathogenic fungi. In: CHET, I. **Innovative approaches to plant disease control.** New York: John Wiley and Sons, 1987. p. 137-160.
- CIAMPI, M. B.; KURAMAE, E. E.; FENILLE, R. C.; MEYER, M. C.; SOUZA, N. L.; CERESINI, P. C. Intraspecific evolution of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA associated with soybean and rice in Brazil based on polymorphisms at the ITS-5.8S rDNA operon. **European Journal of Plant Pathology.** v. 113. p. 183-196. 2005.

CLARRIDGE, J.E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 17. p. 840-862. 2004.

COLEMAN, J.J.; ROUNSLEY, S.D.; RODRIGUEZ-CARRES, M.; KUO, A.; WASMANN, C.C.; GRIMWOOD, J.; SCHMUTZ, J.; TAGA, M.; WHITE, G.J.; ZHOU, S.; SCHWARTZ, D.C.; FREITAG, M.; MA, L.J.; DANCHIN, E.G.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P.M.; NELSON, D.R.; STRANEY, D.; NAPOLI, C.A.; BARKER, B.M.; GRIBSKOV, M.; REP, M.; KROKEN, S.; MOLNÁR, I.; RENSING, C.; KENNEL, J.C.; ZAMORA, J.; FARMAN, M.L.; SELKER, E.U.; SALAMOV, A.; SHAPIRO, H.; PANGILINAN, J.; LINDQUIST, E.; LAMERS, C.; GRIGORIEV, IV.; GEISER, D.M.; COVERT, S.F.; TEMPORINI, E.; VANETTEN, H.D. The genome of *Nectria haematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion. **PLoS genetics**. v. 5 (8). p. e1000618. 2009.

COTXARRERA, L.; TRILLAS-GAY, M.I., STEINBERG, C., ALABOUVETTE, C. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 34 p. 467–476. 2002.

DAN, W.; HUAZHI, Y.; YUN, Q. The resistance of *Fusarium graminearum* to Carbendazim in Sichuan. **Agrochemicals**. v.46. p.560-562. 2007.

DAY, S.; LALITHA, P.; HAUG, S.; FOTHERGILL, A.W.; CEVALLOS, V.; VIJAYAKUMAR, R.; PRAJNA, N.V.; ACHARYA, N.R.; MCLEOD, S.D.; LIETMAN, T.M. Activity of antibiotics against *Fusarium* and *Aspergillus*. **British Journal of Ophthalmology**. v. 93. p. 116–119. 2009.

DE MEYER, G., BIGIRIMANA, J., ELAD, Y. & HOFTE, M. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**. v.104 p. 279–286. 1998.

DESJARDINS, A.E. **Fusarium Mycotoxins Chemistry, Genetics, and Biology**. St. Paul: The American Phytopathological Society Press. 2006.

DESJARDINS, A.E. Gibberella from A (venaceae) to Z (eae). **Annual Review of Phytopathology**. v. 41. p. 177–198. 2003.

DICKMAN, M.B.; YARDEN, O. Serine/Threonine Protein Kinases and Phosphatases in filamentous Fungi. **Fungal Genetic Biology**. v. 26. p. 99 – 117. 1999.

DRUZHININA, I.S.; KOPCHINSKIY, A.G. TrichoKEY v. 2 - a DNA oligonucleotide BarCode program for the identification of multiple sequences of *Hypocrea* and *Trichoderma*. *Proceedings of the 8th International Mycological Congress*, Cairns, Australia. 2006.

DRUZHININA, I.S., KOPCHINSKIY, A.G., KUBICEK, C.P. a. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. **Mycoscience**. v. 47. p. 65-54. 2006.

DRUZHININA, I. S.; SCHMOLL, M.; SEIBOTH, B.; KUBICEK, C. P. b. Global Carbon Utilization Profiles of Wild-Type, Mutant, and Transformant Strains of *Hypocrea jecorina*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 72 (3). p. 2126-2133. 2006.

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

DRUZHININA, I.; KUBICEK, C. P. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters?. **Journal of Zhejiang University SCIENCE**. v. 6B(2). p. 100-112. 2005.

DRUZHININA, I.S.; KUBICEK, C.P.; KOMOŃ-ZELAZOWSKA, M.; MULAW, T.B.; BISSETT, J. The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. **BMC Evolutionary Biology**. v. 10. p. 94. 2010.

DUGGAR, B.M. **Rhizoctonia crocorum** (Pres.) DC and **R. solani** Kühn (**Corticium vagum** B. & C.) with notes on other species. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. v. 2. p. 403–458. 1915.

EAPEN, S.J.; BEENA, B.; RAMANA, K.V. Tropical soil microflora of spicebased cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. **Journal Invertebrate Pathology**. v. 88. p. 218–225. 2005.

FENILLE, R. C.; CIAMPI, M. B.; KURAMAE, E. E.; SOUZA, N. L. Identification of *Rhizoctonia solani* associated with soybean in Brazil by rDNA-ITS sequences. **Fitopatologia Brasileira**. v. 28. p. 413-419. 2003.

GALANTE, Y.M.; DE CONTI, A.; MONTEVERDI, R. Application of *Trichoderma* enzymes in the food and feed industries. In: HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. **Trichoderma and Gliocladium**. v. 2. London: Taylor and Francis, London, 1998. P. 327–342.

GORDON, T.R.; MARTYN, R.D. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. **Annual Review of Phytopathology**. v. 35. p. 111–128. 1997.

GOSWAMI, R.S.; KISTLER, H.C. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. **Molecular Plant Pathology**. v. 5. p. 515–525. 2004.

HANSON, L.E.; HOWELL, C.R. Biocontrol efficacy and other characteristics of protoplast fusants between *Trichoderma koningii* and *T. virens*. **Mycological Research**. v.106 p. 321–328. 2002.

HARAN, S.; SCHINCKLER, H.; CHET, I. Molecular mechanism of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. **Microbiology**. v. 142. p. 2312-2331. 1996.

- HARMAN, G. E., PETZOLDT, R., COMIS, A. & CHEN, J b. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of this interaction on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology** v. 94 (2). p. 147-153. 2004.
- HARMAN, G.E.; HOWEL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M a. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**. v.2 (1). p. 43-56. 2004.
- HENRISSAT, B. ; CLAEYSSSENS, M. ; TOMME, P. ; LEMESLE, L. ; MORNON, J. P. Cellulase families revealed by hydrophobic cluster-analysis. **Gene**. v. 81 p. 83 – 95. 1989.
- HENSON, J.M., BUTLER, M.J. AND DAY, A.W. The dark side of mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**. v. 37. p. 447 - 471. 1999.
- HIDE, G.A.; CAYLEY, G.R. Chemical techniques for control of stem canker and black scurf (*Rhizoctonia solani*) disease of potatoes. **Annals of Applied Biology**. v.100. p. 105-116. 1982.
- HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. **Plant Disease**. v. 87, n.01, Jan, 2003.
- HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. **Fungal Genetics and Biology**. v.46. p. 615-631. 2009.
- JAKLITSCH, W.M.; KOMON, M.; KUBICEK, C.P.; DRUZHININA, I.S. *Hypocrea crystalligena* sp. nov., a common European species with a white-spored *Trichoderma* anamorph. **Mycologia**. v. 98. p. 499–513. 2006.
- JAKLITSCH, W.M. European species fo *Hypocrea* Part I. The green-spored species. **Studies in Mycology**. v. 63. p. 1-91. 2009.
- JIANXIN, W.; MINGGUO, Z.; YUEJIAN, L.; ZHONGYIN, Y. Dynamics of resistant population of *Fusarium graminearum* to carbendazim and substitutable fungicide screening. **Journal of Nan jing Agricultural University**. v.25 p.43-47. 2002.
- JONES, D.; FARMER, V. C.; BACON, J. S. D.; WILSON, M. J. Comparison of ultrastructure and Chemical components of cell walls of certain plant pathogenic fungi. **Transactions of the British Mycological Society**. v. 59. p. 11–23. 1972.
- JONES, R. K.; BELMAR, S. B. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. isolated from rice, soybean, and other crops grown in rotation with rice in Texas. **Plant Disease**. v. 73. p. 1004-1010. 1989.

KATAYAMA, A.; MATSUMURA, F. Photochemically enhanced microbial degradation of environmental pollutants. **Environmental Science & Technology**. v.25. p. 1329–1333. 1991.

KINDERMANN, J.; EL-AYOUTI, Y.; SAMUELS, G.J.; KUBICEK, C.P. Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA cluster. **Fungal Genetics and Biology**. v. 24. P. 298–309. 1998.

KOGAN, M. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary development. **Annual Review of Entomology**. v. 43. p. 243-270. 1998.

KOPCHINSKIY, A.G. KOMON, M.; KUBICEK, C.P.; DRUZHININA, I.S. TrichoBLAST: A multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. **Mycology Research**. v.109. p. 657-660. 2005.

KUBICEK, C.; BISSETT, J.; DRUZHININA, I.; KULLNIG-GRANDIGER, C.; SZAKACS, G. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South East Asian isolates. **Fungal Genetics and Biology**. v. 38. p. 310–31. 2002.

KUBICEK, C.P.; KOMON-ZELAZOWSKA, M.; DRUZHININA, I.S. Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**. v.9 (10). p. 753-763. 2008.

KUBICEK, C.P.; MACH, R. L.; PETERBAUER, C. K.; LORITO M. *Trichoderma*: From genes to biocontrol. **Journal of Plant Pathology**. v. 83 (2). p. 11-23. 2001.

KÜÇÜK, C.; KIVANÇ, M.; KINACI, E.; KINACI, G. Determination of the growth and solubilization capabilities of *Trichoderma harzianum* T1. **Biologia**. v. 63 (2). P. 167-170. 2008.

KULLNIG-GRADINGER, C.M.; SZAKACS, G.; KUBICEK, C.P. Phylogeny and evolution of the fungal genus *Trichoderma* — a multigene approach. **Mycology Research**. v.106. p. 757–767. 2002.

KUMAR, R.; SINGH, S. SINGH, O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 35. p. 377–391. 2008.

KUNIEDA-ALONSO, S.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A. Sobrevivência de micélio e escleródios de *Rhizoctonia solani* tratados com *Trichoderma* spp., em restos de cultura de *Eucalyptus* sp. **Fitopatologia brasileira**. v.30 (2). p. 164-168. 2005.

LEITE, R. M. V. B. C. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. Londrina: EMBRAPA Soja, 2005. 3 p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 76).

LIMA, A. L. **Caracterização morfológica, molecular e bioquímica de *Trichoderma* spp isolados de solo do cerrado brasileiro**. Tese (Doutorado) - Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2002.

LISS, S.N.; BREWER, D.; TAYLOR, A.; JONES, G.A. Antibiotic activity of an isocyanide metabolite of *Trichoderma hamatum* against rumen bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 31. p.767–772. 1985.

LOGRIECO, A.; MORETTI, A.; PERRONE, G.; MULÈ, G. Biodiversity of complexes of mycotoxigenic fungal species associated with Fusarium ear rot of maize and Aspergillus rot of grape. **International Journal of Food Microbiology**. v. 119. p. 11–16. 2007.

LUZ, W. C. Manejo integrado de doenças de trigo no século XXI. **Fitopatologia Brasileira** v. 28 (Suplemento) p. 101-109. 2003.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN-ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.66. p. 506 – 577. 2002.

MANITOBA AGRICULTURE. *Sclerotinia* in Canola. 2002. Disponível em : < <http://www.gov.mb.ca/agriculture/crops/diseases/fac07s00.html>>. Acesso em 16 de out. 2011.

MELO, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como Bioprotetores de Plantas. In: LUZ, W.C. (ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas. Passo Fundo – R.S - EMBRAPA**. v.4. p. 261 - 295. 1996.

