

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



BIOPROSPECÇÃO DE ISOLADOS DE *Trichoderma stromaticum* PARA CONTROLE BIOLÓGICO DA VASSOURA-DE-BRUXA DO CACAUEIRO.

AÍTALA CARVALHO DE CARVALHO

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Junho de 2006

AÍTALA CARVALHO DE CARVALHO

BIOPROSPECÇÃO DE ISOLADOS DE *Trichoderma stromaticum* PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DA VASSOURA-DE-BRUXA DO CACAUEIRO.

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

APROVADA: ____ de junho de 2006

Prof. Dr. Marcio Gilberto Cardoso Costa
(UESC)

Dr. Alan Willian Vilela Pomella
(Sementes Farroupilha)

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

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Junho de 2006

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Eliomar Batista de Carvalho e Almery Carvalho de Carvalho, pelos ensinamentos e apoio.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me fornecido coragem, luta e persistência nessa caminhada, tornando possível a realização de um sonho.

Ao Professor Dr. Leandro Lopes Loguercio, meu amigo e orientador pelos ensinamentos e confiança que foram fundamentais no cumprimento desta jornada.

Ao Dr. Alan Pomella pelo grande apoio e ajuda nos trabalhos realizados na Almirante Cacau.

Ao Dr. Rogério Eiji Hanada pela amizade, carinho, colaboração, companheirismo e mensagens de otimismo.

Ao Dr. Márcio Gilberto Cardoso Costa e ao M.S. Carlos Priminho Pirovani pela cooperação e sugestões durante o desenvolvimento da pesquisa.

Ao pesquisador Dr. Jorge Teodoro de Souza pelo apoio científico.

Aos técnicos do laboratório da Almirante Cacau (Iara, Agnaldo, Livia, Alício, Rui e Cosme) pelo apoio e amizade.

À colega e amiga Livia Silva Santos pelo carinho, companheirismo e incentivo para continuarmos e vencermos juntas mais uma fase de nossas vidas.

Ao Curso de Pós-graduação e a Universidade Estadual de Santa Cruz pela oportunidade.

Ao Centro de Estudos do Cacau – Almirante Cacau pela oportunidade e espaço, onde comecei e desenvolvi meus trabalhos de pesquisa.

Ao Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC/CEPLAC), pelo suporte técnico de material e equipamentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelas concessões de bolsas que permitiram o trabalho ser realizado.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
EXTRATO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Cacaucultura e vassoura-de-bruxa – características do patógeno, sintomatologia e impactos	4
2.2. Técnicas de manejo da doença	7
2.3. Controle Biológico.....	9
2.3.1. Mecanismos de interação antagônica	11
2.3.2. Micoparasitismo	12
2.3.3. Enzimas hidrolíticas	13
2.4. O gênero <i>Trichoderma</i> e a espécie <i>T. stromaticum</i>	16
3. METODOLOGIA	20
3.1. INTERAÇÃO DE <i>Trichoderma stromaticum</i> COM <i>Moniliophthora perniciosa</i> EM VASSOURAS SECAS.....	20
3.1.1. Coleta a campo e preservação no laboratório dos isolados de <i>T. stromaticum</i>	20
3.1.2. Avaliação a campo dos isolados de <i>T. stromaticum</i> quanto ao biocontrole de <i>Moniliophthora perniciosa</i>	21
3.1.3. Esporulação de <i>T. stromaticum</i> a campo	22
3.1.4. Presença residual de <i>M. perniciosa</i> nas vassouras tratadas	22
3.1.5. Análise de regressão entre esporulação de <i>T. stromaticum</i> a campo e presença residual de <i>M. perniciosa</i> nas vassouras tratadas.....	23
3.2. PARÂMETROS DE LABORATÓRIO COM POTENCIAL CORRELAÇÃO COM DADOS DE CAMPO	24
3.2.1. Análise de correlação do crescimento e esporulação <i>in vitro</i> , a 25 e 30 °C, dos isolados de <i>T. stromaticum</i> testados a campo.....	24
3.2.2. Avaliação do padrão de colonização de <i>T. stromaticum</i> em relação ao ponto de aplicação da suspensão de esporos	25

3.2.3. Caracterização da velocidade de colonização (agressividade) de isolados de <i>T.stromaticum</i> em vassouras secas.....	25
3.3. ANÁLISES DAS PROTEÍNAS TOTAIS SECRETADAS NOS SOBRENADANTES DE CULTURAS LÍQUIDAS DE <i>T. stromaticum</i>	27
3.3.1 Crescimento dos isolados de <i>T. stromaticum</i> em meio de cultura TLE e coleta dos sobrenadantes	27
3.3.2. Extração de proteínas totais secretadas nos sobrenadantes dos isolados de <i>T. stromaticum</i>	28
3.3.3. Quantificação das proteínas totais pelo método de Bradford.....	30
3.3.4. Inibição <i>in vitro</i> da germinação de basidiosporos de <i>M. pernicioso</i> pela fração proteínas totais dos isolados de <i>T. stromaticum</i>	31
3.3.5. Atividade enzimática de quitinase e glucanase na fração proteínas totais de isolados de <i>T. stromaticum</i>	32
3.3.6. Análises estatísticas.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE INTERAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Trichoderma stromaticum</i> COM <i>Moniliophthora pernicioso</i> EM VASSOURAS SECAS EM CONDIÇÕES DE CAMPO.....	35
4.2. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE ISOLADOS DE <i>T. stromaticum</i> A 25 E 30 °C COM PARÂMETROS DE CAMPO	42
4.3. AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE COLONIZAÇÃO DE VASSOURAS SECAS POR ISOLADOS DE <i>T. stromaticum</i> EM RELAÇÃO AO PONTO DE APLICAÇÃO INICIAL DOS ESPOROS	44
4.4. CARACTERIZAÇÃO DA VELOCIDADE DE COLONIZAÇÃO (AGRESSIVIDADE) DE VASSOURAS POR DIFERENTES ISOLADOS DE <i>T. stromaticum</i>	45
4.5. SECREÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS POR ISOLADOS DE <i>T.stromaticum</i> EM MEIOS DE CULTURA COM DUAS FONTES DE CARBONO DIFERENTES.....	48
4.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DAS PROTEÍNAS TOTAIS SECRETADAS NOS SOBRENADANTES DOS ISOLADOS DE <i>T. stromaticum</i> NA GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE BASIDIÓSPOROS DE <i>M. pernicioso</i>	50
4.7. ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE QUITINASE E GLUCANASE NA FRAÇÃO PROTEÍNA TOTAL DE ISOLADOS DE <i>T. stromaticum</i>	52
4.8. ANÁLISE DE REGRESSÃO-CORRELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS <i>IN VITRO</i> E DADOS DE BIOCONTROLE A CAMPO.....	58
5. CONCLUSÕES.....	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (a) Câmara úmida das vassouras; (b) aspecto da vassoura esporulada com *T. stromaticum*; (c) crescimento em placa dos isolados de *T. stromaticum* em meio BDA.

Figura 2. (a) Vassouras colonizadas por *M. pernicioso*; micélio branco indicado por setas. (b) Esporulação de *T. stromaticum* em vassouras pré-colonizadas por *M. pernicioso* (setas).

Figura 3. Aspecto geral da câmara úmida utilizada com vassouras fragmentadas e numeradas a partir da origem da aplicação da suspensão de esporos.

Figura 4. Crescimento de *T. stromaticum* em cultura líquida. (a) Aspecto geral da cultura em meio TLE; (b) aspecto dos micélios retirados do sobrenadante por filtração.

Figura 5. Microfotografia de basidiósporos de *M. pernicioso* evidenciando germinação (seta).

Figura 6. Parâmetros avaliados nos experimentos a campo. (a) Vassouras esporuladas por *T. stromaticum*; setas indicam esporos visíveis. (b) Presença residual de *M. pernicioso*, após câmara úmida (setas). (c) Precipitação pluviométrica nos meses dos experimentos.

Figura 7. Análise de regressão linear entre os parâmetros de campo para as classes de biocontrole estabelecidas (vide Tabelas 1 e 2); (a) e (b) correspondem ao primeiro experimento de campo e (c) e (d) ao segundo.

Figura 8. Freqüência de esporulação de *T. stromaticum* em vassouras com aplicação da suspensão de esporos por dois métodos distintos; resultados após 6 dias (a) e 12 dias de incubação (b).

Figura 9. Análise de agressividade em vassouras-secas de 14 isolados de *T. stromaticum* contrastantes no efeito de biocontrole a campo. (a) Número médio de pedaços de vassoura colonizados por isolado; (b) ordem decrescente de eficiência de biocontrole para os isolados, de acordo com os resultados do experimento de campo nº 1.

Figura 10. Efeito inibitório na germinação de basidiosporos de *M. pernicioso* das proteínas totais secretadas no sobrenadante de isolados de *T. stromaticum*, crescidos em meio de cultura com duas fontes de carbono e pertencentes a classes contrastantes de biocontrole a campo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados do experimento de campo nº 1, avaliando o comportamento de biocontrole de 64 isolados de *T.stromaticum*, aplicado às vassouras em 9 de maio de 2003, e avaliadas durante três meses.

Tabela 2. Resultados do experimento de campo nº 2, avaliando o comportamento de biocontrole de 64 isolados de *T.stromaticum*, aplicado às vassouras em 31 de julho de 2003, e avaliadas durante dois meses e meio.

Tabela 3. Análise de correlação entre a presença residual de *M. pernicioso* em vassouras tratadas com os diferentes isolados de *T. stromaticum* (experimento nº 1 de biocontrole a campo) e os respectivos crescimentos e esporulações *in vitro* a 25 °C e 30 °C.

Tabela 4. Comparação dos resultados das análises estatísticas para os três ensaios de agressividade em vassouras-secas com 16 isolados de *T. stromaticum*, contrastantes no biocontrole a campo (experimento nº 1).

Tabela 5. Rendimento de proteína total secretada no sobrenadante de 13 isolados de *T. stromaticum* de distintos grupos genéticos e fenótipos de biocontrole, crescidos em cultura líquida com glicose ou pó micelial seco de *M. pernicioso* como fontes de carbono, depois de seis dias de cultura.

Tabela 6. Atividades relativas de glucanase e quitinase na fração proteína total secretada no sobrenadante de 8 isolados de *Ts*, representativos de 2 grupos genéticos e diferentes classes fenotípicas de biocontrole, normalizada com base na quantidade de proteína aplicada na reação.

Tabela 7. Atividades relativas de glucanase e quitinase na fração proteína total secretada no sobrenadante de 8 isolados de *Ts*, representativos de 2 grupos genéticos e diferentes classes fenotípicas de biocontrole, normalizada com base na quantidade de peso seco de micélio obtido após seis dias de cultura dos isolados.

Tabela 8. Correlação entre percentuais de germinação de basidiosporos de *M. pernicioso*, tratados com proteína total secretada no sobrenadante de 10 isolados de *T. stromaticum* representantes de diferentes classes de biocontrole, e os respectivos parâmetros avaliados a campo (experimento nº 1).

Tabela 9. Análise de correlação entre parâmetros de biocontrole (a campo e *in vitro*) e atividades de quitinase e glucanase da fração 'proteínas totais' secretadas no sobrenadante de culturas de isolados de *Ts* pertencentes a diferentes classes fenotípicas.

EXTRATO

CARVALHO, Aítala Carvalho de, M.Sc. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, junho de 2006. **Bioprospecção de isolados de *Trichoderma stromaticum* para o Controle Biológico da vassoura-de-bruxa do cacauero.** Orientador: Leandro Lopes Loguercio. Co-orientador: Jorge Teodoro de Souza.

A vassoura-de-bruxa do cacauero, doença causada pelo fungo fitopatogênico *Moniliophthora perniciosa* (ex *Crinipellis* - **Cp**), possui relevante interesse de pesquisa científica, devido aos altos prejuízos causados para a cultura. Dentre as várias estratégias utilizadas para controlá-la, destaca-se o Controle Biológico (CB) que, ao utilizar a aplicação de organismos antagonistas ao patógeno para reduzir a atividade causadora da doença, apresenta relação custo/benefício favorável, tanto econômica quanto ambientalmente. O fungo *Trichoderma stromaticum* (*Ts*) apresenta grande potencial para o CB da vassoura-de-bruxa do cacauero, atuando predominantemente como micoparasita de *Cp*. O isolado de *Ts* introduzido na região cacauera sul baiana como agente de CB foi identificado no Estado do Pará; contudo, em algumas condições ambientais específicas, não tem se comportado de modo satisfatório para controlar a vassoura-de-bruxa. Considerando que há abundância de isolados de *Ts* nativos na região cacauera sul baiana que apresentam diversidade biológica e que pertencem a dois grupos genéticos distintos (I e II), a hipótese deste trabalho baseou-se na possibilidade de que existam isolados mais eficazes no CB deste patógeno. Sessenta e quatro isolados de *Ts*, a grande maioria, coletados em diferentes pontos da região cacauera baiana e pertencentes aos grupos genéticos I e II, foram estudados a campo e em laboratório em diversos aspectos relacionados aos seus fenótipos de biocontrole. Os isolados de *Ts* foram aplicados em vassouras secas e levados a campo, onde realizou-se dois experimentos com duração de três meses cada um, em condições climáticas diferentes; avaliou-se o percentual de esporulação de *Ts* sob vassouras ao fim do período no campo, e a presença residual de *Cp* no laboratório. Houve diferença

entre isolados e entre experimentos quanto aos efeitos de antagonismo, mas que não estiveram associadas a nenhum dos dois grupos genéticos de forma específica. A partir da incidência residual de *Cp*, classificou-se os isolados em diferentes níveis de biocontrole. Esta análise de grupos mostrou haver correlação entre maiores percentuais de esporulação de *Ts* a campo e menores níveis de presença residual de *Cp*, independentemente das condições climáticas. Isto sugere que, em procedimentos de escrutínio a campo por isolados mais eficientes, a esporulação de *Ts* pode ser usada como indicador antecipado de um maior efeito de CB.

