UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÈNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS

IZAEL OLIVEIRA SILVA

Etiologia da podridão radicular da mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz) var. Rosinha no Estado de Alagoas e Influência de *Trichoderma* spp. sobre o desenvolvimento de *Fusarium falciforme*

Rio Largo-AL
2016

IZAEL OLIVEIRA SILVA

Etiologia da podridão radicular da mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz) var. Rosinha no Estado de Alagoas e Influência de *Trichoderma* spp. sobre o desenvolvimento de *Fusarium falciforme*

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas como requisito para obtenção do grau de Doutor em Proteção de Plantas.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Edna P. da Rocha Amorim

Rio Largo-AL

2016

Folha de Aprovação

IZAEL OLIVEIRA SILVA

Etiologia da podridão radicular da mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz) var. Rosinha no Estado de Alagoas e Influência de *Trichoderma* spp. sobre o desenvolvimento de *Fusarium falciforme*

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas.

_____

Profª Drª Edna Peixoto da Rocha Amorim,
Universidade Federal de Alagoas
(Orientadora)

Banca Examinadora:

_____

Prof.ª Dr.ª Juliana Paiva Carnaúba Ramos,
Instituto Federal de Alagoas
(Examinador Externo)

_____

Dra. Iraildes Pereira Assunção
Universidade Federal de Alagoas
(Examinador Interno)

_____

Dra Julio Alves Cardoso dos Santos
Universidade Federal de Alagoas
(Examinador interno)

Ao Pai de Misericórdia, que com toque sutil de amor, me fez "enxergar" a graça de reencontrar o sentido de ser melhor.
À Ele que me sustentou e me guiou nos meus momentos mais escuros e cegos,
à Ele que me abriu os olhos da alma, quando a vida me fechou o da carne.
Bendito seja Deus para sempre em tudo que me acontece,
à Ele toda Honra, toda Glória agora e para sempre.

OFEREÇO

À minha família,
que em todos os momentos de minha vida foram presentes,
tanto na alegria quanto na tristeza sempre foram minha fortaleza.

HOMENAGEM

À professora e Mãe acadêmica EDNA PEIXOTO DA ROCHA AMORIM, por toda a graciosidade de Mãe, compreensiva, incentivadora, protetora e afetuosa,
meu terno carinho, admiração e respeito.

EXEMPLO

A meu amigo-irmão NELSON AUGUSTO DO NASCIMENTO JÚNIOR,
que em todos os momentos me encorajou,me guiou com seu exemplo de pessoa,
de pai e profissional.

GRATIDÃO

A meu Irmão de todas as horas GRAZZIANO DUARTE SILVA SANTOS,
por tudo desprendimento e apoio nos momentos mais cruciais
de minha vida meu grande exemplo de amizade.

ADMIRAÇÃO

Aos meus pais José Raimundo e Mª Juligia Oliveira Silva,
Meus irmãos, Beclaute, Ibéria, Wcleuton e Maricléia
Aos meus sobrinhos Thomas, Adrian Guilherme, Sahvanna,
Miguel, Sophia e Ana Pietra. A todos os meus familiares,

DEDICO

Submeto-me a Teu querer, eu que um dia esqueci, meu principio meu fim,
fez-se visível quando já não podia ver, fez-se presente em meu deserto,
fostes Misericórdia diante de minha miséria,
me amou e se fez encontrar no momento exato em que me perdi,
agora resgatado por Ti, sou livre para permanecer a Teu lado,
meu primeiro Amor, meu Deus, meu Senhor.
(Izael Oliveira Silva)

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelo dom da vida e por ter me dado o maior presente que tenho até hoje, minha família. A Universidade Federal de Alagoas, e ao Centro de Ciências Agrárias (CECA) por me proporcionar a conclusão de mais uma etapa da minha longa jornada em busca dos meus objetivos;

A CNPq-CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado. Ao Laboratório de Fitopatologia coordenado por Profª. Drª. Edna Peixoto da Rocha Amorim. Ao corpo docente do Programa de Pós Graduação em Proteção de Plantas, pelos ensinamentos; Aos Profs. Drs, Iraildes Pereira Assunção e Gaus Silvestre de Andrade, pela oportunidade, apoio e paciência;

A minha Orientadora Profª. Dra. Edna da Rocha Amorim, pelas instruções dadas, além do aprendizado diário, o qual foi de suma importância para execução deste trabalho. A ela minha Admiração e respeito além dos momentos de descontração e ensinamento, dos quais sem sombra de dúvidas me fizeram ver que tudo pode ficar melhor em mãos talentosas;

Um agradecimento muito especial à Profª Dra Adriana Duarte, que sempre me ajudou seja em incentivo, defesa e dispondo de seus estagiário Antonio e Laysa para me auxiliar nas etapas dos experimentos no momento mais intenso de minha vida, meu sinceros agradecimentos. A Profª Drª. Fátima Muniz, pela convivência harmoniosa pelos conselhos e ensinamentos;

Aos meus pais, José Raimundo Silva, pelo exemplo de força e segurança e minha amada mãe Maria Julígia Oliveira Silva, a qual "na alegria ou na tristeza sempre foi minha fortaleza" por todo carinho, apoio e alegria transmitidas durante todos estes anos;

Aos Meus irmãos, Beclaute, Ibéria, Wcleuton, Maricléia, por sempre me apoiarem e pela presença em todos os momentos sendo os meus exemplos de persistência e conquistas. As minhas cunhadas, Gilmara e Leiziane, e cunhados Adriano e Odijas, por serem grandes e verdadeiros irmãos;

Aos meus sobrinhos amados, Thomas, Adrian Guilherme, Sahvana, Miguel, Sophia e Ana Pietra pelos abraços, sorrisos e amor demonstrado a cada dia. A meus avós paternos Manoel e Claudemira "in memory" que foi presente em minha infância como mãe amorosa. A meu avô José Ferreira "in memory" pelos momentos de alegria e descontração que tivemos;E ao Vô Manuel "in memory" que apesar de não o ter conhecido carrego as históras de sua pasciência e retidão que são exemplos para mim.

A minha guerreira e Amada avó Cleonice "in memory" a qual sem sobra de dúvidas foi guerreira, amorosa e vitoriosa. A mulher mais forte que já pude conhecer, que sorria mesmo tendo vários motivos para chorar, que num olhar distante, profundo, mas acima de tudo tranquilo, transmitia a paz e o amor que nos fez ter certeza que podiamos ir mais além do que imaginamos. A senhora minha avó o meu muito obrigado por ter me dado o meu maior e mais precioso presente, a minha amada Mãe;

A meus tios e tias maternos pelo afeto, que de várias formas e maneiras foi demonstrado. A tia Ní pela alegria irradiante, a Rosa pela dedicação e cuidado, a Zeta pelas saudosas brincadeiras e orações e a Zezé pelo carinho que todas às vezes me é dado quando nos vemos. Aos meus tios Jota, Duda, Ismar e Giselho "in memory" por participarem de todos os momentos de descontração;

A meus tios paternos o meu obrigado, em especial a Jurimar e Mª das Dores José Moreira "in memory" Lourival, Luiz José, Damião e Maria e Maria José os quais de forma direita ou indireta participaram de minha vida;

A meu grande amigo e irmão Grazziano e Luana, por serem verdadeiros irmãos, sendo companheiros, se dispondo de forma muito expressiva em minha vida, estando sempre perto nos momentos mais importante de minha vida;

Às Dra. Juliana Carnauba e Kirley Michelly pela amizade de longa data e que até hoje são grande orgulho para mim. E a Magdaly que com sua alegria sempre soube arrancar um sorriso de meu rosto;

A todos os meus amigos na fé do TLC são Miguel em especial a Jayane, Janderson, Claudemir, Rose, Vicente Jocicleide (Keu) e seu filho Neto, Thais, Felipe, Luan e por ultimo mais tão importante quanto, Thamires aquela que hoje aquece meu coração. Meu muito obrigado;

À Ana Izabel, que mesmo na distância se faz presente todos os dias em oração, uma das pessoas que admiro e que sempre foi sentinela, uma verdadeira amiga, uma irmã. A você todo meu carinho;

A família Justino, em especial a Sr. Antonio, Dona Maria José, Ana Deize e Tonny, que durante maior parte deste curso foram companheiros e parceiros nas etapas iniciais deste trabalho. Ao Sr. Manuel e Dona Santina que são para mim exemplo de retidão fé e oração. E a Marta, Alexandre e Janiele pelos momentos de descontração e alegria. Amo vocês como família. Obrigado por tudo, a vocês toda minha admiração, respeito e carinho.

Ao Dr. Eduardo S. P. Melo "in memory", por ter sido um grande parceiro e amigo em todos os momentos em que estava sobre tratamento, sendo exemplo de humildade, dedicação e sapiência. Meu muito obrigado. A Dr. Denizio Dantas, por sua destreza, competência, além de humildade e amizade em todo processo de minha recuperação. Minha Gratidão. A Dr. Alan por acompanhar todo o processo, sendo um verdadeiro parceiro em todos os momentos angustiantes do tratamento;

Aos funcionários da Secretaria do Programa de Pós Graduação em Proteção de Plantas, Geraldo de Lima, Marcos Antônio Lopes e Michele Cristina, pela atenção e convivência;

Aos amigos Nelson Augusto Nascimento Junior, Rui Silva, Maria Quitéria C. dos Santos, Henrique, Daniella, Mércia, Jair Tenório, Clemens Fortes, Maria Lausane, Manoel Elion, Alexandre Guimarães, pela amizade, cooperação e apoio;

Aos amigos que fazem parte do Laboratório de Fitopatologia, em especial, Nelson Augusto Nascimento Junior, Dayse Rocha, David Vitor, Roasângela, Jardel, Cristiane, Erika, pela amizade, conviência e apoio; A todos os colegas e amigos da pós graduação;

A Residência Universitária Alagoana (RUA) e a todos os meus amigos IRMÃOS, que por lá passaram e a todos que de alguma maneira contribuíram para realização desse trabalho.

RESUMO

A podridão radicular causada por diversos patógenos limita a produção da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), cultura de elevado interesse para a região Nordeste do Brasil, proporcionando grandes prejuízos. As dificuldades no manejo tem direcionado a busca por alternativas, entre as quais, o biocontrole, vem apresentando resultados significativos. Os objetivos deste trabalho foram determinar a etiologia dos fitopatógenos envolvidos com a podridão radicular da mandioca, no estado de Alagoas, avaliar a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. em inibir o desenvolvimento de *Fusarium* sp. e identificar molecularmente os isolados de *Trichoderma* e *Fusarium* sp. Para tanto, experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Fitopatologia e Fitopatologia Molecular do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA-UFAL). Inicialmente, solo da rizosfera e raízes tuberosas de mandioca com sintomas de podridão foram coletados e submetidos a isolamento, identificação morfológica e testes de patogenicidade. Os fungos isolados foram *Fusarium* sp., *Neoscytalidium* sp. e o oomiceto *Phytophthora* sp., todos patogênicos a mandioca. Em seguida, realizou-se a seleção de isolados de *Trichoderma* pela técnica de pareamento. Foram obtidos 12 isolados de *Trichoderma*, ente os quais sete *(*T2; T3; T5; T6; T10; T13; T15) produziram substancias bioativas que inibiram o desenvolvimento de *Fusarium* sp. Posteriormente, a caracterização molecular de *Fusarium* sp. e de *Trichoderma* spp. foi realizada através do sequenciamento da região ITS do DNA e análise filogenética, cujo estudo, construído usando o método de ‘‘maximum Likelihood Tree’’ com base em 1000 réplicas de “bootstrap”, mostrou 100% de similaridade genética com a espécie *Fusarium falciforme*. Os isolados de *Trichoderma* foram identificados como *T. harzianum* (T6), *T. citrinoviride* (T5) e *T. orientale* (T15). Avaliou-se também o efeito do extrato bruto a 50°C, extrato térmico (100°C) e extrato autoclavado (120°C/15 minutos) *de Trichoderma* spp. e a detecção de índice enzimático de *F. falciforme* e de *Trichoderma* spp. Os extratos brutos de *T. harzianum*, *T. citrinoviride* e *T. orientale* são eficientes em inibir o desenvolvimento de *F. falciforme,* sendo o extrato bruto, o que proporcionou a maior porcentagem de redução de crescimento micelial (85%), seguido do extrato a 100°C (59%) e 121°C (40%). Os isolados T2, T3 e T6 (*T. harzianum*), T5 (*T. citrinoviride*) e T15 *(T. orientale)* e o isolado de *F. falciforme* produziram as enzimas amilase, celulase, gelatinase, lípase, protease e quitinase. O presente estudo constitui o primeiros registro de *F. falciforme* nessa cultura.

Palavras - Chave: Raiz tuberosa, Identificação molecular, Patologia.

ABSTRACT

Root rot caused by several pathogens limits the production of manioc (Manihot esculenta Crantz), a crop of great interest to the Northeast region of Brazil, causing great losses. The difficulties in the management have directed the search for alternatives, among which, the biocontrol, has presented significant results. The objectives of this work were to determine the etiology of phytopathogens involved with root rot of cassava, in the state of Alagoas, to evaluate the ability of Trichoderma spp. In inhibiting the development of Fusarium sp. And to identify molecularly the Trichoderma and Fusarium sp. For that, experiments were conducted in the Phytopathology and Molecular Phytopathology Laboratories of the Agricultural Sciences Center of the Federal University of Alagoas (CECA-UFAL). Initially, rhizosphere soil and tuberous roots of cassava with symptoms of rot were collected and submitted to isolation, morphological identification and pathogenicity tests. The isolated fungi were Fusarium sp., Neoscytalidium sp. And the Phytophthora sp., All pathogenic to cassava. Then, the selection of Trichoderma isolates was performed by pairing technique. Twelve isolates of Trichoderma were obtained, of which seven (T2, T3, T5, T6, T10, T13, T15) produced bioactive substances that inhibited the development of Fusarium sp. Subsequently, the molecular characterization of Fusarium sp. And Trichoderma spp. Was performed through the DNA ITS region sequencing and phylogenetic analysis, whose study, constructed using the " Maximum Likelihood Tree " method based on 1000 bootstrap replicates, showed 100% genetic similarity with the falciform Fusarium species . Trichoderma isolates were identified as T. harzianum (T6), T. citrinoviride (T5) and T. orientale (T15). The effect of the crude extract at 50 ° C, thermal extract (100 ° C) and autoclaved extract (120 ° C / 15 minutes) of Trichoderma spp. And the detection of enzymatic index of F. falciforme and Trichoderma spp. The crude extracts of T. harzianum, T. citrinoviride and T. orientale are efficient in inhibiting the development of falciform F. The crude extract yielded the highest percentage of mycelial growth reduction (85%), followed by the extract At 100 ° C (59%) and 121 ° C (40%). The isolates T2, T3 and T6 (T. harzianum), T5 (T. citrinoviride) and T15 (T. orientale) and the F. falciform isolate produced the enzymes amylase, cellulase, gelatinase, lipase, protease and chitinase. The present study constitutes the first record of F. falciformus in this culture.

Key words: Root tuber, Molecular identification, Pathology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto das colônias e estruturas reprodutivas dos isolados de fitopatógenos causadores de podridão em mandioca: *Fusarium sp* (A1-A6), *Neoscytalidium* sp (B1-B6) e *Phytophthora* sp. (C1-C6). Colônia de *Fusarium* sp (A1); conídios (A2); célula conidiogênica (A3-A6). Colônia de *Neoscytalidium* sp (B1); Conídios (B2-B6). Colônia de *Phytophthora* sp (C1); Esporângio (C2); Clamidósporos (C3 E C4); Esporângios (C5) e Esporângios em reprodução (C6).....*50*

Figura 2. Aspecto da colônia e estruturas reprodutivas do isolado T6 de *Trichoderma* spp.....51

Figura 3. Plantas e raízes de mandioca cv rosinha apresentando sintomas de podridão após inoculação: sintomas de lesão no caule, clorose e murcha nas folhas (A1 e A2) e podridão seca na raiz (A3 e A4), causadas por *Fusarium* sp.; murcha e seca das folhas (B1 e B2), lesão negra no caule (B3) e podridão negra na raiz (B4), causadas por *Neoscytalidium* sp.; lesões no caule, murcha e morte da planta (C1 e C2), crescimento cotonoso na raiz (C3) e podridão mole com degradação da parede (C4) causadas por *Phytophthora* sp.....52

Figura 4. Confronto entre os isolados de *Trichoderma* spp e *Fusarium* sp: isolado de *Fusarium* sp sem confronto (T0); isolados de *Trichoderma* spp na posição superior de cada placa (T1-T15).....54

Figura 5. Notas atribuídas aos isolados de *Trichoderma* spp. avaliadas após o pareamento.....55

Figura 6. Produção de metabólitos por isolados de *Trichoderma* spp confrontados com *Fusarium* sp: isolado de *Fusarium* sp (T0); isolados de *Trichoderma* spp na posição superior de cada placa (T2-T15) 56

Figura 7. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de *Fusarium* sp. em cultivo pareado com isolados de *Trichoderma* spp.....57

Figura 8.Árvore filogenética baseada na região ITS do DNA de *Fusarium* sp, construída usando o método de ‘‘maximum Likelihood Tree’’. O isolado *Fusarium redolens* 6VVBY3 foi utilizado como “outgroup”. A barra de escala representa mudança de 0,04 e valores de suporte de *bootstrap* de 1000 repetições são apresentados nos ramos. 60

Figura 9. Árvore filogenética baseada na região ITS do DNA de *Trichoderma* spp, construída usando o método de ‘‘maximum Likelihood Tree’’. O isolado de *Fusarium falciforme CBS 128812* foi utilizado como “outgroup”. A barra de escala representa mudança de 0,02 e valores de suporte de *bootstrap* de 1000 repetições são apresentados nos ramos. 63

Figura 10. Extratos centrifugados dos isolados de *Trichoderma* spp.....89

Figura 11. Efeito dos extratos de Trichoderma spp. sobre a porcentagem de inibição do crescimento micelial de Fusarium sp., aos 3 e 6 dias de incubação: T2; T3; T5; T6 e T15 (*Trichoderma*),T0 (Testemunha).....95

Figura 12. Efeito dos extratos de *Trichoderma* spp., sobre a porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Fusarium* sp.: A) atividade de biocontrole dos extrato dos isolados, B) efeito da concentração dos extratos e C) Efeito do tempo sobre a PIC.....97

Figura 13. Efeito dos extratos de *Trichoderma spp.* sobre a porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Fusarium* sp.: Atividade de biocontrole dos extratos (A) e efeito do tempo sobre a PIC (B).....99

Figura 14. Índice enzimático dos isolados de *Trichoderma* spp. e *Fusarium falciforme*.Escala de Furlanato (1989).....102

Figura 15. Reação enzimática de *Fusarium falciforme* e *Trichoderma* spp nos meios específicos para secreção de enzimas.....107

Figura 16. Indice enzimático dos isolados de *Trichoderma* spp. e *Fusarium falciforme*..... 108

Figura 17. Potencial enzimático (P.E.) dos isolados de *Trichoderma* spp. e *Fusarium falciforme*.....111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escala de Bell et al. (1982) 46

Tabela 2. Descrição do primer utilizado para identificação dos gêneros fúngicos..... 47

Tabela 3. Média dos Índices de Atividade enzimática dos isolados de *Trichoderma* spp e *Fusarium falciforme*.....102

SUMARIO

RESUMO ..... **vii**

ABSTRACT ..... **viii**

1.INTRODUÇÃO **16**

2. REVISAO DE LITERATURA **18**

2.1. A CULTURA DA MANDIOCA **18**

2.2. PROBLEMAS FITOSSANITÁRIOS NA CULTURA DA MANDIOCA **19**

2.3. O PATÓGENO Fusarium sp **21**

2.4. CONTROLE DA DOENÇA **23**

2.5. BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS **24**

2.6. O FUNGO *Trichoderma* sp **26**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **30**

3. ETIOLOGIA DA PODRIDÃO RADICULAR DA MANDIOCA NO ESTADO DE ALAGOAS E EFEITO DE *Trichoderma* spp. SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Fusarium falciforme* **39**

RESUMO **39**

ABSTRACT **40**

3.1. INTRODUÇÃO **41**

3.2. MATERIAL E MÉTODOS **43**

3.2.1. . LOCAL DE EXECUÇÃO. **43**

3.2.2. COLETA DE SOLO E OBTENÇÃO DOS ISOLADOS **43**

3.2.3. TESTE DE PATOGENICIDADE E REISOLAMENTO **44**

3.2.4. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIOCONTROLE DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Fusarium* sp **45**

3.2.5.CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS 46

3.2.5.1. Extração do DNA de *Fusarium* sp. e dos isolados de *Trichoderma* spp **46**

3.2.5.2. Amplificação do DNA e sequenciamento dos produtos de PCR.....47

3.2.5.3. Sequenciamento e Análises filogenéticas.....48

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES 49

3.3.1. IDENTIFICAÇÃO DOS FITOPATOGENOS 49

3.3.2. IDENTIFICAÇÃO DOS BIOCONTROLADORES.....50

3.3.3- PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS.....52

3.3.4. AVALIAÇÃO DA AÇÃO DOS ISOLADOS DE *Trichoderma* sp. SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL DE *Fusarium* sp.....53

3.3.5. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS ISOLADOS.....59

3.3.5.1 Amplificação do DNA, purificação e sequenciamento dos produtos da PCR.....59

CONCLUSÕES.....65

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....66

4. EFEITO DE *Trichoderma* spp. SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Fusarium falciforme* e ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE *Trichoderma* spp E DE *Fusarium falciforme*..... 83

RESUMO 83

ABSTRATIC..... 84

4.1. INTRODUÇÃO..... 85

4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....87

4.2.1. . LOCAL DE EXECUÇÃO.....87

4.2.2. EFEITO DO EXTRATO DE *Trichoderma* spp. SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Fusarium falciforme*..... 87

4.2.3. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ISOLADOS DE *Tichoderma* spp. E EFEITO NO DESENVOLVIMENTO DE *Fusarium falciforme*.....89

4.2.3.1. Teste enzimático para AMILASE (HANKING e ANAGNOSTAKIS, 1975).....89

4.2.3.2. Teste enzimático para CELULASE (HANKING e ANAGNOSTAKIS, 1975).....90
4.2.3.3. Teste enzimático para GELATINASE (HANKING e ANAGNOSTAKIS, 1975)..91
4.2.3.4. Teste enzimático para LIPASE (‘Hankin & Anagnostakis (1975)..... 91
4.2.3.5. Teste enzimático para PROTEASE (Lacaz et al., 1991).....92
4.2.3.6. Teste enzimático para QUITINASE (Renwech et al., 1991) com modificação.....92
4.2.4. DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA.....92
4.2.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANALISE ESTATISTICA.....92
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....93
4.3.1. EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE *Trichoderma* spp. SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Fusarium falciforme*.....*93*
4.3.2 EFEITO DO EXTRATO DE *Trichoderma* spp TRATADO TERMICAMENTE SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Fusarium falciforme*.....97
4.3.3. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. E *Fusarium falciforme*.....99
CONCLUSÕES.....112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 113

1. INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) têm grande expressão econômica e social no Brasil e no mundo pelo seu importante valor na alimentação humana, animal e na industrialização, garantindo a sobrevivência de significativa parcela da população de baixa renda, como fonte alimentícia e como geração de renda para a agricultura familiar (NOTARO *et al.* 2013).

A mandioca e seus derivados é dos alimentos mais consumidos no mundo e ocupa a sexta colocação de maior produção e expressão do planeta, estando atrás apenas das culturas da soja, trigo, arroz, milho e batata (FAO, 2012). O Brasil é o quarto produtor mundial, com uma safra estimada para 2016 de 25 milhões de toneladas (IBGE, 2015).

De grande versatilidade, a cultura é totalmente aproveitada, não só a parte aérea (folhas e hastes) como também a raiz. As folhas têm seu aproveitamento na alimentação humana (suplemento) e animal (triturada). As hastes, na alimentação animal, sob a forma de silagens e fenos e ainda *in natura*. A raiz, na alimentação humana, animal e ainda pelas indústrias, principalmente de farinha, de féculas, plásticos biodegradáveis, produtos têxteis e de biocombustível (CONAB, 2013).

A cultura da mandioca enfrenta muitos desafios, entre os quais, destaca-se os problemas fitossanitários (NASCIMENTO JÚNIOR, 2015). Diversas doenças já foram relatadas na cultura, dentre elas, as podridões radiculares, cujos agentes podem ser *Lasiodiplodia* sp., *Fusarium* sp., *Neoscytalidium lignicola*, *Phytophthora drechsleri* Tucker, *Pythium* sp. e *Rosellinia* sp. Entretanto, registros sobre os principais fitopatógenos envolvidos na podridão radicular nos estados produtores ainda são incipientes e são de suma importância para servir como ferramenta na tomada de decisão sobre qual a melhor estratégia de manejo a ser utilizada (MASSOLA JR; BEDENDO, 2005; MUNIZ *et al.*, 2006; FUKUDA; OTSUBO, 2015; NOTARO *et al.*, 2013; SILVA, 2013).

Os mais importantes agentes causadores da podridão radicular são os microrganismos, *P. drechsleri* e *F. solani*, não somente pela abrangência geográfica, mas principalmente pelas severas perdas na produção. Alguns estudos mostram que a ocorrência de *Fusarium* é mais acentuada em plantios de mandioca em solos ácidos e adensados. Os sintomas podem ocorrer em qualquer fase do desenvolvimento da planta e raramente causam danos diretos nas raízes.

O ataque ocorre no ponto da haste junto ao solo, causando infecções e muitas vezes obstruindo totalmente os tecidos vasculares, impedindo a livre circulação da seiva e, conseqüentemente, provocando podridão indireta das raízes. Ao contrário de *Phytophthora*, cujos o sintomas provocados nas raízes são coloração marrom e podridão mole que exsudam um líquido com mau cheiro, as podridões de *Fusarium* sp são caracterizados por uma podridão de consistência seca e sem o aparente distúrbio dos tecidos (MOURA; SILVA, 1997; POLTRONIERI et al, 2001; SILVA; TEIXEIRAS, 2012).

As medidas de controle da podridão radicular envolvem a integração do uso de variedades tolerantes, associado a práticas culturais como rotação de culturas, manejo físico e químico do solo, sistemas de cultivo e outras. Nascimento Júnior (2015), destaca que é de fundamental importância o conhecimento das condições edafo-climáticas da região do cultivo e o uso de técnicas apropriadas que possam ser adotadas pelo agricultor, para que possam ter um retorno econômico dentro de um sistema agrícola sustentável.

O controle alternativo de fitopatógenos com antagonistas, principalmente com espécies de *Trichoderma,* já vem sendo estudado, devido ao interesse mundial de utilizar produtos menos agressivos ao ambiente (SOUSA *et al.,* 2012; SILVA *et al.,* 2014). Para Robbs (1992) e Barbosa; Meza (2009) a competição por alimentos e a antibiose, são os mecanismos mais frequentemente utilizados por algumas espécies *de Trichoderma,* sendo por isso considerado um excelente agente de biocontrole.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi identificar os principais agentes causais da podridão radicular da mandioca de mesa var. Rosinha, no estado de Alagoas e avaliar a capacidade de *Trichoderma* spp em controlar a podridão radicular, causada por *Fusarium* sp.

2. REVISAO DE LITERATURA

2.1. A CULTURA DA MANDIOCA

A mandioca, uma cultura de grande interesse para o Nordeste brasileiro, notadamente para o Estado de Alagoas, é uma planta perene, arbustiva, pertencente à família das Euforbiáceas, rica em fécula, utilizada na alimentação humana e animal ou como matéria prima para diversas indústrias (FRAIRE FILHO; BAHIA, 2015). Nascimento Júnior (2015), enfatiza as vantagens desta cultura, devido a sua rusticidade, baixo custo, adaptação em relação ao clima e solo e suas características nutricionais que estão relacionadas à grande acumulo de amido em suas raízes, bem como de proteínas e aminoácidos nas folhas.

É uma planta originária das regiões tropicais da América do sul, mas que teve como lugares da sua domesticação o Sudeste da Ásia, a África e a América Tropical (NOTARO *et. al.*, 2013; SILVA, 2013; FRAIRE FILHO; BAHIA, 2015).

Em 2013, foram produzidas 281.718.000 toneladas de mandioca em todo o mundo, sendo o Brasil o quarto produtor mundial com 23.977.757 toneladas, ficando atrás da Nigéria, maior produtor, Indonésia e Tailândia. As regiões Norte e Nordeste do Brasil possuem os maiores volumes de produção e a maior área cultivada, sendo as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, as de maiores rendimentos agrícolas. O Estado do Pará é o maior produtor nacional de raiz de mandioca, seguido de Paraná, Maranhão e Bahia (IBGE, 2015).

No Estado de Alagoas, as regiões que se destacam como produtoras de mandioca são o agreste, com 70% da produção total do estado (Arapiraca, São Sebastião e Campo Alegre), a zona da mata e o litoral norte, sendo a primeira região, a que detém a maior quantidade de produtores, responsável por 13,36 $t.ha^{-1}$ e produção de 240.448 toneladas, ocupando a segunda colocação em produtividade se comparados aos outros estados do nordeste (CONAB 2013).

Notaro (2012) enfatizaram que essa cultura ainda é de agricultura familiar e se desenvolve de forma rudimentar, sendo que o principal meio de propagação é vegetativa e ainda cultiva-se variedades de baixa qualidade genética. A sua utilidade esta associada ao teor de ácido cianídrico (HCN) presente nas folhas e raízes, que a classifica como mansa ou doce (<180mg kg^{-1} de HCN), também conhecidas como macaxeira, utilizada para o consumo in natura; intermediárias (180-300mg kg^{-1}) e amarga ou brava (>300mg kg^{-1})

essas duas últimas são utilizadas para ração animal, produção de fécula, farinha e biocombustível (OLIVEIRA et al., 2012).

A maior utilidade da mandioca está na indústria alimentícia, principalmente na produção de fécula destinada para o mercado de amido modificado, que além de atender a culinária regional em pães, tapiocas, beijus, bolinho de goma e pé-de-moleque; é um dos produtos da mandioca que mais emprega mão-de-obra e agrega um elevado valor no produto processado, segundo Nascimento Júnior (2015). Quanto à produção de biocombustíveis, a mandioca vem se mostrando uma boa alternativa na fabricação de etanol, pois apresentou um menor custo energético na produção de etanol comparado a cana de açúcar e o milho, de acordo com Salla *et. al*., (2010).

Segundo Alves (2006), o ciclo da mandioca pode variar de 6 a 24 meses de cultivo, mas comercialmente é 12 a 18 meses para o beneficiamento de farinha e fécula e entre 8 a 10 meses para as de mesa, Dentre as variedades plantadas em Alagoas, destaca-se a Rosinha, cujo ciclo varia entre 9 a 10 meses em sequeiro, podendo ser antecipado para 7 a 8 meses em condições de sistema irrigado. Essa variedade pode atingir três metros de altura, mantém o stand de plantas ao final do cultivo com boa produção de ramas e produtividade em 21 t ha^{-1} (DINIZ *et al*, 2009).

Nascimento Júnior (2015), relata em seu trabalho que mesmo com a rusticidade da cultura é necessário está atento às condições adafo-climáticas, afirmando que a mandioca produz bem em solos férteis, com pH entre 5,5 a 7,0 com classe textural arenosa ou média e uma boa drenagem natural. A condição climática ideal está na faixa de temperatura entre 20°C e 27°C, podendo se estabelecer em ambientes com temperaturas entre 16°C e 38°C; com precipitação entre 1000 a 1500 mm ano^{-1}, em regiões semi-áridas entre 500 e 700 mm ano^{-1}; altitudes de 600 a 800 metros acima do nível do mar e período de luz de 12 horas dia^{-1} (SILVA; ANDRADE, 2011; SILVA, 2013).

2.2. DOENÇAS NA CULTURA DA MANDIOCA

Vários fatores podem limitar a produção da mandioca, tais como, a ocorrência de insetos-praga e fitopatógenos causadores de doenças, prejudicando a qualidade e a produção de mandioca no Brasil e no mundo. De acordo com Nascimento Júnior (2015), a mandioca possui baixa resistência a doenças o que acarreta severas perdas econômicas na produção.

Dentre as doenças de importância destacam-se as causadoras de manchas foliares como mancha parda (*Cercosporidium henningsii*) mancha branca (*Phaeoramularia*

manihotis), queima das folhas (*Cercospora vicosae*), mancha preta (*C. manihobaea*) e antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *manihotis*) que limitam os fotoassimilados (SILVA; ANDRADE, 2011; MORAIS *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). E as podridões radiculares, causadas por fungos e oomicetos, tais como *Diplodia* sp., *Fusarium* sp., *Neoscytalidium* sp., *Rosellinia* sp., *Phytophthora* sp. e *Pythium* sp. (FUKUDA; OTSUBO, 2015; NOTARO *et al.*, 2013; SILVA 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Notaro *et al.*, (2013) e Silva (2013) alertam que a podridão radicular da mandioca é uma doença de alto impacto econômico e social, nos Estados do Maranhão, Pará, Alagoas e Pernambuco, pois está provocando uma queda progressiva na produtividade, além de inutilizar as áreas para plantio ao longo dos ciclos da cultura. Segundo Nascimento Júnior (2015), as podridões são responsáveis por grandes perdas na produção de mandioca no Nordeste, sendo o Omyceto *Phytophthora* sp e o fungo *Fusarium* sp., os patógenos que limitam a cultura entre 30 e 70%. O autor afirma ainda que em condições favoráveis a doença pode provocar 100% de perda.

A podridão causada por *Fusarium* sp. ocorre em plantas jovens e adultas, com sintomas de murcha repentina e severo desfolhamento, que pode ser potencializado em áreas de solo argiloso e mal drenados (SILVA; TEXEIRA, 2012). Fato este já relatado por Gomes; Leal (2003), que ao trabalharem com mandioca nos Estados de Sergipe, Bahia e Alagoas, afirmaram que a podridão das raízes é a doença mais limitante da cultura na região Nordeste, principalmente quando é implantada em áreas formadas por solo compactado.