MICHIELSE, C.B.; REP, M. Pathogen profile update: Fusarium oxysporum. **Molecular Plant Pathology**. v. 10 (3). p. 311–324. 2009.

MONTE, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. **International Microbiology**. v.4. p. 1-4. 2001.

MONTEIRO, V. **Avaliação do perfil de proteínas secretadas pelo isolado de *Trichoderma harzianum* (ALL42) obtido do solo do Cerrado induzido por fitopatógenos**. Tese (Doutorado) - Programa De Pós-Graduação Em Biologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

MUCHA, J.; DAHM, H.; STRZELCZYK, E.; WERNER, A. Synthesis of enzymes connected with mycoparasitism by ectomycorrhizal fungi. **Archives of Microbiology** v. 185 p. 69-77. 2006.

NAITO, S. Ecological studies on teleomorphic and anamorphic stages in *Rhizoctonia* fungi. **Journal Genetics of Plant Pathology**. v. 72. p. 400-403. 2006.

NORTHERN TERRITORY GOVERNMENT. Department of Primary Industry, Fisheries and Mines. Fusarium Wilt of Bananas (Panama Disease). **Agnote**. v.786. 2006. Disponível em: < http://www.nt.gov.au/d/Content/File/p/Plant_Pest/786.pdf>. Acesso em 16 de out. 2011.

PANISSON, E.; REIS, E. M.; BOLLER, W. Quantificação de danos causados pela giberela em cereais de inverno, na safra 2000, em Passo Fundo, RS. **Fitopatologia Brasileira**. v. 28. p. 189-192. 2003.

PANNECOUCQUE, J.; HÖFTE, M. Interactions between cauliflower and *Rhizoctonia* anastomosis groups with different levels of aggressiveness. **BMC Plant Biology**. v. 9. p. 95. 2009.

PARMERTER, J.R.; WHITNEY, H.S. Taxonomy and nomenclature of the imperfect state. In: PARMERTER, J.R. (ed.). ***Rhizoctonia solani: Biology and Pathology***. p. 225. Berkeley: University of California Press. 1970.

PARMERTER, J.R.; WHITNEY, H.S.; PLATT, W.D. Affinities of some *Rhizoctonia* species that resemble mycelium of *Thanatephorus cucumeris*. **Phytopathology**. v. 57. p. 218–223. 1967.

PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. Controle Biológico: Terminologia. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. **Controle Biológico no Brasil – Parasitóides e Predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p.1-16.

PERALDI, A.; BECCARI, G.; STEED, A.; NICHOLSON, P. Brachypodium distachyon: a new pathosystem to study Fusarium head blight and other Fusarium diseases of wheat. **BMC Plant Biology**. v. 11. p. 100. 2011.

POLETTI, I.; MUNIZ, M. F. B.; CECONI, D. E.; SANTIN, D.; WEBER, M. N. D.; BLUME, E. Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causador de podridão-de-raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) na região do Vale do Taquarí-RS. **Ciência Florestal**. v. 16 (1). p. 1-10. 2006.

POLETTI, I.; MUNIZ, M. F. B.; CECONI, D. E.; SANTIN, D.; WEBER, M. N. D.; BLUME, E. Primeira ocorrência de *Pythium* sp. e *Rhizoctonia* sp. causando podridão-de-raízes em ervais no Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**. v. 17 (1). p. 65-69. 2007.

POMELLA, A.W.V. A utilização do controle biológico para grandes culturas – a experiência do grupo Sementes Farroupilha. **Summa Phytopathologica**. v. 34. P. 195-196. 2008.

PURDY, L.H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. **Phytopathology**. v.69. p. 875–880. 1979.

RAMADA, M. H. S.; LOPES, F. A. C.; ULHOA, C. J.; SILVA, R. N. Optimized microplate β -1,3-glucanase assay system for *Trichoderma* spp. screening. **Journal of Microbiological Methods**. v.81. p. 6–10. 2010.

READER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters Applied Microbiology**. v.1. p. 17-20. 1985.

RICE, W. R. Analyzing Tables of Statistical Tests. **Evolution**. v. 43. p. 223-225. 1989.

SAMUELS, G. J.; DODD, S. L.; LU, B.; PETRINI, O.; SCHROERS, H.; DRUZHININA, I. S. The *Trichoderma koningii* aggregate species. **Studies in Mycology**. v. 56. p. 67–133. 2006.

SAMUELS, G.J.; ISMAIEL, A.; BOM, M.C.; DE RESPINIS, S.; PETRINI, O. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. **Mycologia**. v.102(4). p. 944-966. 2010.

SAMUELS, G.J.; ISMAIEL, A. *Trichoderma evansii* and *T. lieckfeldtii*: two new *T. hamatum* - like species. **Mycologia**. v. 101. p. 142–156. 2009.

SEIDL, V.; SCHMOLL, M.; SCHERM, B.; BALMAS, V.; SEIBOTH, B.; MIGHELI, Q.; KUBICEK, C. P. Antagonism of *Pythium blight* of zucchini by *Hypocrea jecorina* does not require cellulase gene expression but is improved by carbon catabolite derepression. **FEMS Microbiology Letters**. v. 257. p. 145-151. 2006.

SCHOFFELMEER, E.A.; KLIS, F.M.; SIETSMA, J.H.; CORNELISSEN, B.J. The Cell Wall of *Fusarium oxysporum*. **Fungal Genetics and Biology**. v. 27. p. 275 – 282. 1999.

SHARON, M.; KUNINAGA, S.; HYAKUMACHI, M.; NAITO, S.; SNEH, B. Classification of *Rhizoctonia* spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. **Mycoscience**. v. 49 (2). p.93-114. 2008.

SHARPLEY, A. N. Phosphorus cycling in unfertilized and fertilized agricultural soils. **Soil Science Society of America Journal**, v.49. p. 905 – 911. 1985.

SILVAN, A.; CHET, I. Degradation of Fungal Cell Walls by Lytic Enzymes of *Trichoderma harzianum*. **Journal of General Microbiology**. v.135. p. 675 – 682. 1989.

SILVEIRA, S.F.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.; SUZUKI, M.S. Controle químico da queima de folhas e da mela de estacas de eucalipto, causadas por *Rhizoctonia* spp. **Fitopatologia Brasileira**. v. 28. p. 642-649. 2003.

SOUZA, A. A. **Produção E Caracterização Bioquímica de uma Fosfatase Ácida de *Trichoderma harzianum* (ALL42)**. Dissertação (Mestrado) - Programa De Pós-Graduação Em Biologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

SUN, P.; YANG, X. B. Light, temperature and moisture effects on Apothecium production of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**. v. 84. p.1287–1293. 2000.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**. v.24. p. 4876–4882. 1997.

TOLEDO-SOUZA, E. D., LOBO-JUNIOR, M.; SILVEIRA, P. M.; CAFÉ FILHO, A. C. Interações entre *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* e *Rhizoctonia solani* na severidade

da podridão radicular do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. v. 39 (1). p. 13-17. 2009.

TSROR, L.; PERETZ-ALON, I. The influence of the inoculums source of *Rhizoctonia solani* on development of black scurf on potato. **Journal of Phytopathology**. v. 153. p. 240-244. 2005.

ULHOA, C.J.; PEBERDY, J.F. Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. **Enzyme Microbial and Technology**. v. 14. p. 236-240. 1992.

VITERBO, A.; RAMOT, O.; CHEMIN, L.; CHET, I. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 81, p. 549-556. 2002.

WALSH, G. A.; POWER, R. F.; HEARDSON, D. R. Enzymes in the animal feed industry. **TIFS**. v. 5, p. 81 – 82, 1994.

WHIPPS, J.M. & LUMSDEN, R.D. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects, in: T. Butt, C. Jackson, N. Magan (Eds.), *Fungal Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. **CABI Publishing**. p. 9–22. 2001.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J (eds). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, pp. 315-322. 1990.

ANEXOS

Anexo 1. Identificação, local de coleta e cultura de origem dos isolados de *Trichoderma* utilizados.

Nomeclatura Enzimologia	Nomeclatura EMBRAPA	Município - Estado	Geolocalização		Cultura agrícola de origem	Identificação
1	17/06	Santo Antônio de Goiás - GO	16° 29' 55,9" S	49° 17' 32,4" W	Feijão	<i>T. erinaceum</i>
2	468/02	Formosa-GO	15° 10' 43,3" S	47° 35' 31,1" W	Feijão	<i>T. asperellum</i>
3	26/03	Dueré - TO	11°22'30"S	49°22'30"W		<i>T. harzianum</i>
4	360/01	Santo Antônio de Goiás - GO	16° 29' 55,9" S	49° 17' 32,4" W	Feijão	<i>T. asperellum</i>
6	03/07	Mucugê - BA	13° 17' 08,1" S	41° 24' 11,8" W		<i>T. koningiopsis</i>
7	481/02	Formosa-GO	15° 10' 43,3" S	47° 35' 31,1" W	Feijão	<i>T. harzianum</i>
8	12/04	Patos de Minas - MG	19° 00' 54,0" S	47° 05' 28,3" W		<i>T. harzianum</i>
9	11/09	Mucugê - BA	13° 17' 08,1" S	41° 24' 11,8" W	Feijão	Desconhecido ***
11	5T/01					<i>T. harzianum</i>
12	476/02	Formosa-GO	15° 10' 43,3" S	47° 35' 31,1" W	Feijão	<i>T. tomentosum</i>
13	45T/01					<i>T. asperellum</i>
14	03/06	Mucugê - BA	13° 17' 08,1" S	41° 24' 11,8" W	Batata	<i>T. koningiopsis</i> **
15	481/01	Formosa-GO	15° 10' 43,3" S	47° 35' 31,1" W		<i>T. harzianum</i>
16	19/03	Santo Antônio de Goiás - GO	16° 29' 55,9" S	49° 17' 32,4" W	Banana	<i>T. erinaceum</i>
17	356/01	Santo Antônio de Goiás - GO	16° 29' 55,9" S	49° 17' 32,4" W	Feijão	<i>T. asperellum</i> **
18	12/06	Patos de Minas - MG	19° 00' 54,0" S	47° 05' 28,3" W		<i>T. harzianum</i>
19	29/15	Taquarituba - SP	23° 35' 43,4" S	49° 12' 54,9" W	Feijão	<i>T. harzianum</i>
20	11/06	Mucugê - BA	13° 17' 08,1" S	41° 24' 11,8" W	Feijão	<i>T. koningiopsis</i>
22	06T/01					<i>T. harzianum</i>
23	05/05	Mucugê - BA	13° 17' 08,1" S	41° 24' 11,8" W		<i>T. harzianum</i>
25	348/01	Inconfidentes-MG	22° 19' 13,0" S	46° 18' 21,5" W	Morango	<i>T. harzianum</i>
26	06/03	Mucugê - BA	13° 17' 08,1" S	41° 24' 11,8" W		<i>T. koningiopsis</i>