Buscando-se encontrar um método de escrutínio em laboratório que permitisse antecipar os resultados de campo, acelerando a definição de isolados mais promissores, analisou-se o crescimento e esporulação de isolados de *Ts* a 25 °C e 30 °C, bem como suas velocidades de colonização de vassouras secas (agressividade). Os resultados mostraram não haver correlação entre eles e os resultados de campo, bem como em relação aos grupos genéticos I e II. Outros parâmetros *in vitro* foram testados, considerando que o micoparasitismo está normalmente associado à produção e liberação de enzimas hidrolíticas (quitinases, glucanases, proteases, etc.) por parte do agente de biocontrole, que atuam sobre a parede celular dos fungos patogênicos. Assim, verificou-se (i) o nível de secreção de proteínas totais nos sobrenadantes de *Ts* em meios de cultura com duas fontes distintas de carbono, (ii) a inibição de germinação de basidiosporos de *M. perniciosus* expostos a essas proteínas totais, e (iii) a atividade enzimática de quitinase e glucanase presentes nessa fração. Os resultados mostraram que o rendimento de proteínas totais entre isolados não está associado a grupo genético ou classe de biocontrole, mas que sua ação na inibição da germinação de basidiosporos foi capaz de discriminar classes de isolados de *Ts* mais e menos eficientes em CB de *Cp* a campo. Além disso, somente a atividade de quitinase correlacionou-se com o comportamento de biocontrole a campo e com a inibição de germinação de basidiosporos. Desse modo, estabeleceu-se dois parâmetros *in vitro* com potencial de antecipar os resultados a campo e, assim, permitir o escrutínio, numa primeira aproximação, por isolados de *Ts* mais eficientes no CB da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro.

ABSTRACT

CARVALHO, Aítala Carvalho de, M.Sc. Universidade Estadual de Santa cruz, Ilhéus, june, 2006. **Bioprospection of *Trichoderma stromaticum* isolates for the Biological Control of the witches' broom disease of the cocoa tree.** Advisor: Leandro Lopes Loguercio. Co-advisor: Jorge Teodoro de Souza.

The witches' broom disease of cocoa trees, incited by the phytopathogenic fungus *Moniliophthora perniciosa* (former *Crinipellis* - *Cp*), has shown a relevant research interest, because of the high losses it causes to the crop. Among the strategies used for its control, the Biological Control (BC) deserves special attention, as it presents a favorable costs/benefits relationship in terms of economy and environment, due to the application of antagonistic organisms to reduce the disease-causing activity. The fungus *Trichoderma stromaticum* (*Ts*) presents a great potential for the BC of the cocoa witches' broom, acting primarily as a mycoparasite of *Cp*. The *Ts* isolate introduced on the cocoa producing region of southeastern Bahia state as a biocontrol agent was identified in the state of Pará; however, this isolate has not been behaving satisfactorily in the control of witches' broom under certain specific environmental conditions. Considering there is abundance of native *Ts* isolates in this region which present biological diversity and belong to two distinct genetic groups (I and II), our working hypothesis was based on the possibility that other native isolates can be more effective in BC of *Cp*. Sixty-four *Ts* isolates, collected from different spots of the cocoa producing region of Bahia and belonging to the genetic groups I and II, were studied under lab and field conditions regarding several aspects related to their biocontrol phenotypes. The *Ts* isolates were applied on dry brooms and taken to the field, where two three-month experiments were conducted under distinct climatic conditions; the *Ts* sporulation percentage at the end of the field trials, as well as the residual presence of *Cp* in the lab were assessed. Differences were found

among isolates and between experiments in terms of the antagonistic effects, but they were not specifically associated to any of the genetic groups. The isolates were classified according to different biocontrol levels, based upon the values of residual *Cp* incidence. Such a group analysis revealed a correlation between higher *Ts*-sporulation rates at the field and lower levels of residual presence of *Cp*, independently from the climatic conditions. This suggests that, in screening procedures for more efficient isolates, *Ts* sporulation can be used as a preliminary indicator of BC effects.

With the objective of finding a screening method performed under lab conditions that would allow anticipation of field results, thereby accelerating the definition of promising isolates, we evaluated growth and sporulation of *Ts* isolates at 25 and 30 °C, as well as their colonization speed inside dry brooms (aggressiveness). The results demonstrated that there is no correlation between these variables and field results, as well as in relation to the genetic groups I and II. Other *in vitro* parameters were tested, considering that mycoparasitism is normally associated with the production and release of hydrolytic enzymes (i.e. chitinases, glucanases, proteases, etc.) by the biocontrol agent, which degrade the cell wall of pathogenic fungi. Hence, we assessed (i) the levels of total protein secreted in *Ts* supernatants, after growth in culture media with two distinct carbon sources, (ii) the inhibition of germination for *Cp* basidiospores exposed to those proteins, and (iii) the chitinase and glucanase specific activities present in this fraction. The results showed that differences in the total-protein yields for the isolates are not associated with any genetic group or biocontrol class, although their action in the inhibition of *Cp*-basidiospores germination was capable of sorting between *Ts* classes more and less efficient in the BC of *Cp* at the field. In addition, only the chitinase activity correlated with field biocontrol behaviors and with inhibition of basidiospores germination. Therefore, two *in vitro* parameters were established, which had the potential to anticipate the BC field results, and so, to allow the first-tier screening for *Ts* isolates that are more efficient in the BC of the witches's broom disease in cocoa plantations.

1. INTRODUÇÃO

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) é uma planta de porte arbóreo, típica de regiões tropicais, e o seu fruto - o cacau - constitui a parte econômica do cultivo. A cacauicultura é prejudicada por diversas doenças, sendo a 'vassoura-de-bruxa', causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* (ex *Crinipellis*), a mais séria das enfermidades. Atualmente esta doença encontra-se disseminada nas Américas do Sul e Central, e Ilhas do Caribe. Na Amazônia Brasileira, com especial referência ao Estado de Rondônia, já foram registradas em algumas fazendas perdas de até 90% da produção (ANDERBRHAN, 1984). A região sul da Bahia, responsável por 75% da produção nacional de cacau, foi a mais afetada, pois o fungo encontrou nesta área condições ambientais favoráveis para sua rápida disseminação. Esta moléstia foi registrada pela primeira vez em 1989 na cidade de Uruçuca, expandindo-se para outros municípios (PEREIRA et al., 1989). Desde então, vem provocando nas plantações de cacau um grande impacto econômico e crise social, tendo em vista o fato de ter sido, por muito tempo, a principal fonte de renda desta região.

Até o presente momento, ainda não existe um meio de controle completamente efetivo da vassoura-de-bruxa, visto que as tecnologias disponíveis aos agricultores controlam a doença apenas parcialmente (ANDERBRHAN, 1984). Através da poda fitossanitária, todos os tecidos infectados da planta são removidos, tornando-se assim uma prática trabalhosa e cara. A aplicação do controle químico é um complemento à poda fitossanitária, visando proteger os frutos contra infecções; no entanto, o uso de agrotóxicos pode causar contaminações e efeitos danosos ao homem e a outros organismos não-alvo presentes no meio ambiente, promovendo desequilíbrios ecológicos. O controle genético por meio de cultivares resistentes é uma medida duradoura, porém não

definitiva, devido à potencial variabilidade genética existente na espécie *M. pernicioso* que, pode quebrar essa resistência (ANDERBRHAN et al., 1995).

Uma outra alternativa que vem despertando interesse de estudo e aplicação no manejo integrado desta doença é a utilização do Controle Biológico (CB). A finalidade do CB é permitir a redução da densidade populacional do patógeno em níveis econômicos e ecológicos aceitáveis, por meio da introdução de microorganismos antagonistas (BETTIOL; GHINI, 1995). O interesse pelo CB tem crescido consideravelmente no mundo em função do novo direcionamento internacional dado à produção agrícola, no sentido de se utilizar meios alternativos menos agressivos ao ambiente, visando favorecer a conservação e o uso sustentável da biodiversidade (BETTIOL; GHINI, 1995). O sucesso desta metodologia depende de vários fatores e as estratégias empregadas devem ser baseadas principalmente na interação entre os fatores que afetam o fitopatógeno e o agente biocontrolador.

O CB fundamenta-se na interação existente entre antagonista - patógeno, podendo um mesmo agente de biocontrole atuar através de mais de um mecanismo de interação antagônica, sendo, assim, uma característica desejável para o sucesso da técnica. São três os principais mecanismos de interação antagônicas: (i) antibiose, que é a ação à distância de metabólitos liberados pelo antagonista que inibem o crescimento e desenvolvimento do patógeno; (ii) competição, que corresponde à disputa entre patógeno e antagonista pelos mesmos recursos, incluindo: nutrientes, espaço, água e oxigênio; (iii) micoparasitismo, que é resultado do contato físico direto entre antagonista e seu hospedeiro, resultando na nutrição do antagonista pelo consumo do conteúdo celular do hospedeiro. Dentre as etapas deste processo de micoparasitismo, vale destacar a produção e liberação de enzimas hidrolíticas degradadoras da parede celular do patógeno como sendo um fator determinante na eficiência desse processo (LORITO, 1998)

Dentre os agentes de biocontrole (ABCs) mais utilizados, espécies de fungo pertencentes ao gênero *Trichoderma* atuam como antagonistas de diversos fitopatógenos em várias culturas. Este fungo é um micoparásita heterotrófico e necrotrófico natural do solo e adaptado a suportar diferentes condições ambientais. A espécie recentemente descrita como antagonista específico, com

potencialidade para reduzir a produção de inóculos de *M. pernicioso* (**Cp**), é o fungo saprófita *Trichoderma stromaticum* (SAMUELS et al., 2000). Nesta interação antagônica, comprovou-se que o mecanismo mais relevante para o CB da vassoura-de-bruxa é, de fato, o micoparasitismo. Além disso, a espécie *T. stromaticum* (*Ts*) apresenta capacidade de recombinação sexual (BEZERRA et al., 2003) o que pode favorecer o surgimento de isolados diferentes geneticamente, que apresentem graus de atividade antagônica distintos entre si. Estudos recentes (SOUZA et al., 2006) revelaram existir na região cacaueteira sul baiana dois grupos genéticos distintos de *Ts*, denominados de grupo I e II.

Neste trabalho, objetivou-se estudar o comportamento a campo e em laboratório de diferentes isolados de *Ts*, pertencentes aos grupos genéticos I e II, coletados em diferentes pontos de cacauais do sul da Bahia, buscando-se não somente definir estratégias eficazes para seleção de isolados com maior potencial de aplicação no biocontrole de *Cp*, mas também verificar como os parâmetros estudados correlacionam-se entre si e com os grupos genéticos descritos. A avaliação comparativa dos isolados em condições típicas de lavoura cacaueteira a campo mostrou-se necessária para estabelecer parâmetros confiáveis que servissem para identificar diferenças fenotípicas de biocontrole entre eles, com potencial uso em estratégias de escrutínio por isolados mais eficientes. Além disso, os resultados indicaram que atividades hidrolíticas e de inibição da germinação de basidiosporos de *Cp*, presentes na fração proteínas totais secretadas nos respectivos sobrenadantes de culturas líquidas, permitem o estabelecimento de parâmetros *in vitro* que antecipam razoavelmente os resultados de biocontrole a campo, servindo, portanto, como metodologia de escrutínio mais rápida, em primeira aproximação, por isolados de *Ts* mais promissores no CB da vassoura-de-bruxa. Tomadas em conjunto, as análises das classes e isolados de *Ts* também revelaram que maiores e menores eficiências de biocontrole de *Cp* podem ocorrer indistintamente em ambos os grupos genéticos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cacaucultura e vassoura-de-bruxa – características do patógeno, sintomatologia e impactos

O cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.), pertencente à família *Malvaceae*, é uma planta natural da região amazônica, sendo cultivada em nove Estados brasileiros, principalmente na Bahia, Amazonas, e Espírito Santo (ANDERBRHAN, 1984). Esta planta exige condições especiais de clima e de solo para o seu desenvolvimento, sendo o quente e úmido o adequado. As chuvas devem ocorrer em abundância e as temperaturas ideais para o cultivo estão entre 24 e 28 °C. Os solos devem ser ricos em matéria orgânica (ANDERBRHAN, 1984).

Em nível mundial, as enfermidades que mais interferem na produtividade do cacauzeiro são a ‘podridão parda’, a ‘monilíase’ e a ‘vassoura-de-bruxa’ (DIAS, 2001). A cultura do cacau tem sofrido bastante com esta última, tendo em vista ser a responsável por perdas de 40% na produção de cacau da Amazônia brasileira (ANDERBRHAN, 1987). Na região Sul da Bahia, a sua presença foi constatada pela primeira vez em maio de 1989 e, juntamente com um longo período de estiagem, provocou uma redução substancial na produtividade, iniciando a maior crise econômica vivida pela região cacauzeira (PEREIRA et al., 1989). A devastação da cacaucultura nesta região não se resume apenas a um problema econômico, mas também atinge dimensões sociais e ambientais críticas. Diante dessa crise, muitas fazendas de cacau da região foram abandonadas, com a conseqüente demissão de trabalhadores rurais que ocasionou migrações do campo para as cidades, ampliando ainda mais as favelas e o desemprego. Além disso, sabe-se que a cultura do cacau pode ser cultivada

sob remanescentes da Mata Atlântica, formando uma associação conhecida como *cabruca*, que tem sido exemplo para o mundo todo de agrossistema potencialmente sustentável em termos de conservação da biodiversidade, mas que encontra-se ameaçada nesse momento pelos efeitos danosos da vassoura-de-bruxa (MELO, 1991).

O agente causal da vassoura-de-bruxa do cacauero é um fungo fitopatogênico, pertencente à classe dos basidiomicetos, que foi por muito tempo conhecido como *Crinipellis perniciosa* desde os trabalhos de Singer (1942), tendo sido recentemente reclassificado taxonomicamente como ***Moniliophthora perniciosa*** (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005)(para o escopo desta dissertação, sua abreviatura a ser utilizada será '**Cp**'); este fungo é reconhecido mundialmente como importante patógeno do cacau, pois, provavelmente, co-evoluiu com este, já que ambos são endêmicos da Bacia Amazônica (ANDERBRHAN, 1984). O *M. perniciosa* (**Cp**) é um organismo hemibiotrófico, pois apresenta duas fases no seu ciclo de vida - a biotrófica (parasítica) e a necrotrófica (saprofítica). É constituído por hifas septadas podendo possuir um, dois, ou mais núcleos entre os septos. O micélio, formado pelo agrupamento de inúmeras hifas, cresce na superfície ou, mais freqüentemente dentro do hospedeiro, penetrando e espalhando-se entre as suas células, em contato direto com o protoplasma do hospedeiro (ANDERBRHAN, 1984).