Os sintomas da podridão radicular são bastante distintos em função do agente causal. Os autores relatam que normalmente, *Phytophthora* sp. ataca a cultura na fase adulta, causando podridão “mole” nas raízes, com odor muito forte, semelhantes ao de matéria orgânica em decomposição; coloração acinzentada. O aparecimento de sintomas visíveis é mais frequente em raízes maduras; entretanto, existem casos de manifestação de sintomas na base das hastes jovens ou em plantas recém-germinadas, causando murcha e morte total. Já no caso da podridão causada por *Fusarium* sp., o problema pode ser bem mais acentuado, podendo apresentar sintomas em qualquer fase do desenvolvimento da planta e raramente causam danos diretos na raiz. (GOMES; LEAL, 2003; SILVA; TEXEIRA, 2012; NASCIMENTO JÚNIOR, 2015).

2.3. O PATÓGENO *Fusarium* sp.

O gênero *Fusarium* foi descrito em 1809, por Link. As espécies desse gênero pertencem ao reino Fungi, filo Ascomycota, classes Eauscomycetes e Pyrenomycetes, ordem Hypocreales, apresentando 65 espécies, 55 variedades e 22 formas, conforme Wollenweber; Reinking (1935)[1] citado por Ventura (1999). Trata-se de um dos mais importantes fitopatógenos do mundo, com ampla distribuição geográfica, distribuídos no solo e em associação com plantas. Tendo espécies cosmopolitas e outras com ocorrência restrita a determinados ambientes (VENTURA, 1999). A maioria das espécies são sapróbios, mas algumas espécies produzem micotoxinas que podem afetar a saúde humana e animal (URBEN *et al*. 2009). Seifert, 2006; Querales (2010) relatam que o gênero *Fusarium* é um grupo complexo crescente em número de espécies e geram controvérsia taxonômicas para fitopatologistas.

Milanesi, (2009), comenta que o *Fusarium* sp. pode ocorrer especialmente em locais de climas tropicais e subtropicais, e tem uma grande capacidade de sobreviver por longos períodos no solo fora de seus hospedeiros, através da formação de estruturas de resistências chamadas clamidósporos.

Três grupos dentro do gênero são os exemplos mais específicos dessas mudanças, nomeados como o complexo *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw (com o nome genérico referindo-se aos teleomorfo), o complexo *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. e o complexo *F. graminearum.* O gênero é caracterizado pelo seu crescimento rápido, colônias com coloração pálida ou colorida (violeta à púrpura escuro ao laranja), com micélio aéreo e difuso (MARTINS, 2005).

---

[1]WOLLENWEBER, H. W.; REINKING, O. A.. **Die fusarien: ihre beschreibung, schadwirkung und bekämpfung**. Berlin: P. Parey, 1935.

Puhalla (1981); Martins (2005); Agrios (2005), relatam que a identificação de espécies de *Fusarium* sp. era baseada na morfologia dos macro e microconídios, conidióforos, clamidosporos e na disposição dos conídios no conidióforo. Os microconídios são unicelulares e uninucleados; os macroconídios mais comuns são multicelulares, mas cada célula tem somente um núcleo. Todos os núcleos de um

macroconídio, contudo, são descendentes mitóticos de um mesmo núcleo progenitor e são, portanto geneticamente idênticos. Os estágios sexuais de *Fusarium* são ascomicetos; o esporo sexual é o ascósporo. Os que alocados no gênero *Nectria* têm ascósporos bicelulares. Cada célula do ascósporo bicelular é uninucleada e ambos núcleos são geneticamente idênticos. Outros, como é o caso em *Gibberella*, formam ascósporos multicelulares.

Outro fato que é mencionado por Martins (2005), é que as características morfológicas sofrerem influência do ambiente e também nutricionais. Especialistas no gênero utilizam meios de cultura e condições padronizadas para identificação. Devido à esta plasticidade e variações de características fenotípicas encontradas neste fungo, a taxonomia baseada somente em conceitos morfológicos não é confiável.(Martins, 2005; Urbens *et al*., 2009; Querales, 2010).

A identificação da espécie de *Fusarium* é um dos primeiros passos para seu estudo. Tradicionalmente tem sido realizado com base na morfologia, desde a publicação do tratado do gênero "Die Fusarien", em 1935 por Wollenweber; Reinking [1]. Outros sistemas foram propostos, mas não resolveram o problema da identificação das espécies. As ferramentas para a identificação foram incrementadas e incluem a utilização de microscopia ótica e eletrônica, meios seletivos e diferenciais, comparações enzimáticas, metabólitos secundários, bem como, o uso de tecnologias imunológicas e moleculares (LEAL- BERTIOLI, 1998; MARTINS 2005).

O`Donnell *et al*., (2000); Summerell *et al*., (2003); Ottoni, (2008); comentam que com o advento das ferramentas moleculares a identificação de *Fusarium passa a* envolver três conceitos de espécie: o da espécie morfológica, baseada na similaridade dos caracteres morfológicos observáveis, denominados de marcadores morfológicos; o da espécie biológica, baseado na compatibilidade sexual entre membros da mesma espécie; e o conceito de espécie filogenética, baseado na análise de seqüências gênicas. Querales (2010) menciona em seu trabalho que a adoção destes modelos de classificação afeta a taxonomia do gênero já que por décadas foi baseada simplesmente em caracteres morfológicos e também cria controvérsias, pois muitos fitopatologistas acreditam que tais modelos só acrescentam dificuldades para uma identificação prática na diagnose de agentes causais de doenças em plantas e que, portanto, tais modelos estão mais adaptados para os estudos realizados por micologistas. Não obstante, estas mudanças são

pertinentes, dado que dentro deste gênero existem espécies muito próximas, fato que pode levar a uma diagnose errada com importantes conseqüências práticas.

De acordo com Notaro *et al*. (2013), *Fusarium solani* Math (Sacc) é a espécie que prevalente causa podridão radicular na mandioca cv. branquinha no Estado de Pernambuco. Esta espécie produz, em meio de cultura, micélio aéreo, com coloração que varia do branco ao creme, tornando-se marrom-azulado quando esporodóquios estão presentes. Produz três tipos de esporos assexuados: os macroconídios em forma de foice, medindo cerca de 15-35 x 4-7 μm com 3-5 septos; os microconídios, que possuem ou não septo, medem cerca de 5-10 x 1-3 μm e os clamidósporos, que são hialinos, globosos, lisos a áspero, medindo de 6-10 μm.

O estado sexual do fungo é *Nectria haematococca* (Ascomycete). Este fungo sobrevive em restos culturais, solo, tubérculos e sementes infectadas, podendo persistir no solo durante vários anos. As condições ideais para o seu estabelecimento são temperatura de 15 a 25 °C, umidade de 50 a 75%, ocorrência de ferimentos, plantios em solos contaminados e armazenamento inadequado. Ferimentos no sistema radicular, principalmente os ocasionados por nematoides, facilitam a penetração do fungo nas raízes dos hospedeiros.

2.4. CONTROLE DA DOENÇA

Por ser um patógeno veiculado pelo solo, sua eliminação, após a instalação na área de plantio se torna uma tarefa muito difícil e medidas de controle químico praticamente inexistem, exceto aquelas preventivas, como o uso de tratamento de sementes ou outros materiais de propagação (LAZAROTTO *et al.,* 2012). O Controle cultural, baseado na prevenção de ferimentos durante a colheita e o armazenamento, o uso de sementes sadias e substrato livre do patógeno, utilizado uma única vez, a aplicação equilibrada dos nutrientes, o controle da irrigação, bem como a utilização de variedades resistentes e o tratamento com fungicida das estacas sementes (maniva) e do substrato utilizado para o semeio quando infectado, podem minimizar as perdas de produção.

Como medida de controle o que mais se mostrou eficiente baseado nas pesquisas realizadas pela Embrapa Mandioca e Fruticultura e Empresa de Desenvolvimento Agropecuária (EMAGRO), foi o uso de variedade tolerante, associado à rotação de culturas e sistemas de plantio, que reduziram a podridão em cerca de 80%. As variedades

consideradas tolerantes até então conhecidas são: Osso Duro, Cedinha, Bibiana, clone 148/02, Aramaris e Kiriris, para o Nordeste. (GOMES; LEAL, 2003; BETTIOL, 2009; LOBO JÚNIOR *et al.*, 2009; LAZAROTTO *et al.*, 2012)

Para o controle de *Fusarium* sp., o produto químico difenolconazol e thiram, no tratamento de solo e, no tratamento de sementes, são os mais recomendados pela eficiência apresentada. No entanto, o controle químico se tornou constante e com o uso indiscriminado advieram problemas ecológicos, pois estes provocam alterações no ambiente como: seleção de patógenos resistentes, ocorrência de surtos de doenças consideradas como secundárias, diminuição de microrganismos benéficos, além de causar efeitos deletérios (nocivos) ao homem, aos animais e ao ambiente, através do acúmulo de resíduos no solo, na água e nos alimentos (BIZI, 2015).

De uma maneira geral, os custos elevados da prática do controle químico, associado ao surgimento de resistência aos produtos comumente empregados, bem como a proibição do uso de outros, como o brometo de metila, torna essencial o desenvolvimento de técnicas alternativas de controle (BETTIOL, 2009; LOBO JÚNIOR *et al.*, 2009; LAZAROTTO *et al.*, 2012). No chamado controle alternativo inserem-se o controle biológico, a indução de resistência em plantas (MORAES, 1992) e o uso de extratos naturais com propriedades antimicrobianas e ou indutoras de resistência (STANGARLIN *et al.*, 2008).

2.5. BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS

A tentativa de reduzir a atividade deletéria de um patógeno ou do inoculo tem sido uma constante na agricultura, e a substituição de agroquímicos por produtos naturais com atividade de supressão ou de controle tem sido uma das alternativas viáveis, pois o resíduo deixado é mais rapidamente assimilado e decomposto pelo ambiente devido a sua baixa persistência **(**SOUZA, 2013; BIZI, 2015**).**

Ethur, (2006) e Dianese, (2007); relatam a importância das pesquisas na área de controle biológico, tais como a introdução de organismos antagônicos em ambientes em que o patógeno esteja causando danos como forma de otimizar controle. Cancela (2015), afirma que a dinâmica da ação do controle biológico ocorre de forma natural e consiste na regulação do número de plantas e animais por inimigos naturais. O controle biológico é o componente fundamental do equilíbrio da natureza e como o controle químico apresenta

vantagens e desvantagens. Entre as vantagens está o fato de ser uma medida atóxica, não provocar desequilíbrio, não possuir contraindicações, propiciar um controle mais extenso e é eficiente quando não existe maneira de se utilizar o controle químico. Em compensação requer mais tecnologia, possui um efeito mais lento, não é de tão fácil aquisição e nem sempre pode ser aplicado em qualquer época do ano.

Manter o equilíbrio no Agroecossitema é uma pratica do controle biológico de modo que o hospedeiro, na presença do patógeno, não sofra danos significativos, em função da ação controladora dos organismos não patogênicos do sistema. Os autores relatam ainda que doença é mais que uma íntima interação do patógeno com o hospedeiro, influenciada pelo ambiente e sim o resultado de uma interação entre hospedeiro, patógeno e uma variedade de não-patógenos que também repousam no sítio de infecção e que apresentam potencial para limitar ou aumentar a atividade do patógeno, ou a resistência do hospedeiro. Portanto, patógeno, hospedeiro e antagonistas, interagindo num sistema biológico, são os fatores e componentes do controle biológico (BIZI, 2015; CANCELA (2015).

Um fator limitante para o uso de produtos biológico é a disponibilidade no mercado para esta modalidade de controle. Outro problema é o fato de que a grande maioria dos produtos naturais não estão devidamente registrados para uso em escala comercial (SILVA *et al.*, 2008).

A presença do fitopatógeno interfere na homeostase da planta, mas também podem atuar acionando mecanismos de defesa da planta e/ou ativando genes que conferem resistência da planta hospedeira (AGRIOS, 2005). Michereff *et al.*, (1993), afirmam que o patógeno possui atividades determinantes que envolvem crescimento, infectividade, agressividade, virulência e outras atribuições do patógeno ou processos, que determinam a infecção, desenvolvimento dos sintomas e reprodução. A interação entre antagonista, hospedeiro e patógeno não ocorre de maneira particular, mas mutuamente.

Diversos autores relatam as interações e sua interferência na vida do fitopatógeno por mecanismos de ação como competição por espaço e nutrientes a antibiose, micoparasitismo ou hiperparasitismo, predação, indução de resistência, aumentando assim vantagem competitiva no ambiente. Estes mecanismos variam de espécie para espécie e, também, de linhagem para linhagem dentro da mesma espécie, de acordo com a interação hospedeiro-parasita. (CARVALHO, 2006; BETTIOL; MORANDI, 2009;

BRITO *et al.*, 2010; ZUCCHI, 2010; DIAS, 2011; MACHADO *et al.*, 2012; BIZI, 2015; CANCELA, 2015; FIPKE, *et al.*, 2015).

Dentre os fungos que apresentam elevado potencial para serem utilizados como agentes de biocontrole, o gênero *Trichoderma* Pers. é um dos mais pesquisados e estudados (MENEZES *et al.*, 2010). As espécies mais conhecidas de *Trichoderma* são: *T. hamatum* (Bonord.) Bainier, *T. viride* Pers, *T. aureoviride* Rifai, *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Oudem, *T. pseudokoningii* Rifai e *T. longibrachiatum* Rifai (BETTIOL; GHINI, 2005).

Ezziyyani *et al*., (2007) relatam que a freqüência de *Trichoderma* spp., é muito importante por ser um biocontrole de fitopatógenos como *Phytophthora*, *Fusarium* e *Neoscytalidium*. Remuska & Pria (2007) avaliando a efeito antagônico *de Trichoderma* spp., no controle do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos observou que este exerceu efeito antagonista sobre alguns fitopatógenos radiculares, tais como *Sclerotium rolfsii*, *Pythium aphanidermatum* e *Fusarium solani*, sendo este último gênero descrito como um dos principais fitopatógenos associados à podridão radicular da mandioca no estado de Pernambuco.

Hoffmann *et. al.*, (2015) relatam que tiveram 80% de controle de *Fusarium* sp utilizando isolados de *Trichoderma* spp. Da Silva *et. al*., (2011); Pereira (2013) comprovam em seus trabalhos um grande potencial de inibição de crescimento micelial de *F. solani* por espécies de *Trichoderma* spp. Souza *et. al.*, (2015) também relatam que *Fusarium* sp., e *Bipolaris* sp., tiveram seu crescimento fortemente inibido pelos isolados de *Trichoderma* spp. Outros trabalhos realizados por Bomfim *et al.*, (2010); Dias (2011); Lazarotto *et al.*, (2012); Santos *et al.*, (2012); Marques *et al.*, (2014), obtiveram resultados promissores apresentando de bom a ótimo desempenho, no que diz respeito a inibição do crescimento micelial de fitopatógenos por eles testados.

2.6. O FUNGO *Trichoderma* sp

O gênero *Trichoderma*, esta classificado como pertencente ao Reino Fungi, filo Ascomycota, classes Eauscomycetes e Pyrenomycetes, ordem Hypocreales, família Hypocreaceae, gênero *Hypocrea* (teleomorfo). Este fungo apresenta grande potencial antagônico e frequentemente é associado a solos supressivos a fitopatógenos (MELO,

1991). De acordo com Harman *et al*. (2004); Harman (2005), seu uso pode oferecer outras vantagens: decomposição de matéria orgânica, competição com uma microflora deletéria através da colonização da rizosfera, produção de antibiose e indução de resistência

Espécies de *Trichoderma* já foram documentadas para o controle de vários patógenos, tais como *Rhizoctonia solani* Kühn, *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Sclerotina sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Fusarium* spp. e *Pythium* spp. (MELO; AZEVEDO 1998). Diferentes espécies de *Trichoderma*, incluindo *T. harzianum* Hifai, apresentaram uma elevada taxa de parasitismos e atividade antagônica para os fitopatógenos, tais como *S. rolfsii, S. minor e S. sclerotiorum, R. solani e Pyricularia grisea* Sacc. (ROLLAN et al.,1999; RONDÓN et al., 2007).

De acordo com Dos Santos (2010), o isolado de *T. harzianum* apresentaram antagonismo *in vitro* sobre o fungo *S. rolfsii*; sendo capaz de hiperparasitar as hifas do patógeno e competir por espaço e nutriente. Silva *et al* (2013), trabalhando com isolados de *Trichodema* spp como agente de controle biológico de *S. lignicola,* observaram que inicialmente o isolado de *Neoscytalidium* sp mostrou-se bastante competitivo ao ser confrontado com *Trichoderma* spp, porém ao se encontrarem na placa de Petri, o *Trichoderma* spp sobrepôs a colônia do patógeno. O material observado da região sobreposta pelo antagonista indicou que ali houve uma ação enzimática degradativa da hifa do patógeno, visto que se destinguia com precisão apenas esporos e hifas do antagonista.

Para Robbs (1992) e Barbosa; Meza (2009) a competição por alimentos e a antibiose, são os mecanismos mais frequentemente utilizados por agentes de biocontrole, uma vez que os organismos mais eficientes em usar os recursos disponíveis se multiplicam e colonizam rapidamente a rizosfera, garantindo a sua sobrevivência. De acordo com Ethur (2006), a competição é uma das principais características de isolados de *Trichoderma* sp., usados como agentes de biocontrole e que a sua velocidade de crescimento, busca por alimento e espaço são as características que o promoveram a condição de um excelente agente de biocontrole.

A secreção de substâncias orgânicas antibióticas (antibiose), produzidas por microrganismos, que mesmo em baixa concentração interfiram nas atividades metabólicas, na redução ou paralisação do crescimento e esporulação, redução na

germinação de esporos, além de distorções na hifa e endólise, quer seja especifica, quer seja de amplo aspecto de ação, são importantes artifícios para eficiência de organismos antagonistas (LOBO JUNIOR; ABREU, 2000; BOMFIM, 2007; SOUZA, 2013). Segundo Claydon *et al.,* (1987), antibióticos são produtos do metabolismo secundário de seus produtores, e podem ser mais importantes na inibição de outros organismos do que a competição por nutrientes.

A antibiose também foi relatada por diversos pesquisadores como um dos mecanismos de ação de espécies de *Trichoderma* (BETTIOL, 1991; DIAS, 2011; CARVALHO FILHO, 2013). A gliotoxina, viridina e trichodermina, são algumas das substâncias produzidas por espécies de *Trichoderma* capazes de inibir o desenvolvimento de outros fungos (Amorim *et al.* 2011). Ethur (2006) relatou que a gliotoxina foi responsável pela inibição da germinação de esporângios e do crescimento micelial de *Pythium ultimum*.

Segundo Bomfim *et al.,* (2010) e Souza (2013), o biocontrolador será bem sucedido se for capaz de degradar a parede celular (composta por carboidratos, tais como quitina), além de proteínas e lipídios em quantidades significativas do fitopatógeno ou interromper os processos relacionados a sua síntese. Portanto, a produção de enzimas que hidrolisem os componentes da parede celular dos fitopatógenos, particularmente quitinases e glucanases, é uma característica comum em muitos agentes de biocontrole. Algumas espécies de *Trichoderma* são conhecidas pela sua alta capacidade em produzir enzimas que degradam celulose e quitina (MELO, 1991; HARMAN *et al.,* 2004).

O micoparasitismo**,** situação em que o microrganismo antagonista vive sobre ou dentro do fungo antagonizado, alimentando-se e desenvolvendo-se às expensas deste, é outro mecanismo de ação que um bom agente de controle biológico deve possuir. O micoparasitismo envolve antibiose e canibalismo provocados pela ação de enzimas hidrolíticas, como quitinases, glucanases, proteases e lipases, que provocam a morte de um deles que, assim, servem de alimento para o sobrevivente (LOBO JUNIOR; ABREU, 2000; HARMAN, 2000; BOMFIM, 2007; BARRA et. al., 2008; ZUCCHI, 2010).

Quitinases e β-1,3-glucanases estão diretamente envolvidas nas interações de micoparasitismo entre espécies de *Trichoderma* e seus hospedeiros, devido a maioria dos fungos fitopatogênicos possuírem em sua parede celular quitina, organizada em camadas regularmente ordenadas e β-1,3-glucanas arranjadas como um enchimento de maneira

amorfa. A quitinase age de forma aleatória e degradam a parede celular de fungos, liberando oligômeros que induzem as exoquitinases, começando assim o ataque micoparasítico, hidrolisando os oligossacarideos da parede celular do fitopatógeno. (MARCELLO, 2008; GIESE et. al, 2003; BAUERMEISTER et. al, 2010).

Melo (1996) relata que a atividade micoparasitica necrotrófica tem grande eficiência em inúmeros fungos fitopatogênicos, principalmente aqueles com estruturas de resistência consideradas difíceis de serem atacadas por microrganismos, como esporos, escleródios, clamidósporos e microescleródios. Melo; Azevedo (1998) afirma que *Trichoderma* sp possui característica micoparasita, pois pode detectar e localizar hifas de fungos suscetíveis, crescendo em sua direção presumivelmente em resposta a estímulos químicos, produzidos pela hifa hospedeira, formando estruturas semelhantes a apressórios e enrolando-se em toda a sua extensão para, então, penetrar e digerir a hifa.

O gênero *Trichoderma* é considerado um bom agente de controle microbiano, pois apresenta além habilidades descritas acima, características essenciais, como ausência de impacto negativo ao meio ambiente, presença de estruturas de reprodução de fácil propagação, principalmente em substratos naturais (Spiegel; Chet, 1998), capacidade de sobreviver em ambientes desfavoráveis, além de conter populações de patógenos em condições de solo diferentes (VINALE *et al.*, 2008).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. Amsterdam : Elsevier Academic Press. 5.ed, 2005. 922p.

ALVES, A., A., C.. Fisiologia da mandioca. In: **Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca**. EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, 2006., 817p.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia. Piracicaba**: Agronômica Ceres. v. 1,4. Ed, p. 383 -387, 2011.

BARBOSA, R.J.F.; MEZA, C.L.S. **Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum rifai* sobre *Fusarium oxy*sporum *schlecht f.* sp *passiflorae* en maracuyá** (Passiflora *edulis sims* var. *flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín, v.62, n.1, p.4743-4748, 2009.

BARRA, V. R.; ROMEIRO, R.S.; FERRAZ, H.G.M.; MACAGNAN, D.; SILVA, H. S. A.; MOURA, A. B.; HALFELD-VIEIRA, B. A; MENDONÇA, H. L.; VIEIRA JÚNIOR, J. R. **Potencialidade antagonística em alguns procariotas agentes de biocontrole de enfermidades de plantas**. Summa Phytopathologica, v.34, n.2, p.121-126, 2008.

BAUERMEISTER, A.; REZENDE, M. I.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. **1,3-Glucanases Fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas.** LONDRINA SP. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, , v. 31, n. 2, p. 75-86, jul./dez. 2010.

BETTIOL, W. Controle biologico de doencas do filoplano. In: BETTIOL, W., org. **Controle biologico de doencas de plantas**. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p.33-52 (EMBRAPA-CNPDA. Documentos, 15).

BETTIOL, W.: MORANDI, M.A.B. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.: MORANDI, M.A.B. (Org). **Biocontrole de Doenças de Plantas: uso e perspectivas.** Jaguariúna – SP: Embrapa Meio Ambiente, p. 7-14, 2009.

BETTIOL, W.; GHINI, R. **Solos Supressivos**. In: MICHEREFF,S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds.) Ecologia e Manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Recife:UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. cap.6, p. 125-143.

BIZI, R. M., **Utilização de fungos no Controle Biológico de Doenças.** < http://www.floresta.ufpr.br/alias/lpf/public_html/contbio03.html.> Acesso em 16/11/2015.

BOMFIM, M. P.**, Antagonismo in vitro e in vivo de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo.** Vitória da Conquista BA, 2007. 74f.: Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. 2007

BOMFIM, M. P., SÃO JOSÉ, A. R., REBOUÇAS, T. N. H., ALMEIDA, S. S. D., SOUZA, I. V. B., & DIAS, N. O **. Avaliação antagônica in vitro e in vivo de *Trichoderma* spp. a *Rhizopusstolonifer* em maracujazeiro amarelo**. Summa Phytopathologyca**,** v.36, n.1, p. 61-67, 2010.

BRITO, F. S.; MILLER, P. R. M., STADNIK, M. Presença de *Trichoderma* spp em composto e suas características para o controle de fitopatógenos**. Rev**. **Bras. de Agroecologia**, Porto Alegre , p. 43-53. 2010.

CANCELA, K. C., **Controle Biológico Florestal Conceitos, Terminologia, Descrição e Caracterização de Agente. Proteção florestal Disponível em** <http://www.floresta.ufpr.br/alias/lpf/public_html/contbio01.html> Acesso em 16/11/2015.

CARVALHO FILHO, M. R., **Relações filogenéticas, identificação e potencial de uso de isolados de *Trichoderma* no controle do mofo branco e como promotores de crescimento do feijoeiro**. Brasília-DF, 2013. 123f. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília. Brasília. 2013.

CARVALHO, A. C., **Bioprospecção de isolados de *Trichoderma stromaticum* para o controle biológico da Vassoura-de-Bruxa do Cacaueiro**. 2006. 82f. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Santa Cruz. 2006.

CLAYDON, N.; ALLAN, M.; ITANSON, J.R.; AVENT, A. G. **Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*.** Transactions of the British Mycological Society**,** v.88, p.503-513, 1987.COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Perspectivas para a agropecuária. **Conab**, Brasília , v.1, 2013., 154p.

DA SILVA, D. C. V., TIAGO, P. V., & DE SOUZA-MOTTA, C. M. . Isolamento **e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de**

Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas1. Revista Brasil. Bot, 34(4), 607-610. 2011

DIANESE, A. de C. **Variabilidade e controle de *Phytophthora palmivora* (Podridão-do-pé) e controle da varíola (*Aperisporium caricae*) do mamoeiro (*Carica papaya*)**. 2007. 109f. Tese Doutorado – Universidade de Brasília, Brasília. 2007

DIAS, P. P., **Controle biológico de fitopatógenos de solo por meio de isolados de fungos do gênero *Trichoderma* e sua contribuição no crescimento de plantas**. 2011. 101 f. Tese Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica - Rio de Janeiro. 2011

DINIZ, M. de S.. Efeito da manipueira na adubação da mandioca. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 5, 2009.

DOS SANTOS, J. *et al*. **Atividade hiperparasíticade *Trichoderma* spp. sobre escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* em solo**. In**:** SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA,7,2010.**Anais**...EPAMIG,2010.Online.Disponívelem:http://www.epamig.br/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=121&dir=DESC&order=date&limit=10&limitstart=10.Acesso em Dezembro 2015

ETHUR, L.Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepino**. 2006. 154p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS. 2006.

EZZIYYANI, M.; REQUENA, M. E.; EGEA-GILABERT, C.; CANDELA, M. E. Biological Control of Phytophthora Root Rot of Pepper Using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in Combination. Journal of Phytopathology , [S.I], v.155, n.6, p. 342-349, 2007

FAO. **Faostatidtics Database. Disponivel** em <https://www.fao.org.br/FAO_Brf2mpu3a.asp> Acesso em Dezembro de 2015.

FIPKE, G. M; PAZINI, J.B.; ETHU,L. Z. **Antagonismo de isolados de *Trichoderma* spp. ao *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes temperaturas.** Magistra, Cruz das Almas BA, V. 27, N.1, p. 23 – 32, Jan./Mar. 2015

FUKUDA C.; OTSUBO A.A. **Cultivo da mandioca na região centro sul do Brasil**. Embrapa Mandioca e Fruticultura.

HTTP://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_centrosul/doenc s.htm . Acessado em 16 de julho de 2015.

FRAIFE FILHO G. A., BAHIA J. J. S., Mandioca. Ceplac-Cepec-BA. http://www.ceplac.gov.br/radar/mandioca.htm . Acessado Dezembro de 2015.

GIESE, E. C.; BARBOSA, A. M.; SILVA M.L.C. **Glucanases Fúngica: Produção e aplicações das -1,3 e -1,6 glucanases**. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília-DF, nº 30 , P.97-104.. jan/jun 2003.

GOMES, J. C.; LEAL, E. C., **Cultivo da Mandioca para a Região dos Tabuleiros Costeiros.** ***In.:*** Podridão Radicular. Embrapa Mandioca e Fruticultura. Sistemas de Produção, 11. ISSN 1678-8796 Versão eletrônica/Jan/2003. https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_tabcosteiros/doencas.htm . Acesso 13/12/2015.

HOFFMANN, C. A. *et al*.**. Potencial de antagonismo de isolados de *Trichoderma* sp. contra o isolados de *Fusarium* sp., in vitro**. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento **Sustentável**, v. 10, n. 1, p. 236-242, 2015.

HARMAN, G. E. **The Nature and Application of Biocontrol Microbes II: *Trichoderma* spp. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp**. Phytopathology, St Paul, v. 96, p. 190-194. 2005

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

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

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. **PAS - Pesquisa Anual de Serviços, 2015.** [online] Disponível na internet via WWW URL: http://www.ibge.gov.br/home/. Arquivo consultado Dezembro de 2015.

LAZAROTTO, M.; BOVOLINI, M. P.; MACIEL, C. G.; MUNIZ, M. F. B. **Seleção *in vitro* de Isolados de *Trichoderma* spp. com Potencial de Antagonismo a Isolados Patogênicos de *Fusarium* spp**. In: XVI Simpósio De Ensino, Pesquisa E Extensão, Unifra, v. 3, 2012.

LEAL- BERTIOLI, S. C. DE M. **O enfoque molecular na sistemática de fungos.** Revisão Anual de Patologia de Plantas. V.6. p. 197-230, 1998

LOBO JÚNIOR, M. e ABREU, M.S. **Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's.** Ciência Agrotécnica**,** Lavras, v.24, p.521-526, 2000.

LOBO JUNIOR, M.; BRANDÃO, R. S.; CORRÊA, C. A.; GÖRGEN, C. A.; CIVARDI, E. A.; OLIVEIRA, P. de. **Uso de braquiárias para o manejo de doenças causadas por patógenos habitantes do solo.Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão**, 2009. 8 p. (Embrapa Arroz e Feijão. Comunicado técnico, 183).

MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C.F. e ANTONIOLLI, Z. I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v.35, n.1, p. 274-288, 2012.

MARCELLO, C. M. **Avaliação da expressão e caracterização de uma exo**-b-**1,3-glucanase envolvida no mecanismo de micoparasitismo de *Trichoderma asperellum.*** Brasília-DF, 2008. 89f. Tese de Doutorado. Laboratório de Enzimologia Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília – UnB. Brasília – DF. 2008.

MARQUES, H. I. P.; SILVA, M. B.; MARQUES, M. D. P.; RODRIGUES, R. C.; RIBEIRO, P. R. C. C. **Inibição do crescimento micelial de *Trichoderma harzianum* por fertilizantes líquidos**. Enciclopédia Biosfera, v. 10, n. 18, p. 2040, 2014.

MARTINS, M. K.. **Variabilidade genética de isolados de Fusarium spp. e estudo da interação com a planta hospedeira.** 2005. 110f. Diss. Tese (Doutorado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura" Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, SP.[Links], 2005

MASSOLA JR, N.S.; BEDENDO, I. P.. **Doenças da mandioca**. In: KIMATI, H. *et al*. Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas;. 4ª Ed.vol. 2, p. 340-341 – São Paulo: Agronômica Ceres, 2005

MELO, I. S. **Potencialidades da utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas.** In: BETTIOL, W. (Ed.). Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: CNPDA/EMBRAPA, 1991. p. 135-156.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa DNPMA, p. 393-419, 1998.

MELO, I.S. ***Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas**. Revis. Anu. Patol. Plantas v. 4, p. 261-295. 1996.

MENEZES, J. P., LUPATINI, M., ANTONIOLLI, Z. I., BLUME, E., JUNGES, E., & MANZONI, C. G. Variabilidade genética na região its do rDNA de isolados de trichoderma spp.(Biocontrolador) e Fusarium oxysporum f. sp. Chrysanthemi. *Ciência e Agrotecnologia*, *34*(1), 132-139.2010

MICHEREFF, S.J.; MENEZES, M.; MARIANO, R.L.R. **Potencial de *Trichoderma* para o controle da antracnose do sorgo**. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 18, p. 392-398, 1993.

MILANESI, P.M. **Caracterização, toxicidade e patogenicidade de *Fusarium* spp. em genótipos de soja em sistema plantio direto**. 2009. 91 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

MORAES, W. B. C. **Controle alternativo de fitopatógenos**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 27, n. 13, p. 175-190, 1992.

MORAIS, M. dos S.; NASCIMENTO, L. C do; MOREIRA, K. A.; SILVA, M. da; CAVALCANTI, N. T. D. O. **Levantamento e avaliação da incidência das doenças da mandioca no estado da Paraíba**. Summa Phytopathologica, v. 39, n. 3, p. 204. 2013.

MOURA, G. de M.; SILVA, M. D. O. da. **Avaliação de resistência de cultivares de mandioca à podridão de raízes**. Embrapa-CPAF/AC. Comunicado Técnico, 4p. Rio Branco 1997.

MUNIZ J. N, RUFFINO-NETTO A, YAMAMURA M, VILLA TCS, ARCENCIO R. **Aspectos epidemiológicos da coinfecção tuberculose e vírus da imunodeficiência humana em Ribeirão Preto** (SP), de 1998 a 2003. *J. Bras. Pneumol.*, 32(6):529-34, 2006

NASCIMENTO JÚNIOR, N. A. **Efeito da casca de mandioca no controle da podridão radicular causada por *Phytophthora* sp. em mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz) var. Rosinha em ambiente irrigado.** Rio Largo-AL,2015.82f. Tese de Doutorado. (Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas. Alagoas. 2015.

NOTARO, K. A. MEDEIROS, E. V., SILVA, C. A. D., & Barros, J. A. **Prospecção de fitopatógenos associados á podridão radicular da mandioca em Pernambuco, Brasil**. Biosci. J**.,** Uberlândia, v. 29, n. 5, p. 1832-1839, 2013.

NOTARO, K. A. **Prospecção de fitopatógenos e caracterização de solos arenosos envolvidos na supressividade ou conducividade da podridão radicular da mandioca, causada por *Neoscytalidium lignicola*/ Krystal de Alcantara Notaro**. Garanhuns-PE, 2012. 111f. Dissertação (PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO

AGRÍCOLA)**.** Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, 2012.