28	40T/03					<i>T. asperellum</i>	
29	100T/01					<i>T. harzianum</i>	
30	04/10	Mucugê - BA	13° 17' 08,1'' S	41° 24' 11,8'' W		<i>T. asperellum</i>	
31	400/01	Iraí-MG	18° 59' 22,5'' S	47° 28' 33,1'' W	Feijão	<i>T. asperellum</i>	
32	40/03	Água Fria - GO	14° 45' 18,0'' S	47° 57' 45,4'' W	Feijão	<i>Desconhecido</i>	***
33	05/08	Mucugê - BA	13° 17' 08,1'' S	41° 24' 11,8'' W	Feijão	<i>T. harzianum</i>	
34	328/01					<i>T. asperellum</i>	
35	27/04	Dueré - TO	11°22'30''S	49°22'30''W	Milheto + Brachiaria decumbens	<i>T. harzianum</i>	
36	483/01	Formosa-GO	15° 10' 43,3'' S	47° 35' 31,1'' W	Feijão	<i>T. harzianum</i>	
37	475/02	Formosa-GO	15° 10' 43,3'' S	47° 35' 31,1'' W	Feijão	<i>T. harzianum</i>	
38	482/01	Formosa-GO	15° 10' 43,3'' S	47° 35' 31,1'' W		<i>T. asperellum</i>	
39	46/05	Rio Verde - GO	17° 48' 43,4'' S	51° 19' 48,4'' W	Soja	<i>T. harzianum</i>	
40	397/01	Iraí-MG	18° 59' 22,5'' S	47° 28' 33,1'' W	Feijão	<i>T. harzianum</i>	*
41	488/02	Formosa-GO	15° 10' 43,3'' S	47° 35' 31,1'' W		<i>T. harzianum</i>	
44	489/02	Formosa-GO	15° 10' 43,3'' S	47° 35' 31,1'' W		<i>T. harzianum</i>	
45	490/02	Formosa-GO	15° 10' 43,3'' S	47° 35' 31,1'' W	Feijão	<i>T. harzianum</i>	
46	11/08	Mucugê - BA	13° 17' 08,1'' S	41° 24' 11,8'' W		<i>T. ghanense</i>	
47	325/01	Inconfidentes-MG	22° 19' 13,0'' S	46° 18' 21,5'' W	Morango	<i>T. asperellum</i>	**
48	55/02	Água Fria - GO	14° 45' 18,0'' S	47° 57' 45,4'' W	Morango	<i>Desconhecido</i>	***
49	485/01	Formosa-GO	15° 10' 43,3'' S	47° 35' 31,1'' W		<i>T. harzianum</i>	
51	479/01	Formosa-GO	15° 10' 43,3'' S	47° 35' 31,1'' W		<i>T. harzianum</i>	*
52	29/11	Taquarituba - SP	23° 35' 43,4'' S	49° 12' 54,9'' W	Feijão	<i>T. tomentosum</i>	*
53	05/01	Mucugê - BA	13° 17' 08,1'' S	41° 24' 11,8'' W	Feijão	<i>T. asperellum</i>	
54	11/11	Mucugê - BA	13° 17' 08,1'' S	41° 24' 11,8'' W	Feijão	<i>T. asperellum</i>	
55	247/01	Santo Antônio de Goiás - GO	16° 29' 55,9'' S	49° 17' 32,4'' W		<i>T. asperellum</i>	
58	328/02					<i>T. asperellum</i>	
59	484/01	Formosa-GO	15° 10' 43,3'' S	47° 35' 31,1'' W		<i>T. harzianum</i>	
60	362/02	Santo Antônio de Goiás - GO	16° 29' 55,9'' S	49° 17' 32,4'' W	Feijão	<i>T. asperellum</i>	
61	494/01	Formosa-GO	15° 10' 43,3'' S	47° 35' 31,1'' W	Feijão	<i>T. harzianum</i>	

63	475/01	Formosa-GO	15° 10' 43,3" S	47° 35' 31,1" W		<i>T. harzianum</i>	
64	495/01	Formosa-GO	15° 10' 43,3" S	47° 35' 31,1" W		<i>T. tomentosum</i>	*
65	339/01	Inconfidentes-MG	22° 19' 13,0" S	46° 18' 21,5" W	Morango	<i>T. asperellum</i>	
66	398/01	Iraí-MG	18° 59' 22,5" S	47° 28' 33,1" W	Feijão	<i>T. hamatum</i>	**
68	486/01	Formosa-GO	15° 10' 43,3" S	47° 35' 31,1" W		<i>T. harzianum</i>	
70	483/02	Formosa-GO	15° 10' 43,3" S	47° 35' 31,1" W	Feijão	<i>T. asperellum</i>	
73	03/04	Mucugê - BA	13° 17' 08,1" S	41° 24' 11,8" W		<i>T. koningiopsis</i>	
74	353/02	Inconfidentes-MG	22° 19' 13,0" S	46° 18' 21,5" W	Morango	<i>T. asperellum</i>	
75	25/02	Dueré - TO	11°22'30"S	49°22'30"W		<i>T. harzianum</i>	
77	47T/01	Santo Antônio de Goiás - GO	16° 29' 55,9" S	49° 17' 32,4" W	Soja + Feijão	<i>T. erinaceum</i>	
78	490/01	Formosa-GO	15° 10' 43,3" S	47° 35' 31,1" W		<i>T. harzianum</i>	
80	355/01	Santo Antônio de Goiás - GO	16° 29' 55,9" S	49° 17' 32,4" W	Feijão	<i>T. asperellum</i>	
81	480/02	Formosa-GO	15° 10' 43,3" S	47° 35' 31,1" W	Feijão	<i>T. harzianum</i>	
82	337/01	Inconfidentes-MG	22° 19' 13,0" S	46° 18' 21,5" W	Morango	<i>T. asperellum</i>	
83	349/02	Inconfidentes-MG	22° 19' 13,0" S	46° 18' 21,5" W	Morango	<i>T. asperellum</i>	
84	480/01	Formosa-GO	15° 10' 43,3" S	47° 35' 31,1" W		<i>T. harzianum</i>	
85	26/05	Dueré - TO	11°22'30"S	49°22'30"W	Milheto + Brachiaria brizantha	<i>T. harzianum</i>	
86	11/02	Mucugê - BA	13° 17' 08,1" S	41° 24' 11,8" W	Feijão	<i>T. ghanense</i>	
87	05/03	Mucugê - BA	13° 17' 08,1" S	41° 24' 11,8" W	Feijão	<i>T. harzianum</i>	
88	55/03	Água Fria - GO	14° 45' 18,0" S	47° 57' 45,4" W	Morango	<i>Desconhecido</i>	***
89	487/02	Formosa-GO	15° 10' 43,3" S	47° 35' 31,1" W	Feijão	<i>T. harzianum</i>	
90	45/01	Água Fria - GO	14° 45' 18,0" S	47° 57' 45,4" W	Soja	<i>T. tomentosum</i>	*
92	15/05	Patos de Minas - MG	19° 00' 54,0" S	47° 05' 28,3" W	Tomate	<i>T. harzianum</i>	
93	04/02	Mucugê - BA	13° 17' 08,1" S	41° 24' 11,8" W		<i>T. asperellum</i>	
95	479/02	Formosa-GO	15° 10' 43,3" S	47° 35' 31,1" W	Feijão	<i>T. harzianum</i>	*
97	492/02	Formosa-GO	15° 10' 43,3" S	47° 35' 31,1" W		<i>T. harzianum</i>	
98	346/01	Inconfidentes-MG	22° 19' 13,0" S	46° 18' 21,5" W	Morango	<i>T. harzianum</i>	
99	Tn/02	Holambra-SP	22° 36' 41,1" S	47° 04' 31,3" W	Turfa Nacional	<i>T. asperellum</i>	
101	11T/01	Santo Antônio de Goiás - GO	16° 29' 55,9" S	49° 17' 32,4" W	Milho+Milheto	<i>T. harzianum</i>	*

103	55/01	Água Fria - GO	14° 45' 18,0" S	47° 57' 45,4" W	Morango	<i>T. brevicompactum</i>	
104	75/02	Santo Antônio de Goiás - GO	16° 29' 55,9" S	49° 17' 32,4" W	Arroz + Brachiaria	<i>T. harzianum</i>	
105	346/02	Inconfidentes-MG	22° 19' 13,0" S	46° 18' 21,5" W	Morango	<i>T. asperellum</i>	
106	352/01	Inconfidentes-MG	22° 19' 13,0" S	46° 18' 21,5" W	Morango	<i>T. asperellum</i>	
107	356/02	Santo Antônio de Goiás - GO	16° 29' 55,9" S	49° 17' 32,4" W	Feijão	<i>T. asperellum</i>	
108	333/02	Inconfidentes-MG	22° 19' 13,0" S	46° 18' 21,5" W	Morango	<i>T. asperellum</i>	
109	330/01	Inconfidentes-MG	22° 19' 13,0" S	46° 18' 21,5" W	Morango	<i>T. asperellum</i>	*
110	333/01					<i>T. asperellum</i>	
111	364/01	Santo Antônio de Goiás - GO	16° 29' 55,9" S	49° 17' 32,4" W	Morango / Feijão	<i>T. asperellum</i>	
112	476/01	Formosa-GO	15° 10' 43,3" S	47° 35' 31,1" W	Feijão	<i>T. harzianum</i>	
113	364/02	Santo Antônio de Goiás-GO	16° 29' 55,9" S	49° 17' 32,4" W	Feijão	<i>T. tomentosum</i>	*
114	301/01	Holambra-SP	22° 36' 41,1" S	47° 04' 31,3" W	Turfa Importada	<i>T. virens</i>	
115	21/02	Dueré - TO	11°22'30"S	49°22'30"W	Pousio	<i>T. harzianum</i>	
116	400/02	Iraí-MG	18° 59' 22,5" S	47° 28' 33,1" W	Feijão	<i>T. asperellum</i>	
117	362/01	Santo Antônio de Goiás - GO	16° 29' 55,9" S	49° 17' 32,4" W	Morango	<i>T. erinaceum</i>	
118	26/02	Dueré - TO	11°22'30"S	49°22'30"W		<i>T. harzianum</i>	
119	357/01	Santo Antônio de Goiás - GO	16° 29' 55,9" S	49° 17' 32,4" W	Feijão	<i>T. asperellum</i>	
120	419/02	Iraí-MG	18° 59' 22,5" S	47° 28' 33,1" W		<i>T. tomentosum</i>	*
ALL-42	ALL-42	Rio Verde - GO	17° 48' 43,4" S	51° 19' 48,4" W	Pomar de Goiaba	<i>T. harzianum</i>	*
T00	T00	PAD - Brasília - DF	15° 48' 00" S	47° 51' 50" W	Solo	<i>T. asperellum</i>	

* Identificação pelo TrichoBLAST utilizando ITS 1 - 2 e *tef1* e confirmado utilizando análise Bayesiana com ITS.

** Identificação pelo TrichoBLAST utilizando ITS 1 - 2 e *tef1* e confirmado utilizando análise Bayesiana com *tef1*.

*** Não foi identificado por nenhuma técnica utilizada.

As células vazias condizem com os dados não repassados pela EMBRAPA Arroz e Feijão.

Anexo 2. Artigo formatado para a revista Fungal Biology

Qualis

Fator de Impacto: 2.921

Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from Brazilian cerrado beans crops and its antagonism potential against *Sclerotinia sclerotiorum*

Fabyano Alvares Cardoso Lopes¹, Andrei Stecca Steindorff¹, Alaerson Maia Geraldine², Renata Silva Brandão¹, Valdirene Neves Monteiro³, Murillo Lobo Júnior², Alexandre Siqueira Guedes Coelho⁴, Cirano José Ulhoa¹, Roberto Nascimento Silva⁵

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Goiás (ICB), Goiânia, GO, 74001-970, Brazil.

²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Arroz e Feijão, Rod. GO-462, Km 12, Fazenda Capivara, Zona Rural, CP 179,75375-000, Santo Antônio de Goiás, GO, Brazil.

³Universidade Estadual de Goiás, Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Estadual de Goiás-UnUCET. BR 153, Km 98 Campus Henrique Santillo. 75000-000. Anápolis-GO, Brasil.

⁴School of Agronomy and Engineering of foods, Federal University of Goiás (ICB), Goiânia, GO, 74001-970, Brazil.

⁵Department of Biochemistry and Immunology, School of Medicine, University of São Paulo, 14049-900 Ribeirão Preto, SP., Brazil.