A fase parasítica do fungo é representada pelo seu micélio intercelular que causa hipertrofia e hiperplasia, provocando superbrotações e anomalias nos ramos, frutos e almofadas florais do cacauero. Nas almofadas florais infectadas formam-se cachos de flores anormais que darão origem a frutos com deformações. Já nos frutos que conseguiram se desenvolver, mas que foram infectados, aparece uma mancha negra dura e irregular ficando as amêndoas unidas entre si e inaproveitáveis (ANDERBRHAN,1984). O ataque do fungo nos ramos ou brotos vegetativos provoca inchaços da parte infectada, acompanhada da proliferação de pequenos brotamentos próximos uns aos outros onde se prendem folhas grandes, curvadas e retorcidas, dando o aspecto de uma 'vassoura'. Posteriormente, o fungo vive sua fase saprofítica que é caracterizada pelo micélio intracelular responsável pela morte dos tecidos infectados, causando a necrose e o apodrecimento do tecido da planta quando os nutrientes solúveis se

tornam escassos, tornando as vassouras secas (ANDERBRHAN, 1984). É nessa fase de vida do fungo que aparecem os basidiocarpos, unidade reprodutora dos basidiósporos que infectam a planta e disseminam a doença. O ciclo da doença começa quando os basidiósporos germinam na superfície de plantas de cacau e os tubos germinativos penetram nos tecidos jovens (ANDERBRHAN, 1984). Os sintomas acima descritos que a planta infectada apresenta tornam-se visíveis entre quatro a seis semanas após inoculação.

Os basidiósporos são produzidos no interior de lamelas presentes na parte inferior do píleo do basidiocarpo, que é a estrutura de reprodução do fungo. São os únicos propágulos infectivos de *Cp* (SILVA et al., 2002) e sua dispersão pode ser dada pela ação do vento, chuva ou homem, incluindo o transporte de sementes contaminadas. A condição primordial que garante a sobrevivência dos basidiósporos está na sua liberação quando há umidade relativa do ar e temperaturas próximas a 20 e 30 °C (ALVES, 2002), já que temperaturas elevadas dificultam a reprodução dos basidiocarpos. Assim, a liberação dos esporos se dá preferencialmente à noite, estando associada à queda de temperatura e ao aumento da umidade relativa do ar. A produção de basidiósporos do *Cp* pode ocorrer sobre qualquer tecido infectado ou necrótico do hospedeiro, após períodos alternados de umidade e seca (MELO, 1991). A altura em que o basidiocarpo é produzido é muito importante para o progresso da doença (COSTA, 1993). Vassouras na superfície do solo produzem poucos basidiocarpos, cujos basidiósporos tem menor chance de atingir os tecidos susceptíveis; fontes mais altas permitem disseminação a maior distância (ANDERBRHAN et al., 1993).

Cp apresenta hospedeiros alternativos dentro da mesma família a qual pertence o cacaueiro, tais como: *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu), *T. speciosum* (cacaui), *T. subincanum* (cupuí) e *T. obovatum* (cacau 'cabeça-de-urubu'). Por essa razão, suporta-se a idéia de que essa ampla variedade de hospedeiros alternativos possa contribuir para o aumento da variabilidade desta espécie (ANDERBRHAN et al., 1995). *Cp* tem demonstrado apresentar quatro biótipos: o biótipo-S (patógeno de Solanáceas), o biótipo-B (patógeno da espécie *Bixa orellana*), biótipo-L (patógeno em Lianas) e o biótipo-C (patógeno do cacau). Existem várias evidências de que o biótipo-B e o biótipo-C são idênticos e o

biótipo-S e o biótipo-C são realmente formas diferentes entre si (LANA, 2004). A detecção da variabilidade genética apresentada por este fungo tem sido feita através da utilização de diferentes técnicas de genética molecular, que vem demonstrando diferenças entre isolados dentro de diversos estados, incluindo a Bahia (ARRUDA, 2003).

A composição da parede celular da maioria dos fungos filamentosos (por exemplo, o *Cp*) é constituída pelos polissacarídeos quitina, glucana e celulose, além de proteínas e outros compostos em menor proporção. A quitina é um dos componentes funcionalmente mais importantes. É formada por moléculas de N-acetil-D-glicosamina, unidas por ligações glicosídicas β -1,4 que resultam em cadeias lineares (STIRLING et al., 1979). É um biopolímero linear e insolúvel em água, sendo abundantemente encontrado no exoesqueleto dos invertebrados que vivem no mar, nos insetos, e na parede celular de fungos e de algumas algas. Análises de difração de raios-X revelaram três formas de interação intercadeias das moléculas de quitina (α -quitina, β -quitina e γ -quitina), que são estabilizadas por meio de pontes de hidrogênio. Dentre estas, apenas a α -quitina é encontrada na parede celular de fungos (STIRLING et al., 1979). A parede celular de *Cp*, especificamente, contém 60% de quitina e uma porcentagem maior de β -1,3-glucana em relação à β -1,6 glucana, além de galactose, galactosaminas, e proteínas e lipídeos em quantidades significativas. A quitina e as β -1,3-glucanas estão embebidas em uma matriz de material amorfo e envoltas por substâncias contendo grupos amino não acetilados como, por exemplo, a quitosana. Nessa estrutura, a quitina parece estar protegida pelas β -1,3-glucanas (CHERIF; BENHAMOU, 1990) e os complexos quitina-glucanas parecem estar covalentemente ligados por meio de ligações glicosídicas na posição seis do N-acetilglicosamina (quitina) e na posição um dos resíduos de glicose nas glucanas (SURARIT et al., 1998). Essas características são relevantes, quando se considera o modo de ação micoparasítica de agentes de biocontrole (ver abaixo).

2.2. Técnicas de manejo da doença

O controle da moléstia vassoura-de-bruxa é de fundamental importância

para a preservação das plantações de cacau no Brasil; entretanto, até o presente momento não há uma técnica completamente efetiva de prevenção ou controle da doença. Mais recentemente, as recomendações para o controle do *Cp* tem ocorrido dentro de uma perspectiva de manejo integrado. O Controle Integrado consiste em mecanismos pelos quais se avaliam e se consolidam, em um programa unificado, todas as técnicas de controle disponíveis, com a finalidade de se manejar a população de uma praga, considerando a possibilidade de se conviver com ela enquanto níveis de dano econômico não são atingidos (BETTIOL; GHINI, 1995). Dentro do controle integrado, temos como técnicas para o manejo desta doença a poda fitossanitária, o controle genético, o controle químico e o controle biológico (BETTIOL; GHINI, 1995). Através da fitossanificação, os tecidos infectados pelo fungo são removidos antes do início do período chuvoso. Apesar de, por vezes, produzir resultados satisfatórios, é dispendiosa e exige um trabalho intensivo, com elevado custo de mão-de-obra. Já o uso de variedades clonais resistentes, ou seja, o controle genético, tem sido o método mais recomendado, pois assegura baixos índices de doença de forma mais permanente (COSTA; BASTOS, 2001). Contudo, trata-se de uma estratégia arriscada, uma vez que há relatos em outras localidades de quebra de resistência pelo patógeno e, se isso ocorrer antes das árvores novas atingirem sua fase produtiva (3 a 5 anos), o prejuízo será grande, por conta do custo havido em replantar a lavoura (COSTA; BASTOS, 2001). Essa quebra de resistência é possível devido a mutações que podem vir a ocorrer no fungo, podendo gerar variantes ainda mais virulentas (COSTA; BASTOS, 2001). A aplicação do controle químico através dos defensivos agrícolas possui uma alta e rápida eficiência, mas, são necessárias aplicações repetidas desses produtos, o que representa grandes quantidades lançadas no ambiente, além de um alto custo associado à técnica (ANDERBRHAN, 1984). Esses produtos propiciam uma alta produtividade, mas com efeitos negativos sobre o meio ambiente (toxicidade para o homem e organismos não-alvos), além de poderem provocar a seleção de mutantes resistentes aos seus princípios ativos, resultantes da forte pressão seletiva (ANDERBRHAN, 1984). Além disso, seu tempo de degradação no ambiente é muito lento, permanecendo assim uma concentração elevada dessas substâncias na cadeia alimentar. O uso de fungicidas tem caráter preventivo, não

sendo efetivo após o aparecimento dos primeiros sintomas. Já o uso do controle biológico por sua vez, pela exploração de interações antagônicas entre organismos, é uma estratégia de bom potencial para o controle da vassoura-de-bruxa. Deve-se ressaltar que o nível de controle obtido com o método biológico isoladamente, apesar de não oferecer desequilíbrio ecológico, pode estar abaixo do necessário para que danos à produção não ocorram. Assim, segundo (BACKER; COOK, 1974), a integração dos métodos de controle faz-se necessária, de modo a haver mínima interferência entre os métodos aplicados. Além disso, a possibilidade de efeito sinérgico entre as medidas oferece uma perspectiva de maior sucesso no controle da vassoura-de-bruxa.

2.3. Controle Biológico

O Controle Biológico de doenças de plantas iniciou-se como ciência em 1926, quando B. B. Sanford publicou um trabalho sobre fatores que afetavam a patogenicidade de *Streptomyces scabies*, agente causal da sarna comum da batata. Em 1931, Sanford e W. C. Broadfoot empregaram pela primeira vez o termo 'controle biológico' em um artigo sobre o mal-do-pé do trigo, causado por *Gaeumannomyces graminis* (BACKER; COOK, 1974). No contexto do controle biológico, doença é o resultado de uma interação entre hospedeiro, patógeno e diversos fatores não-patógenos que também habitam o sítio de infecção e que apresentam potencial para limitar a atividade do patógeno ou aumentar a resistência do hospedeiro. Deste modo, os componentes do controle biológico são o patógeno, o hospedeiro e os antagonistas, sob a influência do ambiente, todos interagindo num sistema biológico (BACKER; COOK, 1974).

O controle biológico (CB) de doenças de plantas pode ser definido como, "*Redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, através da ação de um ou mais organismos*". Nesta definição, segundo Junqueira e Gasparotto (1991), as '*atividades determinantes da doença*' envolvem crescimento, infectividade, agressividade, virulência e outros atributos do patógeno ou processos que determinam a infecção, o desenvolvimento dos sintomas e a reprodução. O termo '*organismos*' inclui indivíduos ou populações

avirulentas ou hipovirulentas dentro das espécies patogênicas, bem como outros que antagonizam-se aos patógenos. O termo 'antagonista' é empregado para designar agentes biológicos com potencial para interferir nos processos vitais dos fitopatógenos, estando estas espécies adaptadas ecologicamente ao mesmo tecido das plantas que os ocupados pelos patógenos, mas sendo não-patogênicas às mesmas (BETTIOL; GHINI, 1995). Por esses conceitos, o CB visa manter, através de certas práticas, um equilíbrio no agrossistema, de modo que a planta hospedeira, na presença do patógeno, não sofra danos significativos em função da ação controladora dos organismos antagonistas, não-patogênicos. Além disso, a ação dos organismos antagonistas pode ocorrer no sentido de contribuir diretamente para a resistência da planta hospedeira ao ataque do patógeno.

Para o CB obter sucesso, não basta apenas o antagonista ser um excelente agente controlador *in vitro* - é preciso, também, conhecer os fatores ecológicos que podem afetar no seu desempenho para que sejam adotadas práticas de manejo adequadas que favoreçam a sua permanência e atividade no ambiente, devido a sua especificidade para com o patógeno (LUMSDEN; LOCKE, 1989). Entretanto, antes que o CB chegue a ser um componente importante no manejo de enfermidades de plantas, ele deve ser efetivo, confiável, consistente e econômico. E para alcançar esses critérios, deve-se desenvolver cepas superiores (por escrutínio e seleção de isolados, ou por manipulação genética), juntamente com sistemas de aplicação que complementem a atividade biocontroladora (LUMSDEN; LOCKE, 1989).

A maioria dos estudos publicados ressaltam a utilização de fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* como agentes de CB efetivo das enfermidades mais importantes que acometem as plantações de maior importância econômica e mundial, pois atuam como antagonista natural de vários fungos fitopatogênicos (BENITEZ et al., 1998; STEYAERT et al., 2003). Bastos (1996) relata que espécies de *Trichoderma* em geral destacam-se tanto no controle de fitopatógenos habitantes do solo como no controle da parte aérea de plantas. Apesar de muitas espécies do gênero *Trichoderma* apresentarem grande potencial antagônico em relação ao fungo fitopatogênico *Cp*, a utilização da espécie *Trichoderma stromaticum* tem sido mais freqüente (ver adiante). A ação de CB

dá-se através de mecanismos de interação que ocorrem entre o agente controlador ou antagonista e o patógeno.

2.3.1. Mecanismos de interação antagônica

Os mecanismos das interações entre microorganismos patogênicos e antagônicos que fundamentam o CB podem ser divididos em competição, antibiose e parasitismo, além de hipovirulência, predação e indução de defesa do hospedeiro. Apesar desta divisão, um antagonista pode atuar por meio de um ou mais mecanismos, o que torna-se, assim, uma característica favorável para sucesso do CB (BETTIOL; GHINI, 1995).

A antibiose é definida como a interação entre organismos na qual um ou mais metabólitos antibióticos, voláteis ou não-voláteis, são produzidos e secretados pelo fungo antagonista, tendo efeito danoso ao fungo patogênico. A capacidade para produzir tais substâncias e o seu efeito fungicida pode variar entre espécies e entre isolados da mesma espécie. Competição é referente à interação entre dois ou mais organismos empenhados numa mesma ação ou substrato, disputando recursos tais como espaço, nutrientes, água e luz. (BETTIOL; GHINI, 1995). O micoparasitismo refere-se à situação em que o microorganismo antagonista vive sobre ou dentro do fungo antagonizado, alimentando-se e desenvolvendo-se às expensas deste. Dentre as diversas etapas do processo, merece destaque a produção e liberação no meio externo de enzimas hidrolíticas, tais como quitinases, glucanases, celulasas e proteases, cuja função principal é degradar a parede celular do patógeno.

Os fungos do gênero *Trichoderma* são excelentes hiperparasitas, pois atacam hifas e estruturas de reprodução e sobrevivência dos patógenos de plantas, reduzindo a infecção e o inóculo do patógeno (BETTIOL; GHINI, 1995). A capacidade saprofítica do *Trichoderma* está na quantidade de enzimas hidrolíticas produzidas e liberadas. Estas enzimas apresentam efeito sinérgico com os antibióticos visto que a ação antifúngica de ambos compostos tende a ser superior a qualquer um deles agindo separadamente (BETTIOL; GHINI, 1995). A quantidade de enzimas hidrolíticas produzidas por *T. harzianum* segundo Gómez et al. (1997) é diferente em cada interação parasito-hospedeiro, correlacionado-se

com a capacidade de que cada isolado de *Trichoderma* tem em controlar um patógeno específico. Para este autor, estas diferenças na produtividade enzimática podem também explicar a variabilidade da atividade antagônica entre isolados.