O`DONNELL, K.; NIRENBERG, H.I.; AOKI, T.; CIGELNIK, E. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikoroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species.**Mycoscience**, Tokyo, v. 41, p. 61-78, 2000.

OLIVEIRA, L. G. SILVA, A.C.S; SILVA, R. L. ,LIMA, D. W. S & LIMA, G; COSTA. **Atividade proteolítica de fungos de solo fitopatogênicos ao Feijão-Caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]** In: III CONAC Congresso Nacional de Feijão-Caupi. Pernambuco. Resumo expandido. 4p. 22-24 de abril Recife Pernambuco 2013.

OLIVEIRA, N. T; J. M. A., UCHÔA, S. C. P., RODRIGUES, G. S., MELVILLE, C. C., & de ALBUQUERQUE, J. D. A. A.. Caracterização e identificação de clones de mandioca produzidas em Roraima para o consumo in natura. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 5, n. 3, p. 188-193, 2012.

OTTONI, R.J. **Analise da incidência de *Fusarium* spp. toxigenicos e de níveis de fumonisinas em grãos ardidos de milho hibrido.** 2008. 54 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

PEREIRA, C O.F. **Estudo da patogenicidade e controle biológico de *Fusarium* sp. Com *Trichoderma* sp**. 2013.74f. Dissertação. Universidade de Caxias do Sul. 2013.

PUHALLA, J.E. Genetic considerations of the genus *Fusarium*. In: Nelson, P.E.; Toussoun, T.A.; Cook, R.J. (Ed) **Fusarium: diseases, biology, and taxonomy.** Pennsylvania: Pennsylvania State University, v.27, p.291-305, 1981.

QUERALES, P. J.. **Caracterização morfológica e genética de Fusarium spp. isolados de sementes e associados à podridão do colmo de milho** *(Zea mays L.)*. Diss. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz, 2010.

REMUSKA, A.C.; DELLA PRIA, M. Efeito de *Bacillus truringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento de fungos fitopatogênicos. **Publication UEPG**: Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharia, Ponta Grossa, v.13, n.3, p.31-36, 2007.

ROBBS, F. C. **Controle Biológico de doenças em plantas**. In: NETO, A. M. A.; BARAN, C. L. (ed.). Manual de Controle Biológico. Rio de Janeiro: Lidador. 1992. p.46-51.

ROLLAN M, MONACO C, NICO A. **Efecto de la tempratura sobre la interaccion invitr o entre especies de *Tricihoderma* y *Sclerotinia sclerotiorum, S. minor* y *Sclerotium rolfsii***. Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. 14:1-16. 1999.

RONDÓN T.R, GUTIÉRREZ GR, ZAYAS A.D.P, PÉREZ LA, CUTIÑO Y.L. **Efectividad in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai para el biocontrol de Rhizoctonia solani Kühn y Pyricularia Grisea sacc. aislados en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* l.**). Fitosanidad 11: 29-34.2007.

SALLA, D. A., CABELLO, C. **Análise energética de sistemas de produção de etanol de mandioca, cana-de-açúcar e milho**. Revista Energia na Agricultura**.** Botucatu, vol. 25, n.2, p.32-53., 2010.

SANTOS, C. C., OLIVEIRA, F. A. de; SANTOS, M. S. dos; TALAMINI, V.; FERREIRA, J. M. S.; SANTOS, F. J. dos., **Influência de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa***. Scientia Plena 8, 047309 www.scientiaplena.org.br . 2012

SEIFERT, K.A. Enhancing the relevance of fungal taxonomy to plant pathology: phylogenetics, molecular diagnostics, and long-term memory1. Symposium contribution. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Otawa, v. 28, p. S280-S287, 2006.

SILVA, A. N.; AZEVEDO, G. B.; ROCHA-SOBRINHO, G. G.; NOVAES, Q. S.; **Efeito de produtos químicos e de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium solani* do maracujazeiro**. Interciencia, v. 6, p. 398-403, 2014.

SILVA, C. A. D., DE MEDEIROS, E. V., BEZERRA, C. B., DE MORAIS; SILVA, W., DE BARROS, J. A., & DOS SANTOS, U. J. **Interferência da incorporação de matéria orgânica no solo no controle da podridão negra da mandioca, causada por Scytalidium *lignicola*. Biosci. J.,** Uberlândia, v. 29, n. 6 , p. 1823-1831, Nov./Dec. 2013.

SILVA, C. A. D., **Prospecção em fitopatógenicos e avaliação de fontes de matéria orgânica sobre a supressividade da podridão radicular da mandioca**. Garanhuns- PE, 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado em Produção Agrícola). Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, 2013.

SILVA, H. S. A.; ANDRADE, E. C. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças da mandioca no Brasil. In: **Impactos das mudanças climáticas sobre doenças de importantes culturas no Brasil.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 263-272, 2011.

SILVA, J. L.; TEIXEIRA, R. N. V. **Esporulação e crescimento micelial de *Fusarium solani* em diferentes meios de cultura e regimes de luminosidade**. Revista

Agrombiente On-line,v.6,n.1,p.47-52, 2012. Disponível em: <http://revista.ufrr.br/index.php/agroambiente/article/view/604>

SILVA, K. S.; REBOUÇAS, T. N. H.; BOMFIM, M. P.; SILVA, D. S.; SÃO JOSÉ, A. R.; BENETT, C. G. S. **Atividade antagônica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora***. Londrina. Semina: Ciências Agrárias, v. 29, n. 4, p. 749-754, out./dez. 2008.

SILVA, M.B.; NICOLI, A. COSTA, A.S.V.; BRASILEIRO, B.G.; JAMAL, C.M., SILVA, C. A.; PAULA JÚNIOR, T. J.; TEIXEIRA, H. **Ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero *Colletotrichum***. Revista Brasileira de Plantas Medicinais , Botucatu, v.10, n.3, p.57-60, 2008.

SOUSA, R.M.S.; SERRA, I.M.R.S.; MELO, T.A. **Effect of essential oils as an alternative in the control of *Colletotrichum gloe*sp*orioides* in pepper**.Summa Phytopathologica , v.38, n.1, p.42-47, 2012.

SOUZA, J. R., **Potencialidade de fungicida e agente biológico no controle de requeima do tomateiro**. 2013. 63f. Dissertação. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista. Bahia – BR. 2013.

SOUZA, K. de A.;VAZ, M. C. A.; ALVES, G. C. S.; PAZ -LIMA, M. L.. **Confronto in vitro de isolados de *Trichoderma* spp. com fungos filamentosos**. 2p. IV Congresso Estadual de Iniciação Científica do IF Goiano 21 a 24 de setembro de 2015.

SPIEGEL, Y.; CHET, I. **Evolution of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant parasitic nematodes in Israel**. Integrated Pest Management Review, v. 03, p. 167-175, 1998.

STANGARLIN, J.R. *et al*. **Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal**. Revisão Anual de Patologia de Plantas, v.16, p.265-304, 2008.

TOCAFUNDO, F., **Avaliação de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *Phytophthora palmivora* em mamoeiro**. 2008.66f, Dissertação Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus– Bahia. 2008.

URBEN, A.F., et al., **Curso taxonomia de *Fusarium***. Embrapa recursos genéticos e biotecnologia. Brasilia-DF: Embrapa informação tecnólogica, 2009.

VENTURA, J. A. **Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados: I- história, meios e procedimentos de cultivo**. Revisão Anual de Patologia de Plantas , Passo Fundo, v. 7, p. 271-298, 1999.

VINALE F, SIVASITHAMPARAM, K., GHISALBERTI, E. L., MARRA, R., WOO, S. L., & LORITO, M.. ***Trichoderma*–plant–pathogen interactions**. Soil Biology and Biochemistry, v. 40, p.1-10.2008.

ZUCCHI, F. O**. *Trichoderma* sp. em áreas agrícolas visando o controle de doenças fúngicas de raízes de plantas cultivadas**. Campinas SP. JV Biotecnologia. 15p. 2010.

3.ETIOLOGIA DA PODRIDÃO RADICULAR DA MANDIOCA NO ESTADO DE ALAGOAS E AVALIAÇÃO DO EFEITO DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Fusarium falciforme*.

RESUMO

A podridão radicular é a doença mais limitante da produção de mandioca nas Regiões Norte e Nordeste do Brasil, com perdas que chegam a aproximadamente 70%. Este trabalho teve como objetivos identificar os agentes causais da podridão radicular da mandioca cv Rosinha no Estado de Alagoas, proceder a caracterização morfológica e molecular de *Fusarium* sp. e de seu biocontolador (*Trichoderma* spp.). Para tanto foram conduzidos três experimentos No primeiro experimento, estudou-se as espécie de patógenos, causadores da podridão radicular da mandioca, através do isolamento, caracterização morfológica e confirmação da patogenicidade. Posteriormente, em um segundo experimento avaliou-se a capacidade de inibição dos isolados de *Trichoderma* spp., obtidos da rizosfera da mandioca e da coleção de microrganismos da Embrapa Meio Ambiente-SP, sobre o desenvolvimento de *Fusarium* sp. No terceiro experimento, procedeu-se a caracterização molecular de *Fusarium* sp. e de *Trichoderma* spp. Inicialmente, solo da rizosfera e raízes tuberosas de mandioca, apresentando sintomas de podridão foram coletados e submetidos a isolamento. Em seguida, realizou-se a seleção de isolados de *Trichoderma* pela técnica de confrontamento e produção de metabólitos. Posteriormente, a caracterização molecular de *Fusarium* sp. e de *Trichoderma* spp. foi realizada através do sequenciamento da região ITS e análise filogenética. Os fungos isolados foram *Fusarium* sp., *Neoscytalidium* sp. e o oomiceto *Phytophthora* sp., todos patogênicos às raízes e plantas de mandioca. Foram obtidos 12 isolados de *Trichoderma,* entRe os quais, sete *(*T2; T3; T5; T6; T10; T13; T15) produziram substâncias bioativas que inibiram o desenvolvimento de *Fusarium* sp. O estudo filogenético baseado na região ITS do DNA construído usando o método de ‘‘maximum Likelihood Tree’’ com base em 1000 réplicas de “bootstrap”, mostrou 100% de similaridade genética com a espécie *Fusarium falciforme*. Os isolados de *Trichoderma* foram identificados como *T. harzianum* (T6), *T. citrinoviride* (T5) e *T. orientale* (T15).

Palavras-Chave: *Manihots* sp., Controle biológico, Fungo.

ETIOLOGY OF CASSAVA BROWN STREAK IN THE STATE OF ALAGOAS AND *Trichoderma* spp EVALUATION OF THE EFFECT OF ISOLATES OF *Trichoderma* spp ON THE DEVELOPMENT OF *Fusarium falciforme*.

ABSTRACT

Root rot is the most limiting disease of cassava production in the North and Northeast regions of Brazil, with losses reaching approximately 70%. The objective of this work was to identify the causal agents of root rot of cassava cv Rosinha in the State of Alagoas, to perform the morphological and molecular characterization of Fusarium sp. And its biocontainer (Trichoderma spp.). For this purpose, three experiments were carried out. In the first experiment, the pathogen species responsible for root rot of cassava were studied through isolation, morphological characterization and confirmation of pathogenicity. Later, in a second experiment, the inhibition capacity of the Trichoderma spp. Isolates obtained from the manioc rhizosphere and the collection of microorganisms of Embrapa Meio Ambiente-SP on the development of Fusarium sp. In the third experiment, the molecular characterization of Fusarium sp. And Trichoderma spp. Initially, soil of rhizosphere and tuberous roots of manioc, presenting symptoms of rot were collected and submitted to isolation. Then, the selection of Trichoderma isolates was performed by the technique of comparison and production of metabolites. Subsequently, the molecular characterization of Fusarium sp. And Trichoderma spp. Was performed through the ITS region sequencing and phylogenetic analysis. The isolated fungi were Fusarium sp., Neoscytalidium sp. And Phytophthora sp., All pathogenic to roots and cassava plants. Twelve isolates of Trichoderma were obtained, and seven (T2, T3, T5, T6, T10, T13, T15) produced bioactive substances that inhibited the development of Fusarium sp. The phylogenetic study based on the ITS region of the DNA constructed using the " Maximum Likelihood Tree " method based on 1000 bootstrap replicates, showed 100% genetic similarity with the falciform Fusarium species. Trichoderma isolates were identified as T. harzianum (T6), T. citrinoviride (T5) and T. orientale (T15).

Key words: Manihots sp., Biological control, Fungus.

3.1. INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é muito importante para o Nordeste brasileiro, notadamente para o Estado de Alagoas. Seu principal uso é na alimentação humana e animal, como matéria prima para indústria de biocombustível, plásticos biodegradáveis, processamento de carnes, na produção de massas, produtos têxteis e amidos modificados (CONAB, 2013; OLIVEIRA *et al*., 2012; FRAIFE FILHO & BAHIA, 2015).

Por exercer um impacto social bastante significativo, que vai da mão de obra, plantio, beneficiamento e principalmente pelo seu teor nutricional, a mandioca e seus derivados é dos alimentos mais consumidos no mundo. Essa cultura ocupa a sexta posição em área plantada. Entretanto, enfrenta muitos desafios, principalmente no emprego de técnicas que possibilitem aumentar a produção de raízes, processamento, comercialização e problemas fitossanitários (NOTARO *et al.*, 2013; SILVA, 2013).

Os prejuízos causados pela podridão radicular são fatores limitantes nas regiões Norte e Nordeste do pais (NASCIMENTO JÚNIOR, 2015). Entretanto, registros sobre os principais fitopatógenos envolvidos na podridão radicular são incipientes, apesar da importância para servir como ferramenta para tomada de decisão sobre qual a melhor estratégia de manejo a ser utilizada.

Uma das maneiras de conter os prejuízos causados por essa doença é o uso de agroquímicos que quando usados de forma irresponsável causam grande prejuízo ao ambiente devido ao resíduo toxico. Uma forma de conseguir que se tenha uma redução no uso desses agrotóxicos é a utilização de agentes de controle biológico, sendo o fungo *Trichoderma* sp. um dos mais promissores (BIZI, 2015; CANCELA, 2015; FIPKE, *et al.*,2015).

Vários são os mecanismos utilizados por *Trichoderma* spp. no controle de fitopatógenos, sendo hiperparasitismo, antibiose e competição os mais conhecidos. Zucchi (2010) relata que a atividade micoparasitica necrotrófica tem grande eficiência em inúmeros fungos fitopatogênicos, principalmente aqueles com estruturas de resistência consideradas difíceis de serem atacadas por microrganismos, como esporos, escleródios, clamidósporos e microescleródios. Outro mecanismo importante dos biocontroladores é a produção de substâncias bioativas voláteis ou não voláteis que são capazes de impedir o desenvolvimento de outros organismos de espécies diferentes (DIAS, 2011; CARVALHO FILHO, 2013; MATOS *et al.*, 2014).

Devido à importância da cultura da mandioca e os problemas fitossanitários existentes, pesquisas voltadas à identificação dos agentes etiológicos de doenças e seu controle são cada vez mais necessárias. Por estes motivos, este trabalho teve como objetivos identificar os agentes responsáveis pela podridão radicular da mandioca e avaliar a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. em inibir o desenvolvimento de *Fusarium* sp.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. . LOCAL DE EXECUÇÃO.

Os trabalhos foram conduzidos no laboratório de Fitopatologia e de Fitopatologia molecular, da Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias (CECA), da Universidade Federal de Alagoas (UFAL)- Campus Delza Gitaí, em Rio Largo, Estado de Alagoas.

3.2.2. COLETA DE SOLO E OBTENÇÃO DOS ISOLADOS

As coletas de solo e raízes foram realizadas em áreas produtoras de mandioca cv rosinha, nos municípios de Campo Alegre, São Sebastião, Arapiraca e Penedo no Estado de Alagoas, que apresentavam problemas de podridão radicular. As amostras constaram de pelo menos 5 sub-amostras coletadas (entre espaços de 3 até 10m e 5-15cm de profundidade), homogeneizadas e não peneiradas, resultando numa amostra final de 100-150g. As amostras foram acondicionadas em recipientes plásticos e mantidas em caixa de isopor durante as viagens.

Para o isolamento dos microrganismos utilizou-se a técnica de diluição seriada, conforme metodologia de Tuite (1969): 25g de cada amostra de solo foram homogeneizadas manualmente e transferidas para Erlenmeyeres contendo 225mL de água destilada esterilizada (ADE) com 5 gotas de Tween 10, para facilitar o desprendimento das estruturas dos isolados das partículas de solo; e isolamento indireto das raízes que apresentaram sintomas da doença (ALFENAS *et al*., 2007).

Para o isolamento dos patógenos, o material foi mantido sob agitação por 5 minutos, posteriormente, 10 mL da suspensão foi transferida para 90 mL de ADE (água destilada esterilizada) e agitada brevemente. A operação foi repetida até a diluição 10^{-8}. Em seguida 1,0 mL dessa suspensão foi transferida para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata – 200 g, Dextrose – 20 g, Ágar – 18 g e água destilada – 1000 mL).

Para o isolamento de *Trichoderma* sp., as suspensões das amostras de solo foi mantida sob agitação constante por 30 minutos, seguida das diluições em ADE e transferência de 1,0mL das suspensões, 10^{-3} e 10^{-4} para os meios de cultura BDA e EM- Extrato de Malte (malte 20 g, ágar 20 g e água 1000 mL).

As placas foram mantidas em condições ambiente (28±2°C), em regime de alternância luminosa e escuro para isolamento dos patógenos e biocontroladores, respectivamente. Após sete dias, verificou-se o crescimento das colônias. Posteriormente, os isolados dos patógenos e de *Trichoderma* foram transferidos e preservados em BDA em temperatura ambiente.

Os isolados obtidos foram repicados para placas de Petri contendo meio BDA. Após sete dias, foram feitas observações em lâminas para identificar as estruturas dos isolados. As medições das estruturas propagativas foram realizadas através de imagens capturadas por câmera digital (Olympus IX2-SLP) acoplada ao microscópio óptico com aumento de 400x, projetada em monitor de computador, através do software Cellsenses Standard (SAMSUNG SDC-415®). Foram efetuadas 50 medições de cada tipo de estrutura produzida.

3.2.3. TESTE DE PATOGENICIDADE E REISOLAMENTO

O teste de patogenicidade foi realizado, conforme Nascimento Júnior (2015), em raízes e em plantas de mandioca da cultivar rosinha, pois a região onde foram coletados o solo com problema de podridão era desta variedade. As raízes foram lavadas com água e sabão líquido e depois desinfetadas com álcool a 70%, durante 5 minutos, hipoclorito de sódio 2,5% durante 3 minutos, e lavadas com ADE, duas vezes por 2 minutos. Após o procedimento de desinfestação, as raízes foram secas e postas em bandejas plásticas. A inoculação de cada isolado foi realizada em raízes de mandioca com ferimento, usando perfurador de aproximadamente 6,0 mm de diâmetro, retirando um disco do tecido vegetal e colocando outro de meio de cultura BDA contendo micélio dos microrganismos isolados. Para a testemunha, o mesmo procedimento foi realizado, sendo que o disco de BDA não continha propágulo dos patógenos.

As raízes inoculadas foram mantidas em câmara úmida, preparadas com sacos plásticos transparentes e um chumaço de algodão hidrófilo umedecido com ADE, durante 48h. Após este período, as raízes de mandioca foram avaliadas observando se apresentavam sintomas da doença, característicos de cada patógeno.

Para o teste de patogenicidade em plantas, manivas de mandioca cv. rosinha foram semeadas em copos plásticos de 500mL contendo solo autoclavado. As manivas foram previamente desinfestadas com álcool a 70%, durante 5 minutos, hipoclorito de sódio 3%, por 2 minutos, e lavadas com ADE duas vezes por 1 minuto.

Trinta dias após o plantio, as plantas foram inoculadas com três discos de BDA contendo micélio dos fitopatógenos sobre ferimentos previamente feitos na altura do caule das plantas. Foram mantidos em câmera úmida durante 72h.

As plantas que apresentaram sintomas típicos da doença foram utilizadas para o reisolamento do patógeno em placas de Petri contendo meio BDA, sob condições ambientais a fim de confirmar a identidade do patógeno.

3.2.4. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIOCONTROLE DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Fusarium* sp.

Para avaliar o potencial de biocontrole dos isolados de *Trichoderma* contra *Fusarium* sp., foram utilizados doze isolados de *Trichoderma* spp., obtidos dos pontos de coleta e três isolados disponibilizados pelo laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Alagoas.

Utilizou-se o método do pareamento, que consistiu em confrontar discos (5mm de diâmetro) de meio de cultura contendo estrutura do patógeno e o antagonista em uma única placa de Petri contendo meio BDA, equidistantes entre si. Como testemunha, usou-se o patógeno cultivado isoladamente. As placas foram mantidas por sete dias em temperatura ambiente (28±2ºC) e fotoperíodo de 12h.

O grau de antagonismo foi avaliado utilizando da escala de notas descrita por Bell *et al*. (1982), que atribuí notas de 1 a 5, a depender do micelial dos isolados de *Trichoderma* sobre o crescimento micelial do fitopatógeno (Tabela 1) e também por meio do diâmetro ortogonal das colônias com auxílio de um paquímetro WESTERN®Pro Digital Caliper. Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) foi aplicada a fórmula proposta por Abbott (1925)[1], citado por Nascimento Júnior (2015), (Eq 1), sendo que o período de avaliação foi quando o patógeno atingiu o diâmetro da placa na testemunha.

---

[3]ABBOTT, W. S. **A method of computing the effectiveness of an insecticide**. Journal of Economic Entomology, Lanhan, v. 18, p. 265-267, 1925.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 15 tratamentos e 4 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey de significância a 5%.

Tabela 1. Escala de Bell *et al*. (1982)

Nota (1) - *Trichoderma* completamente crescido sobre o patógeno preenchendo toda placa;
Nota (2) - *Trichoderma* com crescimento de pelo menos 2/3 da superfície do meio;
Nota (3) - *Trichoderma* e patógeno ocupando cerca de 1/2 da superfície do meio cada um, não havendo nenhum domínio de um sobre o outro;
Nota (4) - Patógeno colonizando pelo menos 2/3 da superfície do meio e aparentemente sendo impedido de crescer devido ao *Trichoderma*;
Nota (5) - Patógeno crescido sobre o *Trichoderma* preenchendo a superfície do meio.

$$PIC(\%) = \frac{(T - t)}{T} \times 100 \qquad (Eq.1)$$

Em que: PIC- percentagem de inibição do crescimento micelial (%); T- testemunha em milímetro (mm) e t- tratamento avaliado em milimetro (mm).

3.2.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

3.2.5.1. Extração do DNA de *Fusarium* sp. e dos isolados de *Trichoderma* spp.

Discos de micélio de isolados de *Fusarium* sp. e de *Trichoderma* spp. foram transferidos para Erlenmeyers com 30 mL de meio líquido sacarose-extrato de levedura-asparagina (ALFENAS et al.,1991). Após cinco dias, os micélios foram retirados e os excessos do meio lavados com água destilada esterilizada. Para extração, 200mg do micélio de cada isolado foram transferidos para almofariz e refrigerados a – 80º C por cinco minutos. Em seguida, os micélios foram macerados na presença do tampão de extração, conforme o protocolo de extração CTAB (cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide), segundo DOYLE; DOYLE (1987).

Os micélios triturados foram transferidos para dois tubos de micro-centrífuga com capacidade de 1,5 mL. Em seguida, adicionou-se 1 mL de tampão de extração (CTAB 4%, NaCl 1,4M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, PVP 1%), 4 µL de β-mercaptoetanol, e depois,

os tubos foram mantidos em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foi adicionado 600 µL de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico 24:1). Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, acrescentando –se 400 µL de etanol absoluto.

O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e seco em temperatura ambiente e, em seguida, ressuspendido com 40 µL de TE (Tris-EDTA; Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM) + RNAse (10µg/mL). A qualidade do DNA foi estimada visualmente em gel de agarose 0,8%. O material foi armazenado sob a temperatura de -20°C.

3.2.5.2. Amplificação do DNA e sequenciamento dos produtos de PCR

Os isolados obtidos foram amplificados com o gene que codifica para a região ITS-rDNA (Tabela 2).

Tabela 2. Descrição do primer utilizado para identificação dos gêneros fúngicos.

Gene	Primer	Sequencia (5'-3')	Referências
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al., 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

As reações de PCR foram preparadas com tampão 10X, $MgCl_2$ 50 mM, DNTP's 10 mM, 10 µM de cada oligonucleotídeo, 1U de Taq DNA Polimerase e 1µL de DNA diluído (1:20). O volume final das reações foi ajustado para 60µL com água Milli-Q autoclavada. As reações de PCR ocorreram em termociclador Applied Biosystems (2720 Thermal Cycler) nas seguintes condições para a região ITS: desnaturação inicial de 95°C por 2 min e 38 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 30 s, 72°C por 45 s e um ciclo final de 10 min por 72°C. Em seguida, o produto de PCR foi enviado, para purificação e sequenciamento com os mesmos primers utilizados na amplificação, para Macrogen Inc. (Seoul, Coréia do Sul).

3.2.5.3. Sequenciamento e Análises filogenéticas

O sequenciamento foi realizado pela Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul) diretamente dos produtos de PCR purificados e posteriormente, comparadas com outras

sequências depositadas no Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), utilizando o programa BlastN (*Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*), para a identificação preliminar da espécie do fungo com maior porcentagem de identidade. Também foram comparadas com sequências no banco de dados Q-Bank Fungi (http://www.q-bank.eu/fungi/) para determinar os gêneros fúngicos com os quais compartilharam maior identidade de sequência.

Alinhamentos múltiplos de sequências nucleotídicas foram preparados utilizando-se o algoritmo MUSCLE (EDGAR, 2004) e ajustados manualmente no pacote MEGA6 (TAMURA et al., 2013). Inferência Bayesiana foi realizada no *web portal* CIPRES (MILLER et al., 2010) usando MrBayes v. 3.2.3 (RONQUIST et al., 2012). O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi determinado usando MrModeltest 2.3 (POSADA; BUCKLEY, 2004) de acordo com o *Akaike Information Criterion* (AIC). Análises foram rodadas para cada conjunto de dados por 10 milhões de gerações usando quatro cadeias e amostrando a cada 1.000 gerações, para um total de 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas como uma fase de *burn-in*. Probabilidades posteriores (RANNALA; YANG, 1996) foram determinadas a partir de uma árvore consenso *majority-rule* gerada com as 7.500 árvores remanescentes. As árvores foram visualizadas e editadas nos programas FigTree v. 1.4 (ztree.bio.ed.ac.uk/software/figtree) e Inkscape (https://inkscape.org/pt/).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.3.1. IDENTIFICAÇÃO DOS FITOPATOGENOS

Após a diluição em série, foram identificados três fitopatógenos em nível de gênero como agentes causais da podridão radicular da mandioca,

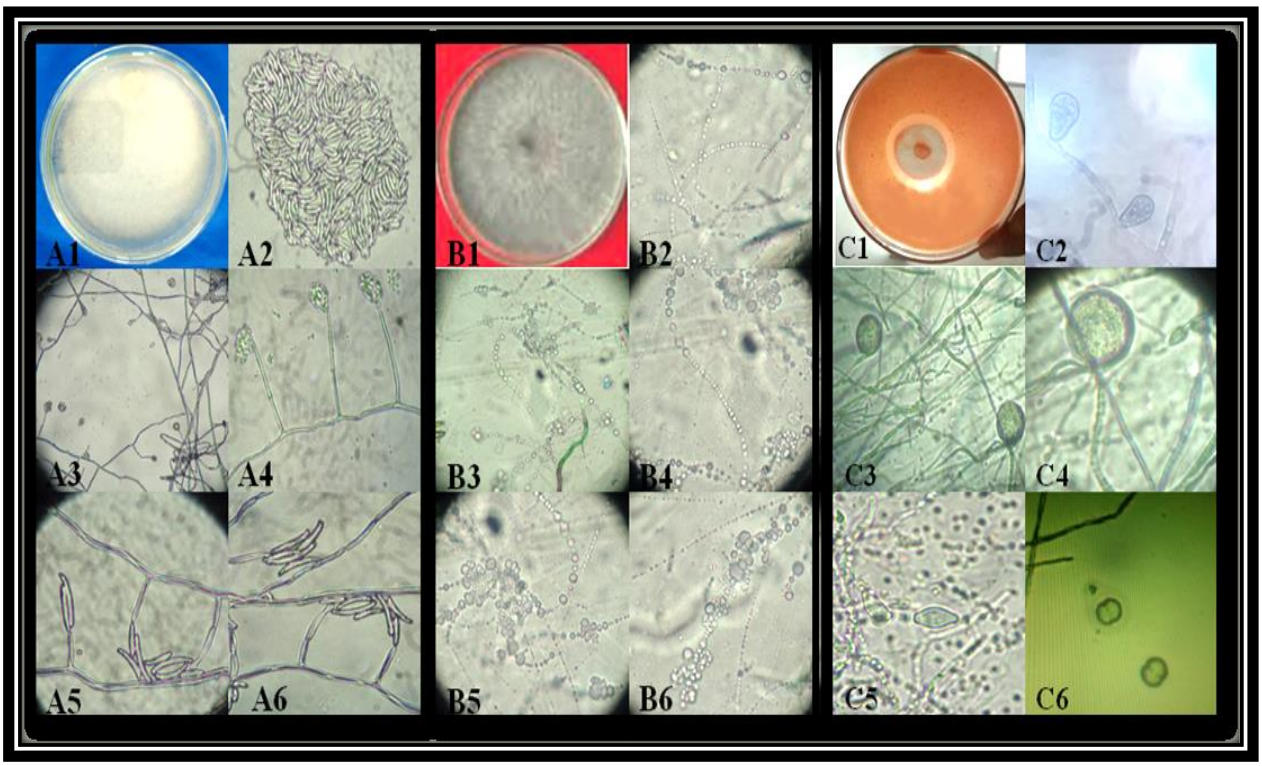
O primeiro isolado apresentou micélio aéreo filamentoso, denso e cotonoso, formado de hifas ramificadas, septadas, variando de branco ao creme, tornando-se levemente avermelhado. Seu crescimento, em placas de 90mm com meio BDA, levou cerca de sete dias. Em lâminas feitas para observação das estruturas foram obervados macroconídios com 3-7 septos e tamanho variando de 27-60 µm x 3-5 µm e microconídios com e sem septos, medindo 8-16 µm x 2-4 µm, de forma cilíndrica a oval. Com auxílio da literatura especializada e observação das estruturas, foi concluído que se tratava do gênero *Fusarium*, pertencente ao complexo *F. solani* (Mart.) Sacc. (Figura 1 A).

O outro isolado encontrado apresentava micélio inicialmente claro e depois chegando até a cor negra. Seu crescimento em meio BDA, em placas de 90mm, levou em média quatro dias. Os conídios mostraram-se escuros, cilíndricos, esféricos ou sub-esféricos, lisos, em cadeia, e a grande maioria sem septo, medindo 4,0-8,5 x 3,5-7,0µm de comprimento e largura, respectivamente. De acordo com as características morfológicas observadas o agente causal foi identificado como *Neocytalidium lignicola* Pesante, conforme descrição de Ellis (1971 Dematiaceous Hyphomycetes. CMI). Discrição semelhante foi encontrada nos trabalhos de Serra *et al.* (2009), Machado *et al*. (2014) e Hohenfeld, 2016. (Figura 1 B).

O terceiro fitopatógeno apresentou crescimento micelial de aspecto felpudo e coloração esbranquiçada com hifas cenocíticas e hialinas. As observações microscópicas revelaram a presença de esporângios com formatos piriformes e elipsoides, não papilados, com dimensões de 33,8-46,46 µm x 21,6-29,6 µm. Os clamidósporos foram raros e apresentaram-se globosos e terminais. Segundo Cother, Griffin (1974), estes propágulos são registrados apenas em alguns isolados de *P. drechsleri*. Outra característica marcante foi à formação de um halo no meio de cultura, visualizado por uma circunferência bem definida ao redor do micélio. De acordo com as características morfológicas observadas e comparadas com a literatura especializada foi concluído que se tratava de *Phytophthora* sp. (Figura 1 C).

Todos esses fitopatógenos isolados e identificados são relatados como causadores podridão de raiz em diversas culturas inclusive na mandioca.

Figura 1. Aspecto das colônias e estruturas reprodutivas dos isolados de fitopatógenos causadores de podridão em mandioca: *Fusarium* sp. (A1-A6), *Neoscytalidium* sp. (B1-B6) e *Phytophthora* sp. (C1-C6). Colônia de *Fusarium* sp. (A1); conídios (A2); célula conidiogênica (A3-A6). Colônia de *Neoscytalidium* sp. (B1); Conídios (B2-B6). Colônia de *Phytophthora* sp (C1); Esporângio (C2); Clamidósporos (C3 E C4); Esporângios (C5) e Esporângios em reprodução (C6).

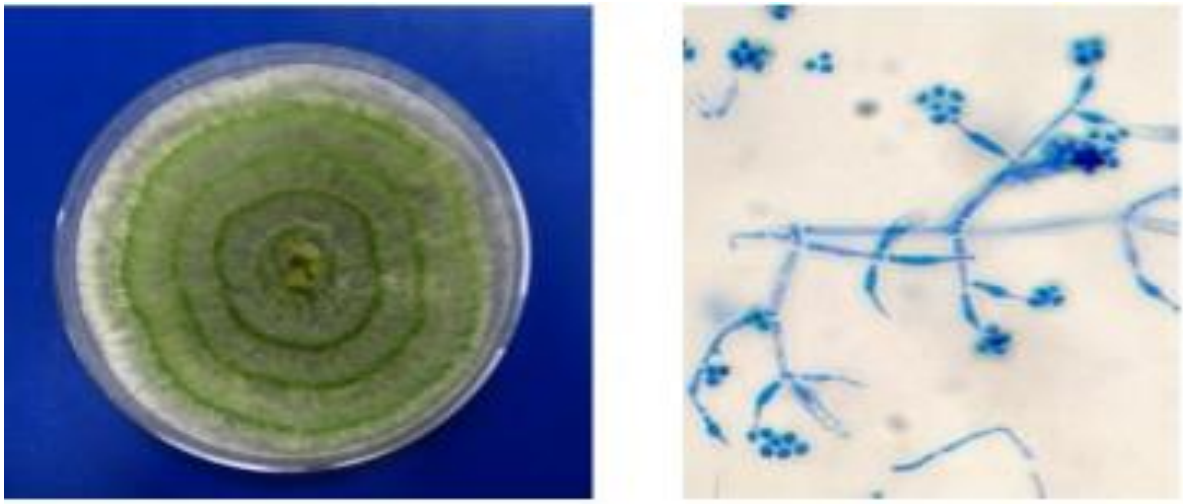


Fonte: SILVA e NASCIMENTO JÚNIOR; (2016).