Tel.: +55 16 3602-3260

E-mail address: rsilva@fmrp.usp.br

Abstract

The potential of the genus *Trichoderma* as a biocontrol agent in relation to plant diseases has been recognized since the 1930s. Some species of *Trichoderma* have been used successfully in the commercial biological control of fungal pathogens of interest to agriculture, such as *Sclerotinia sclerotiorum*, a fungus that has devastated several cultures of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Brazil. The aims of this study were to characterize at the molecular level the metabolic profile of different *Trichoderma* strains from Brazilian cerrado, and to evaluate the ability of these to antagonize *S. sclerotiorum* via the production of cell wall-degrading enzymes (CWDEs) and volatile antibiotics. Of twenty-one isolates, 42.86% were identified as *T. asperellum*, 33.33% *T. harzianum*, 14.29% *T. tomentosum* and 4.76% of *T. koningiopsis*, *T. erinaceum*. The *T. asperellum* species showed the greatest CWDE activity, but no species showed a specific secretion of a specific group of CWDE. The 364/01, 483/02 and 356/02 strains of *T. asperellum* showed high and medium specific activities of key enzymes in the mycoparasitic process but did not show a good capacity for antagonism. No significant correlation between CWDE/antagonism or metabolic profile/antagonism were found. The quality of being a good candidate for biological control is more related to environmental adaptation and the type of pathogen than to a specific species of *Trichoderma*.

Keywords: *Trichoderma*, ITS, Phenotype microarray, antagonism, mycoparasitism, CWDE.

Introduction

The genus *Trichoderma* (Ascomycetes, Hypocreales) was first described by Persoon over 200 years ago (Persoon 1794), and consists of anamorphic fungi that mainly inhabit soil, organic matter and decaying trees (Kubicek et al. 2008). *Trichoderma* species are among the most commonly distributed fungi in nature and can be found in ecosystems ranging from tundra to tropical (Samuels 1996). This ability to survive in different regions can be attributed to their diversified metabolic capabilities as well as to their natural competitive aggression (Klein and Eveleigh 1998).

Trichoderma spp. have a large number of mechanisms for survival and proliferation including physical attack and degradation of other fungi, and utilization of complex carbohydrates (Harman et al. 2004). Due to these characteristics, these fungi are economically important and are used in commercial applications such as industrial enzyme production, heterologous protein expression (Kubicek and Penttila 1998), antibiotic production (Sivasithamparam and Ghisalberti 1998) and as biological control agents (BCA) against plant pathogenic fungi (Benitez et al. 2004). However, there are also negative effects caused by *Trichoderma* including indoor contamination (Thrane et al. 2001), pathogenic action against commercial fungi (Seaby 1998) and action as an opportunistic pathogen in immuno compromised humans (Kredics et al. 2003).

The potential of the genus *Trichoderma* as a biocontrol agent in plant disease was first recognized in the early 1930s by Weindling (Weindling 1934) who described the action of mycoparasitic *Trichoderma* against *Rhizoctonia* and *Sclerotinia*, as well as its beneficial effects in controlling plant disease. *Sclerotinia sclerotiorum* can cause a disease known as white mold that affects a wide range of hosts. In Brazil, this disease is one of the major problems in the highly mechanized irrigated winter production of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) (Meinhardt et al. 2002) in Cerrado areas. The brazilian cerrado is a savanna-like region that covers a large area of Brazil and this area are converted to a bean and soybean plantation. This has prompted several studies in this area and some species of *Trichoderma* have been used successfully, including in the commercial biological control of fungal pathogens of interest to agriculture. The control of these pathogens can occur through several mechanisms, the most relevant being: competition for nutrients, production of volatile and nonvolatile antibiotics and production of hydrolytic enzymes (reviewed by Benitez et al. 2004). The mechanism involves the action of hydrolytic enzymes and is known as mycoparasitism.

Mycoparasitism appears to be a complex process involving the recognition of the plant pathogen by chemotropism, with coiling around the pathogen and appresoria formation, followed by cell wall degrading enzymes (CWDE) and peptaibols production (Howell 2003), which is mediated by heterotrimeric G-proteins and mitogen-activated protein (MAP) kinases (Zeilinger and Omann 2007).

Fungi of the genus *Trichoderma* are good producers of hydrolytic enzymes and the most studied of these belong to the chitinolytic (chitinases and N- β -acetylglucosaminidases (NAGase)) and glucanolytic (β -1,3-glucanases) systems followed by protease families (Almeida et al. 2007; De Marco and Felix 2002). The composition of the cell wall of plant pathogens is an important feature for inducing the production of these enzymes. The fungal cell wall is a complex structure consisting of 80-90 % carbohydrate (mostly polysaccharides such as glucans, chitin, cellulose, mannans and others), and 10-20 % proteins, lipids, ions and organic pigments (Elad et al. 1983).

In an attempt to understand the mechanism of mycoparasitism, several studies have been carried out to identify new enzymes involved in this process using genomic and proteomic approaches (Steindorff et al. 2012; Monteiro et al. 2010), to explain the synergism between hydrolytic enzymes, and between enzymes and antibiotics (Reithner et al. 2005), as well as cell signaling during the formation of CWDEs (Silva et al. 2009).

The aims of this study were to characterize CWDE production at the molecular level, and evaluate the antagonistic ability, and metabolic profile of various *Trichoderma* strains isolated from Cerrado in Brazil.

Materials and methods

Microorganisms and culture conditions

Twenty strains of *Trichoderma* spp. (EMBRAPA-CNPAF) isolated from Brazilian cerrado converted to a bean plantation (Table 1), *T. harzianum* (ALL-42) and *S. sclerotiorum* (EMBRAPA-CNPAF) were used in this study. The microorganisms were maintained on potato dextrose agar (PDA) plates at 28°C.

DNA extraction and rDNA amplification/sequencing

DNA was isolated from frozen and lyophilized mycelium according to methodology proposed by Raeder and Broda (1985). The nuclear rRNA gene cluster containing the internal transcribed spacer (ITS) 1 and ITS2 and the 5.8S rRNA gene was amplified using the primer combination ITS1 and ITS4, following the protocol described by White et al. (1990). Similarly, a portion of translation elongation factor 1 alpha gene (*tef1*) (short 5th intron) was amplified using the primers *tef1fw* (5'-GTGAGCGTGGTATCACCA-TCG-3') and *teflrev* (5'-GCCATCCTTGGAGACCA-GC-3') following the protocol described by Kullnig-Gradinger et al. (2002). After amplification, the PCR product was subjected to gel electrophoresis in a 1 % agarose gel and purified using a protocol based on PEG (polyethylene glycol) – 20 % PEG, 2.5 M NaCl, 80 % ethanol and pure ethanol - the product of purification was used for sequencing in a reaction using DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit from GE Healthcare, according to the manufacturer's instructions, and electrophoresed using the ABI Prism 3100 (Applied Biosystems).

Analysis of sequence data

DNA sequences were aligned using the software Clustal X v2.0.12. The terminal regions with poor alignment were manually removed using BioEdit v7.0.5.3, and the remaining portions were aligned together. Sequence analysis of the ITS and *tef1* amplicons was performed using the TRICHOKEY 2.0 (Druzhinina et al. 2005) and TRICHOBLAST (Kopchinskiy et al. 2005) tools available online at <http://www.isth.info/>. The sequences were deposited in GenBank (Table 1).

The phylogenetic reconstruction using the Bayesian approach was performed according to Jaklitsch et al. (2006) through *tef1* gene using Mr. Bayes v3.1.2. The best model proposed by Mr. Modeltest v2.3 based on AIC was a Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) + Gamma distribution (G) model. Markov chain Monte Carlo (mcmc) sampling was performed with 1×10^6 generations. The Bayesian posterior probabilities (pp) were obtained from the 50% majority rule consensus of 15,310 trees (one tree sampled from each 10 generations) after removal of 4000 first trees using the “burnin” process.

The tree was rooted with *tef1* sequence of the OY6607 (FJ619248.1) strain from *T. longibrachiatum*.

Metabolic profile analysis

The global carbon assimilation profiles were evaluated by the Biolog Phenotype MicroArray technique (Druzhinina et al. 2006) using Biolog FF MicroPlate (Biolog).

The *Trichoderma* strains were grown in 2 % malt extract agar under ambient laboratory conditions with diffuse daylight at 25 °C. The inoculums were prepared after conidial maturation (2-3 days) by rolling a sterile, wetted cotton swab in the area that contained the conidia. The conidia were suspended in 16 ml of sterile phytagel (0.25 % Phytagel, 0.03 % Tween 40) in disposable borosilicate tubes (20 x 150 mm). The spore

solution was mixed manually for 5 seconds and adjusted for T_{590} of $75 \% \pm 3 \%$. Afterwards, 100 μ l of spore solution were transferred to each well of the FF MicroPlate. The MicroPlates were kept in the dark at 25 °C. The mycelial growth was measured through A_{750} at 12 h, 24 h and 48 h. Each *Trichoderma* strain was analyzed in three independent experiments using different inoculums. Cluster analyses were performed using Mev v.4.6.1 (Saeed et al. 2003) using the Pearson product-moment correlation coefficient as a similarity statistic, and average linkage clustering as linkage method.

Volatile metabolites from *Trichoderma* spp. against *S. sclerotiorum*

Separate plates containing PDA medium were inoculated in the center with a mycelial disc of 5 mm containing *S. sclerotiorum* or the different *Trichoderma* strains. The lids were removed and two plates were inverted and placed on top of another plate. The two plate bases were then sealed with a double layer of parafilm. The plates were kept in Biochemical Oxygen Demand (B.O.D.) incubator at 25 °C with a photoperiod of 12 h. The pathogen was in the upper plate to avoid any interference by antagonistic spores in the plate inoculated with *S. sclerotiorum*. The moment of evaluation was determined as the time when the pathogen completely covered the control plate without *Trichoderma*. The diameters of pathogens were measured and used to calculate the percentage of inhibition in relation to the control plate. The experiment was conducted with three repetitions for each *Trichoderma* strain and results were compared by analysis of variance and use the Scott-Knott post-test ($\alpha = 5 \%$) to distinguish samples that differ, analyzed using the SISVAR software. The correlation analysis was performed using the STATISTICA 8.0 software and the Pearson correlation.

Dual culture test

To examine the antagonism of *Trichoderma* spp. strains against *S. sclerotiorum*, discs of PDA medium (5 mm diameter) were taken from the edge of actively growing colonies of fresh fungal cultures and placed on the surface of a fresh PDA plate at a spacing of 4 cm. The plates were incubated in BOD at 25 °C with a photoperiod of 12 h. The evaluation was performed when the pathogen completely covered the control plate without *Trichoderma*.

The evaluation of antagonism was carried out according to the classification proposed by Bell et al. (1982) as follows: Grade 1 - *Trichoderma* grows on the pathogen and occupies the entire surface of the medium; grade 1.5 - *Trichoderma* grows on 87.5 % of the surface of the medium; grade 2 - *Trichoderma* grows on about 66.6 % of the surface of the medium; grade 2.5 - *Trichoderma* grows on about 62.5 % of the surface of the medium; grade 3 - *Trichoderma* occupies approximately half of the surface of the medium; grade 3.5 - *Trichoderma* grows on about 37.5 % of the surface of the medium; grade 4 - *Trichoderma* grows on about 33.3 % of the surface of the medium; grade 5 - *Trichoderma* does not grow and pathogen occupies the entire surface of the medium. The experiment was conducted with three repetitions for each *Trichoderma* strain and the results were compared by ANOVA as described above.