2.3.2. Micoparasitismo

O micoparasitismo exercido pela espécie *Trichoderma stromaticum* (Ts) é o mecanismo predominante de antagonismo para CB da vassoura-de-bruxa (BASTOS, 1996; SAMUELS et al., 2000). Os organismos hiperparasitas, por viverem às custas do patógeno, estão sujeitos às mesmas variações ambientais e dependem das mesmas condições do organismo parasitado (LORITO, 1998). Chet et al. (1998) descreveu as etapas sucessivas que fundamentam o complexo processo do micoparasitismo por *Trichoderma sp.* O antagonismo inicia-se com o crescimento quimiotrópico do *Trichoderma* em resposta a algum estímulo químico da hifa do hospedeiro, detectando-o. O primeiro sinal de interação demonstrado pelo *Trichoderma* ao seu hospedeiro é específico e controlado. O reconhecimento e ligação do micoparasita ao hospedeiro se dão através das 'lecitinas' presentes nos polissacarídeos extracelulares deste (ELAD, 1990). Essas moléculas são glicoproteínas que aglutinam células e precipitam glicoconjugados; no caso da interação com o micoparasita, carboidratos específicos na parede celular deste são os componentes que ligam-se às lecitinas do hospedeiro, conferindo a compatibilidade de ligação entre os dois (ELAD, 1990). Diferentes carboidratos interagem com diferentes lecitinas, conferindo especificidades de ligação entre isolados diferentes e seu(s) respectivo(s) hospedeiros (HJELJORD; TRONSMO, 1998). Quando o micoparasita faz este contato físico com seu hospedeiro, suas hifas aderem-se por meio de estruturas especializadas denominadas 'apressórios' e enrolam-se ao redor das hifas do hospedeiro (CHET et al., 1998). Esse contato físico é o disparador da emissão de enzimas hidrolíticas pelo micoparasita, as quais degradam os componentes da parede celular do hospedeiro, facilitando a penetração (CHET et al., 1998). O micoparasita, então, penetra no lúmen da hifa do hospedeiro, visando assimilar e metabolizar seu conteúdo protoplasmático. Observações ao microscópio eletrônico têm permitido sugerir que *Trichoderma*

produz e secreta enzimas hidrolíticas responsáveis pela degradação parcial e/ou total da parede celular do seu hospedeiro (ELAD, 2000). Outros resultados que apóiam esta hipótese tem mostrado que *Trichoderma* produz extracelularmente glucanases, quitinases, lípases e proteases que são capazes de degradar a parede celular do microrganismo antagonizado (DE MARCO et al., 2000; CHET et al., 1998). Diversos estudos tem sido realizados com estas enzimas em relação a sua atividade sobre a inibição da germinação de esporos e de todos os estágios de vida dos patógenos. Tem-se encontrado uma clara correlação entre a produção de enzimas e a sua atividade antifúngica (DE MARCO et al., 2000; CHET et al., 1998). Fungos membros do gênero *Trichoderma* estão sendo extensivamente estudados em relação a sua habilidade de produzir e secretar as enzimas hidrolíticas que agem no biocontrole. A maioria dos trabalhos já realizados enfocaram isolados de *T. viride* e *T. hamatum* que produzem extracelularmente enzimas celulolíticas, isto é, endoglucanases, exoglucanases e celobiasas, as quais agem de maneira sinérgica na conversão da celulose para glicose (BENITEZ et al., 1998).

Vale salientar que os níveis de enzimas hidrolíticas produzidas são diferentes para cada interação hospedeiro-parasito analisada. Este fenômeno se correlaciona com a habilidade de que cada isolado de *Trichoderma* possui para controlar um patógeno específico. Entretanto, a especificidade do processo não pode ser explicada apenas por uma simples diferença de atividade enzimática, já que os isolados não antagonistas também produzem quantidades significativas de enzimas líticas, apesar de serem em níveis mais baixos (HJELJORD; TRONSMO, 1998). Dentro dos interesses atuais de pesquisa, a averiguação está em estabelecer qual tipo de comunicação existe entre diferentes cepas de *Trichoderma*, assim como, que tipo de sinais determinam a expressão de genes relacionados com o micoparasitismo e como se transmitem no interior da célula.

2.3.3. Enzimas hidrolíticas

As enzimas hidrolíticas são aquelas produzidas e liberadas pelos fungos antagonistas durante o seu processo micoparasítico para degradar os componentes constituintes da parede celular dos patógenos. Estas devem

manter-se presentes para exercer o papel lítico significativo (LORITO et al., 1994). Esta categoria de enzima digere a parede celular do hospedeiro, possibilitando a utilização de nutrientes intracelulares pelo fungo antagonista. A viabilidade celular depende da integridade dos componentes de sua parede celular, a qual funciona como barreira seletiva ante as pressões físico-químicas exercidas pelo meio ambiente em que o microorganismo sobrevive. Tal barreira é o ponto inicial das interações envolvidas no processo de antagonismo entre fungos (LORITO et al., 1994). As enzimas hidrolíticas capazes de lisar os componentes da parede celular desempenham, portanto, papel fundamental no processo antagônico do micoparasitismo. As quitinases (endoquitinases, exoquitinases e β -1,4-N-acetilglucosaminidases), as exoglucanases e endoglucanases do tipo β -glucanases (β -1,3 e β -1,6), as proteases e as celulases (β -1,4- D-glucosidases), são as hidrolases identificadas nos fungos do gênero *Trichoderma* (DE MARCO et al., 2000). A produção e aplicação de 1,3- β -glucanases foi caracterizada como uma atividade enzimática importante no biocontrole de microorganismos.

As enzimas quitinolíticas foram descritas pela primeira vez em microorganismos e plantas na década de 90 (DE MARCO et al., 2000). As exoquitinases liberam somente diacetilquitobiose ou apenas quitobiose (dímeros de N-acetilglicosamina) de uma forma progressiva, a partir da extremidade não redutora do polímero. As endoquitinases agem aleatoriamente, liberando oligossacarídeos como quitotetrose, quitotriose e quitobiose. Por sua vez, a β -1,4-N-acetilglucosaminidase hidrolisa os oligossacarídeos da parede celular, formando monômeros de N-acetilglicosamina (GlcNac) como produto final (DE MARCO et al., 2000). Quando quitinases degradam paredes celulares de fungos, liberam oligômeros que induzem as exoquitinases, começando assim o ataque micoparasítico. As propriedades das quitinases, seu envolvimento nos processos antagônicos e sua importância no controle biológico têm despertado grande interesse. Os sistemas quitinolíticos, assim como os celulolíticos, mais bem estudados são aqueles produzidos por fungos do gênero *Trichoderma*. A espécie que apresenta maior número de trabalhos identificando a presença de quitinases no controle biológico é a *T. harzianum* (LORITO, 1998).

As β -1,3- e β -1,6-glucanas representam a maior parte das β -glucanas

presentes na parede celular de fungos filamentosos, incluindo o *Cp*. O sistema hidrolítico das β -1,3- glucanas é composto das exo e endo β -1,3-glucanases, que hidrolisam ligações β -glicosídicas e agem de forma sinérgica, com diferentes modos de atuação. As β -1,3- exoglucanases são as mais abundantes em fungos e clivam o polímero, liberando resíduos de glicose a partir da extremidade não redutora do carboidrato. As β -1,3-endoglucanases clivam aleatoriamente as ligações do tipo β no interior da molécula, liberando pequenos oligossacarídeos (LORITO, 1998). Muitas β -1,3-glucanases de fungos são secretadas e podem hidrolisar polissacarídeos extracelularmente para um eventual transporte para o interior da célula e assimilação, viabilizando, assim, o uso de β -glucanas como única fonte de carbono (DE LA CRUZ et al., 1995). Tanto as β -1,3- quanto as β -1,6-glucanases são capazes de inibir a germinação de esporos e o crescimento celular de fitopatógenos (DE LA CRUZ et al., 1995). A espécie que apresenta maior número de trabalhos identificando a presença e ação das glucanases no controle biológico é, também, a *T. harzianum* (LORITO, 1998). Evidências indicam que várias destas enzimas atuam em sinergismo com outras enzimas hidrolíticas para lisar a parede celular dos fitopatógenos hospedeiros (DE LA CRUZ et al., 1995).

Os sistemas celulolíticos mais bem caracterizados em fungos são os que pertencem ao gênero *Trichoderma*. O sistema do *T. reesei* consiste em três classes gerais de enzimas: (i) a exo-glucanase 1,4- β -D-glucana celobiohidrolase, que age sobre as extremidades não-redutoras da cadeia de celulose, liberando unidades celobiosídicas, (ii) a endo-glucanase 1,4- β -D-glucana-4-glucanohidrolase, a qual cliva as ligações glicosídicas de forma aleatória, e (iii) a 1,4- β -D-glucosidase, que por sua vez cliva celooligossacarídeos para produção de glicose (KUBISCEK , 1992). Além de suas atividades individuais tais enzimas também atuam em conjunto, proporcionando o aumento da sua eficiência no processo de lise. Membros de cada um desses grupos de enzimas produzidas por *Trichoderma* já foram caracterizados em níveis genéticos e moleculares, tanto de organização no genoma quanto de expressão.

As proteases, ainda pouco estudadas em *Trichoderma*, referem-se a todas as enzimas que clivam ligações peptídicas, podendo ser classificadas quanto as condições hidrogeniônicas ótimas para sua ação (láticas, neutras e alcalinas),

quanto a especificidade ao substrato (colagenase, elastase, etc.), ou quanto a similaridade com proteases bem caracterizadas (pepsina, tripsina, catepsina, etc.) (KUBISCEK , 1992). Muitos fungos produzem proteinases capazes de hidrolisar proteínas nativas, como a proteinase A de *Aspergillus niger* e as proteinases A1, A2 e B de *Scytalidium lignicolum*. Assim como as proteases secretadas por bactérias e fungos patogênicos mediam na planta hospedeira uma série de processos patológicos, as proteases de fungos antagônicos apresentam possivelmente funções semelhantes nos processos de antagonismo (KUBISCEK , 1992). Foi observado num isolado de *T. harzianum* a produção da protease - caseína em meio de cultura líquida, apresentando propriedade de hidrólise da parede celular de *Cp* (DE MARCO et al., 2002).

2.4. O gênero *Trichoderma* e a espécie *T. stromaticum*

O gênero *Trichoderma* pertence a classe dos fungos ascomicetos e tem sido comumente utilizado na produção de muitas exoenzimas em escala industrial (por exemplo, as enzimas celulolíticas), além de atuar nos processos de biodegradação de compostos clorofenólicos e na biorremediação do solo (ESPOSITO; SILVA, 1998). Neste gênero, as características morfológicas que definem as espécies são muito variáveis e, por isso, tem sido utilizado pelos taxonomistas o termo 'agregado de espécies', referindo-se a um grupo de espécies morfológicamente muito semelhantes (SAMUELS, 1996). As espécies deste gênero são caracterizadas por apresentarem crescimento rápido, atingindo de 2 a 9 cm de diâmetro após quatro dias de crescimento em meio de cultura (ESPOSITO; SILVA, 1998). As colônias podem apresentar-se dispersas e flocosas, ou compactadas em tufo. O tamanho e formato dos conídios são bastante variados. É observada neste gênero a existência de clamidósporos, os quais são esporos assexuais originados por modificações de segmentos das hifas. Os conídios podem ser verdes, amarelos ou hialinos. Não existe em *Trichoderma* conidióforos definidos (SAMUELS, 1996), sendo os conídios formados nas extremidades das fiáldes em determinadas hifas diferenciadas. Os conídios tendem a se agregar em massas. Em algumas espécies, há

dependência da luz para a esporulação (GRESSEL; HARTMANN, 1968). Vários fatores genéticos assexuais, como a combinação parassexual, mutação e outros processos contribuem para a variação deste gênero.

O gênero *Trichoderma* está amplamente distribuído por todo o mundo e ocorre em quase todos os tipos de solo e ambientes naturais, especialmente naqueles contendo matéria orgânica. Muitas espécies do gênero são também encontradas na rizosfera de plantas. O fato das espécies deste gênero desenvolverem-se em vários substratos torna este grupo de grande interesse biotecnológico (ESPOSITO; SILVA, 1998). São utilizadas como agentes de controle biológico de variadas enfermidades de plantas, ocasionadas pela ação de fungos patogênicos (MELO, 1991), por serem antagonistas tanto para patógenos radiculares (ex. *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Armillaria* spp, etc.) como da parte aérea (ex. *Venturia* sp., *Botrytis* spp, etc.).

Conforme anteriormente, as espécies do gênero *Trichoderma* produzem grandes quantidades de celulases e outras enzimas hidrolíticas (KUBICEK, 1992), sendo *T. reesei* um conhecido produtor de múltiplas enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. As xilanases são enzimas produzidas por várias espécies e utilizadas em escala industrial na fabricação de rações e papel. As quitinases são também enzimas produzidas por espécies deste gênero que atuam no micoparasitismo, na etapa de digestão das paredes celulares dos fungos hospedeiros (LORITO et al., 1998).

Espécies de *Trichoderma* tem sido utilizadas em formulações comerciais empregadas para o controle biológico de fungos causadores de doenças em plantas, reduzindo a necessidade da aplicação de fungicidas químicos, poluentes do meio ambiente. O *T. harzianum* é o agente ativo do composto comercial 'Tricodex', o qual é utilizado contra o fungo causador do apodrecimento pós-colheita da maçã e está também combinado com o *Trichoderma polysporum* no composto denominado 'Binab-T', utilizado no controle do apodrecimento da madeira (RICARD, 1981). O composto 'GlioGard' possui o fungo *T. virens* como seu agente ativo e é utilizado na prevenção do tombamento de plântulas causado por espécies de *Phytophthora* e *Rhizoctonia* (LUMSDEN; LOCKE, 1989). *Trichoderma* é um organismo natural do solo envolvido em processos de decomposição, reciclagem de nutrientes e na regulação da microbiota associada (ESPOSITO;

SILVA, 1998). *T. stromaticum* vem sendo experimentalmente usado como agente de controle biológico com bons resultados desde 1995 (BASTOS, 1996) e já foi incorporado como base para a produção do biofungicida 'Tricovab', desde 1996, no controle biológico da vassoura-de-bruxa. Em suma, este gênero apresenta um vasto potencial em áreas diversas, tais como agrícola, industrial e ambiental. Assim, um melhor entendimento das espécies pertencentes a este grupo, torna-se necessário para um amplo aproveitamento do potencial destes fungos.