3.3.2. IDENTIFICAÇÃO DOS BIOCONTROLADORES

Foram obtidos doze isolados de *Trichoderma* spp. que apresentaram crescimento micelial esbranquiçado que originou rapidamente conidióforos hialinos, agregados e muito ramificados, não verticiliados, fiálides simples ou em grupos. Conídios unicelulares, ovoides, com paredes lisas ou ásperas produzidos em pequenos clusters terminais, de coloração verde ou hialinos se espalhando rapidamente sobre a superfície da colônia, medindo 3,8-4,0 x 3,1-3,7 µm, características de espécies de *Trichoderma* (Figura 2).

Figura 2- Aspecto da colônia e estruturas reprodutivas do isolado T6 de *Trichoderma* spp.



Fonte: SILVA; AMORIM (2016)

3.3.3- PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS

Nos testes realizados em raízes, após 5 dias da inoculação foram observados sintomas iniciais de podridão, que variaram de consistência de acordo com o isolado: algumas apresentavam aspecto seco e crescimento cotonoso de coloração esbranquiçada, outras apresentavam tecidos desintegrados e consequente podridão mole, com odores muito fortes, semelhantes ao de matéria orgânica em decomposição e mostraram uma coloração acinzentada e em outras a podridão tinha a coloração negra (Figura 3).

Foram realizados reisolamentos em meio BDA e os materiais apresentaram as mesmas características, confirmando, desta forma, que os microrganismos causadores das podridões radiculares em mandioca cv rosinha foram *Fusarium* sp. *(*podridão seca), *Phytophthora* sp. (podridão mole) e *N. lignicola* (podridão negra) que foi com bases no sequenciamento de regiões genômicas foi reclassificado para *Neoscytalidium hyalinum.* (MACHADO *et al*. 2014 e HOHENFELD, 2016)

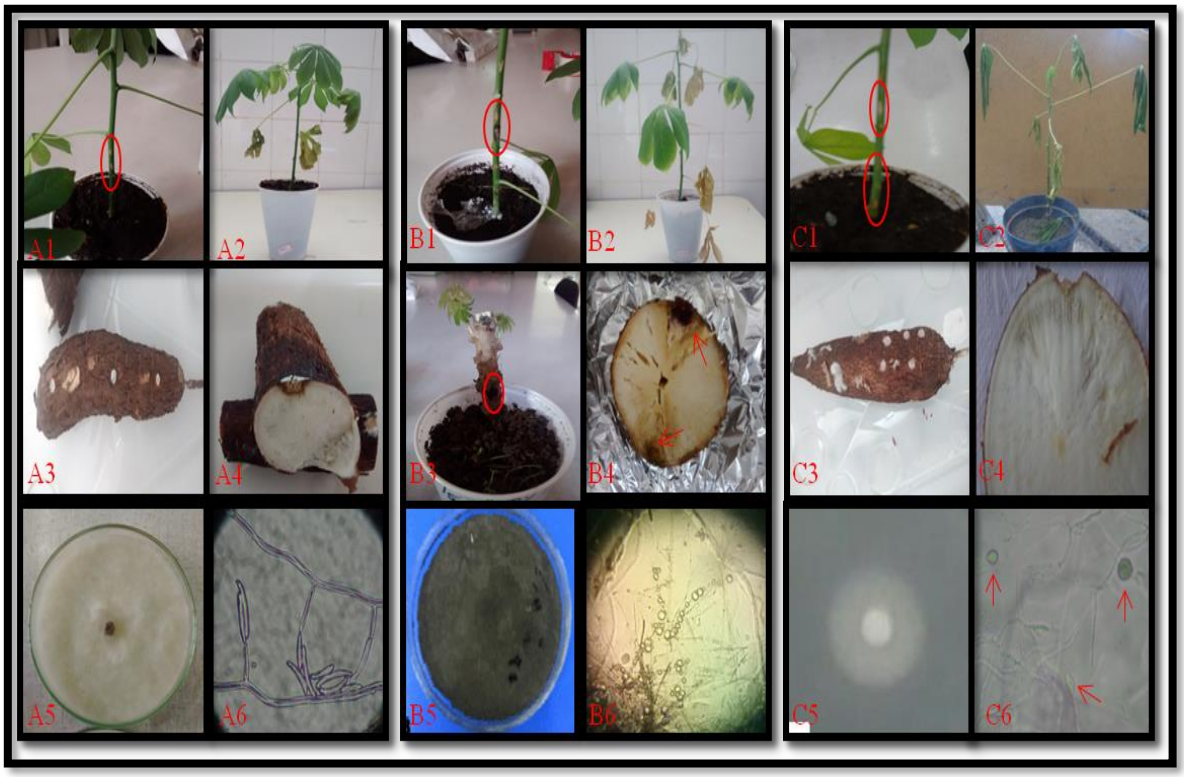
Os isolados também mostraram-se patogênicos às plantas em desenvolvimento. Após 10 dias, as plantas que receberam ferimento no caule e foram inoculadas com um disco contendo micélio, apresentaram lesões características de podridão na região do colo, conforme pode ser observado na Figura 3.

De acordo com Alves e Silva (2003), os mais importantes agentes causadores da podridão radicular em mandioca são *Phytophthora* sp. e *Fusarium* sp., causando podridões

moles e secas nas raízes, respectivamente.

O fungo *N. hyalinum* tem sido descrito também como um importante patógeno na cultura da mandioca causando a podridão negra em raízes e caule. A presença deste patógeno no Brasil foi verificada pela primeira vez no estado de Pernambuco e, em seguida, nos estados do Pará, de Alagoas e do Maranhão (LARANJEIRA *et al.*, 1994; POLTRONIERI *et al.*, 2002; MUNIZ *et al.*, 2006; SERRA *et al*, 2009; MACHADO *et al*. 2014 e HOHENFELD, 2016).

Figura 3. Plantas e raízes de mandioca cv rosinha apresentando sintomas de podridão após inoculação: sintomas de lesão no caule, clorose e murcha nas folhas (A1 e A2) e podridão seca na raiz (A3 e A4), causadas por *Fusarium* sp.; murcha e seca das folhas (B1 e B2), podridão negra no caule e na raiz (B3 e B4), causadas por *Neoscytalidium* sp.*;* lesões no caule, murcha e morte da planta (C1 e C2), crescimento cotonoso na raiz (C3) e podridão mole com degradação da parede (C4) causadas por *Phytophthora* sp.

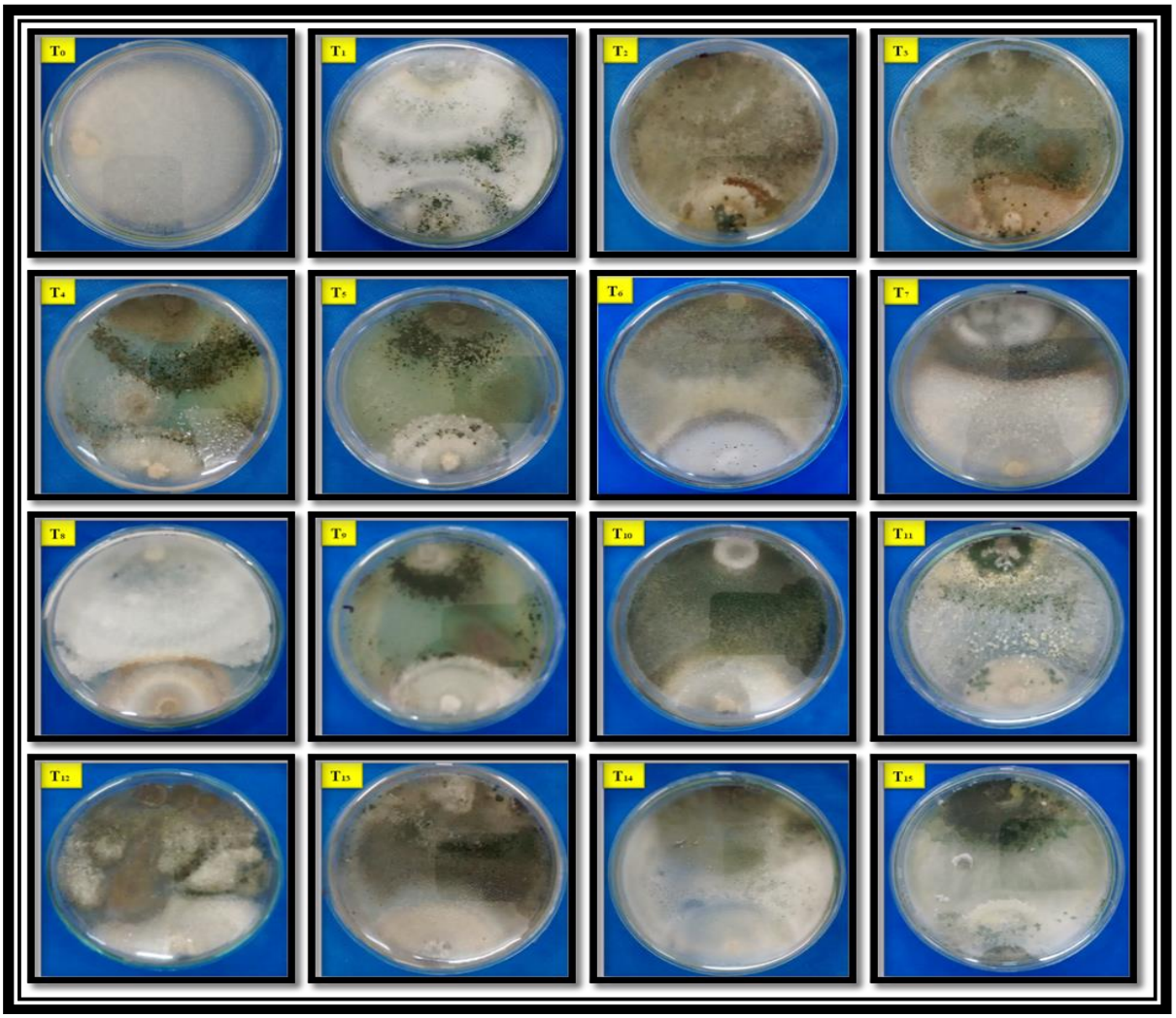


Fonte: SILVA; NASCIMENTO JÚNIOR (2016)

3.3.4. AVALIAÇÃO DA AÇÃO DOS ISOLADOS de *Trichoderma* sp. SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL DE *Fusarium* sp.

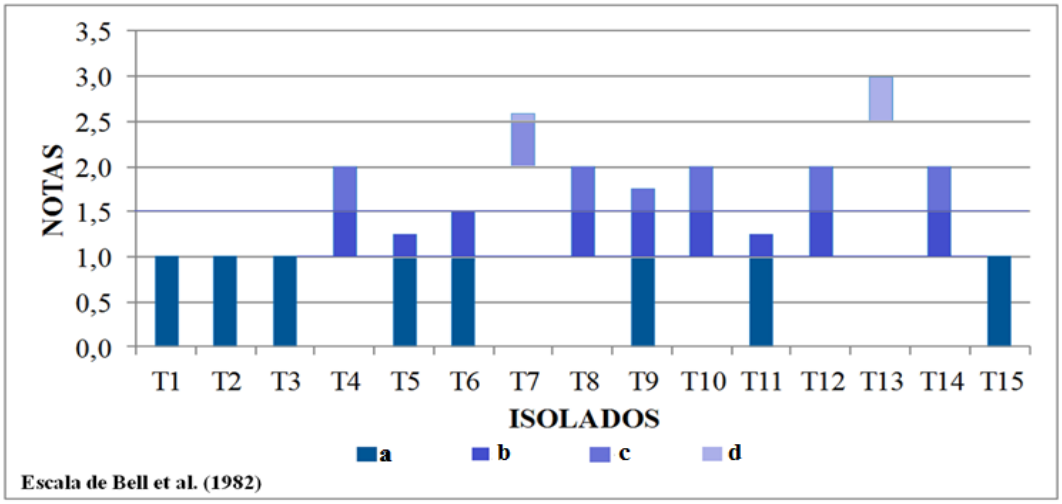
A partir dos resultados obtidos pela escala adotada, verificou-se que aos sete dias, os 15 isolados de *Trichoderma* spp. já provocaram algum grau de inibição no crescimento micelial do fitopatógeno (Figura 4). Após 14 dias foi verificado que os isolados (T1; T2; T3; T5; T6; T9 e T15) obtiveram alta atividade de biocontrole (notas 1) e os isolados (T4; T8; T10; T12 e T14) apresentaram bom desempeno (notas 2). Já os isolados T7 e T13 foram os que obtiveram menor desempenho em sua atividade de biocontrole, ou seja, menor nota entre todos (Figura 5).

Figura 4. Confronto entre os isolados de *Trichoderma* spp. e *Fusarium* sp.: testemunha (T0); isolados de *Trichoderma* spp. na posição superior de cada placa (T1-T15).



Fonte: SILVA e NASCIMENTO JÚNIOR (2016)

Figura 5. Notas atribuídas aos isolados de *Trichoderma* spp. avaliadas após o pareamento.



*Colunas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Vários pesquisadores corroboram com os resultados observados neste trabalho. Estudos semelhantes realizados por Hoffmann *et al.*, (2015) concluíram que dos 15 isolados por ele testados no controle de *Fusarium* sp., mais de 80% dos isolados inibiram completamente o crescimento micelial do fitopatógeno. Os resultados obtidos por Da Silva *et. al*., (2011); Pereira (2013) indicaram um grande potencial de inibição de crescimento micelial de *F. solani* por espécies de *Trichoderma* spp. Souza *et al.* (2015), também relatam que *Fusarium* sp. e *Bipolaris* sp., tiveram seu crescimento fortemente inibido pelos isolados de *Trichoderma* spp. Outros trabalhos realizados por Bomfim *et al.*, (2010); Dias (2011); Lazarotto *et al.*, (2012); Santos *et al.*, (2012); Marques *et al.*, (2014), obtiveram resultados promissores apresentando de bom a ótimo desempenho, no que diz respeito a inibição do crescimento micelial de fitopatógenos por eles testados.

No teste de confronto, os isolados que foram classificados como excelentes (T1; T2; T3; T5; T6; T9 e T15) e bons (T4; T8; 10; T11; T12 e T14) no potencial de biocontrole, detinham a maior velocidade de crescimento e colonizaram placas com meio BDA entre três a quatro dias de incubação, tendo um crescimento de aproximadamente 30mm e 22,5mm/dia, respectivamente. Os isolados classificados como moderados (T7 e T13) colonizaram as placas em cinco dias e foram os que tiveram menor velocidade de crescimento 18,2mm/dia. Dentre todos os isolados o T15 foi o que colonizou a placa de Petri com meio de cultura BDA em

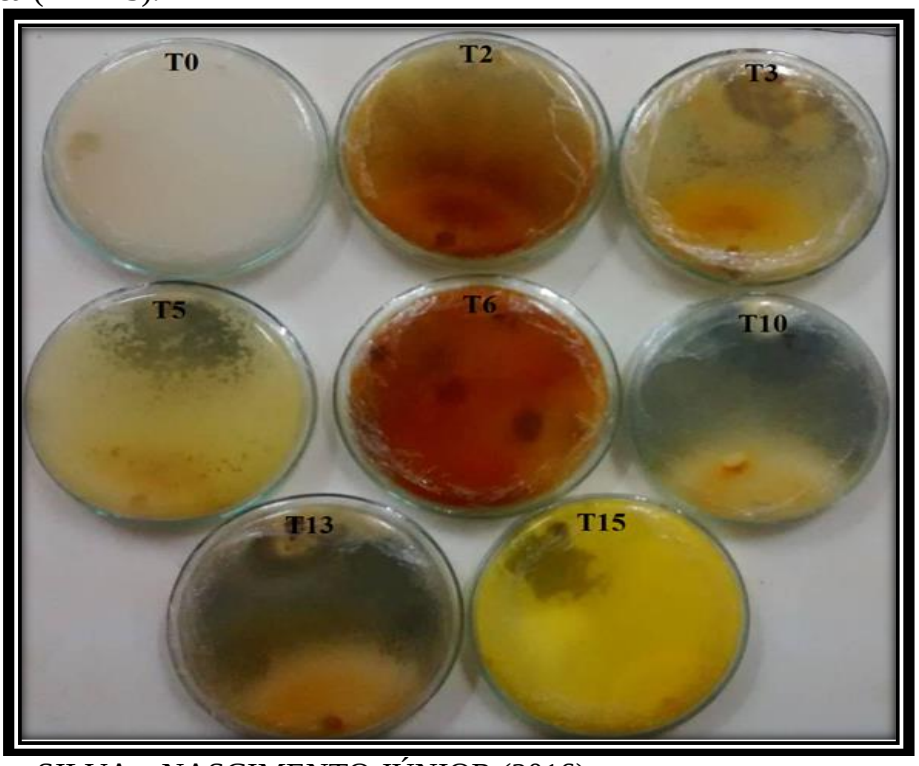
apenas dois dias, tendo uma velocidade de 44,7mm/dia, além de modificar a cor do meio, esporular no terceiro dia. De acordo com Michereff *et al* . (1993), a velocidade de crescimento apresentada por *Trichoderma* spp., tem motivado a utilização deste microrganismo como agente de biocontrole.

As relações desarmônicas, ocorridas entre os isolados de *Trichoderma* spp. e o patógeno, foram observadas desde a velocidade de crescimento, comprovando a sua alta capacidade de assimilação de nutrientes, e no momento do confronto entre o micélio do biocontrolador e patógeno, pois era possível visualizar desde halos de inibição (antibiose) a mudança na coloração na linha de contato entre eles, isso devido a ação de hiperparasitismo ou micoparasitismo.

Outra peculiaridade observada nos isolados de *Trichoderma* spp., utilizados neste trabalho foi que além de apresentarem as características de um bom competidor, alguns isolados modificaram a cor do meio de cultura, sugerindo assim que eles produziam metabolitos (Figura 6). Dentre os isolados que alteraram a coloração do meio, destacam-se os isolados T2; T3; T10 e T13 que só manifestavam essa característica quando entraram em contato direto com o fitopatógeno. A cor do meio variou entre tons de vermelho, amarelo e cinza como constam na Figura 6.

O confronto possivelmente acionou as defesas do fitopatógeno que como resposta liberou substâncias bioativas na tentativa de conter ação hiperparasitica do antagonista. Em contrapartida também esta reação estimulou o biocontrolador a ativar seus bioativos de defesa. Os isolados de *Trichoderma* spp. estudados apresentaram características de competição, hiperparasitismo (estrangulamento e degradação de hifas) e antibiose (liberação de enzimas que hidrolisam a estrutura dos tecidos do fitopatógeno). Estes aparato físico e químico, normalmente faz extravasar o conteúdo celular que possivelmente pode ter alterado o pH, condicionando assim a mudança da cor do meio e/ou produção de metabolitos.

Figura 6. Produção de metabólitos por isolados de *Trichoderma* spp. confrontados com *Fusarium* sp.: isolado de *Fusarium* sp (T0); isolados de *Trichoderma* spp. na posição superior de cada placa (T2-T15).



Fonte: SILVA e NASCIMENTO JÚNIOR (2016).

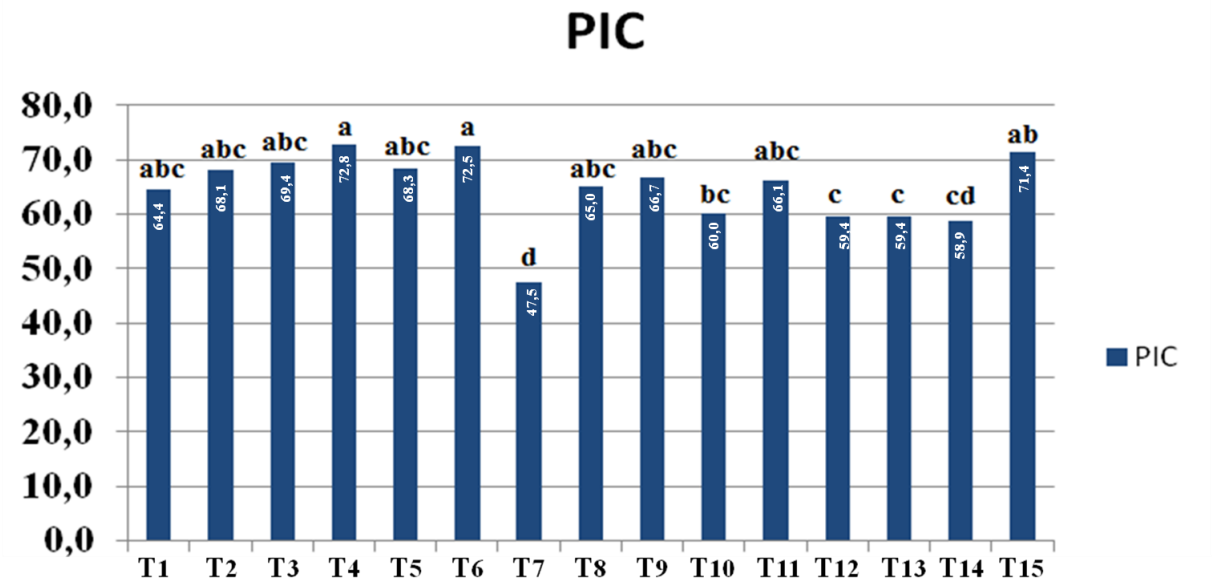
Firn; Jones (2003) comprovaram em suas pesquisas, que a produção de metabólitos secundários está relacionada à coloração obtida pelo desenvolvimento do fungo no meio. Demain (2000) afirma que a maioria das pesquisas de novos compostos antibióticos consistem em modificações químicas de antibióticos naturais, ou seja, pela via semi-sintética ocorridas e observadas nos biocontroladores e a cor é um dos sinais desta produção. Santin, (2008) e Zucchi (2010) comentam que *Trichoderma* spp., possuem característica de micoparasita capazes de detectar e localizar hifas de fungos suscetíveis, crescendo em sua direção presumivelmente em resposta a estímulos químicos produzidos pela hifa hospedeira, formando estruturas semelhantes a apressórios e enrolando-se em toda a sua extensão para, então, penetrar e digerir a hifa. Algo semelhante é relatado por Silva *et al.*, (2013) que comentam, que as ações de biocontrole usadas por este microrganismo só ocorreram quando *Trichoderma* spp., entrou em contato direto com o fitopatógeno crescendo sobre ele.

Nascimento *et al.*, (2014) verificaram algo semelhante em seu trabalho com prospecção de fungos da caatinga produtores de antibióticos, quando detectou que meio pobre em nutrientes (aveia) estimula a esporulação e mudança da cor do meio, deste modo, há

produção de metabolitos secundários como forma de sobrevência. Os isolados que liberavam metabolitos, testados pelos autores obtiveram eficiência de controle de 86,36% e apresentaram atividade contra *Escherichia coli e Staphylococcus aureus.* Os autores comentam ainda que estes metabolitos são sintetizados por meio de uma série de reações bioquímicas que ocorrem nas células, onde o resultado é a síntese de um produto que favoreça a sobrevivência e induz o fungo a produzir substâncias de defesa para vencer a concorrência na obtenção de alimento.

Quanto à capacidade de inibição de crescimento micelial de *Fusarium* sp., promovida por isolados de *Trichoderma* spp., pôde-se, observar que os isolados que proporcionaram maior percentual de inibição foram T4 e T6, seguido do T15 com mais de 70%. No entanto não diferiram de T1, T2, T3, T5, T8, T9, e T11. O segundo melhor resultado foi obtido por T10 com aproximadamente 60% mas não diferiram de T1, T2, T3, T5, T8, T9, T11 E T15. Os isolados T12 e T13 proporcionaram terceiro melhor percentual de inibição com aproximadamente 58% e não deferiram de T1, T2, T3, T5, T8, T9, T10, T11 E T14. O menor percentual de inibição foi proporcionado pelo isolado T7 com pouco mais de 45%, porém não diferindo estatisticamente do isolado T14 (Figura 7).

Figura 7. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) de *Fusarium* sp. em cultivo pareado com isolados de *Trichoderma* spp.



* Colunas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Os resultados obtidos neste trabalho comprovaram a capacidade de biocontrole de todos os isolados de *Trichoderma* spp., em inibir o crescimento micelial de *Fusarium* sp. A taxa de inibição variou de 47,5% (isolado T7), que teve menor desempenho a 72,8% (isolado T4) que teve o melhor desempenho.

Observa-se que os isolados T7 e T14, que obtiveram as menores notas (3) na escala de Bell (1982), obtiveram um percentual de inibição de 47,5% e 58,9% respectivamente. Os isolados T4, T8, T10, T12, e T14, que tiveram uma boa nota (2), os percentuais de inibição foram 72,8%, 65%, 60%, 59,4%, e 58,9%. Já os isolados T1, T2, T3, T4, T5, T6, T9, T11 e T15 com excelente nota (1), inibiram 64,4%, 68,1%, 69,4%,72,8%, 68,3%, 72,5%, 66,7%, 66,1% e 71,4%. Notou-se que todos os isolados de *Trichoderma* spp., testados foram capazes de causar inibição do fitopatógeno com eficiência que variaram de 47,5% a 72,8%. Apenas o isolado T7 teve eficiência inferior a 50%. Portanto 93,34% dos isolados de *Trichoderma* spp. testados inibiram a crescimento micelial de *Fusarium* sp.

Notou-se ainda, que o isolado que teve maior taxa de inibição não teve a melhor nota na escala de Bell (1982), isso possivelmente ocorreu devido a alguns isolados de *Trichoderma* spp., liberarem substâncias voláteis e não voláteis que são capazes de inibir o crescimento do fitopatógenos. Dos Santos (2008); Aguiar *et al*.,(2013) e Maciel *et al.*, (2014) justificam este fato ao relatarem em seus trabalhos, a eficiência de inibição do crescimento micelial de *F. oxysporum* quando exposto a metabólitos voláteis e não voláteis produzidos pelos isolados de *Trichoderma* spp.

Resultados obtidos por Kwon Chung e Bennett, (1992), corroboram com os dados deste trabalho, pois dentre os isolados que apresentaram notas excelentes e boas na escala de Bell (1982), tiveram maior percentual de inibição (PIC), produção de metabolitos e mudança da cor do meio entrando em contato com o patógeno ou em seu desenvolvimento no meio (Figura 7). Os isolados T5; T6 e T15 alteravam todo o meio de cultura, demonstrando assim sua capacidade de produção de metabolitos ou mudança de pH do meio como possível condição básica para sua colonização (Figura 6).

Outra explicação pode ser dada em relação ao tipo de característica observável: a PIC está relacionada com percentual de crescimento do fitopatógeno confrontado com o biocontrolador. Então, o isolado de *Trichoderma* spp., que obteve maior crescimento micelial na placa, obteve a maior PIC. Na escala de Bell *et al*. (1982) a relação está mais voltada ao tipo de interação existente entre biocontrolador versos fitopatógeno, ou seja, se fitopatógeno

ocupar maior diâmetro de crescimento na placa, e mesmo assim o biocontrolador conseguisse crescer e esporular sobre o fitopatógeno, o isolado teria a melhor nota na escala, mesmo tendo uma PIC menor. Silva (2013) relata em seu trabalho que *Neoscytalidium* sp., foi bastante competitivo ao ser confrontado com *Trichoderma* sp., porém no momento em que as hifas se tocarem na placa de petri, o isolado de *Trichoderma* spp., sobrepôs a colônia do patógeno. Seguindo a mesma linha de raciocínio, a nota na escala de Bell (1982) para o isolado de *Trichoderma* spp., seria excelente (1), mas o diâmetro de crescimento do fitopatógeno na placa seria maior, por tanto a PIC seria menor. Resultados semelhantes foram encontrados nos trabalhos de Lazarotto *et al*. (2012) e Santos *et al*, (2012) trabalhando com isolados de *Trichoderma* spp, *Fusarium* sp e *F. solani,* também encontra resultados semelhantes utilizando *T. paradoxa.*

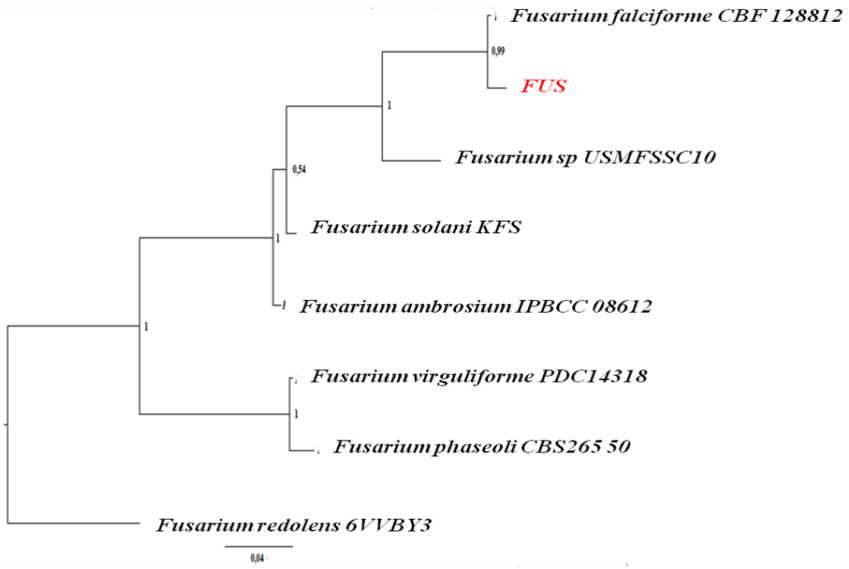
3.3.5 Caracterização molecular dos isolados

3.3.5.1 Amplificação do DNA, purificação e sequenciamento dos produtos da PCR

O produto da amplificação da PCR com os primers ITS1 e ITS4 resultou num fragmento de aproximadamente 550 pares de bases (pb). A análise filogenética baseada nas sequências gênicas da região ITS do DNA do isolado, usando o método de ‘‘maximum Likelihood Tree’’ com base em 1000 réplicas de “bootstrap”, revelou com 100% de confiabilidade que o isolado pertence ao genero *Fusarium* e 99% similar com a sequência de *Fusarium falciforme* depositada no GenBank (CBS128812) (Figura 8).

Os resultados são aceitáveis para conclusão em nível de espécie, pois, o valor de similaridade encontrado foi 99%. MENEZES *et al.*,(2010); concluíram em seu trabalho que o sequenciamento da região ITS foi um eficiente método para identificação e separação de isolados de *Fusarium* spp., e também de *Trichoderma* spp.

Figura 8 – Árvore filogenética baseada na região ITS do DNA de *Fusarium* sp, construída usando o método de ‘‘maximum Likelihood Tree’’. O isolado *Fusarium redolens* 6VVBY3 foi utilizado como “outgroup”. A barra de escala representa mudança de 0,04 e valores de suporte de *bootstrap* de 1000 repetições são apresentados nos ramos.



Portanto podemos afirmar que a partir da região genômica estudada e árvore filogenética formada o isolado de FUS se trata de *F. falciforme* e não de *F. solani* como esperado. Sendo assim o primeiro relato desta espécie causando podridão em raiz de mandioca.

Vários autores descrevem *Fusarium solani,* como agente causal da doença e relatam também que isolados *F. verticillioides* e *F. oxysporum* causam a podridão da raiz da mandioca, mas nenhum dos autores pesquisados neste trabalho mencionam a ocorrência espécie *F. falciforme* como agente causal da podridão em mandioca. FUKUDA, 1991; MASOLA; BEDENDO, (2005); BANDYOPADHYAY *et al*., (2006); HOHENFELD, (2016).

Uma explicação lógica se deve ao fato que o conceituar espécie, se baseando em caracteres morfológicos, patogenicidade de hospedeiro e *formae speciales*, pode não refletir a real diversidade de espécies e populações, podendo assim omitir a variabilidade genética e as

verdadeiras relações filogenéticas, espécies biológicas, variedade de hospedeiro e distribuição geográfica desses patógenos (O'DONNELL; GRAY, 1995; BAAYEN *et al*., 2000; O'DONNELL, 2000).

O'Donnell, (2000); O'Donnell *et al*., (2008) e Nalim *et al*.(2011) evidenciaram, através da análise da filogenia molecular, que *F. solani* engloba várias espécies filogenéticas distintas. Dessa forma, atualmente, refere-se na literatura a esse grupo de fungos como *Fusarium solani* species complex- FSSC. Espécies deste complexo apresentam comportamento reprodutivo com populações homotálicas e heterotálicas. Cardoso (2015) ao fazer caracterização filogenética, descobre outros isolados de *Fusarium* que causavam podridão do colo do maracujazeiro**.**

Vaz, (2013) ressalta que muitas espécies do complexo *Fusarium solani* ocorrem de forma saprofítica e em seu trabalho com pimenta-do-reino, mais da metade dos isolados obtidos com sintomas de fusariose não pertenciam ao agente etiológico da doença, evidenciando assim claramente que apenas a identificação morfológica é ineficiente para diagnosticar a doença, pois estirpes patogênicas e não patogênicas podem surgir na natureza provavelmente devido ao fluxo genético existente entre eles.