Enzyme production and enzymatic assays

For hydrolytic enzyme production, discs (3 mm diameter) from *Trichoderma* strains previously grown on malt extract, yeast extract and glucose (MYG) medium were inoculated into TLE medium ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g.L⁻¹, KH_2PO_4 2.0 g.L⁻¹, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g.L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g.L⁻¹, Urea 0.3 g.L⁻¹, Peptone 1.0 g.L⁻¹, trace elements solution (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}) 0.1 %). As the carbon and nitrogen source

was added lyophilized cell wall of *S. sclerotiorum* (0.5 %) obtained after maceration with mortar and pestle. The cultures were grown in 125 ml conical flasks with constant shaking (120 rpm) at 28 °C. After 48 h, the mycelium was harvested by filtration through filter paper, and the culture filtrate was used as a source of enzymes.

The chitinase, NAGase, acid phosphatase, β -glucosidase, α -mannosidase and ABFAse activities were determined using pnp-derived substrates: p -nitrophenyl-NN-diacetylchitobioside (p -NPNDC) (2.5 mM), p -nitrophenyl- β -N-acetylglucosamine (p -NPAG) (5 mM), p -nitrophenyl-phosphate (p -NPP) (5 mM), p -nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (p -NPGluc) (5 mM), p -nitrophenyl- α -D-manopyranoside (p -NPMan) (5 mM) and p -nitrophenyl- α -L-arabinopyranoside (p -NPABF) (5 mM). The reactions were carried out in microplate assay format. The assay mixtures contained 10 μ l of enzyme solution, 40 μ l of pnp-derived solution and 100 μ l of buffer. The molarity and the pHs of the buffers were: sodium acetate buffer 50 mM, pH 4.8, 5.0, 5.5 and 6.0 for acid phosphatase/ α -L-arabinofuranosidase, chitinase, NAGase and β -glucosidase/ α -mannosidase respectively. After incubation of the mixture at 37 °C for 15 minutes, the reaction was stopped by the addition of 100 μ l of Na₂CO₃ (1 M). The amount of p -nitrophenol (p -NP) was determined spectrophotometrically at A₄₀₅. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme necessary to release 1 μ mol de p -NP per minute. Only enzyme assays with standard deviation (SD) less than 20 % were accepted.

The lipase activity was determined using p -nitrophenyl-palmitate (p -NPPa) (Sigma[®]) as a substrate at a concentration of 5 mM in acetonitrile (Jain et al. 2005). The assay mixtures contained 100 μ l of enzyme solution, 20 μ l of p -NPPa solution and 100 μ l of 0.1 mol.l⁻¹ sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.27 M of NaCl and 0.9

% v/v Triton X-100. After incubation of the mixture at 37 °C for 30 minutes the reaction was transferred to a domestic microwave oven and irradiated for 30 seconds on medium low power to stop the reaction. The enzyme activities were calculated as above. Only enzyme assays with SD less than 20 % were accepted.

The β -1,3-glucanase activity was determined using laminarin (Sigma[®]) as a substrate at a concentration of 0.75 % w/v in sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.0) (Ramada et al. 2010). The assay mixtures contained 10 μ l of enzyme solution and 20 μ l of laminarin solution. After incubation of the mixture at 50 °C for 10 minutes, 100 μ l of 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) were added and incubated at 95 °C for 5 minutes. The amount of reducing sugar was determined spectrophotometrically at A_{540} . One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme necessary to release 1 μ mol of reducing sugar per minute. Only enzyme assays with SD less than 20 % were accepted.

The proteases activities were determined using azocasein (Sigma[®]) as a substrate at a concentration of 0.25 % w/v in phosphate/citrate buffer (50 mM, pH 5.0 and pH 7.0) and Tris-HCl (50 mM, pH 8.5) for acid, neutral and basic proteases respectively (Cabral et al. 2004). The assay mixtures contained 20 μ l of enzyme solution, 40 μ l of azocasein solution and 40 μ l of the respective buffers. After incubation of the mixture at 37 °C for 30 minutes, 100 μ l of trichloroacetic acid (TCA) 10 % w/v were added and the samples incubated at 4 °C for 10 minutes. The samples were centrifuged at 2,500 rpm for 30 minutes and 100 μ l of supernatant were transferred to another microplate containing 100 μ l of NaOH (1 M), and read at A_{450} . One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme necessary to elevate 1 unit of absorbance per minute. Only enzyme assays with SD less than 20 % were accepted.

The protein concentrations of samples were determined by the Bradford assay (Bradford 1976) using bovine serum albumin (BSA-Sigma) as a standard.

The enzyme assays were conducted with two repetitions for each sample and results were compared by ANOVA and use the Scott-Knott post-test ($\alpha = 5\%$) to distinguish samples that differ, analyzed using the SISVAR software.

Results

Molecular identification

The isolates were identified using molecular tool TRICHOKEY 2.0 based on ITS sequence. When it was not possible TrichoBLAST was used for specie identification using both sequences ITS 1 - 2 and *tef1* 5th intron, as indicated in Table 1. The identification was confirmed by Bayesian analysis of *tef1* cluster (Fig.1). Nine out of 21 isolates were identified as *T. asperellum* (42.86 %) followed by seven as *T. harzianum* (33.33 %), three as *T. tomentosum* (14.29 %) and one of each as *T. koningiopsis* (4.76 %) and *T. erinaceum* (4.76 %) (Table 1).

Metabolic profile analysis

The metabolic profiles of isolates were characterized using Biolog FF MicroPlates (Biolog). Separate analyses were performed for mycelial production, measuring turbidity (A_{750}) at 12 h, 24 h and 48 h. Only the turbidity data at 48 h are presented here, representing mycelial formation and assimilation of the test substrate (Fig. 2). The cluster analysis separated the strains into three major groups (Pearson coefficient > 0.8), the first containing a separate group of *T. asperellum* and one strain of *T. tomentosum*, the second containing *T. erinaceum*, *T. koningiopsis*, *T. tomentosum* and *T. harzianum*, the third containing two strains of *T. harzianum*, two strains of *T. harzianum* did not grouped. Clusters I was 70-80 % supported while the clusters II and

III were 0-50 % supported after bootstrap analysis with 1000 iterations. Inside of Cluster II there are two sub-groups formed, one containing *T. koningiopsis* 11/06 and *T. erinaceum* 17/06 supported with 80-90% bootstrap analysis and other containing *T. tomentosum* 364/02, *T. harzianum* 476/01 and *T. harzianum* 494/01 supported with 90-100 % after bootstrap analysis (data not shown). As can be observed, the groups containing *T. harzianum* do not correlate with the groups generated in phylogenetic analysis, indicating variability among species of *T. harzianum* as described by Druzhinina et al. (2010). Even that, internal clustering within *T. harzianum* showed four separated groups (Pearson coefficient > 0.8), indicating a metabolic versatility in these species. These data demonstrate the importance of this tool in identification of *Trichoderma* strains and understanding in a global sense.

Another application of Biolog data is in the analysis of specific metabolic properties of *Trichoderma* species, as can be appreciated visually in Fig. 2 which shows the most assimilable carbon sources. In general, the highest growth detected among all species was with the following carbon sources: D-glucose, glycerol, D-mannitol, N-acetyl-D-glucosamine, i-erythritol, gentiobiose, D-aribitol, D-fructose, dextrin and xylose. On the other hand, poor or non-growth was observed on glucuronamide, (quando colocado na análise, leva a formação de um agrupamento sem sentido), N-acetyl-D-galactosamine, sedoheptulosan, p-Hydroxyphenyl-acetic acid, L-pyroglutamic acid, L-fucose, rhamnose and psicose. *T. asperellum* and *T. tomentosum* 476/02 showed greater growth on substrates, followed by *T. harzianum*, *T. gamsii*, *T. tomentosum*, *T. koningiopsis* and *T. erinaceum*. Specific carbon source species assimilation was found only for *T. asperellum* and *T. tomentosum* 476/02, which was the only one that assimilated D-melezitose.

Potential for antagonistic activity

The potential for antagonism in the strains was assessed by the inhibition of pathogen growth by volatile metabolites produced by isolates of *Trichoderma*, and by direct pairing of cultures. The strains 11/11 (*T. asperellum*) and ALL-42 (*T. harzianum*) showed the greatest inhibition (> 50 %) of *S. sclerotiorum* growth in the volatile metabolites production test. Most strains showed a moderate inhibition ($\cong$ 30%) and only three strains 364/02 (*T. tomentosum*), 400/01 (*T. asperellum*) and 476/02 (*T. tomentosum*) showed an inefficient (< 10 %) inhibition of *S. sclerotiorum* growth (Table 2). In dual culture test the 11/11 (*T. asperellum*) and ALL-42 (*T. harzianum*) as well as the 29/11 strain (*T. tomentosum*) received the best evaluations in Bell's classification (Table 2). Most of the remaining strains showed an efficient and moderate antagonism against *S. sclerotiorum*, and the strains 356/02 (*T. asperellum*), 475/02 (*T. harzianum*) and 479/02 (*T. harzianum*) showed inefficient antagonism (Table 2). Despite observing no statistical difference between the species in growth inhibition of *S. sclerotiorum*, tendency among the species were observed, indicating the variability within the genus *Trichoderma*. Furthermore, a correlation was observed between volatile metabolites production and antagonism against *S. sclerotiorum* ($r = 0.55$; $p = 0.0069$) (data not shown), this outcome indicates the existence of a tendency of the efficient strains in the antagonism process to be efficient in the growth inhibition of *S. sclerotiorum*.

CWDE analysis

In general, when presented with *S. sclerotiorum* cell wall, the strains examined secrete a number of different CWDEs, such chitinases, proteases, glucanase, lipase,

phosphatase, α -mannosidase, α -L-arabinofuranosidase and β -glucosidase (Fig. 3 or Supplemental material 1). The highest chitinase specific activity was found from *T. asperellum* 356/02 (1.067 U.mg^{-1} , $p < 0.001$) followed of three *T. harzianum* strains; ALL-42 (0.626 U.mg^{-1}), 475/02 (0.460 U.mg^{-1}), 487/02 (0.452 U.mg^{-1}) and *T. asperellum* 483/02 (0.438 U.mg^{-1}). The highest NAGase specific activity was obtained with *T. asperellum* 468/02 (6.148 U.mg^{-1} , $p < 0.001$) and isolates *T. asperellum* 356/02 and 483/02 had expressive values but do not statistic differs of others strains that had not expressive values. For acid phosphatase production, two *T. asperellum* strains showed greater activity, namely 357/01 (4.017 U.mg^{-1} , $p < 0.001$) and 400/01 (3.782 U.mg^{-1} , $p < 0.001$), followed by two *T. harzianum* strains, 487/02 (2.364 U.mg^{-1}) and 479/02 (1.638 U.mg^{-1}); and *T. asperellum* 364/01 (1.457 U.mg^{-1}). The β -glucosidase specific activity was highest in *T. asperellum* 364/01 (1.736 U.mg^{-1} , $p < 0.001$) followed by *T. asperellum* 360/01 (1.015 U.mg^{-1} , $p < 0.001$) and by strains that had similar performances, *T. koningiopsis* 11/06 (0.784 U.mg^{-1}), *T. harzianum* 494/01 (0.763 U.mg^{-1}) and *T. erinaceum* 17/06 (0.698 U.mg^{-1}). In relation to ABFase, α -mannosidase and lipase, no strain showed exceptional outcomes.

The 483/02, 364/01 and 468/02 strains of *T. asperellum* showed the highest β -1,3-glucanase specific activity ($3,156 \text{ U.mg}^{-1}$, $3,120 \text{ U.mg}^{-1}$ and $2,703 \text{ U.mg}^{-1}$ respectively, $p < 0.001$). The *T. erinaceum* 17/06 strain showed a strong result ($2,669 \text{ U.mg}^{-1}$) followed by two *T. asperellum* strains, 360/01 ($2,423 \text{ U.mg}^{-1}$) and 356/02 ($2,413 \text{ U.mg}^{-1}$).