T. stromaticum (*Ts*), espécie de fungo antagonista a *Cp* que foi recentemente identificada e caracterizada (SAMUELS et al., 2000), tem sido usada no controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauero (BASTOS, 2001). Até o momento, tem-se revelado como um bom agente biocontrolador em condições controladas e naturais (BASTOS, 1996). Resultados promissores em experimentos preliminares demonstram que essa espécie, através do micoparasitismo, pode reduzir em 99% a formação de basidiocarpos em vassouras em contato com o solo e em 56% em vassouras presas à planta (BASTOS, 1996).

A descoberta do teleomorfo de *Ts* (CHAVERRI et al., 2001) denominada de *Hypocrea stromatica* favorece a ocorrência da recombinação sexual desta espécie, que propicia a variabilidade genética. Desta forma, sugere-se que haja isolados com diferentes níveis de antagonismo à *Cp*. A ocorrência de *Hypocrea stromatica* é comum na natureza, nas condições da região cacauera da Bahia. *Hypocrea stromatica* distingue-se das demais espécies pelas características únicas do seu anamorfo, que justificaram a criação de uma espécie nova de *Trichoderma* (SAMUELS et al., 2000). O uso de marcadores moleculares tais como o RAPD e AFLP têm permitido o estudo da diversidade genética inter e intra-específica, caracterizando raças fisiológicas e classificando de forma detalhada isolados de fungos (SOUZA et al., 2006). Variabilidade genética intra-específica, como a observada para os isolados de *Ts* e *H. stromatica*, é comumente detectada ao se utilizar marcadores RAPD. Com base nos dados morfobiométricos, juntamente com os marcadores moleculares, fica evidente a conexão entre o anamorfo (*Ts*) e o teleomorfo (*H. stromatica*) subsidiando a descrição da nova espécie e elucidando o ciclo vital deste fungo.

Uma estratégia para melhorar a eficiência do biocontrole é explorar a

diversidade de microorganismos que pertencem a uma mesma espécie. Souza et al. (2006) utilizou métodos moleculares e clássicos para estudar a diversidade genética dos isolados de *Ts* coletados na região cacaueteira baiana. Segundo este trabalho, 91 isolados, sendo a maioria destes coletados na região cacaueteira sul baiana, foram caracterizados em nível genético. Pelas análises feitas por AFLP, dois grupos genéticos distintos - I e II - foram caracterizados. Essa classificação também foi relacionada com vários experimentos complementares *in vitro*, incluindo crescimento e esporulação, com a finalidade de verificar até que ponto essa distinção de grupos genéticos poderia ser indicativo de distinto comportamento biológico nesta espécie. Os resultados indicaram haver um maior número e uma maior diversidade entre isolados pertencentes ao grupo I. Além disso, diferenças significativas de comportamento *in vitro* detectadas entre os representantes dos grupos I e II não se traduziram em comportamento semelhante a campo, pois não houve diferença significativa entre as médias de ação de biocontrole entre os grupos.

No presente estudo buscou-se investigar o potencial de diferentes isolados locais de *Ts*, de forma comparativa, quanto aos comportamentos fenotípicos de biocontrole a campo, assim como em relação a alguns parâmetros biológicos e moleculares (bioquímicos), com os objetivos de: (i) analisar possíveis associações existentes entre esses parâmetros com os grupos I e II previamente definidos (SOUZA et al., 2006), buscando identificar alguma característica que fosse específica para cada grupo genético, para ser utilizada como descritor mais prático dos mesmos, e (ii) verificar o nível de plasticidade fenotípica quanto ao antagonismo a *Moniliophthora perniciosa* (*Cp*), definindo estratégias eficazes para escrutínio e seleção (bioprospecção) de isolados mais eficientes para uso em Controle Biológico da vassoura-de-bruxa do cacaueteiro.

3. METODOLOGIA

3.1. INTERAÇÃO DE *Trichoderma stromaticum* COM *Moniliophthora perniciosa* EM VASSOURAS SECAS

3.1.1. Coleta a campo e preservação no laboratório dos isolados de *T. stromaticum*

Sessenta e quatro isolados de *T. stromaticum* (*Ts*) foram previamente coletados na região cacauceira que engloba os municípios sul-baianos de Camacã, Mascote, Pau Brasil, Uruçuca, Ilhéus, Itabuna, Gandú, Ipiaú, Ituberá e Valença, a partir de 30 vassouras vegetativas secas por área visitada, distribuídas entre o chão e a copa das árvores. O isolado 'TVC', originário do Pará e correspondendo àquele utilizado na formulação do produto 'TRICOVAB' (distribuído aos cacauicultores pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira para aplicação em controle biológico da vassoura-de-bruxa) foi gentilmente cedido pelo Centro de Estudos de Cacau (CEPEC/CEPLAC). No laboratório, as vassouras coletadas foram submetidas à câmara úmida (sacos plásticos contendo pedaços de papel umedecidos - Figura 1a) para indução da esporulação do *Ts* (Figura 1b). Em seguida, foram incubadas em placas de Petri à temperatura de 25 °C até a ocorrer a produção de conídios (esporulação - Figura 1c), em meio BDA (batata, dextrose e ágar) normal para os isolados do grupo genético II e BDA 1/5 (acidificado) para os do grupo I. Após 10 dias de incubação, e tendo a esporulação ocorrido, os isolados foram identificados e preservados em papel filtro, segundo metodologia de Dhingra e Sinclair (1985). Segundo esta metodologia, adiciona-se 5 mL de leite-em-pó a 10% (autoclavado) aos esporos,

juntamente com pedaços de papel filtro cortado (0,25 cm²) esterilizados, e deixa-se por 10 min. Raspa-se os esporos da placa com auxílio de espátula autoclavada, retirando-se os papéis e transferindo-os para um papel toalha estéril (em placa) com finalidade de retirar a umidade, deixando-os secar por 3 dias. Estes papéis contendo esporos de diferentes isolados são, posteriormente, preservados em cartuchos feitos com papel filtro estéril, em frascos de vidro contendo aproximadamente 8,5 g de sílica gel.



Figura 1. (a) Câmara úmida das vassouras; (b) Aspecto da vassoura esporulada com *T. stromaticum*; (c) Crescimento em placa dos isolados de *T. stromaticum* em meio BDA.

3.1.2. Avaliação a campo dos isolados de *T. stromaticum* quanto ao biocontrole de *Moniliophthora perniciosa*.

Vassouras secas de aproximadamente 25 cm de comprimento, medindo em média 0,5 cm em diâmetro, foram coletadas de plantas localizadas em áreas tipicamente infestadas por *M. perniciosa* (**Cp**) e testadas para a presença do micélio branco do fitopatógeno e também para esporulação de *Ts*, o que poderia indicar uma eventual colonização prévia da vassoura pelo antagonista. Para esses testes, segmentos de 2 cm de comprimento foram cortados das extremidades de cada uma dessas vassouras e colocados em câmara úmida (ver acima), sendo incubados à temperatura ambiente por 7-10 dias. Somente vassouras que apresentaram presença de *Cp* e ausência de *Ts* nas suas extremidades testadas foram aquelas usadas para os experimentos de campo (e de agressividade - vide adiante).

Dois experimentos no campo foram conduzidos em condições climáticas diferentes. O primeiro experimento estendeu-se de 09/mai a 14/ago de 2003, em condições de precipitação pluviométrica mais intensa, enquanto que o segundo ocorreu de 31/jul a 06/out do mesmo ano, em condições menos favoráveis de umidade. Os 64 isolados foram crescidos em placas de Petri contendo meio BDA, a temperatura ambiente, apresentando no geral uma boa esporulação após 14 dias. As suspensões de esporos para aplicação nas vassouras foram preparadas através da varredura e coleta dos mesmos com o auxílio de água bidestilada. Buscou-se padronizar a concentração de esporos para todos os 64 isolados, isto é, aproximadamente 1×10^7 conídios/mL⁻¹. Os isolados de *Ts* foram aplicados nas vassouras secas previamente testadas para presença de *Cp* (vide acima), sendo estas completamente pulverizadas com as suspensões de esporos e penduradas abaixo da copa de plantas de cacau, a ~1,30 - 1,60 m de altura. O desenho experimental em cada experimento consistiu de 21 vassouras por isolado, divididas em três grupos de sete vassouras, distribuídos em blocos casualizados na área de cacau a campo, utilizada para simular as condições típicas de lavoura da região. Foram realizadas duas a três avaliações por semana, durante os períodos experimentais. Os parâmetros avaliados associados a esses dois experimentos são descritos a seguir.

3.1.3. Esporulação de *T. stromaticum* a campo

O primeiro parâmetro avaliado com os dados de campo foi o percentual acumulado de esporulação de *Ts*, medido pela contagem da quantidade total de vassouras (por isolado) que foram esporuladas durante o período experimental, sendo que se as 21 vassouras para um determinado isolado produzisse esporos de *Ts*, o valor de esporulação equivaleria à 100%.

3.1.4. Presença residual de *M. pernicioso* nas vassouras tratadas

Após os tratamentos de biocontrole (item 3.1.2) e o registro da esporulação dos isolados de *Ts* (item 3.1.3), as vassouras dos experimentos a campo (tanto as esporuladas quanto as não-esporuladas) foram trazidas para o laboratório,

cortadas até o comprimento de 12 cm e desinfetadas. Esta desinfestação foi realizada mergulhando-se as vassouras em álcool 50% por 1 min e no hipoclorito de sódio a 2% por 6 min. Após, as vassouras foram lavadas em água corrente e cortadas em seis pedaços de 2 cm, os quais foram incubados em câmara úmida à temperatura ambiente. Após 6 dias, observou-se visualmente e registrou-se a presença residual de *Cp* (Figura 2a) e, ou a esporulação de *Ts* na superfície das vassouras (Figura 2b).

O parâmetro 'presença residual' de *Cp* foi subdividido em 'incidência' e 'severidade'. A incidência foi registrada dividindo-se por 21 o número total de vassouras esporuladas por isolado e multiplicando-se por 100. Para severidade, os registros para cada isolado basearam-se na contagem do número total de fragmentos (pedaços) de vassoura esporulados, dividido por um total de 126 (21 vassouras x 6 pedaços) e multiplicado por 100.

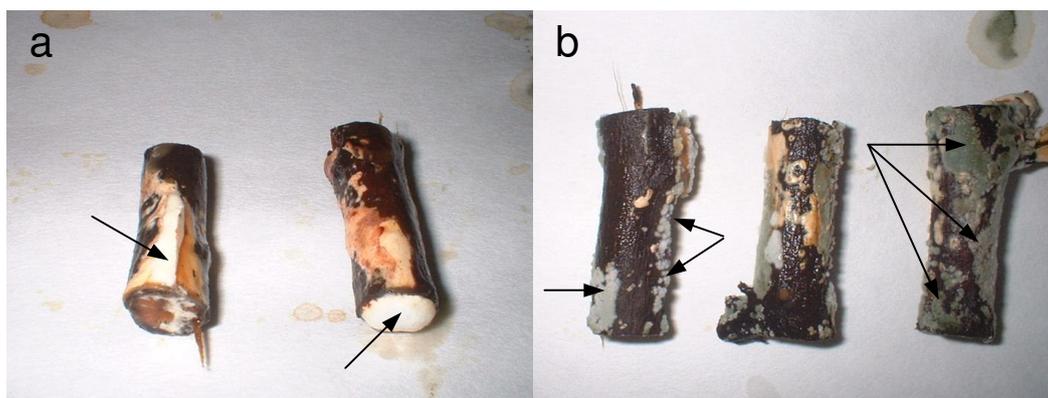


Figura 2. (a) Vassouras colonizadas por *M. pernicioso*; micélio branco indicado por setas. (b) Esporulação de *T.stromaticum* em vassouras pré-colonizadas por *C.pernicioso* (setas).

3.1.5. Análise de regressão entre esporulação de *T. stromaticum* a campo e presença residual de *M. pernicioso* nas vassouras tratadas

A partir dos valores de 'incidência residual de *Cp*' obtidos para cada um dos 64 isolados testados, estabeleceu-se classes de biocontrole em cada experimento de campo, de modo que os isolados cujas vassouras tratadas apresentaram *menores* percentuais de incidência residual de *Cp* foram agrupados nas classes

superiores e vice-versa (vide designação das classes nas Tabelas 1 e 2). A seguir, calculou-se a média dos três parâmetros de campo (ver itens 3.1.3. e 3.1.4. acima) para cada classe, utilizando os respectivos valores individuais dos isolados pertencentes a elas. Assim, cada classe de biocontrole apresentou um valor médio para cada parâmetro, sendo esses os dados que compuseram os pares de pontos utilizados nos gráficos de dispersão e na análise de regressão correspondente (ver Figura 7). Os pares de dados incluíram de um lado os percentuais médios de esporulação de *Ts* a campo, e do outro a presença residual de *Cp* no laboratório (incidência ou severidade média) para as classes de biocontrole. As equações das retas e os respectivos coeficientes de regressão R^2 foram calculados, utilizando os comandos específicos do programa *MS Excel*[®]. Foram utilizados cinco pares de dados para o experimento nº 1 e quatro para o nº 2, correspondendo às classes de biocontrole definidas em cada experimento.

3.2. PARÂMETROS DE LABORATÓRIO COM POTENCIAL CORRELAÇÃO COM DADOS DE CAMPO

3.2.1. Análise de correlação do crescimento e esporulação *in vitro*, a 25 e 30 °C, dos isolados de *T. stromaticum* testados a campo.

Dados de crescimento e esporulação em placa para os isolados de *Ts* haviam sido obtidos anteriormente por outro técnico de laboratório, a partir do seguinte procedimento: discos de micélio provenientes das bordas das colônias de cada isolado de *Ts*, crescidos previamente em meio BDA, foram depositados no centro de placas de Petri contendo o mesmo meio e, posteriormente, deixados à temperatura de 25 °C e 30 °C em incubadora BOD, com ausência de luz. O crescimento radial das colônias fora avaliado diariamente por inspeção visual, e a esporulação por contagem de esporos em câmara de Neubauer após 14 dias de incubação para todas as colônias. Os dados por isolado obtidos em duas repetições desse experimento (que haviam produzido os mesmos resultados) foram submetidos à análise de correlação, conforme descrito no item 3.3.6, com os respectivos dados individuais de presença residual de *Cp* (incidência e

severidade) nas vassouras utilizadas nos experimentos de campo (item 3.1.2.); os resultados dessa análise aparecem na Tabela 3.