CHEHRI *et al.* (2015), relatam que membros do complexo de espécies *Fusarium solani* foram encontrados não só causado infecções em plantas, mas também em animais e humanos. No entanto, o status taxonômico deste complexo ainda é muito confuso e muitas novas espécies, bem como linhagens só foram esclarecidas recentemente. Os mesmos autores utilizaram regiões genômicas espaçadoras internas transcritas (ITS) e sequências de fator de alongamento de tradução parcial (TEF-1α) e concluíram que isolados descritos morfologicamente como isolados de *Fusarium solani* na verdade se tratava de *Fusarium keratoplasticum* e de *Fusarium falciforme* e se agruparam no mesmo clado com 95% de similaridade. A filogenia molecular com base nestas regiões confirmaram que todas as estirpes formaram um grupo monofilético. NALIM, *et al.* (2011) encontraram resultados semelhantes ao trabalhar com peritécio de *Nectria* sp., isolados de solo de regiões tropicais, e acrescentaram novas espécies de *Fusarium* no complexo *solani.*

HYDE, (2014) verificou também que dentro do complexo *F. solani* foram encontradas além dos citados acima *F.ambrosium. F. phaseoli, F. virguliforme, F.dimerum, Fusarium* spp. utilizando os primers de ITS (ITS1 e ITS5) e RPB (RPB1 e RPB2). O'DONNELL *et al.*

(2010) ao estudar regiões genômicas descobriram um elevado número de *loci* e que o complexo *solani* FSSC é composto por, pelo menos, 40 espécies filogeneticamente distintas, que antes eram desconhecidas por causa da semelhança morfológica. O'Donnell *et al*., (2013) comentam que esta ultima região é bastante informativa e concatenada com a ITS aumentam a confiabilidade na determinção das especie de *Fusarium* spp. no complexo solani.

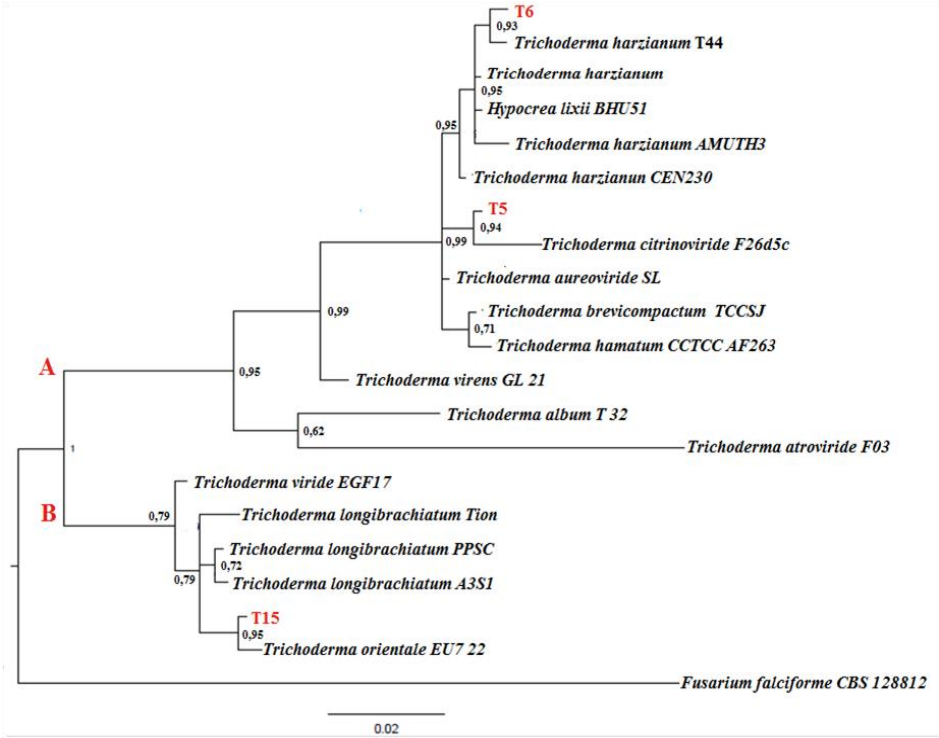
Quanto aos isolados de *Trichoderma* spp., os isolados T2 e T3 foram fornecidos pela Embrapa Meio Ambiente- Jaguariúna-SP e identificados como *Trichoderma harzianum,* já os isolados T5, T6 e T15 que apresentaram melhor nota na escala de Bell *et al.*, (1982) possível produção de metabolitos secundários, bem como os que tiveram melhor taxa de inibição de *Fusarium* sp., foram submetidos a extração de DNA e sequenciamento para posterior identificação molecular e a analise filogenética.

A árvore filogenética gerada a partir das sequências dos genes ITS1 e ITS5 do rDNA, apresentou dois grandes Clados com suporte de 100%. Estes clados foram classificados como A, que apresentou o maior número de ramos e também agrupou os isolados T5 e T6 e B, onde ficou agrupado o isolado T15 (Figura 9).

Observando a árvore podemos verificar que T6 agrupou-se no clado A e apresentou 99% de suporte onde estão sequências de *Trichoderma harzianum* e *Hypocrea lixii* sua forma teleomorfica (sexuada) com 95% de similaridade, confirmando então que o isolado em questão seja *Trichoderma harzianum*.

O isolado T5 também apresentou suporte de 99%, igual ao de isolado T6, agora identificado como *T. harzianum* e sua similiaridade se deu com isolado de *Trichoderma citrinoviride* com suporte de 94%, afirmando assim que o isolado seja da mesma espécie. Mais recentemente as formas teleomórficas *Hypocrea lixii, H. atroviridis, T. harzianum e T. atroviride* , foram descobertas e comprovadas através da análise do DNA (CHAVERRI *et. al*., 2003; DODD *et al*., 2003).

Figura 9 – Árvore filogenética baseada na região ITS do DNA de *Trichoderma* spp., construída usando o método de ‘‘maximum Likelihood Tree’’. O isolado de *Fusarium falsiforme CBS 128812* foi utilizado como “outgroup”. A barra de escala representa mudança de 0,02 e valores de suporte de *bootstrap* de 1000 repetições são apresentados nos ramos.



O isolado T15 se agrupou no clado B, onde apresentou suporte de origem de 100%, mas sua similaridade no ramo em que o isolado foi agrupado foi mais baixa. No entanto, o mesmo apresentou similaridade de 95% com *Trichoderma orientale*. Devido a sua similaridade podemos sugerir a espécie deste isolado como a mesma espécie que ele foi agrupado na árvore filogenética.

Trabalho semelhante foi realizado por Carvalho Filho (2013), que ao analisar a mesma região genômica, relata que a região ITS é suficiente para identificar isolados de *Trichoderma* spp., comparando sequências depositadas no NCBI GeneBank. CORABI-ADELL (2005), estudando a filogenia usando a mesma região, também corrobora com resultados encontrados neste trabalho, ao identificar os isolados de *Trichoderma* spp usando a região transcrita. REYES-FIGUEROA (2016), também conseguiu identificar em nível de

espécie seus isolados de *Trichoderma* spp, apenas com esta região e com suporte em árvore com escore mais baixos que os encontrados neste trabalho. MENEZES *et al.*,(2010) concluíram que o sequenciamento da região ITS foi um eficiente método para identificação e separação de isolados de *Trichoderma* spp. LIMA- LUZ, (2012) corrobora com os autores acima citados ao concluir a eficiência na identificação de isolados de *Trichoderma* spp. oriundos de solos agrícolas do Norte do Maranhão.

Samuels (2004), em seu estudo não identificou alguns isolados a nível de espécie, devido ao fato desta região ser muito conservada. Por este motivo os isolados que não foram identificados tiveram outra região genômica sequenciada (EF1 – Translation elongation) e concatenadas com a região transcrita para identificar a espécie destes isolados. Jaklitsch (2015), relata que a região RPB1 e RPB2 também são regiões que apresentam elevado número de *loci* e que dá também um grande suporte pra identificação molecular de isolados de *Trichoderm* spp. e de sua forma Teleomorfica.

Sanchez e Rebolledo (2010), comentam que as pesquisas voltadas a biologia molecular com *Trichoderma* ainda são muito escassas e que apartir do estudo realizado por ele com a região ITS foram descritas quatro novas especies.

As árvores filogenéticas geradas mostraram que os isolados foram identificados corretamente, uma vez que, os grupos resultaram em ramos contendo indivíduos pertencentes a suas respectivas seções e espécie, com seu alto grau de similaridade e suporte nos clados e nos ramos.

3.4. CONCLUSÕES

Os fungos *Fusarium falciforme*, *Neoscytalidium* sp. e o oomiceto *Phytophthora* sp. são agentes causais da podridão radicular da mandioca cv Rosinha no estado de Alagoas.

As espécies de *Trichoderma* capazes de controlar *F. falciforme* são *T. harzianum* (T2, T3 e T6), *T. citrinoviride* (T5) e *T. orientale (T15)*

Todos os isolados de *Trichoderma* spp. testados foram capazes de inibir o crescimento micelial do *F. falciforme*.

Os isolados de *Trichoderma* sp., T2; T3; T5; T6; T10; T13; T15 produzem substâncias bioativas capazes de alterar a cor do meio e favorecer a atividade de biocontrole sobre

Fusarium falciforme, sendo que os isolados testados T2; T3 apresentam reação mais rápida de biocontrole, seguidos dos isolados T6; T5 e T15 respectivamente

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; MAFIA, R.G.; GONÇALVES, R. C. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; M (Ed.). **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa, MG: UFV, p. 53-90. 2007.

ALVES, A. A. C.; SILVA, A. F. **Cultivo da mandioca para a região semi-árida**. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMF, 2003.

AGUIAR, A. R.; AGUIAR, D.; TEDESCO, S. B., & SILVA, A. C. F. Antagonismo a fungos associados às sementes de *Pas*p*alum* notatum *flügge* por *Trichoderma*. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.17; p. 198. 2013.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia. Piracicaba**: Agronômica Ceres. v. 1,4. Ed, p. 383 -387, 2011.

BANDYOPADHYAY, R. *et al. Fusarium* species from the cassava root rot complex in West Africa. **Phytopathology**, v.96, p.673-676, 2006

BARATTO, C. M. *et al*. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência-Ciência e Biotecnologia**, Joaçaba v. 11 n. 2, p. 15-28, julho/dezembro 2011.

BARRA, V. R. *et al.*. Potencialidade antagonística em alguns procariotas agentes de biocontrole de enfermidades de plantas. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.2, p.121-126, 2008.

BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** v. 45, n. 11, p. 1282-1289, 2011

BAUERMEISTER, A. *et al.* 1,3-Glucanases Fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas. LONDRINA SP. **Semina**: Ciências Exatas e Tecnológicas, v. 31, n. 2, p. 75-86. 2010.

BELL, D.K. *et al*. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v.72, p.379-382, 1982.

BISPO, A. S. R. Bioprospecção de actinomicetos isolados de solos noestado da Bahia e seu potencial na produção de enzimas lingocelulolíticas. 2010. 104f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas-BA. 2010.

BIZI, R. M., **Utilização de fungos no Controle Biológico de Doenças.** < http://www.floresta.ufpr.br/alias/lpf/public_html/contbio03.html.> Acesso em 16/11/2015.

BOMFIM, M. P., **Antagonismo in *vitro* e in vivo de *Trichoderma* spp. a Rhizopus stolonifer em maracujazeiro amarelo**. Vitória da Conquista BA, 2007. 74f.: Dissertação (Mestrado em Agronomia do Programa de Pós Graduação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Unidade

Acadêmica Vitória da Conquista BA. 2007.

BOMFIM, M. P., SÃO JOSÉ, A. R., REBOUÇAS, T. N. H., ALMEIDA, S. S. D., BORTOLAZZO, N. G.. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 77f. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz. 2011.

BRAGA, R. M. *et al.* **Avaliação da Produção de Celulase por Cepas de *Fusarium***. XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos. 6p. Natal-RN de 02 a05 de agosto de 2009.

BRITO, F. S.; MILLER, P. R. M., STADNIK, M. Presença de *Trichoderma* spp em composto e suas características para o controle de fitopatógenos. Porto Alegre ISSN: 1980-9735. **Rev. Bras. de Agroecologia**, , p. 43-53. 2010.

BUENO, C. J. *et al*. Produção de enzimas extracelulares por *Fusarium* solani de maracujazeiro amarelo. **Tropical Plant Pathology**, 343-346.2009.

CANCELA, K. C., **Controle Biológico Florestal Conceitos, Terminologia, Descrição e Caracterização de Agente. Proteção florestal Disponível em** <http://www.floresta.ufpr.br/alias/lpf/public_html/contbio01.html> Acesso em 16/11/2015.

CARDOSO, A.M.S.. "**Caracterização filogenética, biológica e patogênica de espécies do complexo Fusarium solani-FSSC associadas à podridão do colo do maracujazeiro**." 2015. 72f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras UFLA. Lavras Minas Gerais. 2015.

CARVALHO FILHO, M. R. D. **Identificação e relações filogenéticas, potencial de uso de isolados de *Trichoderma* no controle do mofo branco e como promotores de crescimento do feijoeiro**. 2013. 123*f.* Tese de doutorado do programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília. BRASÍLIA DISTRITO FEDERAL –BRASIL. 2013

CARVALHO, A. C., **Bioprospecção de isolados de *Trichoderma stromaticum* para o controle biológico da Vassoura-de-Bruxa do Cacaueiro**. 2006. 82f. Dissertação. Universidade Estadual de Santa Cruz. 2006.

CHAVERRI, P. *et al.* Hypocrea/Trichoderma: species with conidiophore elongations and green conidia. **Mycologia**, v.95, n.6, p.1100-40, 2003

CHEHRI, K., SALLEH, B., and ZAKARIA, L. "Morphological and phylogenetic analysis of Fusarium solani species complex in Malaysia." **Microbial ecology** 69.3 (2015): 457-471. 2015

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Perspectivas para a agropecuária. **Conab**, Brasília, v.1, 154p. 2013.

CORABI-ADELL, C.. **Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (Hypocreales-Fungi) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica**. 2005.220*f* Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, Ciências Biológicas, Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular .Rio Claro Estado de São Paulo – Brasil. 2005.

COTHER, E.J. & GRIFFIN, D.M. Chlamydospore germination in *Phytophthora drechsleri*. **Transactions British Mycological Society**, v.61, p.273-279, 1974.

DA MATA, J. F. *et al*. Emprego de extratos orgânicos e aquoso obtidos a partir de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de fitopatógenos. **BIOFAR (Revista de biologia e farmácia)**, v.2,n.2 , p.12-23, 2008.

DA SILVA, D. C. V., TIAGO, P. V., e DE SOUZA-MOTTA, C. M. . Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas1. **Revista Brasil. Bot**, 34(4), 607-610. 2011.

DE BRITO, J. P. C.; LOPES, F. A. C.; ULHOA, C. J. **Avaliação da atividade de α-Manosidase, α-arabinofuranosidase e lipase secretada por isolados de *Trichoderma* spp.em presença de parede celular de *Fusarium solani, Fusarium oxy*sporum, *Rhizoctonia solani e Sclerotinia sclerotiorum*.** Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Brasil. http://www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/conpeex/pivic/trabalhos/JOAO_PAU.PDFisponível em . Visitado em 04 de fevereiro de 2016.

DEMAIN, A. L. **Microbial biotechnology**. Trends in biotechnology, v. 18, n. 1, p. 26-31, 2000.

DIAS, P. P., **Controle biológico de fitopatógenos de solo por meio de isolados de fungos do gênero *Trichoderma* e sua contribuição no crescimento de plantas**. 2011. 101 f. Tese Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica - Rio de Janeiro.

2011.

DODD, S.L., LIECKFELDT, E., SAMUELS, G.J. *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. **Mycologia**, v.95, n.1, p.27-40, 2003.

FUKUDA, C. **Podridão das Raízes da Mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, Mandioca em Foco, 1991.

DOS SANTOS, H.A. ***Trichoderma* spp. como promotores de crescimento em plantas e como antagonistas a *Fusarium oxysporum***. 2008. Tese de Doutorado. Tese de, Universidade de Brasília. 2008.

ELIAS, A.; FERREIRA, A.B.M.; BUENO, C.J. Produção in vitro de enzimas extracelulares por fungos e sua relação com os sintomas descritos em planta hospedeira. **Summa Phytopathologica**,v.41, n.4, p315-317, 2015.

FACCHIN, S. **Isolamento de microrganismos e seleção de enzimas microbianas com aplicações biotecnológicas no tratamento de esgotos tratamento de esgotos.** 2013. 87f. Tese (Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais). PhD Thesis. Universidade Federal de Minas Gerais. 2013.

FAHEINA JUNIOR, G.S**. Produção de celulases por fermentação submersa utilizando microorganismos prospectados em coleções de culturas nacionais**. 2012. 75f. Dissertação (Mestrado) –Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2012.

FELDMAN, K.A.; LOVETT, J.S.; TSAO, G.T. Isolation of the cellulose enzymes from the termophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and regulation of enzyme production. **Enzyme and Microbial Technology,** New York, v.10, p. 262-272, 1988.

FERNANDES, A. P. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes.** Dissertação de mestrado em Ciências do Alimento. 2009. 58f . Universidade Federal de Lavras- UFLA, 2009.

FIPKE, G. M; PAZINI, J.B.; ETHU,L. Z. Antagonismo de isolados de *Trichoderma* spp. ao *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes temperaturas**. Magistra**, Cruz das Almas BA, V. 27, N.1, p. 23 – 32, Jan./Mar. 2015.

FIRN, D. & JONES, C. G. Natural products–a simple model to explain chemical diversity. **Natural product reports**, v. 20, n. 4, p. 382-391, 2003.

FLORENCIO, C., COURI, S., FARINAS, C. S. Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma strains*. **Enzyme Research**, p.1-7, 2012.

FRAIFE FILHO G. A., BAHIA J. J. S., **Mandioca**. Ceplac-Cepec-BA. http://www.ceplac.gov.br/radar/mandioca.htm . Acessado em 26 de novembro de 2015.

FRANTZ, S. C.; CARREIRO, S. C.; SILVA, J. B. A. **Produção de enzimas hidrolíticas por fungos isolados de folhas em decomposição.** 10° seminário de Iniciação cientifica da UFT. Câmpus de Palmas. 5p. 25 a 28 de novembro de 2014.

FUNGARO, M. H. P, MACCHERONI Jr, W. **Melhoramento genético para produção de enzimas aplicadas a Indústria de Alimentos.** In: MELO, I. S, VALADARES INGLIS, M. C., NASS, L. L., VALOIS, A. C. C., ed. Recursos Genéticos e Melhoramento-Microrganismo . Jaguariúna, São Paulo, Brasil: Embrapa Meio Ambiente, p. 426-453, 2002.

FURLANETO, M.C. **Recombinação genética e produção de celulases em *Trichoderma Pseudo Koningii Var*** . 1989. 152 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura"Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.

GALLIANO, H.; GAS, G.; DURANT, H. Lignocellulose biodegradation and ligninase excretion by mutant strains of *Phanerochaete chrysosporium* hyperproducing cellulases. **Biotechnology Letters,** Dordrecht, v. 10, p. 655-660, 1988.

GIESE, E. C.; BARBOSA, A. M.; SILVA M.L.C. Glucanases Fúngica: Produção e aplicações das B -1,3 e -1,6 glucanases. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** Brasília-DF - ISSN 1414-6347. Edição nº 30 , P.97-104.. jan/jun 2003.

GOMES, J. C.; LEAL, E. C., **Cultivo da Mandioca para a Região dos Tabuleiros Costeiros.** ***In.:*** Podridão Radicular. Embrapa Mandioca e Fruticultura. Sistemas de Produção, 11. ISSN 1678-8796 Versão eletrônica/Jan/2003.https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_tabcosteiros/doencas.htm . Acesso 13/12/2015.

GUIMARÃES, S. S. C.. ***Fusarium solani* associado à soja no Brasil : morfologia, filogenia molecular e patogenicidade**. 2010. 65f. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010

GUIMARÃES, G. R. **Controle de *Cladosporium herbarum* e promoção de crescimento do feijoeiro pelo emprego de *Trichoderma harzianum***. 2014. 54f. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Goiás –Unidade Universitária de Ipameri, 2014.

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

HOFFMANN, C. A. *et al*.**.** Potencial de antagonismo de isolados de *Trichoderma* sp. contra o isolados de *Fusarium* sp., in vitro. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 1, p. 236-242, 2015.

HOHENFELD, C. S.**. Podridão radicular da mandioca: metodologias de inoculação e seleção de fontes de resistência.** 2016.. 86f. Dissertação (Recursos Genéticos Vegetais) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas, BA.2016.

HYDE, K. D *et al*.One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera: I ***Fungal Diversity***, *67*(1), 21-125. 2014.

ISAIAS, C.O. *et al*. Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica** v.40, n.1, p.34-41, 2014.

JAKLITSCH, W. M.; VOGLMAYR, H. Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. ***Studies in mycology***, 80: 1-87. 2015.

JAYAPRAKASHVEL, M. *et al.*. Hydrogen cyanide mediated biocontrol potential of Pseudomonas sp. AMET1055 isolated from the rhizosphere of coastal sand dune vegetation. **Adv. Biotech**.9(10): 39-42. 2010.

JAMAL, C. M. *et al*. **O uso de extratos vegetais no controle alternativo da podridão pós- colheita da banana.** In: SIMPÓSIO NACIONAL DO CERRADO, IX , 2008,ParlaMundi. Anais. Brasília, DF: EMBRAPA Cerrados, p. 1-9. 2008.

KUPPER, K.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum* , agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, v. 28, n. 3, p. 251-257, 2003.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. - **Medical mycology.** Philadelphia, Lea & Febiger, 866p. ill. 1992.

LARANJEIRA, D. *et al.* Ocorrência da podridão negra da maniva e raiz da mandioca (*Manihot esculenta*) causada por *Scytalidium lignicola* no estado de Pernambuco, Brasil. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 19, n. 3, p. 466-469, 1994.

LAZAROTTO, M. *et al.* **Seleção *in vitro* de Isolados de *Trichoderma* spp. com Potencial de Antagonismo a Isolados Patogênicos de *Fusarium* spp**. In: XVI Simpósio De Ensino, Pesquisa E Extensão, Unifra, v. 3, 2012.

LIMA- LUZ, R., **Identificação e aspectos de biocontrole de isolados de *Trichoderma***

spp. oriundos de solos agrícolas do Norte do Maranhão. 2012. 126*f*. Dissertação (Apresentada ao Programa de Pós -Graduação em Biologia Parasitária). Universidade Ceuma pró-reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e extensão, mestrado em biologia parasitária - CEUMA. São Luiz do Maranhão. 2012.

LOBO JUNIOR, M.; ABREU, M.S. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. **Ciência Agrotécnica,** Lavras, v.24, p.521-526, 2000.

LOPES , F.A.C. *et al*. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma strains* isolated from common bean crops in the Brazilian cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Biology,** v.116, p.815 -824, 2012.

LUZ, J. S.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. **Revista Caatinga**, v. 19, n. 2, 2006.

MACHADO, A. R. *et al.*. New occurrences of Botryosphaeriaceae causing black root rot of cassava in Brazil**. Tropical Plant Pathology**, v.39, p.464-470, 2014.

MACIEL, C. G. *et al.* Antagonismo de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* (UFV3918) A *Fusarium sambucinum* em *Pinus elliottii* ENGELM**. Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.38, n.3, p.505-512, 2014.

MARCELLO, C. M. **Avaliação da expressão e caracterização de uma exo-**b**-1,3-glucanase envolvida no mecanismo de micoparasitismo de *Trichoderma a*sp*erellum.*** Brasília-DF, 2008. 89f. Tese de Doutorado. Laboratório de Enzimologia Departamento

de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília – UnB. Brasília – DF. 2008.

MARQUES, H. I. P. *et al.* Inibição do crescimento micelial de *Trichoderma harzianum* por fertilizantes líquidos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 2040, 2014.

MASOLA JUNIOR, N.S. BEDENDO, I.P. Doenças de mandioca. In: KIMAT, H; AMORIN, L; REZENDE, J.A.M; BERGAMIN FILHO, A; CAMARGO, L.E.A (Eds.). Manual de Fitopatologia. Doenças de plantas cultivadas. **Agronômica Ceres**, v.2, p 399-455, 2005.

MATOS, F. B. D. **Isolamento e caracterização de fungos isolados de ambiente marinho**. 2012). 63f. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Instituto de Ciências Básicas da Saúde) 2012.

MATOS, K. DA S. *et al*. Estudo in vitro da potencialidade de *Trichoderma* spp., no biocontrole de *Fusarium guttiforme.* **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA** Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.19; p. 2014-2234. 2014.

MENEZES, J. P. *et al*. Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp.(Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciência e Agrotecnologia**, *34*(1), 132-139. 2010.

MICHEREFF, S.J.; MENEZES, M.; MARIANO, R.L.R. Potencial de *Trichoderma* para o controle da antracnose do sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 392-398, 1993.

MUNIZ, M. F. S. *et al*.Caracterização de isolados de *Phytophthora drechsleri*, agente causal da podridão mole de raízes de mandioca.**Fitopatologia Brasileira,** Brasília, v. 31, p. 195-198, 2006.

NALIM F.A. *et al*. New species from the *Fusarium solani* species complex derived from perithecia and soil in the Old World tropics. **Mycologia** 103:1302–1330.2011.

NASCIMENTO JÚNIOR, N. A. **Efeito da casca de mandioca no controle da podridão radicular causada por *Phytophthora* sp. em mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz) var. Rosinha em ambiente irrigado.** Rio Largo-AL,2015.82f. Tese de Doutorado. (Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas.Alagoas. 2015.

NASCIMENTO, R. F. Q. B. L. P. *et al*.Prospecção de fungos da caatinga produtores de antibióticos. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 3, n. 3, p. 76-85, 2014.

NOTARO, K. A.*et al*. Prospecção de fitopatógenos associados á podridão radicular da mandioca em Pernambuco, Brasil. **Biosci. J.,** Uberlândia, v. 29, n. 5, p. 1832-1839, 2013.

NOTARO, K. A. **Prospecção de fitopatógenos e caracterização de solos arenosos envolvidos na supressividade ou conducividade da podridão radicular da mandioca, causada por *Scytalidium lignicola*/ Krystal de Alcantara Notaro**. Garanhuns-PE, 2012. 111f. Dissertação (PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO AGRÍCOLA)**.** Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, 2012.

NUNES, G. F. O *et al*. **Atividade enzimática de isolados de rizóbio obtidos de nódulos de leguminosas forrageiras**. 4p. 34º Congresso Brasileiro de Ciencias do solo.. Florianopolis-SC julho/agosto de 2013.

O`DONNELL, K. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. **Mycologia,**[S.l.], v. 92, n. 5, p. 919-938, Mar. 2000.

O'DONNELL, K. et al. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. **Journal Clinical Microbiology**,[S.l.], v. 46, n. 8, p. 2477-2490, Aug.2008.

O`DONNELL, K. et al. Soybean Sudden Death Syndrome Species Diversity Within North and South America Revealed by Multilocus Genotyping. **Phytopathology**, [S.l.], v. 100, n. 1, p. 58-71, Jan. 2010.

O'DONNELL K. et al. RPB1 and RPB2 phylogeny supports an early Cretaceous origin and a strongly supported clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. **Fungal Genet Biol** 52:20–31. 2013.

OLIVEIRA, A. N. *et al*. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. 26: 853-860. 2006.

OLIVEIRA, L. G. *et al*. **Atividade proteolítica de fungos de solo fitopatogênicos ao Feijão-Caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]** In: III CONAC Congresso Nacional de Feijão-Caupi. Pernambuco. 4p. Resumo expandido. Recife Pernambuco. 22-24 de abril de 2013.

OLIVEIRA, N. T. de *et al*. Caracterização e identificação de clones de mandioca produzidas em Roraima para o consumo in natura. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 5, n. 3, p. 188-193, 2012.

ORLANDELLI, R. C. *et al*. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações.**Revista saúde e biologia**, v.7,n.3, p.97 -109, 2012

PÁDUA, R. R. *et al*. **Avaliação e caracterização de potenciais antagonistas de *Sclerotium rolfsii* pertencentes ao gênero *Trichoderma* .** Boletim de pesquisa e desenvolvimento/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia . Brasília, DF, ISSN 1676 - 1340; Boletim 165, 23 p. Dez. 2007.

PEREIRA, C O.F. **Estudo da patogenicidade e controle biológico de *Fusarium* sp. Com *Trichoderma* sp**. 2013.74f. Dissertação. Universidade de Caxias do Sul. 2013.

PEREIRA, F. F. O. **Produção, purificação e caracterização da atividade proteolítica produzida por *Trichoderma harzianum*.** 2011 72f. Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Brasília, 2011.

PEREIRA, V. M. *Avaliação* **do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulases por *Aspergillus sulphureus* (Fresen) Wehmer**, 2012. 111 f. : Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

POLTRONIERI, L. S. *et al*. Incidência de *Fusarium solani* em mandioca no estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira,** Brasília, v. 27, n. 5,p. 544, 2002.

RAMOS, E.H.S. **Avaliação da produção de celulases por fungos filamentosos**

utilizando bagaço de cana como substrato. 2012. 59f. Dissertação (Mestrado)– Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas, Bioquímica e Fisiologia, 2012

REYES-FIGUEROA, O. *et al*. *Trichoderma* species from the cacao agroecosystem with biocontrol potential of *Moniliophthora roreri***. Revista Chapingo**. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, 22(2), 149-163. 2016.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M.. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 126-131, 2010.

RUEGGER, M.J.S.; TAUK-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados dosolo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins**.** São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, p. 205-211, 2004.

SACCO, L. P. **Isolamento de bactérias produtoras de enzimas de interesse em processos biotecnológicos.** , 2013.47f.Dissertação (mestrado) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal-SP 2013.

SAMUELS, G.J., CHAVERRI, P., FARR, D.F., MCCRAY, E.B. (n.d.) *Trichoderma* Online, Systematic Botany & Mycology Laboratory, ARS, USDA. (http://nt.ars-grin.gov), 2004.

SUMMERBELL, R. C.; SCHROERS H.J. Analysis of phylogenetic relationship of *Cylindrocarpon lichenicola* and *Acremonium falciformeto* the *Fusarium solani* species

complex and a review of similarities in the spectrumof opportunistic infections caused by these fungi. **Journal Clincal Microbiology**, Utrecht, v. 40, n. 8, p. 2866–2875, Aug. 2002.

SÁNCHEZ, V. Y; REBOLLEDO, O. Especies de *Trichoderma* en suelos cultiva-dos con Agave tequilana en la región de Los Altos Sur, Jalisco y valoración desu capacidad antagónica contra *Thielaviopsis paradoxa*. ***Revista Mexicana de Micología***, *32*, 11–18. 2010.

SANTIN, R. C..M., **Potencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* em *Phaseolus vulgaris***. 2008. 91p. Tese (Doutorado Fitotecnia, Área de Concentração Fitossanidade). Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2008.

SANTOS, C. C. *et al*. Influência de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa.* **Scientia Plena** 8, 047309 www.scientiaplena.org.br . 2012.

SANTOS, P. L. D. *et al.* Utilização de extratos vegetais em proteção de plantas. ***Enciclopédia Biosfera***, 2562-2576. 2013.

SAZCI, A.; RADFORD, A.; ERENLER, K. Detection of cellulolytic fungi by using Congo red as an indicator: a comparative study with the dinitrosalicyclic acid reagent method. **Journal Applied Bacteriol**. v. 61, p. 559–562, 1986.

SERRA, I. M. R. S. *et al. Scytalidium lignicola* em mandioca: ocorrência no Estado do Maranhão e reação de cultivares ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 4, p. 327-328, 2009.

SILVA, A. N. *et al.* Efeito de produtos químicos e de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium solani* do maracujazeiro. **Interciencia**, v. 6, p. 398-403, 2014.

SILVA, C. A. D. *et al.*. Interferência da incorporação de matéria orgânica no solo no controle da podridão negra da mandioca, causada por Scytalidium *lignicola*. **Biosci. J.,** Uberlândia, v. 29, n. 6 , p. 1823-1831, Nov./Dec. 2013.

SILVA, C. A. D., **Prospecção em fitopatógenicos e avaliação de fontes de matéria orgânica sobre a supressividade da podridão radicular da mandioca**. Garanhuns-PE, 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado em Produção Agrícola). Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, 2013.

SILVA, K. S. *et al.* Atividade antagônica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora.* **Semina**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 749-754, out./dez. 2008.

SILVA, M.B. *et al.*. Ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero *Colletotrichum*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.10, n.3, p.57-60, 2008.

SILVA, R. A. *et al.*. **Ação do extrato metanólico da Moringa oleifera sobre o crescimento micelial de fitopatógenos**, IV, 2009, Belém. Anais... Belém, PA:. p. 1- 4. 2009.

SILVA, V. M.; MARTINS, C. M.; SILVEIRA, S. C. Atividade celulolítica de actinobactérias de região semiárida do Ceará. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, p. 2026-

2036, 2015.

SINGHANIA, R.R. *et al.*. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, p.541-549, 2010.

SOUZA P. E.A. *et al.***.** Promoção do crescimento do feijoeiro e controle da antracnose por *Trichoderma* spp. **Pesq. Agropec. Bras**., Brasília, v. 47, n. 11, p. 1589-1595, 2012.

SOUZA, H.Q.de.; OLIVEIRA, L.A. de.; ANDRADE,J.S. Seleção de Basidiomycetes da Amazonia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 2011.

SOUZA, J. R., **Potencialidade de fungicida e agente biológico no controle de requeima do tomateiro**. 2013. 63f. Dissertação. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista. Bahia – BR. 2013.

SOUZA, K. de A.;VAZ, M. C. A.; ALVES, G. C. S.; PAZ -LIMA, M. L.. **Confronto in vitro de isolados de *Trichoderma* spp. com fungos filamentosos**. 2p. IV Congresso Estadual de Iniciação Científica do IF Goiano 21 a 24 de setembro de 2015.

STAMFORD, T. L.M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 382-385, 1998.

TUITE, J. **Plant phathological methods**. Mineapolis: Burgess,1969. 239p.

VAZ, M. S. S.C**aracterização do gene lip2 de *Trichoderma harzianum***. 2010. 81 f.

Dissertação (Mestrado)-Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, 2010.

VAZ, A.B. **Caracterização biológica e filogenética do agente etiológico da fusariose da pimenta-do-reino no Brasil.** 2013. 62*f*. Tese (doutorado) –Universidade Federal de Lavras. Lavras, Minas Gerais. 2013

VENTUROSO, L.R.; BACCHI, L.M.A.; GAVASSONI, W.L. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v.37, n.1, p.18-23, 2011.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E.B. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. Documento : Embrapa Clima Temperado, Pelotas, n.316, p.7-15. 2010.

WENZEL, J. B. *et al.*. Atividade enzimática e antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de soja. ***Biológicas & Saúde***, v. 3, n. 9, 2013.

ZAMPIERI, D.; RIBEIRO, R. T. D. S. **Avaliação qualitativa da secreção de enzimas hidrolíticas por fungos endofíticos isolados do cacaueiro (theobroma cacao L.) E o controle biológico de crinipellis perniciosa**. Salão de iniciação Científica (17.: 2005: Porto Alegre, RS). Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2005.