The activities of three types of proteases (acid, neutral and basic) were evaluated. The following strains showed high proteolytic activity for these three groups respectively: *T. asperellum* 364/01 (4.960 U.mg^{-1} , 12.770 U.mg^{-1} , 18.770 U.mg^{-1}), *T.*

harzianum 475/02 (4.662 U.mg⁻¹, 7.753 U.mg⁻¹, 8.077 U.mg⁻¹), *T. harzianum* 476/01 (4.414 U.mg⁻¹, 7.063 U.mg⁻¹, 2.587 U.mg⁻¹), *T. tomentosum* 476/02 (4.335 U.mg⁻¹, 7.538 U.mg⁻¹, 6.765 U.mg⁻¹), *T. harzinaum* ALL-42 (3.353 U.mg⁻¹, 7.813 U.mg⁻¹, 4.406 U.mg⁻¹) and *T. asperellum* 483/02 (2.744 U.mg⁻¹, 7.143 U.mg⁻¹, 8.832 U.mg⁻¹). When protease profiles were compared, acid and basic proteases did not show similar ($p < 0.05$) profile while neutral protease showed equal between both ($p < 0.05$).

Discussion

The present study reports for the first time a complete characterization at the molecular and biochemical level of *Trichoderma* strains isolated directly from an agroecosystem in Brazil. This approach was used in order to select potential candidates for biological control in the field against *S. sclerotiorum*. The most common way to identify *Trichoderma* strains includes morphological and molecular techniques. However, studies to assess the biodiversity of *Trichoderma* have demonstrated that the use of only isolated tools is not enough to explain the diversity, principally in *T. asperellum* and *T. harzianum* (Kubicek et al. 2003; Hoyos-Carvajal et al. 2009). A variety of seven species was found in the analyzed strains, mainly *T. asperellum* and *T. harzianum*, followed by *T. tomentosum*. Many studies have demonstrated that neotropical regions like Brazil show a high biodiversity of *Trichoderma* and the species *T. asperellum* and *T. harzianum* are most frequently found (Kubicek et al. 2008; Hoyos-Carvajal et al. 2009; Annes et al. 2010). Due to this high diversity, a correct classification at the species level is sometimes difficult, for example, using only morphological approaches. Even molecular identification is difficult, principally when using only sequences from public data banks such as GenBank that have sequences with wrong identification. However, a specific database and software was developed recently and the identification of species, including new species has become easier (Druzhinina

et al. 2005) and more reliable. Among the 21 strains, only six strains could not be identified using TrichOkey, but was identified by TrichoBLAST, as three isolates of *T. harzianum* and three isolates of *T. tomentosum*, coupled of phylogenetic analysis. This data emphasizes the necessity of others methods to confirm specie identification.

The diversity of *Trichoderma* species is clearly reflected in the metabolic profiles, principally for *T. harzianum*. This species could be grouped with *T. erinacium*, *T. koningiopsis* as well as with *T. tomentosum*. Furthermore, the strain 476/02 (*T. tomentosum*) was grouped with *T. asperellum* and just them metabolize D-melelitose in biolog analysis. Hoyos-Carvajal et al. (2009) also observed this fact and suggest the possibility of genetic interchange between *T. harzianum* and *T. tomentosum*. However, for *T. asperellum* and *T. tomentosum*, our data suggest a similar evolution in metabolism probably in response to environment, since a genetic interchange between these species is impossible because the difference in their genome (Kubicek et al. 2011). In relation to *T. asperellum*, our metabolic data showed a clear two distinct clusters (Fig.2). Hoyos-Carvajal et al. (2009) also observed this behavior in *T. asperellum* strains and suggested a high metabolic diversity in *T. asperellum* isolated from tropical regions. Recently, Samuels et al. (2010) using a combination of genomic, proteomic and classical mycological techniques showed that *T. asperellum* consists of two cryptic species: *T. asperellum*, *T. asperelloides* sp. nov.. Despite this fact, our results did not distinguish this two cryptic species neither in *tef1* nor morphological analysis. These observations taken together support the idea of heterogeneity within the neotropical *T. harzianum* and *T. asperellum* (Hoyos-Carvajal et al. 2009). The number studies of phylogeny using metabolic characteristics has increased lately, it can be a great tool for solving problems in phylogeny based on ITS sequences and principally in screening of *Trichoderma* species for industrial application (reviewed by Atanasova and Druzhinina

2010). Here we grouped unknowns *Trichoderma* clusters (29/11, 364/02, 476/02) (397/01, 479/02, ALL-42) based on ITS and *tef1* sequences and phylogenetic information into a *T. tomentosum* and *T. harzianum* clusters, respectively, and identified a potential candidates in *T. asperellum* for production of α -1,4 and β -1,4 hydrolytic enzymes that will be further investigated for biomass degradation.

The main parameters for success in biological control by *Trichoderma* are the production of CWDE, antibiosis and competition for nutrients (Almeida et al. 2007). Most studies of mycoparasitism analyze the production of chitinases, β -1,3-glucanases and proteases (De Marco et al. 2002; Almeida et al. 2007; Gajera and Vakhia 2010) and this phenomenon is closely related to pathogen cell wall composition (Viterbo et al. 2002). We previously reported that other enzymes such as phosphatases and lipases are involved in mycoparasitism (Silva et al. 2009). Furthermore new enzymes such as α -mannosidase and ABFase, also related to mycoparasitism, are being identified by our group using proteomic approaches (Monteiro et al. 2010). Our results demonstrate that *T. asperellum* produced the best CWDE activities. No species showed secretion of a specific group of CWDE, and a high diversity in the level of secretion of enzymes was found even within in the same species. This fact can be explained by the high complexity of CWDE gene regulation; these genes are subjected to different rates of evolution and adaptation caused by different environmental pressures.

Some strains were revealed as stronger candidates in the process of biological control of *S. sclerotiorum*. The 364/01, 483/02 and 356/02 strains of *T. asperellum* showed high and medium specific activities of key enzymes in the mycoparasitic process, such as for chitinase, NAGases, β -1,3-glucanases, proteases and the capacity of to metabolize several substrates in Biolog analysis, important for nutrient competition.

The highest specific activity of acid phosphatase observed in these strains is another important point. It is known that acid phosphatase is involved in the release of inorganic phosphate from soil that this can be used by plants (Altomare et al. 1999). Thus, the utilization of these strains in the biological control of *S. sclerotiorum* can contribute to plant development.

The low specific activity of ABFase, α -mannosidase and lipase found in *Trichoderma* strains could be explained by the small amount of their substrate in the composition of *S. sclerotiorum* cell wall (Bartnicki-Garcia 1968), since most CWDEs are inducible by substrate. Monteiro et al. (2010) reported high levels of α -mannosidase from *T. harzianum* in the presence of *R. solani*, and Silva et al. (2009) also observed the same with lipase from *T. reesei* during mycoparasitism against *Pythium ultimum*, suggesting that the secretion of these enzymes is phytopathogen dependent.

Unfortunately high production of CWDEs does not guarantee successful biocontrol by *Trichoderma*. The process is complex and many other factors must be considered before choosing an isolate for field application. These include analysis of the ability of *Trichoderma* to produce and/or resist metabolites, antibiosis, modification of rhizosphere, production of toxic compounds and/or antibiotics, increase in plant growth (biofertilization), stimulation of plant-defense mechanisms and, most importantly, the survival of the *Trichoderma* in the environment (revised by Benitez et al. 2004). For instance, Almeida et al. (2007) did not find correlation between CWDE production and frequency of coiling during the screening of *Trichoderma* strains for biological control of *R. solani*. Here, we found significant correlation ($r > 0.5$; $p < 0.01$) only between proteases, chitinase/antagonism and glucanase/basic protease (data not shown) but is

necessary caution with these outcomes because the numbers of samples used in this work is small and it need a large group of sample to obtain a data more reliable.

The results of antibiosis and antagonism analyses showed the process not to be species-dependent. Different strains of the same species exhibited different results and no correlation between species was found, only synergism between antibiosis and antagonism were found. The same results were reported by Annes et al. (2010) during characterization of field isolates of *Trichoderma* for antagonism of *R. solani*. Furthermore, no synergistic correlation between antagonism and CWDE production was detected (data not shown), excepted for chitinase. For example, despite the 364/01, 483/02 and 356/02 strains of *T. asperellum* showing high CWDE production, the same strains did not show a good capacity for antagonism. Furthermore, the metabolic capacity seems not to be correlated with antagonism, since the best antagonism candidates (ALL42; 11/11 and 29/11) showed different profiles in biologic analysis (Fig. 2, isolated marked with a blue rectangle). These results stress the complexity of events that occur during biological control by *Trichoderma*.

In an attempt to develop a rapid screening system for biocontrol-competent strains of *Trichoderma*, Scherm et al. (2009) identified by subtraction hybridization some specific genes that could be used as markers. However, even in these groups of genes, the authors discuss that the ability for antagonistic activity can be related to the efficiency of expression of these genes in the presence of the host, showing the diversity even within species. These contexts support the idea that the capacity to be a good candidate for biological control is more related to environmental adaptation and the type of pathogenic challenge than to specific species of *Trichoderma*. Due to this fact, formulations of *Trichoderma* to be applied in the field should be considered containing

a mixture of different species/strains with different antagonism and mycoparasitism characteristics related to pathogen type, and most importantly, strains should be used that are well adapted to the agroecosystem where they will be applied. Thus, the development and use of a universal product for biological control is increasingly far from being realized.

The molecular, enzymatic and metabolic analyses reported in this study succeeded in identifying *Trichoderma* strains that have great potential for use in the combat against the phytopathogenic fungus *S. sclerotiorum*. We demonstrated that the tools of analysis are important to the identification of good candidates for biological control. These data, together with data from field testing, currently underway, will be fundamental to the selection of strains of *Trichoderma* in order to achieve more efficient formulations for the control of fungal pathogens.

Acknowledgements

This work was funded by FINEP (Research and Projects Financing) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (FINEP / CT-AGRO/01.07.0551.00 / Ref. 0845/07). F.A.C.L is supported by CAPES fellowship. C.J.U is supported by a biotechnology research grant (CNPQ), FAPEGO and FUNAPE (Proc.: 20081026700108). R.N.S is supported by The State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) (proc. 2010/15683-8).

References

- Almeida FB, Cerqueira FM, Silva RN, Ulhoa CJ, 2007. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters* **29**: 1189-1193.
- Altomare C, Norvell WA, Björkman T, Harman GE, 1999. Solubilization of Phosphates and Micronutrients by the Plant-Growth-Promoting and Biocontrol Fungus

Trichoderma harzianum Rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 2926-2933.

Anees M, Tronsmo A, Edel-Hermann V, Hjeljord LG, Héraud C, Steinberg C, 2010. Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biology* **114**: 691-701.

Atanasova L, Druzhinina IS, 2010. Clonal species *Trichoderma parareesei* sp. nov. likely resembles the ancestor of the cellulase producer *Hypocrea jecorina* / *T. reesei*. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 7259-7267.

Bartnicki-Garcia S, 1968. Cell Wall Chemistry, Morphogenesis and Taxonomy of Fungi. *Annual Review of Microbiology* **22**: 87-108.

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

Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC, 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* **07**: 249-260.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.

Cabral CM, Cherqui A, Pereira, A, Simões N, 2004. Purification and characterization of two distinct metalloproteases secreted by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus* sp. strain Az 29. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 3831-3838.

De Marco JL, Felix CR, 2002. Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches'broom disease. *BMC Biochemistry* **3**:1-7.

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

Druzhinina IS, Kubicek CP, Komoń-Zelazowska M, Mulaw TB, Bissett J, 2010. The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. *BMC Evolutionary Biology* **10**: 94.