3.2.2. Avaliação do padrão de colonização de *T. stromaticum* em relação ao ponto de aplicação da suspensão de esporos

Suspensões de esporos padronizadas dos isolados 56, 64 e 323 foram aplicadas em 10 vassouras secas (repetições) por isolado, sendo cinco delas cobertas com parafina nas extremidades e a outras cinco com as extremidades livres. Para preparação da suspensão dos esporos pesou-se 15 gramas do substrato (arroz + esporos) de cada isolado que foram misturados em 100 mL de água destilada. Em seguida, a suspensão foi coada e diluída até alcançar concentração padrão de 1×10^7 conídios.mL⁻¹ para aplicação nas vassouras. Foram aplicados 40 µL dessa suspensão no centro das vassouras cobertas com parafina e 20 µL em cada uma das extremidades livres das vassouras, sendo estas acondicionadas posteriormente em câmara úmida. Registrou-se, após 6 e 12 dias de incubação, a presença ou ausência de *Ts* nos dois tipos de aplicação das suspensões de esporos nas vassouras, tendo sido registrada a frequência de vassouras esporuladas (colonizadas) aos 6 e aos 12 dias. O experimento apresentado foi repetido uma vez mais, tendo-se obtido os mesmos resultados.

3.2.3. Caracterização da velocidade de colonização (agressividade) de isolados de *T.stromaticum* em vassouras secas

Foram conduzidos três experimentos (repetições) dessa natureza em diferentes momentos, cada um utilizando um mesmo grupo de 12 isolados que foram previamente selecionados como pertencentes às classes de biocontrole 'A', 'C', 'D' e 'E', conforme os resultados do experimento de campo nº 1 (ver item 3.1.5. e Tabela 1), bem como representando os grupos genéticos I e II (SOUZA et al., 2006). Foram utilizadas, em cada experimento, seis vassouras com 12 cm de comprimento por isolado, as quais foram previamente verificadas para presença de *Cp* e ausência de *Ts* (ver item 3.1.2.). Com base nos resultados obtidos para o ponto de aplicação da suspensão padrão de esporos de *Ts* (ver

item 3.2.2), foram depositados 40 μ L dessa suspensão em uma das extremidades das vassouras. As vassouras ficaram incubadas 6 dias em câmara úmida à temperatura de 25 °C para favorecer a colonização do *Cp* pelos isolados de *Ts*. Logo após esse período, as seis vassouras/isolado foram cortadas em seis pedaços de 2 cm cada e numeradas a partir da origem do inóculo (Figura 3). Estes segmentos foram deixados em câmara úmida por mais 6 dias, visando verificar até que pedaço de vassoura, a partir da origem, foi possível identificar o surgimento das estruturas típicas de *Ts*, representando assim a velocidade com que o micoparasita colonizou as vassouras, num mesmo período de tempo. Essa medida estaria avaliando a 'agressividade' característica de cada isolado de *Ts*. Para cada um dos três experimentos, foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey a 5%, buscando-se verificar não somente a significância estatística das diferenças encontradas entre os isolados quanto aos comportamentos de agressividade nos três ensaios, mas também a consistência e reprodutibilidade da metodologia entre experimentos (repetições) e em relação aos parâmetros de campo.



Figura 3. Aspecto geral da câmara úmida utilizada com vassouras fragmentadas e numeradas a partir da origem da aplicação da suspensão de esporos.

3.3. ANÁLISES DAS PROTEÍNAS TOTAIS SECRETADAS NOS SOBRENADANTES DE CULTURAS LÍQUIDAS DE *T. stromaticum*

3.3.1 Crescimento dos isolados de *T. stromaticum* em meio de cultura TLE e coleta dos sobrenadantes

Isolados de *Ts*, selecionados com base nos seus principais contrastes – fenotípico (classes distintas de biocontrole) e genético (grupos I e II) –, e de acordo com os objetivos experimentais específicos (ver seção Resultados e Discussão), cresceram em meio de cultura líquida ‘TLE’, sendo 1 L de cada meio por isolado. Este meio foi composto por bactopectona 0,1%, uréia 0,03%, fosfato monobásico de potássio 0,2%, sulfato de amônio 0,14%, sulfato de magnésio 0,03%, cloreto de cálcio 0,03% e glicose 0,03%, além de 0,1% do estoque de ‘elementos traços’ (usados como cofatores para diversas enzimas); no preparo desta solução estoque foram utilizados 300mL de água ‘milli-Q’, ácido cítrico 2,5%, sulfato de zinco 2,5%, sulfato ferroso 0,5%, sulfato de cobre 0,125%, sulfato de manganês 0,025%, nitrato de sódio 0,025% e ácido bórico 0,025%. Dois meios distintos foram compostos, alterando-se somente a fonte de carbono; um deles incluiu (além do descrito acima) 0,5% de glicose e o outro 0,5% de pó micelial seco de *Cp*. Ambos foram esterilizados por 20 min de autoclavagem.

Ambos os meios foram inoculados com os diferentes isolados (indicados nas respectivas Tabelas e Figuras na seção Resultados e Discussão), utilizando-se 6 discos de papéis por isolado contendo os respectivos esporos preservados (ver item 3.1.1). Optou-se por esta metodologia de inoculação em detrimento à contagem de esporos em Câmara de Neubauer ao se considerar que (i) o enfoque do trabalho visou o estabelecimento de uma técnica rápida e confiável para comparação e discriminação adequada entre os isolados, buscando associar os efeitos no laboratório e no campo, (ii) experimentos preliminares no laboratório haviam sugerido que a diferença de nº de esporos entre os discos de papéis por isolado estaria numa faixa aceitável para comparações mais expeditas, e (iii) essa metodologia permitia um processamento mais rápido de uma grande quantidade de amostras ou repetições. Os meios de cultura inoculados com os isolados selecionados ficaram 6 dias incubando em agitação constante; tal

período de incubação foi assim definido não somente pela necessidade de utilizar um mesmo tempo de cultura para o procedimento de escrutínio e comparação de um grande número de isolados, mas também por corresponder ao período previamente definido no laboratório como sendo aquele em que o final da fase logarítmica e início da fase estacionária de crescimento micelial era atingido para os isolados de *Ts* (dados não publicados). Após este período de crescimento, as culturas (Figura 4a) foram coadas em papel filtro *Mellita*[®] com a finalidade de separar o sobrenadante da massa micelial produzida. Os micélios dos isolados (Figura 4b) retidos no papel filtro foram submetidos à 65 °C por 10 horas em estufa de secagem para se obter o peso seco total. Os sobrenadantes foram coletados em frascos Erlenmeyer para o procedimento de precipitação (ver a seguir). Para sete isolados estudados, foram realizadas 3 repetições de crescimento, consideradas como repetições no tempo, sendo que uma extração de proteína total do sobrenadante foi realizada para cada uma (ver Tabela 5 e item 3.3.2).



Figura 4. Crescimento de *T. stromaticum* em cultura líquida. (a) Aspecto geral da cultura em meio TLE; (b) aspecto dos micélios retirados do sobrenadante por filtração.

3.3.2. Extração de proteínas totais secretadas nos sobrenadantes dos isolados de *T. stromaticum*

Para a extração da fração proteína total secretada pelos isolados de *Ts* nos respectivos sobrenadantes, utilizou-se precipitação por sulfato de amônio, método clássico bastante utilizado em diversos estudos com proteínas secretadas em

culturas líquidas (GRINYER et al., 2005; CHANLIAUD et al., 2004; VISWANATHAN et al., 2003; LOGUERCIO et al., 2002; BARRETO et al., 1999) por permitir adequada manutenção das propriedades biológicas das proteínas existentes no meio. Para o procedimento de precipitação foram utilizados 600 mL de sobrenadante das culturas e 285 gramas do sulfato de amônio, correspondendo a 75% do sal. Cada Erlenmeyer contendo um sobrenadante foi acondicionado numa cuba de isopor com gelo, colocado sobre agitador magnético e submetido à agitação média e constante. O sulfato de amônio foi adicionado lentamente, em pequenas quantidades, esperando que cada quantidade adicionada fosse completamente dissolvida até o acréscimo da seguinte. Após todo o sulfato ser adicionado em todas as amostras, as mesmas foram deixadas a 4 °C sob agitação suave por mais 1 h, no mínimo, para completar a precipitação. Posteriormente, as amostras por isolado foram transferidas para 12 tubos adequados para centrifugação, sendo adicionados 50mL de sobrenadante para cada tubo, sendo estes centrifugados por 20 minutos sob rotação de 16000 rpm, a 4° C, iniciando assim o procedimento de extração protéica. O sobrenadante dos tubos foi descartado, deixando o pélete protéico retido nas paredes dos tubos. Os tubos foram deixados por 20 minutos na bancada invertidos sobre papel toalha com a finalidade de eliminar o máximo de resíduo do sobrenadante. Após este processo de secagem, os 12 péletes referentes a um mesmo isolado foram ressuspensos num total de 2,5 mL de tampão fosfato, solução salina (PBS, pH 7.2). Com a finalidade de retirar o restante do sal ainda retido nas amostras protéicas, estas foram submetidas à diálise, utilizando-se membranas com peso molecular de corte de 4 a 8 mil daltons. Ao serem cortadas para comporem os sacos de diálise (com capacidade para os 2,5 mL de amostra), essas membranas foram imediatamente colocadas em água destilada para hidratarem-se, antes do uso. Os sacos foram preenchidos com essas amostras protéicas, fechados adequadamente com presilhas plásticas apropriadas, e submersos em um Becker contendo 2 L de água destilada gelada. As amostras nessas condições foram deixadas *overnight* à 4 °C (dentro da geladeira), sob agitação suave e constante. Foram realizados três procedimentos de extração de proteínas totais, sendo um para cada repetição de crescimento (cultura) dos isolados (ver item 3.3.1).

3.3.3. Quantificação das proteínas totais pelo método de Bradford

Completado o período da diálise, as amostras protéicas dos isolados foram transferidas para microtubos (para comporem os estoques – ver rodapé da Tabela 5) e transferidas imediatamente para o gelo. Antes de submeter às amostras ao método de Bradford (1976) para quantificação (ver a seguir), foi construída a curva padrão de BSA (*Bovine Serum Albumine* - Sigma) para o fornecimento da equação da reta utilizada nos cálculos de concentração das proteínas totais (ver rodapé da Tabela 5). Utilizou-se uma solução inicial de BSA à $22,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo que a partir dela foram preparados 6 pontos distintos de concentrações de BSA – 0, 1,1, 2,2, 4,4, 8,8 e $17,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Além disso, foram adicionados 400 μL do reativo de Bradford e água suficiente para totalizar 2mL de volume de reação por ponto de concentração de BSA. Após o tempo de reação de 7 min, os pontos de concentração crescente de BSA foram lidos no espectrofotômetro à 595 nm, gerando as seguintes leituras (na mesma ordem das concentrações acima): 0,000, 0,089, 0,138, 0,247, 0,433, 0,836. A equação da reta de regressão linear correspondente foi ‘ $Y = 0,0462X + 0,028$ ’, sendo ‘Y’ o valor de absorbância lido a 595 nm e ‘X’, a concentração protéica (em $\mu\text{g.mL}^{-1}$); a linearidade da função pôde ser verificada pelo alto valor do coeficiente de regressão obtido, isto é $R^2 = 0,9974$. Foram realizadas mais duas curvas padrão para duas outras repetições de crescimento dos isolados (ver Tabela 5), sendo as mesmas conduzidas de forma igual a descrita acima, e obtendo-se valores de R^2 de mesma magnitude (dados não mostrados).

A avaliação da concentração de proteínas totais nas amostras (repetições de crescimento-extração por isolado – Tabela 5; itens 3.3.1 e 3.3.2) foi então realizada em tubos de ensaio estéreis, sendo adicionados e homogeneizados, por tubo de reação, 50 μL de amostra protéica + 1550 μL de água milli-Q + 400 μL do reativo de Bradford, sendo deixados incubar por 7 min à temperatura ambiente, da mesma forma que realizado para a obtenção das curvas-padrão de BSA (ver acima). Decorrido este período, foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro, registrando suas densidades ópticas em comprimento de onda de 595 nm. Três reações e leituras foram realizadas por cada amostra protéica (repetição), sendo o valor de absorbância utilizado para os cálculos de

concentração (ver Tabela 5) igual à média dessas 3 leituras; praticamente não houve variações de leitura entre essas 3 reações por amostra, motivo pelo qual não foram mostradas. A concentração de proteína das amostras foi verificada, substituindo-se os valores de absorvância correspondentes nas respectivas equações de reta das curvas padrão de BSA, de acordo com a repetição de crescimento dos isolados; as 3 repetições de crescimento para os isolados 14, 56, 64, 323, 639, 643, 658 são mostradas na Tabela 5.

3.3.4. Inibição *in vitro* da germinação de basidiosporos de *M. pernicioso* pela fração proteínas totais dos isolados de *T. stromaticum*

Para testar o efeito inibitório das proteínas totais de *Ts* secretadas nos dois meios de cultura líquida – ‘TLE + glicose’ e ‘TLE + pó-de-*Cp*’ (ver item 3.3.1.) –, contra a germinação de basidiosporos de *Cp*, foram utilizadas amostras protéicas de 10 isolados pertencentes a classes contrastantes no efeito de biocontrole sobre *Cp*, de acordo com os resultados do primeiro experimento de campo (ver item 3.1.2.); desses 10 isolados, cinco pertenceram à classe ‘A’ e cinco às classes ‘D+E’. Sobre placas de Petri contendo meio ágar-água 2% solidificado foram acrescentados misturas padronizadas de esporos com proteínas totais, sendo sempre 20 µL de basidiosporos de *Cp* a 1×10^6 esporos.mL⁻¹ para cada tratamento de proteínas totais extraídas dos 10 isolados; esses tratamentos consistiram em cinco diferentes quantidades de proteínas por isolado (0,1, 0,5, 1,0, 5,0 e 10,0 µg) para a mesma quantidade de basidiosporos (ver acima). As misturas de basidiosporos com proteínas foram espalhadas nas placas contendo o meio água-agar e deixadas incubando por 4,5 h, em capela de fluxo laminar, à temperatura ambiente. Na placa de Petri do controle foi adicionada somente a solução de basidiosporos com água. Após esse período, aplicou-se uma gota do corante ‘azul de algodão’ a 20% em lactofenol, para cessar o crescimento do tubo germinativo dos basidiosporos; a determinação da porcentagem de germinação dos basidiosporos foi realizada em microscópio óptico (Figura 5), correspondendo à média de observações feitas para três lâminas de cada placa. Esse experimento foi repetido uma vez mais, obtendo-se os mesmos resultados.