ZUCCHI, F. **O *Trichoderma* sp. em áreas agrícolas visando o controle de doenças fúngicas de raízes de plantas cultivadas**. Campinas SP. JV Biotecnologia. 15p. 2010.

4.EFEITO DE *Trichoderma* spp. SOBRE O CRESCIMENTO DE *Fusarium falciforme* e ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE *Trichoderma* spp.

RESUMO

A antibiose, a produção de substâncias bioativas e a excreção de enzimas capazes de impedir o desenvolvimento ou resultar na completa lise e dissolução da estrutura celular, independente do contato físico. Estes metabólitos mesmo em baixa concentração interferem nas atividades biológicas, na redução ou paralisação do crescimento e esporulação, redução na germinação de esporos, além de distorções na hifa e endólise. O objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. em inibir o desenvolvimento de *Fusarium falciforme* e detectar o índice enzimático dos isolados de *Trichoderma* spp. (T2; T3; T5; T6 e T15) e de *F. falciforme,* agente causal da podridão radicular da mandioca de mesa var. Rosinha. Para obtenção dos extratos foram utilizados meio BD com crescimento micelial dos isolados de *Trichoderma* spp. que foram centrifugados (duas vezes) durante 15 minutos a 4000rpm. O sobrenadante foi utilizado como extrato bruto. Utilizou-se ainda, o extrato térmico (100°C) e extrato autoclavado (120°C a 1atm, durante 15 minutos). Para detecção do índice enzimático foram utilizados isolados de *Trichoderma* spp. e de *F. falciforme,* cultivados em meios de culturas específicos para cada enzima. Os extratos brutos de *T. harzianum* (T2, T3 e T6), *T. citrinoviride* (T5) e *T. orientale (T15)* são eficientes em inibir o desenvolvimento de *Fusarium falciforme,* sendo o extrato bruto a 50°C, o que proporcionou a maior porcentagem de redução de crescimento micelial (85%), seguido do extrato a 100°C (59%) e 121°C (40%). As espécies de *T. harzianum* (T2, T3 e T6), *T. citrinoviride* (T5) e *T. orientale (T15)* bem como o isolado de *F. falciforme* produziram as enzimas amilase, celulase, gelatinase, lípase, protease e quitinase. As espéceis *T. harzianum* (T3 e T6) e *T. citrinoviride* (T5) apresentaram o maior desempenho na produção das enzimas.

Palavras - Chave: Bioativos, Biocontrole, fitopatógeno, antagonismo.

ENZYMATIC ACTIVITY OF ISOLATES OF *Trichoderma* spp E EFFECT ON THE DEVELOPMENT OF *Fusarium* sp

ABSTRATIC

The antibiosis, the production of bioactive substances and the excretion of enzymes capable of impeding the development or result in the complete lysis and dissolution of the cellular structure, independent of the physical contact. These metabolites even in low concentration interfere in biological activities, in the reduction or paralisation of growth and sporulation, reduction in spore germination, besides distortions in the hypha and endolysis. The objective of this work was to evaluate the capacity of Trichoderma spp. In inhibiting the development of falciform Fusarium and to detect the enzymatic index of the isolates of Trichoderma spp. (T2, T3, T5, T6 and T15) and F. falciformis, causal agent of root rot of cassava var. Rosinha. To obtain the extracts were used BD medium with mycelial growth of the isolates of Trichoderma spp. Which were centrifuged (twice) for 15 minutes at 4000 rpm. The supernatant was used as crude extract. The thermal extract (100 ° C) and autoclaved extract (120 ° C at 1atm, for 15 minutes) were also used. Trichoderma spp. Isolates were used to detect the enzymatic index. And S falciform, cultured in culture media specific for each enzyme. The crude extracts of T. harzianum (T2, T3 and T6), T. citrinoviride (T5) and T. orientale (T15) are efficient in inhibiting the development of falciform Fusarium, the crude extract being at 50 ° C, which provided The highest percentage of mycelial growth reduction (85%), followed by the extract at 100 ° C (59%) and 121 ° C (40%). The T. harzianum (T2, T3 and T6), T. citrinoviride (T5) and T. orientale (T15) species as well as the F. falciform isolate produced the enzymes amylase, cellulase, gelatinase, lipase, protease and chitinase. The species T. harzianum (T3 and T6) and T. citrinoviride (T5) showed the highest performance in the production of the enzymes.

Keyword: Bioactive, Biocontrol, plant pathogens, antagonism.

4.1. INTRODUÇÃO

Um dos mecanismos importantes dos biocontroladores é a produção de substâncias bioativas voláteis ou não voláteis que são capazes de impedir o desenvolvimento de outros organismos de espécies diferentes (DIAS, 2011; CARVALHO FILHO, 2013). A produção de metabólitos por organismos biocontroladores pode resultar na completa lise e dissolução da estrutura celular e independe do contato físico entre os microrganismos (BETTIOL, 1991). Carvalho (2006), afirma que a capacidade de produzir substâncias biocontroladoras pode variar entre espécies de patógenos e/ou de isolados da mesma espécie.

Segundo Bomfim (2007) e Souza, (2013), o biocontrolador será bem sucedido se capaz de romper a parede celular (composta por carboidratos, tais como quitina, além de proteínas e lipídios em quantidades significativas) do fitopatógeno ou interromper os processos relacionados à sua síntese e muitos agentes de biocontrole são capazes de secretar essas enzimas. Portanto, a produção de enzimas que hidrolisem os componentes da parede celular dos fitopatógenos, particularmente quitinases e glucanases, se faz importante para o processo de biocontrole. Vários são os mecanismos utilizados por *Trichoderma* spp. no controle de fitopatógeno, sendo hiperparasitismo, antibiose e competição os mais conhecidos.

A secreção de substâncias orgânicas antibióticas produzidas por microrganismos que em baixa concentração interferem nas atividades metabólicas, na redução ou paralisação do crescimento e esporulação, redução na germinação de esporos, além de distorções na hifa e endólise, ou seja, são deletérias a outros organismos, quer de ação específica ou de amplo aspecto de ação são importantes artifícios para eficiência do antagonista (LOBO JUNIOR; ABREU, 2000; BOMFIM , 2007; SOUZA, 2013).

Lobo Junior; Abreu, (2000), afirma que antibióticos são produtos do metabolismo secundário de seus produtores, e podem ser mais importantes na inibição de outros organismos do que a competição por nutrientes. A produção de metabólitos por antagonistas no solo ainda não é bem esclarecida, e baseia-se ainda em suposições. Evidências indicam que várias destas enzimas atuam em sinergismo com outras enzimas hidrolíticas para lisar a parede celular dos fitopatógenos hospedeiros (CARVALHO, (2006).

O micoparasitismo é um processo complexo, no qual enzimas líticas secretadas pelos fungos, como proteinases, quitinases e glucanases, estão envolvidas no processo

de penetração na parede celular do hospedeiro (ETHUR, 2006; CARVALHO, 2006; BARRA, et al., 2008; AMORIM *et al.* 2011; DIAS, 2011; CARVALHO FILHO, 2013; SOUZA, 2011). O processo de destruição física da parede celular pode ser físico ou metabólico com digestão por enzimas hidrolíticas de hifas, estruturas de reprodução e sobrevivência dos patógenos de planta, reduzindo a infecção e o inóculo do patógeno (ETHUR, 2006). Carvalho, (2006), diz de forma esclarecedora que o microorganismo antagonista vive sobre ou dentro do fungo antagonizado e que dentre as várias etapas a que merece destaque é a liberação das exoenzimas cuja função supracitada anteriormente. Zucchi (2010) relata que a atividade micoparasítica necrotrófica tem grande eficiência em inúmeros fungos fitopatogênicos, principalmente aqueles com estruturas de resistência consideradas difíceis de serem atacadas por microrganismos, como esporos, escleródios, clamidósporos e microescleródios.

Assim sendo o objetivo principal desse trabalho foi avaliar a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. em inibir o desenvolvimento de *Fusarium falciforme* e detectar o índice enzimático dos isolados de *Trichoderma* spp. (T2; T3; T5; T6 e T15) e de *F. falciforme*, agente causal da podridão radicular da mandioca de mesa (*Manihot esculenta* Crantz) var. Rosinha.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. . LOCAL DE EXECUÇÃO.

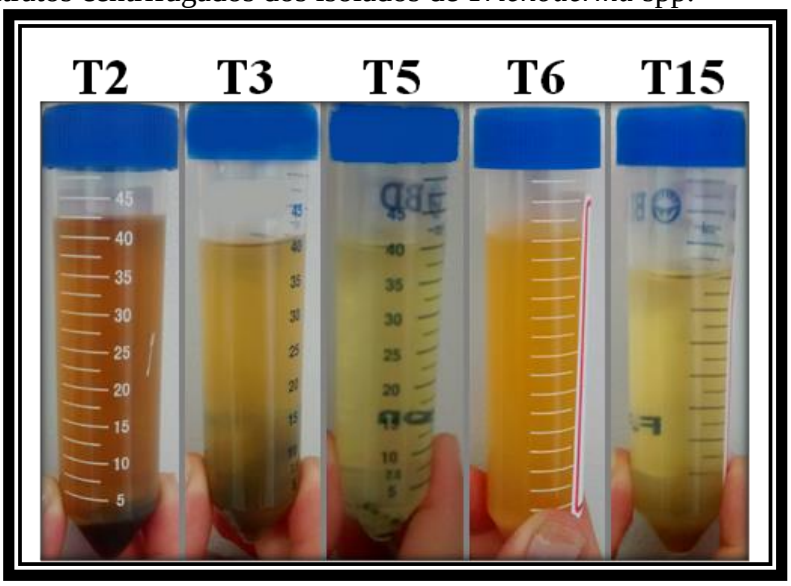
Os trabalhos foram conduzidos no laboratório de Fitopatologia da Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) - Campus Delza Gitaí, em Rio Largo, Estado de Alagoas.

4.2.2. EFEITO DO EXTRATO DE *Trichoderma* spp. SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Fusarium falciforme*.

Para obtenção do extrato bruto de *Trichoderma*, os cinco isolados que apresentaram melhor nota na escala de Bell *et al.*, (1982) e possível produção de metabolitos secundários devido a mudança de cor do meio, bem como os que tiveram melhor taxa de inibição de *Fusarium* sp., foram usados para o preparo dos extratos.

Cinco discos de BDA (5mm) contendo micélio de *Trichoderma* (T2; T3; T5; T6; T15) foram colocados em recipientes de vidro com 200mL de meio líquido BD (Batata-dextrose) durante 10 dias, em temperatura ambiente (25°C) e fotoperíodo de aproximadamente 12h. Após o período de incubação dos isolados, foi observado que os mesmos apresentaram três fases distintas, as quais foram homogeneizados e 25mL foram colocados em tubos Falcon (45mL) que foram centrifugados durante 15 minutos a 4000rpm (Figura 10). Depois de decorrida a centrifugação, o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi mais uma vez centrifugado como na fase anterior. Depois da segunda centrifugação o sobrenadante foi cuidadosamente pipetado e separado para os testes com os extratos usando concentrações e temperaturas que variaram de 5 a 20% e temperaturas de 50 a 120°C. A centrifugação do meio líquido contendo micélio crescido de *Trichoderma* spp., foi realizada com o objetivo de precipitar a massa micelial e os conídios do fungo e utilizar apenas o sobrenadante e metabólitos por eles produzidos para o controle do patógeno.

Figura 10. Extratos centrifugados dos isolados de *Trichoderma* spp.



Fonte: SILVA & NASCIMENTO JÚNIOR; (2016).

Para avaliar a atividade antifúngica, os extratos foram submetidos a três condições de termoterapia: 50°C, 100°C e 120°C a 1 ATM, e quatro concentrações (5%; 10%; 15% e 20%). O volume foi fixado em 40mL.

No tratamento a 50°C, os extratos dispostos em tubos Falcon, nas devidas concentrações, tiveram seus volumes completados com meio de BDA a uma temperatura próxima a 50°C. Em seguida, o meio e o extrato foram homogeneizados e vertidos em placas de Petri (70mm).

No tratamento a 100°C, os extratos de *Trichoderma* sp., foram mergulhados, durante 15 minutos, em Erlenmeyer com água aquecida até o ponto de ebulição (100°C). A temperatura da água ao fim do tratamento foi de aproximadamente 70°C. Decorrido o tempo de tratamento, os extratos termicamente tratados foram mais uma vez centrifugados e os sobrenadantes diluídos nas referidas concentrações, completados os volumes com BDA obtendo volume final de 40mL e vertidos em placas de Petri.

Para o extrato de *Trichoderma* sp., autoclavado, recipientes de vidro contendo meio BD com crescimento micelial de *Trichoderma* spp., foram autoclavados a 120°C a 1atm durante 15 minutos. Após o procedimento, os mesmos foram centrifugados 2 vezes durante 15 minutos e utilizado o sobrenadante nas concentrações acima citados, completados os volumes com meio de BDA e vertidos em placas de Petri.

Depois da solidificação do meio de cultura com as devidas concentrações de extrato, discos de BDA (5mm) contendo *Fusarium* sp., foram dispostos no centro das

placas, sendo o crescimento micelial observado diariamente, bem como suas alterações de cor, produção de metabolitos secundários e antibiose, caso houvessem, e o diâmetro da colônia mensurado com auxílio de paquímetro digital. As placas foram mantidas em temperatura ambiente (25±1ºC) e fotoperíodo de 12h, por 7 dias.

Como testemunha, utilizou-se o patógeno em meio BDA sem extrato de *Trichoderma* spp. Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) foi aplicada a fórmula proposta por Abbott (1925), sendo que o fim da avaliação foi no momento que o patógeno atingiu o diâmetro da placa no meio sem extrato (Testemunha). Para avaliar as interações ocorrida no controle foram aplicadas a escala de notas de Bell *et al.*, (1982), conforme descrito no item 3.2.4.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 61 tratamentos, em esquema fatorial 5 x 4 x 3 + testemunha, sendo 5 isolados de *Trichoderma*, 4 concentrações, 3 temperaturas e 4 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

4.2.3. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. E EFEITO NO DESENVOLVIMENTO DE *Fusarium falciforme*

Para verificação da atividade enzimática foram utilizados o isolado de *Fusarium* sp. e os isolados T2; T3; T5; T6 e T15 de *Trichoderma* sp., selecionados por produzirem substâncias bioativas e inibição do fitopatógeno. As enzimas estudadas foram amilase, celulase, gelatinase, lípase, protease e quitinase, que segundo Bueno *et al*. (2009) a atividade destas enzimas no patógeno está relacionada com as doenças nas plantas. Assim como Bomfim *et al.*, (2010) e Souza (2013), relata que biocontroladores que apresentam enzimas capazes de degradar a parede celular composta por carboidratos, tais como quitina, além de proteínas e lipídios em quantidades significativas do fitopatógeno ou interromper os processos relacionados a sua síntese serão bem sucedidos no controle. Utilizados a partir das informações previamente obtidas, os meios de cultura para detecção de halo enzimático abaixo discriminados:

4.2.3.1. Teste enzimático para AMILASE (HANKING e ANAGNOSTAKIS, 1975)

Extrato de carne.....3,0g
Ágar 15g
Amido 3%
Tampão citrato fosfato 0.1 M 1000mL

O amido e o ágar foram dissolvidos em 500 mL de tampão citrato fosfato separadamente e homogeneizados. Após esse processamento, o meio de cultura foi acondicionado em recipiente de vidro e esterilizado a 121°C durante 20 minutos. As placas de Petri contendo o meio de cultura foram mantidas por seis dias em fotoperíodo de 12h e temperatura ambiente. Para revelar o halo enzimático foi utilizado vapor de iodo, e para fotografar, foi utilizado luz UV da câmara de fluxo laminar.

Para a produção de vapor de iodo foi utilizado 15g de cristal de Iodo em 100mL de ADE em Erlenmeyer de 250mL fechado com tampa de vidro e aquecido em microondas até formação de vapor. As placas de Petri contendo os meios de cultura e isolados foram abertas e posicionadas em direção da abertura do Erlenmeyer para entrar em contato com o vapor durante 15-30 segundos e assim revelado o halo enzimático.

4.2.3.2. Teste enzimático para CELULASE (HANKING e ANAGNOSTAKIS, 1975)

O meio de cultura utilizado para determinar a atividade de celulase foi o Ágar Carboximetilcelulose preparado com:

Ágar.....1,8%
Carboximetilcelulose.....1,0
Tampão Acetato de sódio 0.1M pH 5.0.....500 mL

A carboximetilcelulose (CMC) foi dissolvida em 200 mL de tampão acetato de Na+ 0.1M pH 5.0, aquecido em microondas. Após a dissolução de CMC, foi adicionado o restante do tampão (300 mL) e em seguida o ágar. O meio de cultura foi homogeneizado e esterilizado a 121°C durante 20 minutos. As placas de Petri contendo o meio de cultura foram mantidas por oito dias em fotoperíodo de 12h e temperatura ambiente. Para verificar a atividade celulolítica, utilizou-se como solução reveladora

vermelho congo 0,1%, durante 5 minutos, sendo lavados duas vezes com acetato de sódio para retirar o excesso.

4.2.3.3. Teste enzimático para GELATINASE (HANKING e ANAGNOSTAKIS, 1975)

Extrato de carne.....3,0g
Peptona 5,0g
Ágar 20,0g
Gelatina 150,0g
Tampão citrato fosfato 0.1 M 1000mL

Utilizou-se gelatina sem sabor com corante vermelho, que foi adicionada ao ágar, seguida da dissolução em 500 mL de tampão citrato fosfato. Após a homogeneização dos ingredientes, o meio de cultura foi acondicionado em recipiente de vidro e esterilizado a 121°C, durante 20 minutos. As placas de Petri contendo o meio de cultura foram mantidas por seis dias em fotoperíodo de 12h e temperatura ambiente. Para revelar a formação do halo enzimático foi utilizado vapor de iodo, e para fotografar, a luz UV. O meio depois que sofre a ação da enzima fica fluido, desta forma antes de fotografar as placas foram colocadas em congelador a 12°C por 5 minutos para solidificar o meio.

4.2.3.4. Teste enzimático para LIPASE (‘Hankin & Anagnostakis (1975)).

Tween 20.....1mL
Peptona 10,0g
Cloreto de sódio.....5,0g
Cloreto de cálcio.....0,1g
Ágar 17,0g
ADE.....1,0L

O Tween 20 foi esterilizado separadamente por 20 minutos a 121°C a 1atm, posteriormente foi adicionado a 100 mL de meio esterilizado e resfriado. Para auxiliar a revelação do halo foi adicionado 5mL de Rodamina B.

Para preparar a solução reveladora foi necessário diluir 1g de Rodamina B em 50mL de ADE. Posteriormente foi retirado 0,3mL e diluído em 100mL de ADE. As

placas de Petri contendo o meio de cultura foram mantidas por dez dias em regime escuro e temperatura ambiente. A revelação foi feita em luz UV da câmara de fluxo laminar.

4.2.3.5. Teste enzimático para PROTEASE (Lacaz et al., 1991)

Ágar 20,0g
Leite desnatado 100g
ADE..... 1,0L

O ágar foi dissolvido em 500 mL de água destilada. O leite desnatado foi diluído em 500mL de água destilada. As soluções foram autoclavadas a 121°C, durante 20 minutos, separadas e após resfriamento (50°C) foram homogeneizadas em câmara de fluxo laminar. As placas de Petri contendo o meio de cultura foram mantidas por seis dias em fotoperíodo de 12h e temperatura ambiente. Não foi utilizado nenhum produto para revelar o halo, que foi fotografado em luz UV.

4.2.3.6. Teste enzimático para QUITINASE (Renwech et al., 1991) com modificação.

CaCO3.....0,02g
FeSO47H2O.....0,01g
KCl.....1,71g
MgSO47H2O.....0,05g
Na2HPO47H2O.....4,11g
Ágar 15,0g
Quitina coloidal.....0,8g
Água destilada.....1,0L

Todos os reagentes foram homogeneizados em 1000mL e autoclavados a 121°C, durante 20 minutos. As placas de Petri contendo o meio de cultura foram mantidas por doze dias em fotoperíodo de 12h e temperatura ambiente. Para revelar o halo foi utilizado vapor de iodo, e para fotografar foi utilizado luz UV.

4.2.4. DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA

O índice enzimático (*I.e.*) foi calculado somando o diâmetro da colônia e do halo formado, dividindo o resultado pelo valor do diâmetro da colônia segundo Furlaneto, (1989). Øc = diâmetro da colônia (mm); Øh = diâmetro do halo (mm):

$$I.e = \frac{Øc + Øh}{Øc}$$

Foi adotada a escala sugerida pelo autor: (-) 0 a 0,99; (+) 1,0 a 1,10; (++) 1,11 a 1,20; (+++) 1,21 a 1,30; (++++) >1,31. Onde o sinal (-) = não produtor de enzimas; (+) = produção mínima de enzimas; (2+) = produção fraca de enzimas; (3+) = produção moderada de enzimas e (4+) = produção intensa de enzimas.

4.2.5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 36 tratamentos, em esquema fatorial 6 x 6, representados pelos seis isolados e seis meios de cultura e quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparada pelo teste de Tukey a 5%.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

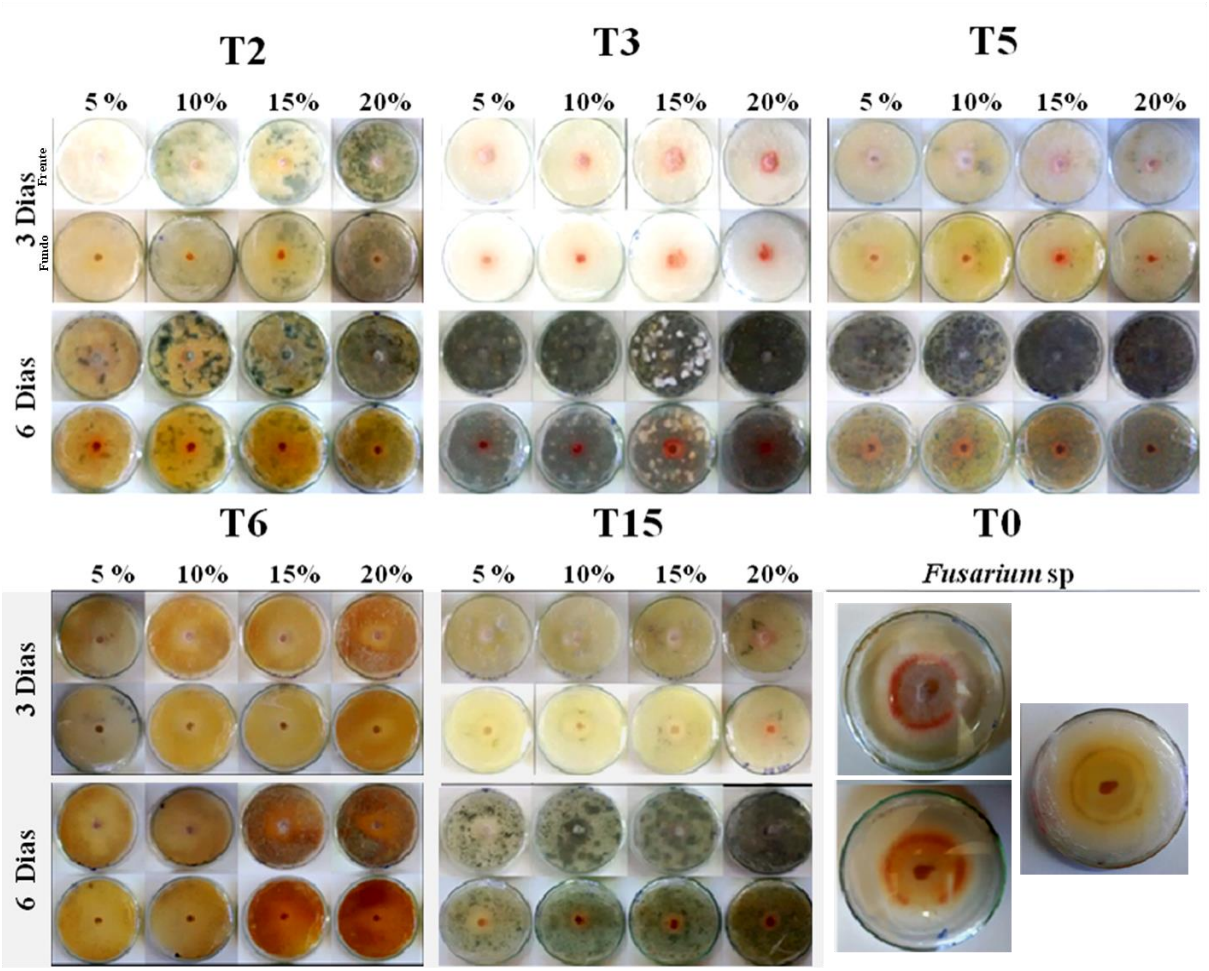
4.3.1. EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE *Trichoderma* spp. SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Fusarium falciforme*

Os resultados do efeito do extrato de *Trichoderma* sobre o desenvolvimento de *Fusarium* sp., demonstram grande diversidade no que diz respeito à reação ocorrida entre o biocontrolador e o fitopatógeno. Foi verificado que, após o segundo dia de incubação, surgiram pequenas colônias brancas de *Trichoderma* spp., em todos os tratamentos e a partir do terceiro dia havia alteração da cor do meio de cultura e também da cor característica do micélio do fitopatógeno que variava de amarelo a vermelho. Após o quarto dia, todos os isolados já tinham atingido o diâmetro da placa. As mudanças na cor do meio variavam com o tempo e a concentração.

A mudança de cor do micélio do fitopatógeno em relação à presença dos isolados de *Trichoderma* spp., está relacionada possivelmente, a uma característica de defesa. Esta capacidade de alteração na coloração do micélio em cultura pura foi percebida no momento em que o mesmo foi submetido à oscilação de temperatura que variou de 20-28°C aproximadamente, e quando estava em contato com contaminantes.

A presença do *Trichoderma* spp., na forma de extrato, e seu desenvolvimento hifal no meio de cultura, bem como suas atividades hiperparasítica e antibiótica possivelmente estimulou as defesas do fitopatógeno como mostra a Figura 11.

Figura 11. Efeito dos extratos brutos de *Trichoderma* spp. sobre a porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Fusarium falciforme*, aos 3 e 6 dias de incubação: T2; T3; T5; T6 e T15 (*Trichoderma*), T0 (Testemunha).



Fonte: SILVA e NASCIMENTO JÚNIOR (2016)

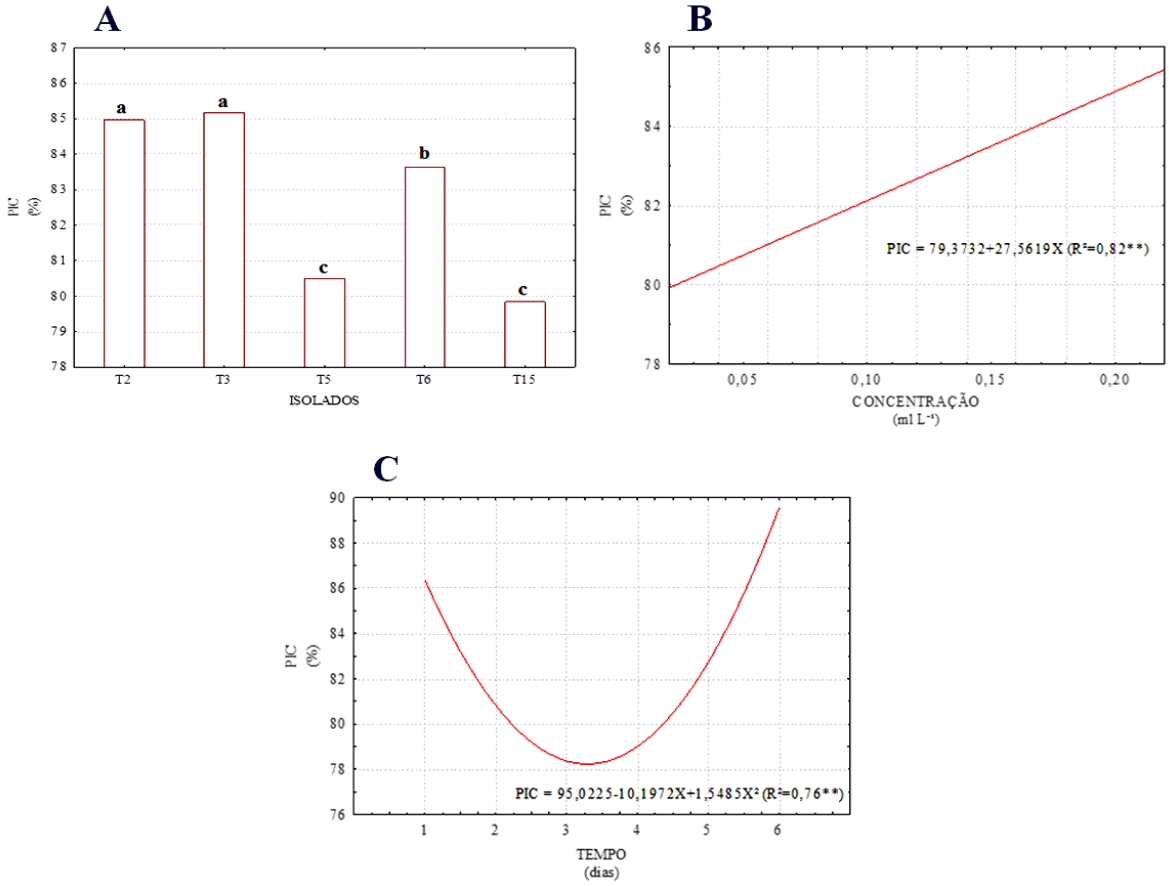
Todos os isolados de *Trichoderma* mostraram-se eficientes em controlar *Fusarium* sp., pois a atividade de biocontrole variou de 79 a 85%, sendo que os isolados T2 e T3 tiveram a maior PIC superior a 85%, seguidos pelo isolado T6 com PIC próxima de 84%. Já os isolados T5 e T15 foram os que obtiveram menor desempenho com PIC de 80,5% e 79,8% respectivamente (Figura 12A). Em relação à concentração dos extratos verificou-se que o comportamento deles foi linear, quanto maior a concentração maior é a PIC (Figura 12B).

O modelo quadrático foi o que apresentou o melhor ajuste para a PIC, onde observa-se que a partir do terceiro dia de incubação ocorreu a diminuição do diâmetro da colônia, devido ao desenvolvimento dos biocontroladores e início do antagonismo. A

reação do fitopatógeno em relação ao crescimento e as alterações fisiológicas ocorreram a partir do segundo dia de confronto com o biocontrolador. Estas alterações podem ter ocorrido devido à reação de defesa do patógeno em resposta a ação antibiótica e/ou hiperparasitca do biocontrolador, que foi notado no momento em que o fitopatógeno teve seu desenvolvimento vegetativo retardado e sua coloração alterada (Figura 11). No terceiro dia, por ação hiperparasítica, o biocontrolador que já havia crescido, paralisado e alterado fisiologicamente o fitopatógeno (mudança na coloração do micélio), penetra, se alimenta, cresce e se reproduz sobre ele, para isso obteve-se como resultados a redução do diâmetro da colônia do fitopatógeno e reprodução do biocontrolador.

No sexto dia o controle do patógeno já estava próximo a 90% e no sétimo dia verificou-se que todos os isolados de *Trichoderma* spp. tinham colonizado toda a placa de Petri e assumido 100% de biocontrole, dando aos isolados testados neste experimento a nota máxima (1) adotada na escala descrita de Bell (1982), como pode ser observado na Figura 12C.

Figura 12. Efeito dos extratos de *Trichoderma* spp. sobre a porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Fusarium falciforme*: A) atividade de biocontrole dos extratos, B) efeito da concentração dos extratos e C) Efeito do tempo sobre a PIC.



Muitos trabalhos mostram o potencial de biocontrole exercido por extratos que liberam bioativos (metabólitos) capazes de fornecer proteção às plantas contra o ataque de organismos patogênicos (JAMAL *et al.*, 2008;. SILVA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2009; VENTUROSO *et al*, 2011; SANTOS *et al.*, 2013). Esses bioativos nas plantas são necessários para sua sobrevivência, mas os metabólitos secundários não possuem uma atividade imediata na célula, e sim, servem como uma vantagem evolutiva para a sua sobrevivência e reprodução, atuando como pesticidas naturais contra herbívoros ou microrganismos patogênicos (VIZZOTTO *et al.*, 2010; VENTUROSO *et al.*, 2011)

Trabalhos realizados com bioativos de microrganismos são em sua maioria com *Trichoderma* spp., pois atuam como biocontrolador competindo por nutriente, antibiose e hiperparasitismo e contam ainda com a produção de bioativos voláteis e não voláteis e enzimas que potencializa ainda mais a sua atividade (CARVALHO, 2006; BRITO *et al.*, 2010; ZUCCHI, 2010; DIAS, 2011; DA SILVA *et al.*, 2011; SOUZA PEDRO,

2012; BIZI, 2015; CANCELA, 2015; FIPKE, *et al.*, 2015). Encontra partida poucos trabalhos relatam a extração destes bioativos em *Trichoderma*.