Druzhinina IS, Schmoll M, Seiboth B, Kubicek CP, 2006. Global carbon utilization profiles of wild-type, mutant, and transformant strains of *Hypocrea jecorina*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 2126-2133.

Elad Y, Chet I, Boyle P, Henis Y, 1983. Parasitism of *Trichoderma harzianum* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. Scanning microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology* **73**: 85-88.

Gajera HP, Vakharia DN, 2010. Molecular and biochemical characterization of *Trichoderma* isolates inhibiting a phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* Van Tieghem. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **74**: 274-282.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M, 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* **02**:43-56.

Howell CR, 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* **87**: 04-10.

Hoyos-Carvajal L, Orduz S, Bissett J, 2009. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genetics and Biology* **46**: 615-631.

Jain P, Jain S, Gupta MN, 2005. A microwave-assisted microassay for lipases. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **381**: 1480-1482.

Jaklitsch WM, Komon M, Kubicek CP, Druzhinina IS, 2006. *Hypocrea crystalligena* sp.nov., a common European species with a white-spored *Trichoderma* anamorph. *Mycologia* **98**: 499-513.

Klein D, Eveleigh DE, 1998. Ecology of *Trichoderma*. In: Kubicek CP, Harman GE (eds), *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*, Taylor & Francis Ltd, London, pp. 57-74.

Kopchinskiy AG, Komon M, Kubicek CP, Druzhinina IS, 2005. TrichoBLAST: A multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. *Mycology Research* **109**: 657-660.

Kredics L, Antal Z, Doczi I, Manczinger L, Kevei F, Nagy E, 2003. Clinical importance of the genus *Trichoderma*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **50**: 105-117.

Kubicek CP, Bissett J, Druzhinina I, Kullnig-Gradinger C, Szakacs G, 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South- East Asian isolates. *Fungal Genetics and Biology* **38**: 310-319.

Kubicek CP, Komon-Zelazowska M, Druzhinina IS, 2008. Fungal genus *Hypocrea* / *Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* **9** (10): 753-763.

Kubicek CP, Penttilä ME, 1998. Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. In: Kubicek CP, Harman GE (eds), *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*, Taylor & Francis Ltd, London, pp. 49-71.

Kubicek CP, Herrera-Estrella A, Seidl-Seiboth V, Martinez DA, Druzhinina IS, Thon M, Zeilinger S, Casas-Flores S, Horwitz BA, Mukherjee PK, Mukherjee M, Kredics L, Alcaraz LD, Aerts A, Antal Z, Atanasova L, Cervantes-Badillo MG, Challacombe J, Chertkov O, McCluskey K, Coulpier F, Deshpande N, von Döhren H, Ebbole DJ, Esquivel-Naranjo EU, Fekete E, Flippin M, Glaser F, Gómez-Rodríguez EY, Gruber S, Han C, Henrissat B, Hermosa R, Hernández-Oñate M, Karaffa L, Kosti I, Le Crom S, Lindquist E, Lucas S, Lübeck M, Lübeck PS, Margeot A, Metz B, Misra M, Nevalainen H, Omann M, Packer N, Perrone G, Uresti-Rivera EE, Salamov A, Schmoll M, Seiboth B, Shapiro H, Sukno S, Tamayo-Ramos JA, Tisch D, Wiest A, Wilkinson HH, Zhang M, Coutinho PM, Kenerley CM, Monte E, Baker SE, Grigoriev IV, 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology* **12**: R40

Kullnig-Gradinger CM, Szakacs G, Kubicek CP, 2002. Phylogeny and evolution of the fungal genus *Trichoderma* - a multigene approach. *Mycology Research* **106**: 757-767.

Meinhardt LW, Wulff NA, Bellato CM, Tsai SM, 2002. Telomere and microsatellite primers reveal diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Brazil. *Fitopatologia Brasileira* **27**: 211-215.

Monteiro V, Nascimento SR, Steindorff A, Costa F, Noronha E, Ricart C, de Sousa M, Vainstein M, Ulhoa C, 2010. New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. *Current Microbiology* **61**: 298-305.

Persoon CH, 1974. Dipositio method icafungorum. *Römer's Neues Magazin Botanische* **1**: 81-128.

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

Ramada MHS, Lopes FAC, Ulhoa CJ, Silva RN, 2010. Optimized microplate β -1,3-glucanase assay system for *Trichoderma* spp. screening. *Journal of Microbiological Methods* **81**: 6-10.

Reithner B, Brunner K, Schuhmacher R, Peissl I, Seidl V, Krska R, Zeilinger S, 2005. The G protein alpha subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genetics and Biology* **42**:749-760.

Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J, 2003. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* **34**: 374-378.

Samuels GJ, 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycological Research* **100**: 923-935.

Samuels GJ, Ismaiel A, Bon MC, De Respinis S, Petrini O, 2010. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia* **102**(4): 944-966

Scherm B, Schmoll M, Balmas V, Kubicek CP, Migheli Q, 2009. Identification of potential marker genes for *Trichoderma harzianum* strains with high antagonistic

potential against *Rhizoctonia solani* by a rapid subtraction hybridization approach. *Current Genetics* **55**: 81-91.

Seaby D, 1998. *Trichoderma* as a weed would or pathogen in mushroom cultivation. In: Kubicek CP, Harman GE (eds), *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*, Taylor & Francis Ltd, London, pp. 267-287.

Silva RN, Steindorff AS, Ulhoa CJ, Félix CR, 2009. Involvement of G-alpha protein GNA3 in production of cell wall-degrading enzymes by *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) during mycoparasitism against *Pythium ultimum*. *Biotechnology letters* **34**: 531-536.

Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Kubicek CP, Harman GE (eds), *Trichoderma & Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics*. Taylor and Francis Ltd, London, pp. 139-191.

Steindorff AS, Silva RN, Coelho ASG, Nagata T, Noronha EF, Ulhoa CJ, 2012. *Trichoderma harzianum* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in mycoparasitism against *Fusarium solani*. *Biological Control* <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.01.014>.

Thrane U, Poulsen SB, Nirenberg HI, Lieckfeldt E, 2001. Identification of *Trichoderma* strains by image analysis of HPLC chromatograms. *FEMS Microbiology Letters* **203**: 249-255.

Viterbo A, Ramot O, Chemin L, Chet I, 2002. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**: 549-56.

Weindling R, 1934. Studies on lethal principles effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology* **24**: 1153-1179.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, pp. 315-322.

Zeilinger S, Reithner B, Scala V, Peissl I, Lorito M, Mach RL, 2005. Signal transduction by Tga3, a novel G protein alpha subunit of *Trichoderma atroviride*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:1591-1597.

Figure Legend

Fig. 1 The consensus tree obtained by Bayesian analysis of *tef1* sequences with the HKY + G model. Strains *T. asperellum* 11/11, 356/02, 357/01, 360/01, 362/02, 364/01 are represent by *T. asperellum* 468/02 because them have same *tef1* sequence.

Fig. 2 The global carbon assimilation profiles from strains of *Trichoderma* (A_{750} , 48h). The mycelium growth is given in absorbance corresponding scale of color. Cluster analyses were based in the grown on fonts of carbon evaluated using Pearson product-moment correlation coefficient as a similarity statistic, and average linkage clustering as linkage method. The experiment was carried out in three independent way and the results is showed with mean error less than 10%. Blue rectangle shows the isolates with the best antagonism/volatile metabolites production.

Fig. 3 Specific activities of CWDEs from strains of *Trichoderma* grown on *S. sclerotiorum* cell wall. (A) Cladogram obtained by Bayesian analysis of *tef1* sequences. Specific activities of enzymes that have pnp-derivatives as substrates: chitinase, NAGase, acid phosphatase, β -glucosidase, α -manosidase, ABFase and lipase (B). Specific activities of β -1,3-glucanase (C), acid, neutral and basic proteases (D). All the experiments were performed in triplicate and the results show the mean with error less than 10%.

* The highest specific activities for each enzyme using ANOVA with Scott-Knott post-test ($\alpha = 5\%$).

Table Title

Table 1 Identification and sequences of *Trichoderma* strains used.

Isolate	Geolocalization	Identification ^a	Accession number	
			ITS 1 and 2	<i>tef1</i>
11/06	-13° 13' 05.01" -41° 22' 36.50"	<i>T. koningiopsis</i>	HQ857120	HQ857137
11/11	-13° 13' 05.01" -41° 22' 36.50"	<i>T. asperellum</i>	HQ857129	HQ857151
17/06	-16° 29' 36.59" -49° 18' 06.13"	<i>T. erinaceum</i>	HQ857130	HQ857133
29/11	-23° 25' 29.57" -49° 13' 28.18"	<i>T. tomentosum</i> *	HQ857127	HQ857149
356/02	-16° 30' 12.63" -49° 17' 27.13"	<i>T. asperellum</i>	HQ857123	HQ857153
357/01	-16° 30' 07.57" -49° 17' 27.01"	<i>T. asperellum</i>	HQ857114	HQ857134
360/01	-16° 30' 10.22" -49° 17' 37.12"	<i>T. asperellum</i>	HQ857131	HQ857143
362/02	-16° 30' 09.80" -49° 17' 35.05"	<i>T. asperellum</i>	HQ857124	HQ857132
364/01	-16° 30' 06.87" -49° 17' 22.10"	<i>T. asperellum</i>	HQ857112	HQ857144
364/02	-16° 30' 06.87" -49° 17' 22.10"	<i>T. tomentosum</i> *	HQ857116	HQ857147
397/01	-18° 56' 50.55" -47° 29' 46.05"	<i>T. harzianum</i> *	HQ857108	HQ857139
400/01	-18° 56' 29.60" -47° 29' 46.05"	<i>T. asperellum</i>	HQ857121	HQ857150
468/02	-15° 39' 48.08" -47° 20' 41.57"	<i>T. asperellum</i>	HQ857128	HQ857152
475/02	-15° 39' 48.08" -47° 20' 41.57"	<i>T. harzianum</i>	HQ857115	HQ857145
476/01	-15° 39' 48.08" -47° 20' 41.57"	<i>T. harzianum</i>	HQ857109	HQ857140
476/02	-15° 39' 48.08" -47° 20' 41.57"	<i>T. tomentosum</i> *	HQ857119	HQ857146
479/02	-15° 39' 48.08" -47° 20' 41.57"	<i>T. harzianum</i> *	HQ857118	HQ857142
483/02	-15° 39' 48.08" -47° 20' 41.57"	<i>T. asperellum</i>	HQ857110	HQ857154
487/02	-15° 39' 48.08" -47° 20' 41.57"	<i>T. harzianum</i>	HQ857113	HQ857138
494/01	-15° 39' 48.08" -47° 20' 41.57"	<i>T. harzianum</i>	HQ857125	HQ857155
ALL-42	-17° 46' 02.25" -50° 56' 24.00"	<i>T. harzianum</i> *	HQ857122	HQ857136

*TrichoBLAST identification using ITS 1 - 2 and *tef1* 5th intron and confirmed using Bayesian analysis with *tef1*.

Table 2 Antagonism and growth inhibition of *Trichoderma* strains against *S. sclerotiorum*.