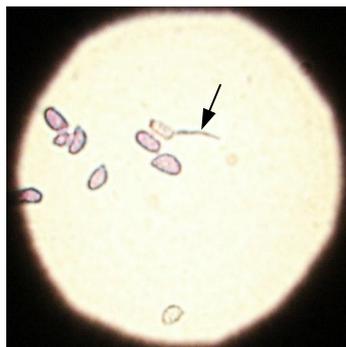


Figura 5. Microfotografia de basidiósporos de *M. pernicioso* evidenciando germinação (seta).

3.3.5. Atividade enzimática de quitinase e glucanase na fração proteínas totais de isolados de *T. stromaticum*

Amostras protéicas extraídas de oito isolados, representantes de classes de biocontrole distintas (três pertencentes à classe 'A', um à classe 'C', dois à classe 'D', e dois à classe 'E' – ver Tabelas 6 e 7) e crescidos nos dois meios de cultura (ver item 3.3.1.), foram utilizadas para determinar a atividade específica de dois tipos de enzimas hidrolíticas que atuam na lise de paredes celulares de fungos – quitinases e glucanases –, tendo sido realizadas de duas a três medições distintas em momentos independentes, correspondendo às repetições de crescimento e extração protéica por isolado (repetições no tempo – ver itens 3.3.1 e 3.3.2, e Tabela 5). Os isolados foram comparados por atividades enzimáticas expressas de forma relativa, isto é, pela razão entre os valores de densidade óptica (OD) das respectivas reações e a quantidade de proteína total aplicada na reação (ver Tabela 6), e entre essas ODs e o peso seco de micélio (ver Tabela 7). Foram avaliadas essas duas atividades para os dois tipos de fonte de carbono no meio TLE, para cada um dos oito isolados de *Ts*. Os micélios, sobrenadantes e extratos protéicos correspondentes às repetições de crescimento dos isolados e, portanto, as atividades enzimáticas, foram obtidos após o tempo de cultura padronizado de 6 dias, previamente determinado para o estabelecimento de metodologia de escrutínio *in vitro* por isolados de *Ts* eficientes a campo (ver item 3.3.1).

A atividade de quitinase nas amostras de proteínas totais foram determinadas utilizando-se como substrato o composto 'carboximetilquitina-remazol violeta brilhante' (*CM-Chitin-RBV*, Loewe Biochemica GmbH, a uma

concentração estoque de 2 mg.mL⁻¹). Em cada microtubo de reação foram adicionados 50 µL da amostra protéica extraída (ver itens 3.3.1, 3.3.2 e 3.3.3), 200 µL do substrato acima e 550 µL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0). As reações foram agitadas por 2 s no vórtex e incubadas à 37 °C em banho-maria por 2 h. A reação foi interrompida pela adição de 200 µL de HCl 2 N, sendo resfriada no gelo por 15 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min à 14.000 rpm. As absorbâncias dos sobrenadantes das amostras contendo oligômeros solúveis de *CM-chitin-RBV* (indicando a atividade enzimática) foram determinadas a 550 nm em espectrofotômetro. Ao tubo correspondente ao 'branco', foi adicionado 400 µL de tampão acetato de sódio, 200 µL de água e 200 µL do substrato *Chitin*. O aparelho foi zerado com água destilada antes de proceder às leituras das amostras. Os valores de atividade relativa estimados para os isolados e repetições de crescimento testados aparecem nas Tabelas 6 e 7, sendo os correspondentes valores médios apresentados aqueles utilizados nas análises de regressão-correlação (ver item 3.3.6).

A atividade de glucanase nas amostras foram determinadas utilizando-se como substrato o composto 'carboximetilcurdian-remazol azul brilhante' (*CMCurdian-RBB*, Loewe Biochemica GmbH, a uma concentração estoque de 4 mg.mL⁻¹). Em cada microtubo de reação foram adicionados 200 µL da amostra protéica (ver acima), 200 µL do substrato acima e 400 µL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0). As reações foram agitadas por 2 s no vórtex e incubadas à 37 °C em banho-maria por 2 h. A reação foi interrompida pela adição de 200 µL de HCl 2N, sendo resfriada no gelo por 15 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min à 14.000 rpm. As absorbâncias dos sobrenadantes das amostras contendo oligômeros solúveis de *CM-Curdian-RBB*, foram determinadas a 600 nm em espectrofotômetro. Ao tubo correspondente ao 'branco', foi adicionado 400 µL de tampão acetato de sódio, 200 µL de água e 200 µL do substrato *Curdian*. O aparelho foi zerado com água destilada antes de proceder às leituras das amostras. Os valores de atividade relativa estimados para os isolados e repetições de crescimento testados também aparecem nas Tabelas 6 e 7, sendo os correspondentes valores médios apresentados aqueles utilizados nas análises de regressão-correlação (ver a seguir).

3.3.6. Análises estatísticas

Análises de variância (ANOVA) e de comparação de médias (Tukey a 5% e 1%), quando aplicadas, foram realizadas utilizando-se o *software* estatístico 'SAEG' versão 8.0 da Universidade Federal de Viçosa-MG (RIBEIRO Jr., 2001). Análises de regressão-correlação foram realizadas compondo-se matrizes com diversos pares de dados, conforme explicitado a seguir; essas matrizes foram correlacionadas, utilizando os comandos específicos do programa *MS Excell*[®] para retornar os coeficientes de correlação '*R*'. Os pares de dados estudados incluíram de um lado os valores individuais (por isolado) dos três parâmetros de campo (percentuais de esporulação de *Ts*, ou incidência, ou severidade residual de *Cp* - ver itens 3.1.3. e 3.1.4.), e do outro, os percentuais de germinação de basidiosporos de *Cp* (ver item 3.3.4), sendo os resultados correspondentes apresentados na Tabela 8; para esta análise de correlação utilizou-se pares de dados para cinco isolados representantes da classe 'A' e cinco das classes 'D+E' (ver item 3.3.4), num total de 10 pontos. De forma semelhante, procedeu-se com análise de correlação envolvendo os parâmetros de campo acima em relação às atividades enzimáticas avaliadas (ver item 3.3.5), bem como destas em relação aos percentuais de inibição de basidiosporos de *Cp*, sendo esses resultados apresentados na Tabela 9. Para esta análise, utilizou-se os dados para isolados de diferentes classes de biocontrole (ver item 3.3.5 e Tabelas 6 e 7), sendo a inibição de germinação de basidiosporos e as atividades enzimáticas baseadas nas proteínas totais extraídas dos sobrenadantes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE INTERAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Trichoderma stromaticum* COM *Moniliophthora perniciosa* EM VASSOURAS SECAS EM CONDIÇÕES DE CAMPO

Os resultados dos dois experimentos de comparação entre isolados quanto aos efeitos de biocontrole, os quais foram realizados em condições de campo típicas de lavoura cacaueteira, mas em condições climáticas distintas, são mostrados nas Tabelas 1 e 2. Em geral, pôde ser observada uma variabilidade fenotípica muito grande no comportamento dos 64 isolados de *T. stromaticum* (*Ts*) testados em relação aos seus efeitos de antagonismo, considerando os parâmetros de campo avaliados, isto é, percentual de esporulação dos isolados ao final dos experimentos de campo (Figura 6a) e presença residual do micélio branco característico de *M. perniciosa* (*Cp*), avaliado por incubação em câmara úmida no laboratório das vassouras (esporuladas e não-esporuladas) trazidas do campo (Figura 6b). No primeiro experimento (Tabela 1) em que as condições climáticas foram caracterizadas principalmente por níveis maiores de precipitação pluviométrica durante o período experimental (Figura 6c), os valores por isolado de esporulação a campo variaram desde 19,05% até 100,0%, os de incidência residual de *Cp* desde 0,0 até 83,3%, e severidade residual de 0,0 a 68,5%. Possíveis explicações para tal variação podem estar associadas à própria variação genética entre os isolados (SOUZA et al., 2006) combinadas com as variações climáticas específicas durante o experimento, o que já foi demonstrado exercer papel relevante na biologia desta interação, de modo que respostas isolado-específicas ocorrem para determinados padrões de variação nos

parâmetros meteorológicos (SANTOS, 2005). Outros aspectos do experimento que não puderam ser controlados, mas que podem também ter sido responsáveis por essa variação do comportamento de biocontrole dos isolados a campo seriam (i) uma possível quantidade variável (desuniforme) de micélio de *Cp* presentes nas vassouras utilizadas, (ii) uma eventual variação não percebida na quantidade de esporos de *Ts* aplicados nos ensaios, e (iii) a impossibilidade de se uniformizar as vassouras selecionadas para o teste em termos de idade, tempo e quantidade de infecção por *Cp*.

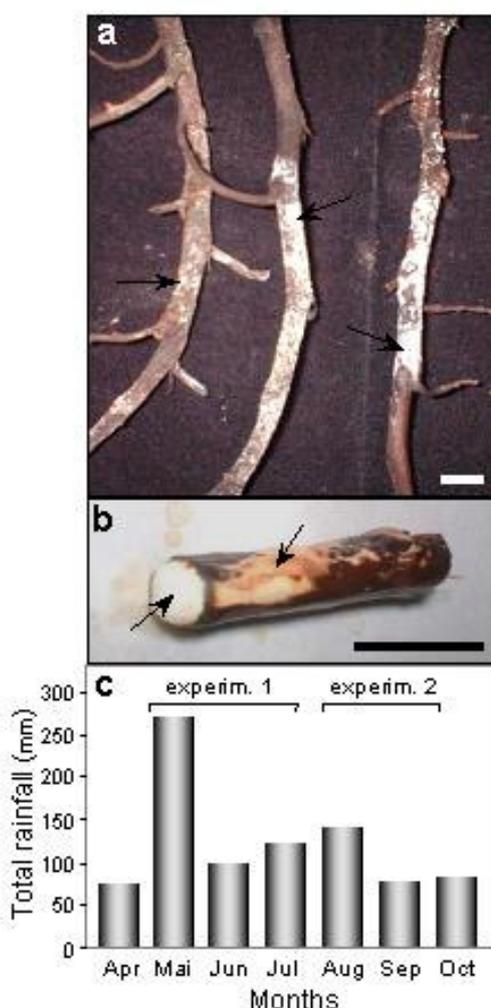


Figura 6. Parâmetros avaliados nos experimentos a campo. (a) Vassouras esporuladas por *T. stromaticum*; setas indicam esporos visíveis. (b) Presença residual de *M. perniciosa*, após câmara úmida (setas). (c) Precipitação pluviométrica nos meses dos experimentos.

Já para o segundo experimento (Tabela 2), para o qual as condições climáticas foram distintas e consideradas menos propícias para *Ts* (Figura 6c), os valores individuais para os três parâmetros de campo foram muito diferentes: variaram de 0,0% a 71,43% para esporulação de *Ts* a campo, de 41,6 a 100,0% de incidência residual de *Cp*, e de 22,2 a 81,9% de severidade. Foi observado que alguns isolados que haviam apresentado ótimo fenótipo de biocontrole no primeiro experimento comportaram-se de modo inverso no segundo, e vice-versa (Tabelas 1 e 2; dados não mostrados). Além disso, as condições climáticas no 2º experimento, no geral, parecem não ter sido favoráveis a *Ts*, mas tiveram pouco efeito em *Cp*, pois este esteve presente em abundância nas vassouras, após o experimento de campo (Tabela 2). Observando-se o comportamento de mudança de classe fenotípica (ver discussão detalhada a seguir) entre os experimentos para os isolados apresentados como representantes das classes e dos dois grupos genéticos, os resultados corroboram evidências anteriores de que os grupos I e II, como grupos, não diferenciaram-se estatisticamente entre si, tanto em termos de eficiência geral de biocontrole, quanto em termos de variação fenotípica entre isolados, dentro de cada grupo (SOUZA et al., 2006).

Devido à grande plasticidade fenotípica observada em ambos experimentos de campo, evidenciada pelos comportamentos individuais diferentes dos isolados (dentro e entre experimentos), bem como devido à observação preliminar de que existiria uma possível associação inversa entre esporulação a campo e presença residual de *Cp*, surgiu a necessidade de classificar os 64 isolados em grupos fenotípicos de biocontrole, para estudá-los melhor. Os critérios de forma geral estabelecidos para as faixas classificatórias (rodapés das Tabelas 1 e 2) basearam-se nas evidências de antagonismo contra *Cp* nos dois experimentos a campo, avaliados pela incidência residual do patógeno. Assim, no 1º experimento, os isolados que apresentaram ausência de *Cp* residual foram classificados como bons antagonistas, estando representados na classe 'A', enquanto aqueles com os maiores percentuais de presença residual de *Cp* (acima de 60%), contrastando fortemente com a classe anterior, foram agrupados na classe 'E' (Tabela 1). As demais classes foram estabelecidas com base em limites intermediários de presença de *Cp* residual. Em contrapartida, 57 dos 64 isolados testados no 1º experimento (isto é, 89% dos isolados) apresentaram, durante o 2º experimento,

presença residual de *Cp* superior à 60%, enquadrando-se na classe E, provavelmente devido às condições climáticas menos favoráveis, como já discutido acima. Contudo, ainda houve variabilidade de comportamento fenotípico entre eles, apesar de menor, de modo que foi possível agrupá-los em subclasses da classe E, seguindo o mesmo princípio da classificação do 1º experimento, isto

Tabela 1. Resultados do experimento de campo nº 1, avaliando o comportamento de biocontrole de 64 isolados de *T. stromaticum*, aplicado às vassouras em 9 de maio de 2003, e avaliadas durante três meses ¹.

Classes fenotípicas ²	Nº isolados	Isolados representantes ³		Esporulação <i>T. stromaticum</i> a campo (%) ⁴	Presença residual <i>M. pernicioso</i> (%) ⁵	
		G I	G II		Incidência	Severidade
A	12	14, 642, 643, 673	56	80,2	0,0	0,0
B	12	115	-	77,0	16,0	6,0
C	18	74	323	65,6	33,0	15,9
D	12	639	64, 113, 408, 657	64,3	53,6	22,2
E	9	647, 667, 678	658	46,6	69,2	40,4
ctrl	-	-	-	0,0	100,0	59,2

¹ Período com níveis mais altos de precipitação, considerado como uma melhor condição para o desempenho do *T. stromaticum* (*Ts*).