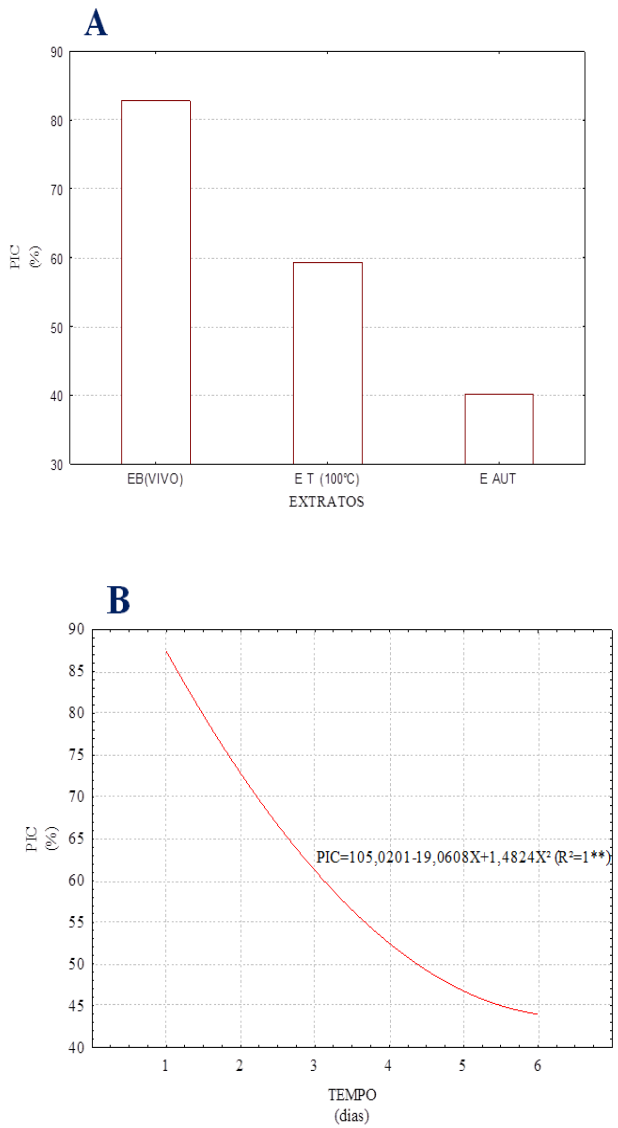
4.3.2 EFEITO DO EXTRATO DE *Trichoderma* spp. TRATADO TERMICAMENTE SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Fusarium falciforme*

O choque térmico de 100°C quando realizado por 15 minutos elevou a temperatura do extrato até 98ºC e no fim do tempo decorrido caiu para 70°C, temperatura ainda muito alta e que possivelmente rompeu as paredes das hifas, inviabilizando os biocontroladores.

O tratamento do extrato a esta temperatura foi para inviabilizar as estruturas reprodutivas do biocontrolador, impedindo assim a sua germinação e a possível interferência pela ação de competição, antibiose e hiperparasitismo. Assim, o choque térmico nos dá certeza de que os bioativos de *Trichoderma* spp. suportam temperaturas elevadas, mantendo-se ativo e controlando o fitopatógeno. Da mesma forma ocorreu com o extrato autoclavado que teve um choque térmico maior, 121°C pelo mesmo tempo.

O desempenho do biocontrolador foi menor quando autoclavado, provavelmente devido à desnaturação de alguns bioativos. Apesar disso, houve a manutenção da estabilidade térmica dos bioativos, indicando a sua capacidade de suportarem temperaturas mais elevadas. Em nenhum dos tratamentos houve crescimento do biocontrolador. A redução da PIC ficou em torno de 30% e 50% para os extratos tratados a 100°C e autoclavados respectivamente, em relação ao extrato bruto vivo (Figura 13-A-B).

Figura 13. Efeito dos extratos de *Trichoderma* spp. sobre a porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Fusarium falciforme*: Atividade de biocontrole dos extratos (A) e efeito do tempo sobre a PIC (B)



Os resultados obtidos mostram que o biocontrolador utiliza todas as formas nele existentes para controlar o fitopatógeno, que vai desde as atividades mecânicas a bioativas, como metabólitos e enzimas que lisam o micélio, facilitando a sua atividade de controle.

Resultados semelhantes foram verificados por Isaias *et al.*, (2014) ao testarem a termoestabilidade de isolados de *Trichoderma*. Os autores relataram ter havido uma diminuição nas porcentagens de inibição dos seus isolados. Os metabólitos de *Trichoderma* spp., se mantiveram ativos mesmo após autoclavagem, pois inibiram o

crescimento micelial dos patógenos, indicando o potencial desses metabólitos antifúngicos, nas condições experimentais utilizadas, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho que tiveram uma capacidade de inibição menor em relação aos extratos brutos e extratos térmicos.

Kupper *et.al.,* (2003) em seu trabalho usando os isolados de *Bacillus* spp., produziram, *in vitro*, metabólitos que foram capazes de inibir o crescimento micelial de *C. acutatum*, os quais mantiveram suas atividades capazes de causar a inibição, após autoclavagem a 120°C, durante 20 min. Segundo Jayaprakashvel *et al.,* (2010) a autoclavagem (121°C por 15 minutos) de metabólito proveniente de um agente de biocontrole pode reduzir em 24% a sua atividade antifúngica quando comparada ao não autoclavado. Já Guimarães (2014) postula que moléculas bioativas, presentes em metabólitos de origem microbiana, podem se decompor em outras moléculas menos ativas ou mesmo inativas, quando submetidas a condições inadequadas que levem à degradação das moléculas.

Jayaprakashvel *et al.,* (2010) verificaram que a inibição média de 35% do crescimento micelial de *Cladosporium herbarum*, obtida com metabólitos previamente submetidos à autoclavagem, por exemplo, chegaria a aproximadamente 45%, quando comparado com ou sem autoclavagem. O fato de alguns desses metabólitos se mostrarem estáveis em várias temperaturas sustenta a hipótese de que os mesmos possam se manter ativos frente a diferentes fatores, como insolação e temperaturas mais elevadas dos solos de diferentes regiões, conforme mencionado anteriormente. Importante salientar que trabalhos desta natureza vislumbram a perspectiva de síntese destes metabólitos secundários seletivos para determinados organismos, por serem vantajosos em relação a outras moléculas de natureza química, sob a ótica ambiental.

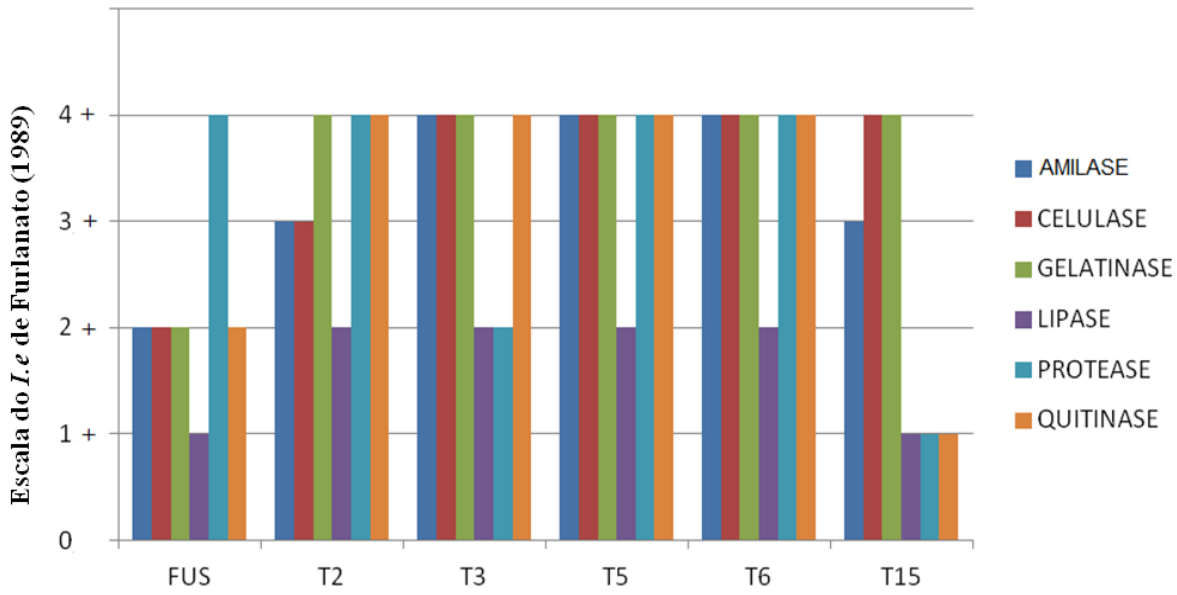
Lopes *et al*. (2012) também relatam a redução da eficiência de controle da maioria dos isolados testados por eles, que ficou em torno de 50% em comparação aos metabólitos não autoclavados. Os trabalhos de Guimarães (2014) a eficiência foi superior a 70%. Da Mata *et. al.,* (2008) e Isaias *et al.,* (2014) afirmam que a variação da sensibilidade dos fungos fitopatogênicos à metabólitos produzidos por biocontroladores e a capacidade de *Trichoderma* spp. de produzirem metabólitos secundários com efeito fungicida, pode variar entre espécies e entre isolados da mesma espécie. Estes resultados corroboram com os obtidos neste trabalho, pois o comportamento de cada

isolado foi diferente em relação a sua capacidade de controle com os extratos tratados termicamente ou não.

4.3.3. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. E *Fusarium falciforme*

Os biocontroladores testados apresentaram índice enzimático que variaram de acordo com isolado e o tipo de enzima secretada (Figura 14). Nesta Figura é possível distinguir a proporção de produção de enzima através da escala descrita por Furlaneto (1989): os isolados que apresentaram *I.e.*>1,31 receberam nota máxima (4+) ou seja produção intensa. Neste trabalho observou-se que alguns isolados obtiveram *I.e.* cinco vezes maior que a nota máxima. Desta forma, isolados que tiveram um *I.e.* superiores a 1,31 tiveram a mesma nota e não diferiram entre eles, mesmo tendo diferido estatisticamente.

Figura 14. Índice enzimático dos isolados de *Trichoderma* spp. e *Fusarium falciforme* (Escala de Furlanato (1989)).



(1+) produção mínima; (2+) produção fraca; (3+) produção moderada, (4+) produção intensa de enzimas.

Considerando a escala proposta por Furlaneto (1989), para a enzima amilase, os isolados T3, T5 e T6 não diferiram entre eles e foram classificados com produção intensa (4+), diferindo dos demais que tiveram produção moderada (3+) para os isolados T2 e T15 e fraca (2+) para o fitopatogeno.

Para celulase e gelatinase os isolados T3, T5, T6 e T15 obtiveram produção intensa (4+), diferindo do fitopatógeno e de T2 para celulase.

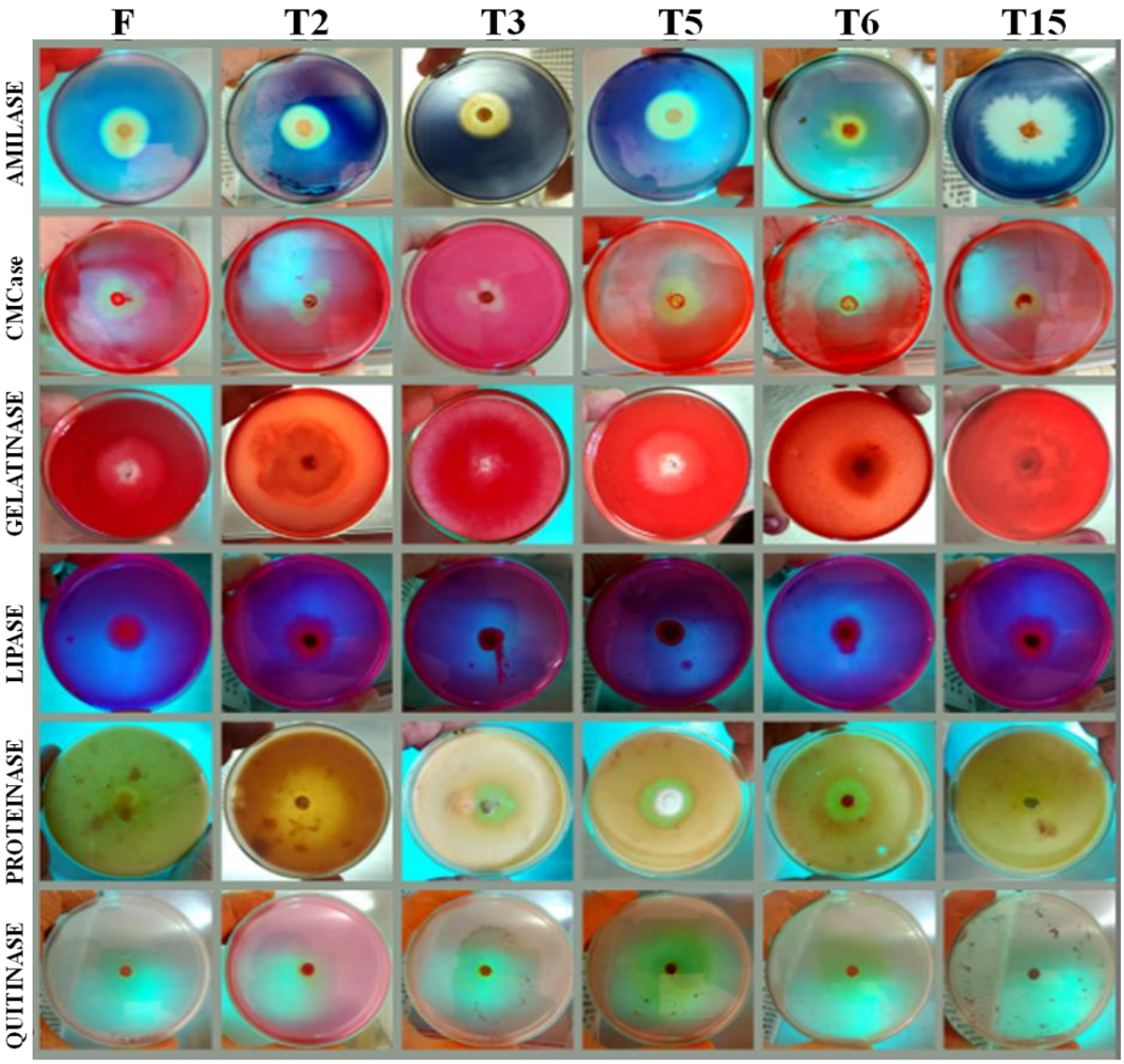
Os isolados que alcançaram melhor índice para lípase foram T2, T3, T5 e T6, com produção fraca (2+) diferindo de T15 e do fitopatógeno com produção mínima.

Os isolados T2, T5, T6 e o fitopatógeno foram os que apresentaram produção intensa (4+) de protease, diferindo dos isolados T3 com produção fraca (2+) e T15 mínima (1+).

Para a enzima quitinase, os isolados T2, T3, T5 e T6 foram classificados com produção intensa (4+), diferindo do isolado T15, que teve produção mínima e do fitopatógeno com produção fraca.

Analisando-se os resultados, verificou-se que os isolados de *Trichoderma* spp., T5 e T6, foram os que apresentaram o melhor desempenho na capacidade degradação dos meios, com *I.e* intensos (4+) para amilase, celulase, gelatinase, protease e quitinase, e fraco (2+) para lipase. O isolado T3, diferiu dos isolados T5 e T6 apenas em protease, pois seu *I.e* também foi fraco. O isolado T2 teve produção moderada (3+) em amilase e celulase, não diferindo do isolado T15 quanto à amilase e dos isolados T5 e T6 com relação às demais enzimas. O isolado T15 foi o que apresentou os menores *I.e* entre os biocontroladores, não diferindo dos isolados T3, T5 e T6 em relação a produção de celulase e gelatinase e do isolado de *F. falciforme,* em lípase e diferindo de todos os isolados com relação ao índice de protease e quitinase, cuja produção foi mínima (1+). O isolado de *F. falciforme*, apresentou uma intensa atividade proteolítica (4+) não diferindo dos biocontroladores com fraca produção (2+) de amilase, celulase e quitinase (Figura 15 e Tabela 3).

Figura 15. Reação enzimática de *Fusarium falciforme* e *Trichoderma* spp. nos meios específicos para secreção de enzimas.



Fonte: SILVA; NASCIMENTO JÚNIOR (2016).

No teste de amilase, o iodo coloriu o meio em violeta e onde teve a atividade enzimática formou um halo opaco. Na produção de celulase, os resultados das reações enzimáticas positivas foram identificados pela formação de um halo amarelo claro em contraste com o meio de cultura vermelho após a adição da solução reveladora. Para a lipase ocorreu à formação de uma borda clara em volta da colônia em razão da completa degradação do sal.

Tabela 3. Média dos Índices de Atividade enzimática dos isolados de *Trichoderma* spp. e *Fusarium falciforme*

ENZIMAS	FUS	T2	T3	T5	T6	T15
AMILASE	1,15 Aa*	1,23 Aba	1,33 ABab	1,72 ABb	2,64 Cc	1,27 Aab
CELULASE	1,16 Aa	1,30 ABab	2,04 Bcd	1,75 Bbc	2,71 Ce	2,26 Bde
GELATINASE	1,11 Aa	1,66 Bb	3,12 Cd	2,39 Cc	2,63 Cc	5,44 Ce
LIPASE	1,09 Aa	1,14 Aa	1,14 Aba	1,15 Aa	1,19 Aa	1,04 Aa
PROTEASE	1,45 Aab	1,35 ABab	1,19 ABab	1,60 ABb	1,54 ABab	1,06 Aa
QUITINASE	1,11 Aab	1,46 ABab	1,57 ABbc	1,58 ABbc	1,95 Bc	1,00 Aa

*Tratamentos com a mesma letra maiúscula, na coluna e tratamentos com a mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

Com relação à degradação de amido observou-se que o isolado T6 apresentou essa capacidade, com a maior taxa de produção de amilase (2,64), seguido pelos isolados T5 (1,72) T3; T15 e T2 que apresentaram os mais baixos índices enzimáticos respectivamente (1,33; 1,27; 1,23). *Fusarium falciforme* foi o que teve o menor *I.e* de todos com (1,15), mas não diferiu de T2; T3 e T15.

Vários trabalhos mostram a capacidade de degradação de amido por isolados de fungos: Zampieri; Ribeiro (2005) comentam que isolados de *Fusarium* teve maior *I.e* na avaliação de atividade de produção de amilase. Já Wenzel *et. al.*, (2013), relatam baixo *I.e*, tanto de *Fusarium* spp., quanto de *Trichoderma* spp., corroborando com os resultados encontrados neste trabalho. Fernandes (2009) relata que o isolado *Fusarium* sp. testado por ele não apresentou degradação de amido. Stamford *et al.*, (2008); Da Silva *et al.*, (2011); Pereira (2012) e Elias *et al*. (2015), também relatam ausência de halo enzimático em isolados de *Fusarium* e de *Trichoderma* testados em seus trabalhos, contrariando os resultados obtidos neste trabalho, visto que o patógeno se nutre das reservas de amido na raiz da mandioca.

Quanto a degradação da celulose, o isolado T6 apresentou o maior *I.e.* com produção de (2,71) seguido dos isolados T15 (2,26), T3 (2,04) e T5 (1,75) que não diferiram entre eles. O isolado de *Fusarium* sp. apresentou o menor *I.e*. (1,16) não diferindo do isolado T2 (1,23).

Analisando-se os resultados encontrados percebe-se que capacidade de degradação de celulose varia de isolado para isolado, entre indivíduos da mesma espécie e espécies diferentes. Fato este observados por vários pesquisadores que trabalharam com estes microrganismos.

Alguns corroboram outros discordam dos resultados obtidos neste trabalho: Braga *et al.* (2009), afirmaram que todos os isolados de *Fusarium* spp., por eles

avaliados, cresceram em meio contendo celulose como única fonte de carbono, indicando sua capacidade de síntese de enzimas celulolíticas, com variação de *I.e* entre fraco (1,06) a intenso (1,32). Bueno *et al*., (2009) também obtiveram resultados semelhantes, usando *F. solani* do cajueiro amarelo, cujos *I.e* variaram de fraco a moderado. Da Silva *et al.,* (2011) e Bortolazzo (2011), relata atividade enzimática muito baixa de espécies de *Fusarium*.

Por outro lado, vários autores relatam um índice enzimático maior para isolados de *Fusarium*, e também para *Trichoderma* spp., Ruegger; Tauk-Tornisielo (2004) observaram a variação entre os isolados de *Trichoderma* em relação à atividade enzimática que foram classificadas entre ausente, baixa (1,1) e intensa (4,0). Resultados obtidos por Feldman *et al.,* (1988) e Galliano *et al.,* (1988), Souza *et al.* (2011) e Sazci *et al*. (1986), entre outros autores, constataram que *Trichoderma* spp., possuem alta capacidade de síntese de enzimas celulolíticas.

Pereira (2012) ressalta que os isolados de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp., apresentaram elevados índices de atividade enzimática com *I.e*>2 *(* 3,7) e (4,3), índices que foram superiores aos encontrados neste trabalho. Resultados semelhantes foram obtidos por Faheina Junior (2012) em relação a isolados de *Fusarium* sp. e *F. moniliforme*, que apresentaram *I.e>2* (4,35) e (5,42), respectivamente. Já no trabalho de Ramos (2012) os isolados de *T. harzianum,* usados por ele, apresentou *I.e* que variaram de 1,10 a 6,0 enquanto para de Faheina Junior (2012) os isolados de *Trichoderma* spp., apresentaram índices muito baixos em torno de 1,09.

Basso *et. al*., (2011) concluíram que as linhagens *Trichoderma* sp., apresentam grandes diferenças em relação as suas atividades celulolíticas e afirmam que essas enzimas são excretadas nos três primeiros dias de incubação. Desta forma a visualização dos halos pode não ocorrer e o isolado considerado fraco ou ineficiente em produzir enzimas celulolíticas, mesmo tendo uma assimilação de nutrientes comprovada pelo seu crescimento no meio de cultura a base de celulose como única fonte de carbono.

Singhania *et al.,* (2010) relatam que as celulases produzidas por microrganismos aeróbios são facilmente secretadas na forma de molécula livre, e os fungos filamentosos são os mais capacitados na produção de celulase, nisto inclui o gênero *Fusarium* spp., e *Trichoderma* spp.

Quanto a produção de gelatinase, dentre os isolados que tiveram *I.e* ≥ 2,0 destacou-se o isolado T15 com um índice enzimático de (5,44) que diferiu de todos os

demais. O isolado T3 apresentou o segundo melhor índice (3,12). Os isolados T6 e T5 não diferiram entre si e obtiveram o terceiro melhor *I.e* na degradação de gelatinase, (2,63 e 2,3). Os demais isolados apresentaram *I.e*<2, sendo o isolado T2 o quarto entre os biocontroladores a obter o menor valor (1,66). O isolado de *F. solani* como pior dos índices entre os isolados testados (1,11).

Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Bueno *et al.* (2009), com *F. solani* e *Fusarium* spp., pois o índice enzimático foi considerado fraco. Elias *et al.* (2015), também encontram os mesmos resultados com *F. oxy*sp*orum f.* sp. *dianthi*.

Para o teste de degradação de lipídeos, nenhum isolado apresentou capacidade de degradação significativa (*I.e* < 2,0). Para Vaz, (2010) e Matos (2012), as lipases podem ser produzidas por vários organismos como animais (pancrea), vegetais (mamona e canola) e microrganismos (bactérias, leveduras, e fungos filamentosos, sendo estes o que possuem o maior potencial em hidrolisar as ligações éster-carboxilicas e liberar ácidos e alcoóis orgânicos).

Luz *et al*., (2006), trabalhando com vários isolados de *Fusarium* spp., verificaram que 85% dos isolados não apresentaram atividade lipolítica e os 15% restantes tiveram *I.e*<2. Fernandes, (2009) também encontrou resultados negativos para produção de lípases por *Fusarium.* Zampieri; Ribeiro (2005) relatam que as lipases foram secretadas em pequena quantidade por dois isolados de *F. oxy*sp*orum* e *T.viride.* Já Roveda *et al.* (2010) comenta que não encontrou atividade lipolítica em fermentação submetida aos isolados de *Trichoderma* spp, mas afirma que isolados de que *Fusarium* sp. são bons produtores desta enzima, sendo *F. solani* o que apresentou maior potencial. Já nos trabalhos realizados por Fernandes (2009), *Fusarium* sp., tiveram um *I.e* >2 contrapondo os resultados obtidos neste trabalho. De Brito *et.al*., (2016) comenta que os isolados de *Trichoderma* secretaram lípases com mais intensidade e de forma diferenciadas na presença dos fitopatógenos principalmente na presença de *F. oxy*sp*orum.*

Com relação à capacidade de degradação proteolítica, os resultados obtidos neste trabalho mostraram que todos os isolados apresentaram um *I.e* <2, sendo que o isolado T5 foi o que deteve a maior produção de protease (1,6) mas não diferiu dos isolados T6; *Fusarium* sp; T2 e T3 (1,54; 1,45; 1,35; 1,19). O isolado T15 foi o que apresentou o mais baixo índice e só diferiu do T5.

Vários pesquisadores comentam sobre a baixa capacidade de degradação proteolítca de *Fusarium* sp.: Bueno *et al*. (2009), Fernandes (2009), Da Silva *et al.*, (2011) relatam que *Fusarium* spp., tiveram *I.e*, considerado fraco, com atividade proteolítica *I.e*<2.

Com relação à *Trichoderma* spp., os trabalhos mostram que ocorreu uma variação na sua capacidade de degradação, de acordo com a espécie estudada*:* Zampieri; Ribeiro (2005) comentam que isolados de *T. viride* destacaram-se por uma atividade de produção de proteases significativa, e Pereira (2011) verificou que a atividade proteolítica de *T. harzianum*, obtidos de solo do cerrado, é maior quando este é cultivado em meio contendo micélio do *F. oxysporum*, provando a importância desta enzima na atividade de biocontrole de *Trichoderma*.

Segundo Carvalho, (2006); Santin, (2008) e Oliveira *et al.*, (2013), as proteases dos fungos estão significativamente envolvidas na atividade antagonista, não somente no desarranjo da parede celular do hospedeiro, mas também por agir como inativadores proteolíticos das enzimas dos patógenos envolvidos no processo de infecção nas plantas.

Quanto a quitinase produzida pelos isolados, verifica-se que estes apresentaram comportamento semelhante ao de produção de lipases com *I.e*<2. Apesar do isolado T6 ter apresentado o maior índice enzimático (1,95), ele não diferiu de T5 e T3 (1,58 e 1,57). O isolado de T2 (1,46) não diferiu dos isolados T3, T5 e *Fusarium* sp. (1,11) que não diferiu do isolado T15 (1,0) que teve o menor índice entre todos os isolados.

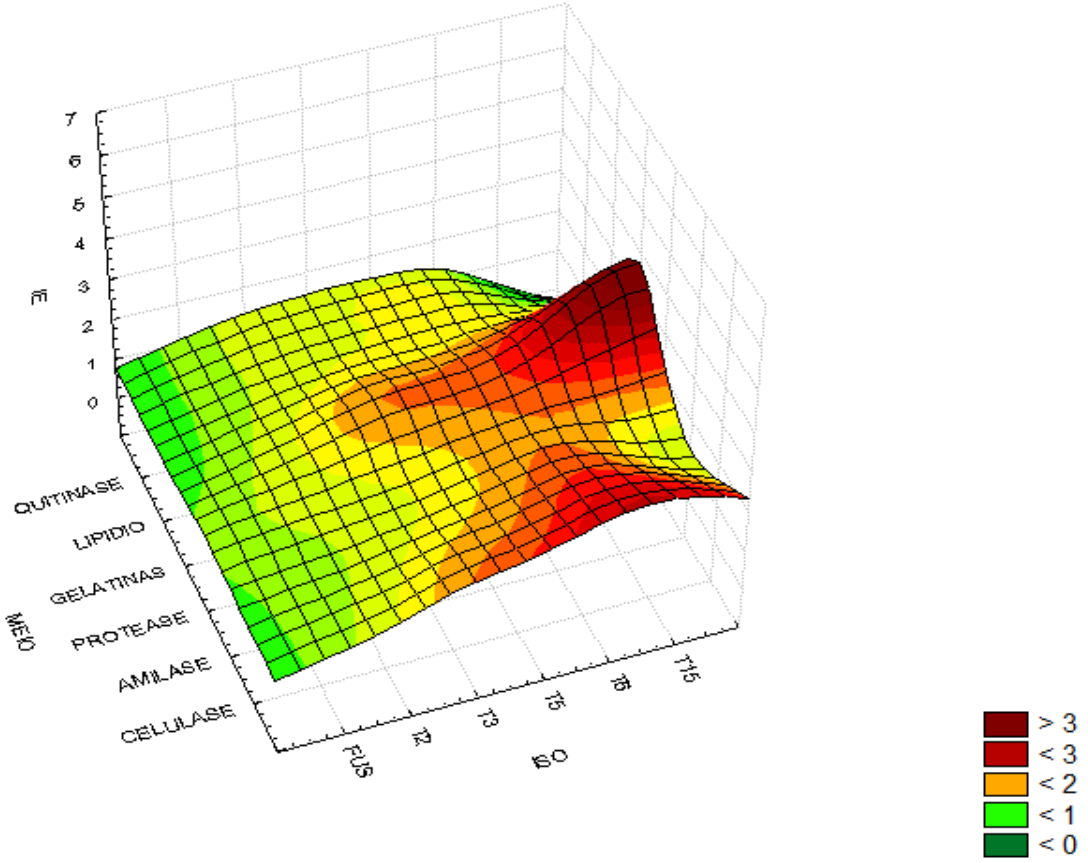
Zampieri; Ribeiro (2005) relatam que não foram observados halos de degradação de seus isolados, sendo então impossível calcular o índice enzimático para quitinase, mas os fungos desenvolveram colônias de aspecto normal, indicando que as fontes de carbono foram consumidas e, portanto, as enzimas foram produzidas e liberadas no meio de cultura, pelos fungos testados. No presente trabalho foi verificado que os isolados formaram o halo enzimático, mas não ficaram tão evidentes para registro fotográfico. Pádua *et al.*,(2007) concluíram que não existiu correlação direta entre o nível de produção de enzimas do sistema quitinolítica com o potencial de biocontrole, pois isolados que apresentaram atividade enzimática baixo obtiveram boa atividade de biocontrole e vice versa. Entretanto, devido à grande diversidade de interações antagonistas, esse importante critério não deve ser totalmente descartado na triagem e seleção de potenciais de isolados de *Trichoderma* como biocontrolador

eficiente, uma vez que a quitinase age de forma aleatória e degradam a parede celular de fungos, liberando oligômeros que induzem as exoquitinases, começando assim o ataque micoparasítico, hidrolisando os oligossacarídeos da parede celular do fitopatógeno. (MARCELLO, 2008; GIESE *et al.*, 2003; BAUERMEISTER *et al*., 2010).

Na Figura 16, pode ser observada a relação dos isolados e sua capacidade de assimilação de nutriente do meio, com a liberação de enzimas líticas e sua intensidade. Nota-se que todos os organismos testados produziram enzimas que degradam amido, celulose, gelatina, lipídios, proteína e quitina, pois os mesmos formaram halo enzimático nos meios testados variando seu *I.e* de 1 (mínima) a 5,54 (intensa).

Observa-se também que o isolado T6 foi o que deteve maior versatilidade e potencial em produzir enzimas com *I.e* > 2 na maioria dos meios testados. O maior índice enzimático foi a celulase (*I.e*=2,71) seguidos de amilase (*I.e*=2,64) e gelatinase (*I.e*=2;63). As outras enzimas testadas apresentaram *I.e*<2, mas observamos que o isolado tem uma intensa produção de quitinase (*I.e*=1,95) e protease (*I.e*=1,54), já em lípase a produção é mínima (*I.e*=1,19). Os isolados T15 e T3 apresentaram pouca variação entre eles, em relação à atividade enzimática, com produção de celulase (*I.e* = 2,22 e 2,04). No entanto, para gelatinase, T15 apresentou o maior índice de todos com *I.e*=5,54. O isolado T3 apresentou uma ótima produção de gelatinase, obtendo o segundo maior índice (*I.e*=3,12). Em relação às demais enzimas a produção de amilase foi significativa, sendo sua produção moderada. Em relação às enzimas lípase e protease a produção foi mínima para ambos, já para quitinase, o isolado T3 apresentou índice considerado intenso (*I.e*=1,54), enquanto T15 teve produção mínima desta enzima.

Figura 16. Índice enzimático dos isolados de *Trichoderma* spp. e *Fusarium falciforme*.



O isolado T5 apesar do *I.e>2* na enzima gelatinase, apresentou intensa produção de celulase (*I.e*=1,75), amilase (I.*e*=1,72), protease (*I.e*=1,6) e quitinase (*I.e*=1,58) e produção mínima (*I.e*=1,15) em lipase.

O isolado T2 foi o que apresentou menor atividade enzimática (*I.e*<2) entre os isolados de *Trichoderma* spp. O isolado apresentou intensa produção de gelatinase (*I.e*=1,66), quitinase (*I.e*=1,46) e protease (*I.e*=1,35), moderada produção de celulase (I.e.= 1,30) e amilase (*I.e*=1,23) e fraca produção de lipase (*I.e*=1,14)

A atividade enzimática do *Fusarium* sp. foi mínima para lipase (*I.e*=1,09), fraca para gelatinase e quitinase (*I.e*=1,11), amilase (*I.e*=1,15) e celulase (*I.e*=1,16) e intensa para protease (*I.e*=1,45). Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que mesmo com à produção mínima de enzimas o fitopatógeno possui atributos bioquímicos básicos para lisar e degradar substratos diversos, causar infecção, se estabelecer, colonizar, se reproduzir e também se defender de outros organismos.

Apesar da literatura não disponibilizar um valor padrão de *Ie*, para Oliveira *et al.*, (2006) e Nunes *et al.*(2013), estes são os melhores parâmetros semiquantitavos usados para avaliar a capacidade de produção enzimática de microrganismos em meio

sólido, pois correlaciona diretamente o diâmetro do halo de degradação com a habilidade degradativa.

Verificamos, neste trabalho, que mesmo em baixas concentrações, as substâncias antibióticas produzidas e secretadas pelos isolados de *Trichoderma* spp., provavelmente, interfiram nas atividades metabólicas, na redução ou paralisação do crescimento e esporulação, redução na germinação de esporos do isolado de *Fusarium* sp., e são importantes artifícios para eficiência do biocontrolador. Estas ações enzimáticas provocam a morte de um deles que, assim, servem de alimento para o sobrevivente (LOBO JUNIOR; ABREU, 2000; HARMAN, 2000; BOMFIM, 2007; BARRA *et. al.*, 2008; ZUCCHI, 2010).

O sucesso de um biocontrolador está relacionado com a capacidade de romper a parede celular (composta por carboidratos, tais como quitina, além de proteínas e lipídios em quantidades significativas) do fitopatógeno ou interromper os processos relacionados à sua síntese (Bomfim, 2007 e Souza, 2013).