Strains	Species	Antagonism*		Growth inhibition by volatile Metabolites** (%)	
11/06	<i>T. koningiopsis</i>	2.00	b	40.67	e
11/11	<i>T. asperellum</i>	1.33	a	55.50	e
17/06	<i>T. erinaceum</i>	3.00	c	40.00	e
29/11	<i>T. tomentosum</i>	1.00	a	31.67	e
356/02	<i>T. asperellum</i>	3.33	d	29.33	e
357/01	<i>T. asperellum</i>	2.67	c	32.00	e
360/01	<i>T. asperellum</i>	1.67	b	33.33	e
362/02	<i>T. asperellum</i>	2.00	b	20.00	f
364/01	<i>T. asperellum</i>	2.00	b	20.67	f
364/02	<i>T. tomentosum</i>	2.67	c	8.33	f
397/01	<i>T. harzianum</i>	3.00	c	26.33	f
400/01	<i>T. asperellum</i>	3.00	c	8.33	f
468/02	<i>T. asperellum</i>	2.00	b	25.00	f
475/02	<i>T. harzianum</i>	4.00	d	15.00	f
476/01	<i>T. harzianum</i>	3.00	c	24.00	f
476/02	<i>T. tomentosum</i>	2.00	b	8.33	f
479/02	<i>T. harzianum</i>	3.67	d	23.33	f
483/02	<i>T. asperellum</i>	2.67	c	16.67	f
487/02	<i>T. harzianum</i>	3.00	c	18.67	f
494/01	<i>T. harzianum</i>	2.00	b	21.67	f
ALL-42	<i>T. harzianum</i>	1.00	a	60.00	e

* classification proposed by Bell.

** Similar letters do not differ by Scott Knott post-test ($\alpha = 5\%$).

a = high efficient; b = efficient; c = moderated; d = inefficient; e = efficient in growth inhibition; f = inefficient in growth inhibition.

Figures

Fig. 1

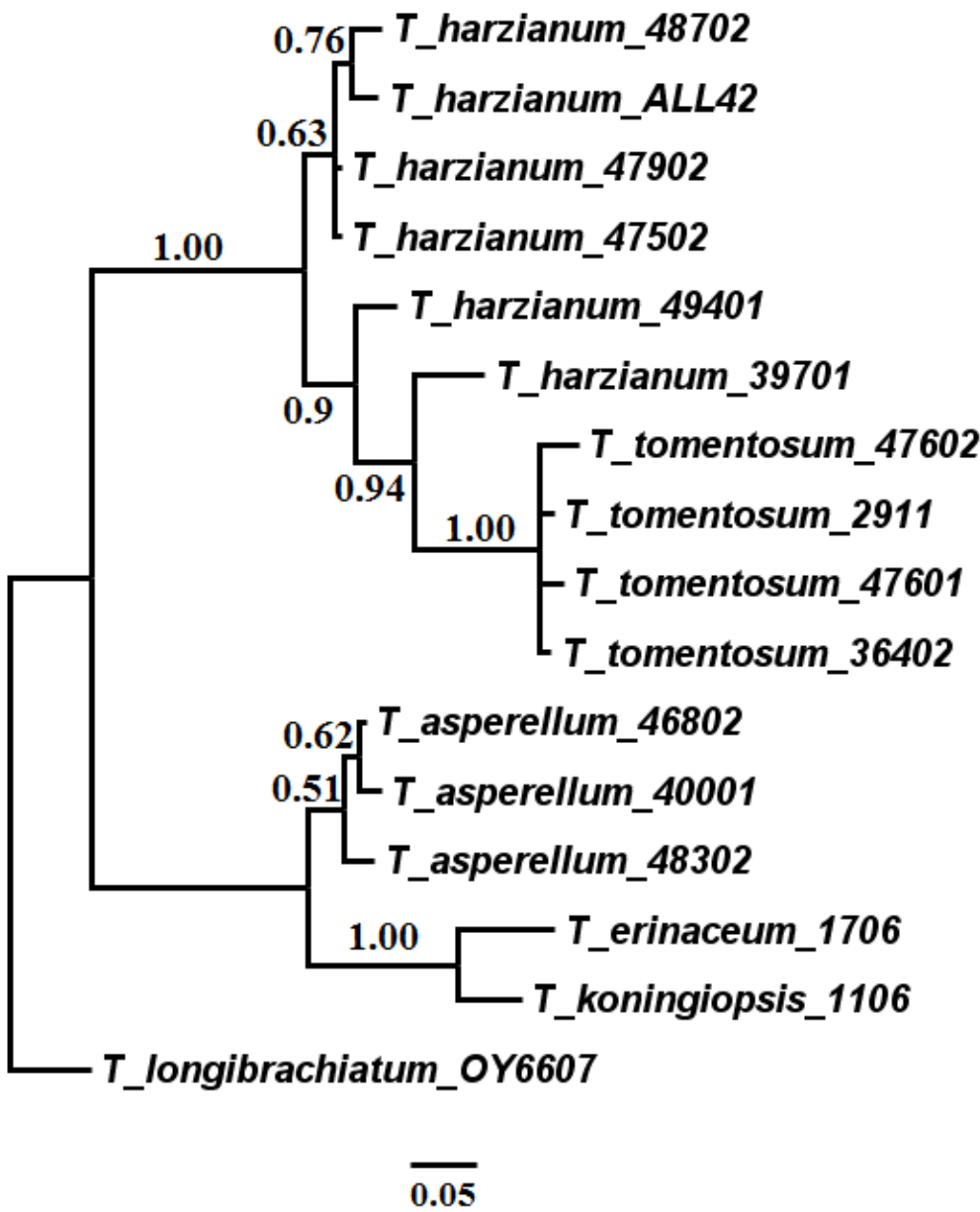


Fig.2

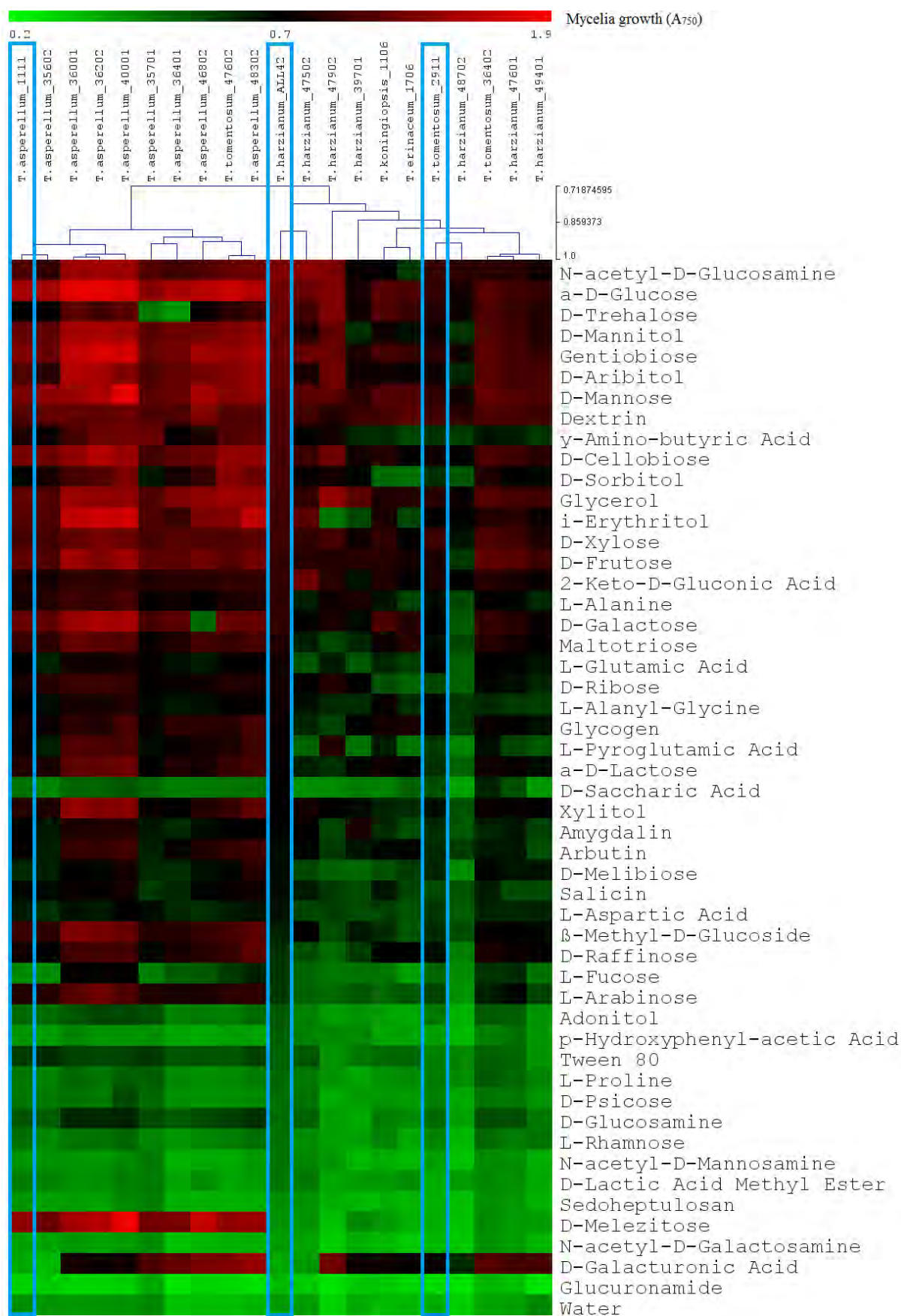
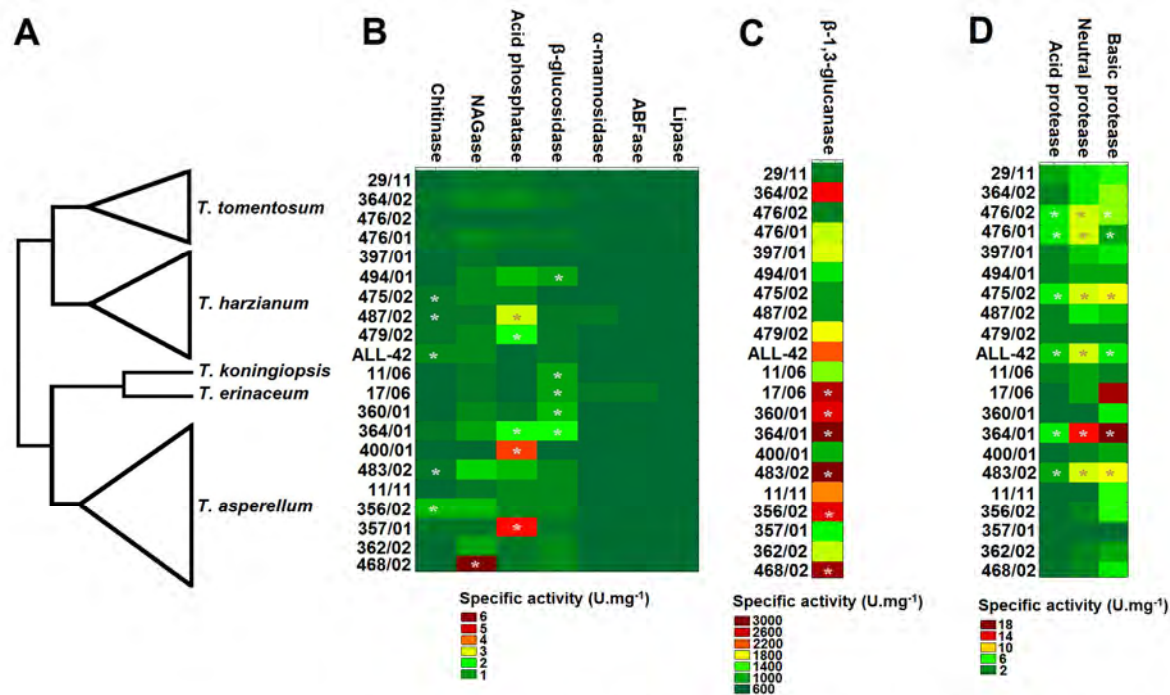


Fig.3



* The highest specific activities for each enzyme using ANOVA with Scott-Knott post-test ($\alpha = 5\%$).

Anexo 3. Artigo publicado na Journal of Microbiological Methods

Qualis B1

Fator de impacto: 2,018