Por serem proteínas que catalisam reações químicas, as enzimas, vem tendo grande aplicabilidade biotecnológica e industrial de biocontrole de fitopatógenos. Por isso as enzimas microbianas têm sido alvo de muitos estudos, já que a produção de enzimas por microrganismos possui diversos benefícios em relação às outras opções. A manipulação de microrganismos é mais fácil, possibilitando produção de enzimas em grande escala. A diversidade de microrganismos existentes que possam ser utilizados para produção enzimática é grande, e há possibilidade de descobertas de novas espécies para esse fim (BARATTO *et al.*, 2011; ORLANDELLI *et al.*, 2012; FRANTZ *et al.*, 2014).

A classificação de intensidade da produção enzimática varia de acordo com os pesquisadores. Furlaneto (1989), considera que o índice enzimático (*I.e*) intenso (4+) é o que é igual ou maior que 1,31. Fungaro; Maccheroni (2002) estabeleceram que valores maiores que 1,0 são indicativos de excreção de enzimas. Bispo (2010); Silva *et al*. (2013) e Silva *et. al*. (2015) indicam $I.e \geq 2$ como característica de atividade enzimática significativa sendo os microrganismos produtores, classificados como forte produtor de enzimas ($I.e \geq 2$), considerado moderado ($1,5 \leq I.e < 2$), fraco produtor ($1 < I.e < 1,5$) e ausência de halo de hidrólise (não produtoras). Fungaro; Maccheroni (2002) e Florencio *et al*. (2012) consideraram em seus trabalhos o $I.e > 1,5$ para isolados de *Trichoderma* spp.

Silva *et al*., (2015) levantaram o questionamento sobre os índices enzimáticos de celulose em seus isolados, assim como neste trabalho foi verificado que a escala adotada por Furlaneto limita o *I.e* como forte produtor de enzima os isolados que apresentem valor igual ou maior que 1,31 (4+). Por tanto a capacidade de produzir e secretar enzimas que degradem estruturas biológicas complexas tais quais estudadas neste trabalho, possivelmente, levem em consideração o fato de elas estarem ligadas a um artifício biológico necessário para estabelecimento e o sucesso do microrganismo no ambiente, degradando matéria orgânica como saprófito, fitopatógeno ou biocontrolador.

Bispo (2010); Silva *et al*. (2013) e Silva *et. al*. (2015) usaram a escala de Furlaneto (1989) para determinação do índice enzimático, mas consideraram que os organismos a serem utilizados em experimentos no seu trabalho, na indústria de alimentos e aplicação biotecnológica, precisariam ter índice que variassem entre ($1,5 \leq I.e < 2$). Se os parâmetros da escala forem seguidos os microrganimos usados por estes autores teriam seus índices variando entre 6+ a 11+.

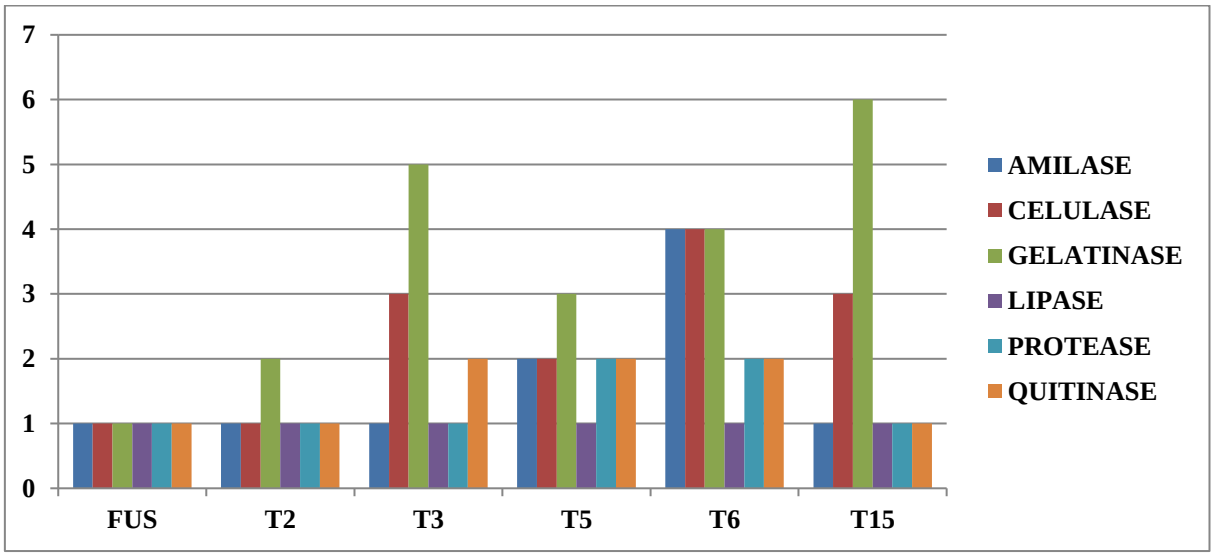
Neste trabalho obtivemos isolados de *Trichoderma* spp. que chegou a *I.e.*= 5,44 (T15). Esse índice é extremamente superior aos que foram encontrados na maioria dos trabalhos com fungos filamentosos, executados pelos pesquisadores acima citados. Desta forma, se fez necessário o uso de uma nova escala com parâmetros mais adequados que agrupasse melhor os microrganismos que secretam quantidades maiores de enzimas que hidrolisam compostos orgânicos, tanto para estudos relacionados à indústria alimentícia e biotecnológica quanto à atividade inerente ao sucesso dos mesmos em subtrair os nutrientes necessários para sua sobrevivência, desenvolvimento e reprodução.

Os isolados que obtiverem índice enzimático, que superaram a escala proposta por Furlaneto (1989), foram classificados pelo Potencial Enzimático (*P.E.*). Os que tiverem Potencial Enzimático ($1 \leq P.E < 1,5$)= 1, foram produtores de enzimas hidrolíticas, com produção mínima ou fraca e secretaram enzimas em quantidades suficientes para sua sobrevivência, sendo portanto, classificados por níveis, neste caso 1^+. Já os isolados com *P.E* ($1,5 \leq P.E. < 2$)=2 foram considerados potencialmente fortes de nível 2^+. Os isolados que ficaram entre ($2 \leq P.E. < 2,5$)=3 foram considerados potencialmente fortes ou de nível 3^+, enquanto os que ficaram ($2,5 \leq P.E. \leq 3$)=4^+ foram classificados como potencialmente forte nível 4^+. Isolados que tiverem

(3,0≤*P.E.*>3,5)=5^{+} foram potencialmente fortes de nível 5^{+}. Os que tiverem P.E>3,5 foram potencialmente forte de nível 6^{+}.

Baseado nesta nova escala podemos observar que o potencial enzimático foi detectado em todos os isolados de *Trichoderma* spp., bem como no fitopatógeno. Esse teve produção mínima ou fraca para todas as enzimas testadas neste trabalho e seu *P.E.* foi classificado com nível 1^{+}. O isolado T2 obteve resultados semelhantes ao fitopatógeno com exceção da enzima celulase, que apresentou *P.E.* nível 2^{+}. O isolado T3 foi o que obteve níveis diversos em relação ao potencial enzimático: para amilase, lípase e protease o *P.E.* apresentou nível 1^{+}, já para celulase e gelatinase o isolado apresentou um alto potencial enzimático com níveis 3^{+} e 5^{+}, respectivamente. O Isolado T5 apresentou P.E. nível 1^{+} para lípase, 2^{+} para amilase, celulase, protease e quitinase e 3^{+} para gelatinase. Já o isolado T6 teve o mesmo P.E. de T5 para lípase, protease e quitinase, e níveis extremamente altos para amilase, celulase e gelatinase com P.E.=4^{+}. O isolado T15 teve potencial enzimático nível 1^{+} para enzimas amilase, lípases, protease e quitinase, mas para celulose foi nível 3^{+} e, com relação à gelatinase, o isolado teve o maior nível na escala, com potencial enzimático nível 6^{+} (Figura 17).

Figura 17. Potencial enzimático (P.E.) dos isolados de *Trichoderma* spp. e *Fusarium falciforme*



Nivel 1^{+} (1≤*P.E*<*1,5*); nível 2+ (1,5 ≤ *P.E.* <2); Nivel 3+ (2 ≤ *P.E.* <2,5); nível 4+ (2,5 ≤ *P.E.* ≤3); nivel 5^{+} (3,0≤*P.E.*>3,5) e nível 6+ (P.E>3,5).

Uma avaliação pertinente ao observar a Figura acima é que a enzima com menor quantidade de excreção pelos microrganismos foi a lípase, que em todos os isolados teve *P.E.* nível 1+, mas produzida em quantidades suficientes para hidrolisar óleos e gorduras, ou seja, estruturas compostas por ácidos graxos, que estão presentes no ambiente em que esses organismos são inseridos.

Facchin (2013); Sacco (2013) e Silva *et al*, (2015) destacam a importância da excreção das enzimas amilase, celulases, lípase, protease por microrganismos, pois estes podem desempenhar um papel muito importante e primordial no tratamento biológico de efluentes, ou na decomposição da matéria orgânica em geral e no potencial biotecnológico. Desta forma, os isolados testados, além de apresentarem características de bons biocontroladores, detêm peculiaridades que os classificam como bons decompositores de matéria orgânica.

A utilização de isolados que apresentam *P.E.* a partir do nível 2^+ desta escala está descrito nas pesquisas de Fungaro; Maccheroni (2002) que trabalhou com microrganismos capazes de produzir enzimas no intuito de serem aplicadas na indústria de alimentos. Florencio *et al*. (2012) também adota este mesmo nível para verificar a degradação de celulose de isolados de *Trichoderma, e* Bispo (2010); Silva *et al*. (2013) e Silva *et. al*. (2015) corroboram quando indicam *I.e*≥2, que nesta escala estaria como nível 2^+ com potencial enzimático moderado.

Com os resultados obtidos neste experimento, podemos perceber que a produção de enzimas pelos isolados de *Trichoderma* spp., é importante para aumentar sua capacidade de biocontrole, mas estas enzimas atuam de forma secundaria já que a antibiose e o hiperparasitismo é a primeira ação destes biocontroladores. Notou-se ainda que nível de enzima produzido, por menor que seja, atua de forma eficaz no complexo ativo do hiperparasitismo. Isto é comprovadamente observado nos isolados T2 e T3, seguido de T15, que apesar de não diferir de T5 e T6, tiveram o melhor desempenho em relação à escala de Bell, mas também os menores *I.e* e consequentemente *P.E*. Portanto, os níveis de produção de enzima é característica de ação qualitativa para o biocontroladores estudados.

4.4. CONCLUSÕES

Os extratos de *T. harzianum* (T2, T3 e T6), *T. citrinoviride* (T5) e *T. orientale (T15)* são eficientes em inibir o desenvolvimento de *Fusarium falciforme*, sendo o extrato bruto a 50°C, o que proporciona a maior porcentagem de redução de crescimento micelial (85%), seguido do extrato a 100°C (59%) e 121°C (40%).

Os isolados possuem bioativos estáveis a temperaturas elevadas.

Todos as espécies de *Trichoderma* e o isolado de *Fusarium falciforme* estudados são produtores das enzimas amilase, celulase, gelatinase, lípase, protease e quitinase. As espécies *T. harzianum* (T3 e T6) e *T. citrinoviride* (T5) apresentam o maior desempenho na produção das enzimas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. Amsterdam : Elsevier Academic Press. 5.ed, 2005. 922p.

ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; MAFIA, R.G.; GONÇALVES, R. C. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; M (Ed.). **Métodos em Fitopatologia.** Viçosa, MG: UFV, p. 53-90. 2007.

ALVES, A. A. C.; SILVA, A. F. **Cultivo da mandioca para a região semi-árida. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMF**, 2003.

AGUIAR, A. R. *et al.* Antagonismo a fungos associados às sementes de *Pa*sp*alum* notatum *flügge* por *Trichoderma*. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.17; p. 198. 2013.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia. Piracicaba**: Agronômica Ceres. v. 1,4. Ed, p. 383 -387, 2011.

BARATTO, C. M. *et al*. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência-Ciência e Biotecnologia,** Joaçaba v. 11 n. 2, p. 15-28, julho/dezembro 2011.

BARRA, V. R. *et al.* Potencialidade antagonística em alguns procariotas agentes de biocontrole de enfermidades de plantas. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.2, p.121-126, 2008.

BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** v. 45, n. 11, p. 1282-1289, 2011.

BAUERMEISTER, A. *et al.*. 1,3-Glucanases Fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas. LONDRINA SP. **Semina**: Ciências Exatas e Tecnológicas, v. 31, n. 2, p. 75-86. 2010.

BELL, D.K. *et al.* In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology, v.72, p.379-382, 1982.

BETTIOL, W. Controle biologico de doencas do filoplano. In: BETTIOL, W., org. **Controle biologico de doencas de plantas**. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p.33-52 (EMBRAPA-CNPDA. Documentos, 15)

BETTIOL, W.: MORANDI, M.A.B. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.: MORANDI, M.A.B. (Org). **Biocontrole de Doenças de Plantas: uso e perspectivas.** Jaguariúna – SP: Embrapa Meio Ambiente, p. 7-14, 2009.

BETTIOL, W.; GHINI, R. **Solos Supressivos**. In: MICHEREFF,S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds.) Ecologia e Manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Recife:UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. cap.6, p. 125-143

BISPO, A. S. R. **Bioprospecção de actinomicetos isolados de solos noestado da Bahia e seu potencial na produção de enzimas lingocelulolíticas**. 2010. 104f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas-BA. 2010.

BIZI, R. M., **Utilização de fungos no Controle Biológico de Doenças.** < http://www.floresta.ufpr.br/alias/lpf/public_html/contbio03.html.> Acesso em 16/11/2015.

BOMFIM, M. P., **Antagonismo in *vitro* e in vivo de *Trichoderma* spp. a Rhizopus stolonifer em maracujazeiro amarelo**. Vitória da Conquista BA, 2007. 74f.: Dissertação (Mestrado em Agronomia do Programa d e Pós Graduação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Unidade Acadêmica Vitória da Conquista BA. 2007.

BOMFIM, M. P., SÃO JOSÉ, A. R., REBOUÇAS, T. N. H., ALMEIDA, S. S. D., BORTOLAZZO, N. G.. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 77f. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz. 2011.

BRAGA, R. M. *et al*. **Avaliação da Produção de Celulase por Cepas de *Fusarium***. XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos. 6p. Natal-RN de 02 a05 de agosto de 2009.

BRITO, F. S.; MILLER, P. R. M., STADNIK, M. Presença de *Trichoderma* spp em composto e suas características para o controle de fitopatógenos. Porto Alegre ISSN: 1980-9735. **Rev. Bras. de Agroecologia**, p. 43-53. 2010.

BUENO, C. J. *et al.* Produção de enzimas extracelulares por *Fusarium* solani de maracujazeiro amarelo. **Tropical Plant Pathology**, 343-346.2009.

CANCELA, K. C., **Controle Biológico Florestal Conceitos, Terminologia, Descrição e Caracterização de Agente. Proteção florestal Disponível em** <http://www.floresta.ufpr.br/alias/lpf/public_html/contbio01.html> Acesso em 16/11/2015.

CARVALHO FILHO, M. R., **Relações filogenéticas, identificação e potencial de uso de isolados de *Trichoderma* no controle do mofo branco e como promotores de crescimento do feijoeiro**. Brasília-DF, 2013. 123f. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília. Brasília. 2013.

CARVALHO, A. C., **Bioprospecção de isolados de *Trichoderma stromaticum* para o controle biológico da Vassoura-de-Bruxa do Cacaueiro**. 2006. 82f. Dissertação. Universidade Estadual de Santa Cruz. 2006.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Perspectivas para a agropecuária. **Conab**, Brasília, v.1, 154p. 2013.

DA MATA, J. F. *et al*.. Emprego de extratos orgânicos e aquoso obtidos a partir de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de fitopatógenos. **BIOFAR (Revista de biologia e farmácia)**, v.2,n.2 , p.12-23, 2008.

DA SILVA, D. C. V., TIAGO, P. V., e DE SOUZA-MOTTA, C. M. . Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas1. **Revista Brasil. Bot**, 34(4), 607-610. 2011.

DE BRITO, J. P. C.; LOPES, F. A. C.; ULHOA, C. J. **Avaliação da atividade de α-Manosidase, α-arabinofuranosidase e lipase secretada por isolados de *Trichoderma* spp.em presença de parede celular de *Fusarium solani, Fusarium oxysporum, Rhizoctonia solani e Sclerotinia sclerotiorum*.** Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Brasil. http://www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/conpeex/pivic/trabalhos/JOAO_PAU.PDFisponível em . Visitado em 04 de fevereiro de 2016.

DEMAIN, A. L. **Microbial biotechnology**. Trends in biotechnology, v. 18, n. 1, p. 26-31, 2000.

DIAS, P. P., **Controle biológico de fitopatógenos de solo por meio de isolados de fungos do gênero *Trichoderma* e sua contribuição no crescimento de plantas**. 2011. 101 f. Tese Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica - Rio de Janeiro. 2011.

DOS SANTOS, H.A. ***Trichoderma* spp. como promotores de crescimento em plantas e como antagonistas a *Fusarium oxysporum***. 2008. Tese de Doutorado. Tese de, Universidade de Brasília. 2008.

ELIAS, A.; FERREIRA, A.B.M.; BUENO, C.J. Produção in vitro de enzimas extracelulares por fungos e sua relação com os sintomas descritos em planta hospedeira. **Summa Phytopathologica**,v.41, n.4, p315-317, 2015.

ETHUR, L.Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepino**. 2006. 154p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS. 2006

FACCHIN, S. **Isolamento de microrganismos e seleção de enzimas microbianas com aplicações biotecnológicas no tratamento de esgotos tratamento de esgotos.** 2013. 87f. Tese (Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais). PhD Thesis. Universidade Federal de Minas Gerais. 2013.

FAHEINA JUNIOR, G.S**. Produção de celulases por fermentação submersa**

utilizando microorganismos prospectados em coleções de culturas nacionais. 2012. 75f. Dissertação (Mestrado) –Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2012.

FELDMAN, K.A.; LOVETT, J.S.; TSAO, G.T. Isolation of the cellulose enzymes from the termophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and regulation of enzyme production. **Enzyme and Microbial Technology,** New York, v.10, p. 262-272, 1988.

FERNANDES, A. P. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes.** Dissertação de mestrado em Ciências do Alimento. 2009. 58f . Universidade Federal de Lavras- UFLA, 2009.

FIPKE, G. M; PAZINI, J.B.; ETHU,L. Z. Antagonismo de isolados de *Trichoderma* spp. ao *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes temperaturas. **Magistra**, Cruz das Almas BA, V. 27, N.1, p. 23 – 32, Jan./Mar. 2015.

FIRN, D. & JONES, C. G. **Natural products–a simple model to explain chemical diversity**. Natural product reports, v. 20, n. 4, p. 382-391, 2003.

FLORENCIO, C., COURI, S., FARINAS, C. S. **Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma strains***. Enzyme Research, p.1-7, 2012.

FRAIFE FILHO G. A., BAHIA J. J. S., **Mandioca**. Ceplac-Cepec-BA. http://www.ceplac.gov.br/radar/mandioca.htm . Acessado em 26 de novembro de 2015.

FRANTZ, S. C.; CARREIRO, S. C.; SILVA, J. B. A. **Produção de enzimas hidrolíticas por fungos isolados de folhas em decomposição.** 10° seminário de Iniciação cientifica da UFT. Câmpus de Palmas. 5p. 25 a 28 de novembro de 2014.

FUNGARO, M. H. P, MACCHERONI Jr, W. **Melhoramento genético para produção de enzimas aplicadas a Indústria de Alimentos.** In: MELO, I. S, VALADARES INGLIS, M. C., NASS, L. L., VALOIS, A. C. C., ed. Recursos Genéticos e Melhoramento-Microrganismo . Jaguariúna, São Paulo, Brasil: Embrapa Meio

Ambiente, p. 426-453, 2002.

FURLANETO, M.C. **Recombinação genética e produção de celulases em *Trichoderma Pseudo Koningii Var*** . 1989. 152 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura“Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.

GALLIANO, H.; GAS, G.; DURANT, H. Lignocellulose biodegradation and ligninase excretion by mutant strains of *Phanerochaete chrysosporium* hyperproducing cellulases. **Biotechnology Letters,** Dordrecht, v. 10, p. 655-660, 1988.

GIESE, E. C.; BARBOSA, A. M.; SILVA M.L.C. **Glucanases Fúngica: Produção e aplicações das B -1,3 e -1,6 glucanases**. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento Brasília-DF - ISSN 1414-6347. Edição nº 30 , P.97-104.. jan/jun 2003.

GOMES, J. C.; LEAL, E. C., **Cultivo da Mandioca para a Região dos Tabuleiros Costeiros. *In.:*** Podridão Radicular. Embrapa Mandioca e Fruticultura. Sistemas de Produção, 11. ISSN 1678-8796 Versão eletrônica/Jan/2003.https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/ Mandioca/mandioca_tabcosteiros/doencas.htm . Acesso 13/12/2015.

GUIMARÃES, G. R. **Controle de *Cladosporium herbarum* e promoção de crescimento do feijoeiro pelo emprego de *Trichoderma harzianum***. 2014. 54f. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Goiás –Unidade Universitária de Ipameri, 2014.

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

HOFFMANN, C. A. *et al*.**. Potencial de antagonismo de isolados de *Trichoderma* sp. contra o isolados de *Fusarium* sp., in vitro**. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento **Sustentável**, v. 10, n. 1, p. 236-242, 2015.

HOHENFELD, C. S.. **Podridão radicular da mandioca: metodologias de inoculação e seleção de fontes de resistência.** 2016.. 86f. Dissertação (Recursos Genéticos Vegetais) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas, BA.2016.

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

JAYAPRAKASHVEL, M. *et al*. Hydrogen cyanide mediated biocontrol potential of Pseudomonas sp. AMET1055 isolated from the rhizosphere of coastal sand dune vegetation. **Adv. Biotech**.9(10): 39-42. 2010.

JAMAL, C. M. *et al.*. **O uso de extratos vegetais no controle alternativo da podridão pós- colheita da banana.** In: SIMPÓSIO NACIONAL DO CERRADO, IX , 2008,ParlaMundi. Anais. Brasília, DF: EMBRAPA Cerrados,p. 1-9. 2008.

KUPPER, K.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum* , agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, v. 28, n. 3, p. 251-257, 2003.

KWON-CHUNG, K.J. & BENNETT, J.E. - **Medical mycology.** Philadelphia, Lea & Febiger, 866p. ill. 1992.

LARANJEIRA, D.; SANTOS, E. O. DOS; MARIANO, R. DE L. R.; BARROS, S. T. Ocorrência da podridão negra da maniva e raiz da mandioca (*Manihot esculenta*) causada por *Scytalidium lignicola* no estado de Pernambuco, Brasil. **Fitopatologia brasileira,** Brasília, v. 19, n. 3, p. 466-469, 1994.

LAZAROTTO, M. *et al*. **Seleção *in vitro* de Isolados de *Trichoderma* spp. com Potencial de Antagonismo a Isolados Patogênicos de *Fusarium* spp**. In: XVI Simpósio De Ensino, Pesquisa E Extensão, Unifra, v. 3, 2012.

LOBO JUNIOR, M.; ABREU, M.S. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes

temperaturas e pH's. **Ciência Agrotécnica,** Lavras, v.24, p.521-526, 2000.

LOPES , F.A.C. *et al*. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma strains* isolated from common bean crops in the Brazilian cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Biology**, v.116, p.815 -824, 2012.

LUZ, J. S.; SILVEIRA, E. B., & CAVALCANTE, U. M. T.. Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. **Revista Caatinga**, v. 19, n. 2, 2006.

MACHADO, A. R. *et al.* New occurrences of Botryosphaeriaceae causing black root rot of cassava in Brazil**. Tropical Plant Pathology**, v.39, p.464-470, 2014.

MACIEL, C. G.; WALKER C.; MUNIZ, M. F. B. e ARAÚJO, M. M. Antagonismo de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* (UFV3918) A *Fusarium sambucinum* em *Pinus elliottii* ENGELM**. Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.38, n.3, p.505-512, 2014.

MARCELLO, C. M. **Avaliação da expressão e caracterização de uma exo**-b-**1,3-glucanase envolvida no mecanismo de micoparasitismo de *Trichoderma a*sp*erellum.*** Brasília-DF, 2008. 89f. Tese de Doutorado. Laboratório de Enzimologia Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília – UnB. Brasília – DF. 2008.

MARQUES, H. I. P. *et al.* Inibição do crescimento micelial de *Trichoderma harzianum* por fertilizantes líquidos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 2040, 2014.

MATOS, F. B. D. **Isolamento e caracterização de fungos isolados de ambiente marinho**. 2012). 63f. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Instituto de Ciências Básicas da Saúde) 2012.

MATOS, K. DA S. *et al.* Estudo in vitro da potencialidade de *Trichoderma* spp., no biocontrole de *Fusarium guttiforme.* **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA** Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.19; p. 2014-2234. 2014.

MICHEREFF, S.J.; MENEZES, M.; MARIANO, R.L.R. Potencial de *Trichoderma*

para o controle da antracnose do sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 392-398, 1993.

MUNIZ, M. F. S. *et al.* Caracterização de isolados de *Phytophthora drechsleri*, agente causal da podridão mole de raízes de mandioca.**Fitopatologia Brasileira,** Brasília, v. 31, p. 195-198, 2006.

NUNES, G. F. O. *et al.*. **Atividade enzimática de isolados de rizóbio obtidos de nódulos de leguminosas forrageiras**. 4p. 34º Congresso Brasileiro de Ciencias do solo.. Florianopolis-SC julho/agosto de 2013.

OLIVEIRA, A. N *et al*. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. 26: 853-860. 2006.

OLIVEIRA, L. G.; SILVA; A. R. S; SILVA, A. C. S.; SILVA; R. L.; LIMA, D. W. S.;LIMA, G.; COSTA, A. F., **Atividade proteolítica de fungos de solo fitopatogênicos ao Feijão-Caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]** In: III CONAC Congresso Nacional de Feijão-Caupi. Pernambuco. 4p. Resumo expandido. Recife Pernambuco. 22-24 de abril de 2013.

OLIVEIRA, N. T. de; ALVES, J. M. A.; UCHÔA, S. C. P.; RODRIGUES, G. S.; MELVILLE, C. C.; ALBUQUERQUE, J. D. A. A. de. **Caracterização e identificação de clones de mandioca produzidas em Roraima para o consumo in natura**. Revista Agro@mbiente On-line, v. 5, n. 3, p. 188-193, 2012.

ORLANDELLI, R. C; SPECIAN, V; FELBER, A.C; PAMPHILE, J.A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações.Revista saúde e biologia, v.7,n.3, p.97 -109, 2012

PÁDUA, R. R.;ALVARENGA, D. O.; QUEIROZ, P. R.; MELLO, S. C. M. **Avaliação e caracterização de potenciais antagonistas de *Sclerotium rolfsii* pertencentes ao gênero *Trichoderma* .** Boletim de pesquisa e desenvolvimento/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia . Brasília, DF, ISSN 1676 - 1340; Boletim 165, 23 p. Dez.

2007.

PEREIRA, C O.F. **Estudo da patogenicidade e controle biológico de *Fusarium* sp. Com *Trichoderma* sp**. 2013.74f. Dissertação. Universidade de Caxias do Sul. 2013.

PEREIRA, F. F. O. **Produção, purificação e caracterização da atividade proteolítica produzida por *Trichoderma harzianum*.** 2011 72f. Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Brasília, 2011.

PEREIRA, V. M. *Avaliação* **do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulases por *Aspergillus sulphureus* (Fresen) Wehmer**, 2012. 111 f. : Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

POLTRONIERI, L. S; TRINDADE, D. R; ALBUQUERQUE, F. C; DUARTE, M. L. R.; CARDOSO, S. S. **Incidência de *Fusarium solani* em mandioca no estado do Pará**. Fitopatologia Brasileira**,** Brasília, v. 27, n. 5,p. 544, 2002.

RAMOS, E.H.S. **Avaliação da produção de celulases por fungos filamentosos utilizando bagaço de cana como substrato.** 2012. 59f. Dissertação (Mestrado)– Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas, Bioquímica e Fisiologia, 2012

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M.. **Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 30, n. 1, p. 126-131, 2010.

RUEGGER, M.J.S.; TAUK-TORNISIELO, S.M. **Atividade da celulase de fungos isolados dosolo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins.** São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, p. 205-211, 2004.

SACCO, L. P. **Isolamento de bactérias produtoras de enzimas de interesse em**

processos biotecnológicos. , 2013.47f.Dissertação (mestrado) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal-SP 2013.

SANTIN, R. C..M., **Potencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* em *Phaseolus vulgaris***. 2008. 91p. Tese (Doutorado Fitotecnia, Área de Concentração Fitossanidade). Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2008.

SANTOS, C. C., OLIVEIRA, F. A. de; SANTOS, M. S. dos; TALAMINI, V.; FERREIRA, J. M. S.; SANTOS, F. J. dos., **Influência de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa***. Scientia Plena 8, 047309 www.scientiaplena.org.br . 2012.

SANTOS, P. L. D., PRANDO, M. B., MORANDO, R., PEREIRA, G. V. N., e KRONKA, A. Z. **Utilização de extratos vegetais em proteção de plantas**. *Enciclopédia Biosfera*, 2562-2576. 2013.

SAZCI, A.; RADFORD, A.; ERENLER, K. **Detection of cellulolytic fungi by using Congo red as an indicator: a comparative study with the dinitrosalicyclic acid reagent method**. Journal Applied Bacteriol. v. 61, p. 559–562, 1986.

SERRA, I. M. R. S., SILVA, G. S. da; NASCIMENTO, F. S.; LIMA, L. K. F. ***Scytalidium lignicola* em mandioca: ocorrência no Estado do Maranhão e reação de cultivares ao patógeno**. Summa Phytopathologica, Botucatu, v. 35, n. 4, p. 327-328, 2009.

SILVA, A. N.; AZEVEDO, G. B.; ROCHA-SOBRINHO, G. G.; NOVAES, Q. S.; **Efeito de produtos químicos e de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium solani* do maracujazeiro**. Interciencia, v. 6, p. 398-403, 2014.

SILVA, C. A. D., DE MEDEIROS, E. V., BEZERRA, C. B., DE MORAIS; SILVA, W., DE BARROS, J. A., & DOS SANTOS, U. J. **Interferência da incorporação de matéria orgânica no solo no controle da podridão negra da mandioca, causada por Scytalidium *lignicola*. Biosci. J.,** Uberlândia, v. 29, n. 6 , p. 1823-1831, Nov./Dec. 2013.

SILVA, C. A. D., **Prospecção em fitopatógenicos e avaliação de fontes de matéria orgânica sobre a supressividade da podridão radicular da mandioca**. Garanhuns-

PE, 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado em Produção Agrícola). Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, 2013.

SILVA, M.B.; NICOLI, A. COSTA, A.S.V.; BRASILEIRO, B.G.; JAMAL, C.M., SILVA, C. A.; PAULA JÚNIOR, T. J.; TEIXEIRA, H. **Ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero *Colletotrichum***. Revista Brasileira de Plantas Medicinais , Botucatu, v.10, n.3, p.57-60, 2008.

SILVA, R. A.; SOUZA, T. O.; DIAS, L. P.; ANDRADE, T . J. A. S. **Ação do extrato metanólico da Moringa oleifera sobre o crescimento micelial de fitopatógenos**, IV, 2009, Belém. Anais... Belém, PA:. p. 1- 4. 2009.

SILVA, V. M.; MARTINS, C. M. & SILVEIRA, S. C. **Atividade celulolítica de actinobactérias de região semiárida do Ceará**. Enciclopédia Biosfera, v. 11, p. 2026-2036, 2015.

SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PATEL, A.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. **Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases**. Enzyme and Microbial Technology, v.46, p.541-549, 2010.

SOUZA PEDRO, E.A.; HARAKAVA, R.; LUCON, C. M. M., & GUZZO, S. D**. Promoção do crescimento do feijoeiro e controle da antracnose por *Trichoderma* spp**. Pesq. agropec. bras., Brasília, v. 47, n. 11, p. 1589-1595, 2012.

SOUZA, H.Q.de.; OLIVEIRA, L.A. de.; ANDRADE,J.S. **Seleção de Basidiomycetes da Amazonia para produção de enzimas de interesse biotecnológico**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 2011.

SOUZA, J. R., **Potencialidade de fungicida e agente biológico no controle de requeima do tomateiro**. 2013. 63f. Dissertação. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista. Bahia – BR. 2013.

SOUZA, K. de A.;VAZ, M. C. A.; ALVES, G. C. S.; PAZ -LIMA, M. L.. **Confronto in vitro de isolados de *Trichoderma* spp. com fungos filamentosos**. 2p. IV Congresso Estadual de Iniciação Científica do IF Goiano 21 a 24 de setembro de 2015.

STAMFORD, T. L.M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. **Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban)**. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 382-385, 1998.

TUITE, J. **Plant phathological methods**. Mineapolis: Burgess,1969. 239p.

VAZ, M. S. S.C**aracterização do gene lip2 de *Trichoderma harzianum*** .2010. 81 f. Dissertação (Mestrado)-Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, 2010.

VENTUROSO, L.R.; BACCHI, L.M.A.; GAVASSONI, W.L. **Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos**. Summa Phytopathologica, v.37, n.1, p.18-23, 2011.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E.B. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. Documento : Embrapa Clima Temperado, Pelotas, n.316, p.7-15. 2010.

WENZEL, J. B., DE ALMEIDA MORESCO, A. A., BOAS, E. V., BURIN, F. A. G., & DE SOUZA, R. O. **Atividade enzimática e antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de soja**. *Biológicas & Saúde*, v. 3, n. 9, 2013.

ZAMPIERI, D.; RIBEIRO, R. T. D. S. **Avaliação qualitativa da secreção de enzimas hidrolíticas por fungos endofíticos isolados do cacaueiro (theobroma cacao L.) E o controle biológico de crinipellis perniciosa**. Salão de iniciação Científica (17.: 2005: Porto Alegre, RS). Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2005.

ZUCCHI, F. **O *Trichoderma* sp. em áreas agrícolas visando o controle de doenças fúngicas de raízes de plantas cultivadas**. Campinas SP. JV Biotecnologia. 15p. 2010.