² Classificação de biocontrole de *M. pernicioso* (*Cp*), baseada na sua presença residual ('incidência'), avaliada em câmara úmida; classe 'A': incidência residual nula de *Cp*; 'B': incid. resid. de *Cp* até 25%; 'C': incid. resid. de *Cp* entre 25% e 40%; 'D': incid. resid. de *Cp* entre 40% e 60%; 'E': incid. resid. de *Cp* acima de 60%; 'ctrl' corresponde ao controle das vassouras não tratadas com *Ts*.

³ Refere-se aos dois grupos genéticos (G I e G II), descritos por análise de AFLP (SOUZA et al., 2006); dos 64 isolados testados, 55 pertencem ao G I e 9 ao G II.

⁴ Percentuais médios de esporulação de *Ts* ao fim do período experimental no campo, considerando o nível de esporulação individual dos isolados dentro de cada classe de biocontrole.

⁵ As vassouras trazidas do campo foram cortadas em número igual de pedaços, os quais foram incubados em câmara úmida por sete a 10 dias; a 'incidência' residual corresponde aos percentuais médios de vassouras nas quais o micélio branco de *Cp* foi identificado após a câmara úmida, enquanto a 'severidade' representa os percentuais médios de pedaços em que o *Cp* foi detectado.

Tabela 2. Resultados do experimento de campo nº 2, avaliando o comportamento de biocontrole de 64 isolados de *T. stromaticum*, aplicado às vassouras em 31 de julho de 2003, e avaliadas durante dois meses e meio ⁶.

Classes fenotípicas ⁷	Nº isolados	Isolados representantes		Esporulação <i>T. stromaticum</i> a campo (%)	Presença Residual <i>M. pernicioso</i> (%)	
		G I	G II		Incidência	Severidade
E1	8	642	658	33,9	55,8	33,3
E2	22	14, 667, 673	56, 323, 657	28,1	71,2	48,0
E3	14	115, 643, 647	113	11,9	82,9	62,5
E4	21	74, 639, 678	64, 408	11,8	93,4	74,3

⁶ Período com mais baixos níveis de queda de chuva.

⁷ Classificação de biocontrole de *Cp*, com limites de classes diferentes em relação ao 1º experimento ('E1': incidência residual de *Cp* entre 40% e 65%; 'E2': incid. resid. de *Cp* entre 65% e 80%; 'E3': incid. resid. de *Cp* entre 80% e 90%; 'E4': incid. resid. de *Cp* entre 90% e 100%).

é, subclasse 'E1' correspondeu aos menores percentuais de *Cp* residual (maiores níveis de biocontrole), descendo gradativamente a eficiência de biocontrole até a classe 'E4', com os maiores percentuais de *Cp* residual (Tabela 2).

Uma vez definidas as classes de biocontrole para os dois experimentos de campo, calculou-se as médias por classe para os três parâmetros de campo, a partir dos valores individuais dos isolados pertencentes a cada classe; essas médias são apresentadas nas colunas da direita das Tabelas 1 e 2. Observando-se essas médias entre os experimentos, é possível confirmar a maior distribuição de comportamento fenotípico (maior variação) dos isolados de *Ts* para o primeiro experimento em relação ao segundo (ver acima). Conforme discutido acima, observou-se um decréscimo geral na eficiência de controle biológico dos isolados no 2º experimento, o que pode ser atribuída às diferentes condições climáticas vigentes em cada um destes experimentos (Figura 6c); para o primeiro, elas puderam ser consideradas favoráveis à esporulação de *Ts* por ter sido realizado

num período bastante chuvoso, em que os parâmetros climáticos umidade relativa do ar, umidade das vassouras, temperatura do ar, radiação solar e velocidade do vento provavelmente comportaram-se de forma coordenada e favorável à biologia do antagonista (SANTOS, 2005). Outros trabalhos já haviam demonstrado a importância da umidade do ar e das vassouras para a esporulação de *Ts* (SANOGO et al., 2002). Já para o 2º experimento, as condições de umidade, temperatura, radiação solar, velocidade do vento (além de outros fatores) provavelmente comportaram-se aquém dos níveis considerados adequados para a biologia geral de *Ts*, levando a este efeito geral de menor eficiência de CB. Observações de dados climáticos coletados na região do experimento sugerem fortemente que isso, de fato, deve ter ocorrido (dados não mostrados).

Apesar dos valores absolutos terem sido diferentes nos dois experimentos, a definição de classes de biocontrole para ambos permitiu a confirmação de uma tendência que era apenas sugerida pelos dados individuais, isto é, a associação entre maiores níveis de esporulação de *Ts* a campo e menores níveis de presença residual de *Cp* no laboratório, tanto para os valores de incidência quanto para os de severidade. Essa associação foi estatisticamente confirmada pela análise de regressão linear realizada (Figura 7), utilizando-se as médias de esporulação de *Ts* e de presença residual de *Cp* apresentadas para as respectivas classes de biocontrole (Tabelas 1 e 2). Essa associação já havia sido fortemente sugerida em experimentos independentes com apenas cinco dos 64 isolados, tendo sido confirmada por teste de médias Tukey a 5% de significância (SANTOS, 2005). Os resultados sugerem, assim, haver uma correlação importante entre esses dois parâmetros, a qual só pôde ser adequadamente observada quando se realizou uma 'análise de grupos'. Além disso, com base nessa correlação negativa, entende-se que a observação do percentual de esporulação de *Ts* de forma comparada entre isolados (ou grupos) pode servir como adequado parâmetro de seleção para melhores efeitos de controle biológico de *Cp*.

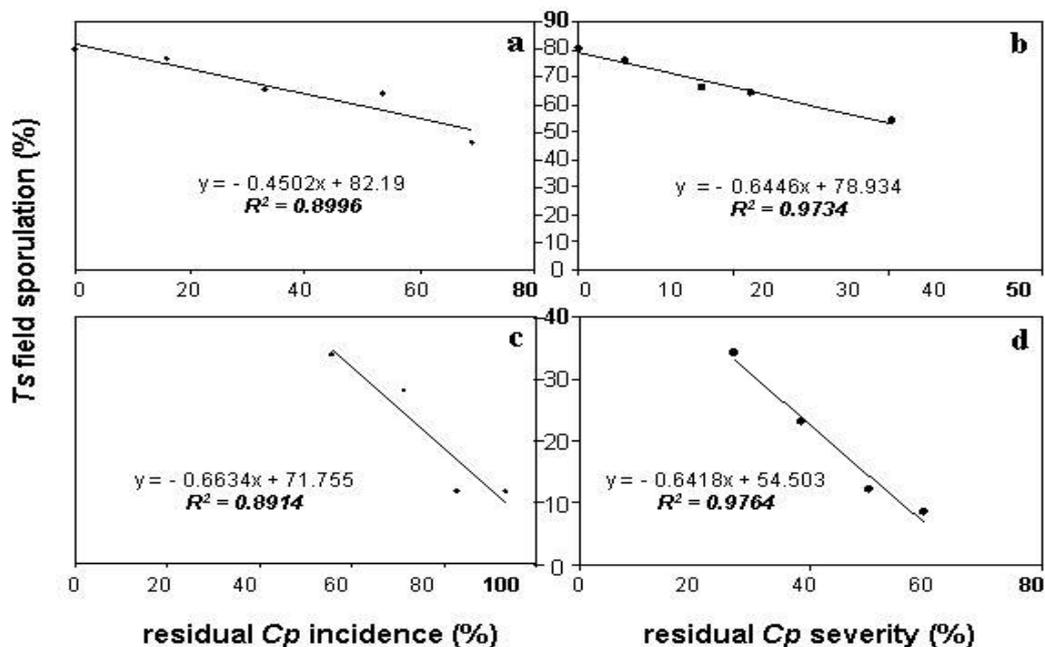


Figura 7. Análise de regressão linear entre os parâmetros de campo para as classes de biocontrole estabelecidas (vide Tabelas 1 e 2); (a) e (b) correspondem ao primeiro experimento de campo e (c) e (d) ao segundo.

Diante destes experimentos conduzidos a campo, foi possível observar que as condições climáticas podem ser determinantes nos resultados fenotípicos de biocontrole, de tal modo que: (i) isolados responderam de forma específica às variações meteorológicas; (ii) essa resposta foi individual e não aparentou estar associada de maneira específica a nenhum dos dois grupos genéticos; (iii) essa resposta alterou a forma relativa com que os isolados se compararam, isto é, fez alguns isolados mudarem de posição de biocontrole em relação aos demais enquanto outros mantiveram sua posição, após mudarem de uma condição climática para outra. Esses resultados corroboram trabalho anterior em que foram evidenciados os efeitos do microclima nos parâmetros de esporulação de *Ts* a campo e incidência e severidade residuais de *Cp* no laboratório (SANTOS, 2005).

Tomados em conjunto, os resultados deste trabalho sugerem que estratégias de escrutínio por isolados de *Ts* mais eficientes no CB de *Cp* provavelmente oferecerão melhores informações e resultados se for utilizado ‘análise de grupo’, sendo que esporulação a campo seria um adequado parâmetro de seleção. Além disso, os resultados apresentados indicaram claramente que há alguns isolados que se mantêm consistentes no seu fenótipo de biocontrole em

relação aos demais; por exemplo, os isolados 642, 14 e 673 do grupo I, e o 56 e 323 do grupo II enquadraram-se nas classes superiores em ambos os experimentos (Tabelas 1 e 2). Outros isolados não apresentados nas Tabelas e que foram classificados nas categorias de biocontrole superiores em ambos os experimentos – sendo, portanto, os isolados recomendados para aplicação no campo juntamente com os descritos acima – foram o 666 (classes ‘A’ e ‘E1’), 661 e 654 (‘B’ e ‘E1’), e 646, 679, 645, 637 e 557 (‘B’ e ‘E2’), todos pertencentes ao grupo I (dados não mostrados). Este seria um critério óbvio e relevante para seleção de isolados mais promissores para aplicação a campo, pois incluiria os isolados que se comportaram de forma relativamente superior, independentemente das condições climáticas e ambientais existentes.

4.2. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO *IN VITRO* DE ISOLADOS DE *T. stromaticum* A 25 E 30 °C COM PARÂMETROS DE CAMPO

Os experimentos de antagonismo *Ts-Cp* a campo apresentados mostraram-se fundamentais para se entender o comportamento relativo (comparado) de isolados de *Ts*, nas condições em que serão utilizados como agentes de biocontrole (Tabelas 1 e 2; Figuras 6 e 7). Contudo, requerem área experimental de campo para sua execução e tempo relativamente longo para a coleta das informações e análises. Uma metodologia de escrutínio compatível com os resultados de campo, mas realizada em condições de laboratório, seria bastante vantajosa. A série de experimentos e resultados apresentados nos itens a seguir representam a busca por estratégias metodológicas que permitissem avaliar *in vitro* coleções de isolados de *Ts*, com o objetivo de identificar diferenças de comportamento de antagonismo e selecionar potenciais biocontroladores mais eficientes. Utilizou-se como critério básico para esses estudos a associação dos resultados *in vitro* com os obtidos a campo.

Dados preliminares foram obtidos no laboratório, envolvendo experimentos *in vitro* realizados por outro pesquisador (ver item 3.2.1), nos quais haviam sido avaliados o crescimento radial em placa e a esporulação em duas temperaturas diferentes - 25 e 30 °C - para os 64 isolados de *Ts* testados a campo.

Considerando a enorme variabilidade fenotípica encontrada nos dados de campo (Tabelas 1 e 2; item 4.1.), procurou-se verificar se algum desses parâmetros previamente medidos *in vitro* estaria, de alguma forma, associado à incidência ou severidade residual de *Cp*, verificados no laboratório. É importante mencionar que somente os dados do 1º experimento foram utilizados para a análise de correlação, devido à maior variação fenotípica entre os isolados, bem como ao fato das condições climáticas terem permitido resultados mais consistentes de biocontrole. Conforme verificado na Tabela 3, os valores dos coeficientes de correlação '*R*' foram muito baixos (crescimento a 25 °C), ou com sinal inadequado para expressarem alguma significância biológica (crescimento a 25 °C e esporulação em ambas temperaturas), não fornecendo, dessa forma, uma correlação entre os dados *in vitro* e a presença residual de *Cp* nas vassouras previamente tratadas com os isolados de *Ts*. Essa ausência de correlação pode ser explicada pelos fatores ambientais (climáticos) que, a campo, sofrem intensa variação diária (SANTOS, 2005), enquanto que *in vitro* eles são controlados e constantes. Desse modo, a resposta individual dos isolados tende a ser menos variável *in vitro* do que em relação às condições de campo. Uma outra possibilidade para explicar ausência de correlação entre os dados seria o fato de 'esporos' ter sido o tipo de inóculo para os experimentos de campo, enquanto 'discos de micélio' (provenientes das bordas das placas previamente crescidas com os isolados) foram usados para o inóculo dos experimentos *in vitro*; contudo, a experiência prévia do grupo com crescimento *in vitro* de *Ts* a partir de esporos sugere essa possibilidade como sendo menos provável.

Tabela 3. Análise de correlação¹ entre a presença residual de *M. pernicioso* em vassouras tratadas com os diferentes isolados de *T. stromaticum* (experimento nº 1 de biocontrole a campo) e os respectivos crescimentos e esporulações *in vitro* a 25 °C e 30 °C.

Parâmetros <i>in vitro</i> – <i>T. stromaticum</i>		1º experimento de campo	
		incidência residual <i>M. pernicioso</i>	severidade residual <i>M. pernicioso</i>
Crescimento	25 °C	-0,0897	-0,0899
	30 °C	0,2507	0,2669
Esporulação ²	25 °C	0.3968	0.2366
	30 °C	0.2527	0.1032

¹ Os dados na tabela correspondem aos coeficientes de correlação entre os parâmetros, calculado pela raiz quadrada do coeficiente de regressão linear (R^2).

² O número de pares de dados analisados na regressão linear foram distintos para cada temperatura, pois (i) nem todos os 56 isolados do grupo genético I esporularam *in vitro* à 25 °C (somente ~30% dos testados), (ii) nenhum deles esporularam à 30 °C, e (iii) todos os nove isolados do grupo II esporularam *in vitro* em ambas temperaturas.

4.3. AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE COLONIZAÇÃO DE VASSOURAS SECAS POR ISOLADOS DE *T. stromaticum* EM RELAÇÃO AO PONTO DE APLICAÇÃO INICIAL DOS ESPOROS

Considerando que o modo de aplicação de *Ts* nas vassouras a campo é feito por pulverização de suspensões de esporos, foi importante verificar se os pontos de germinação, penetração e colonização de *Ts* ocorrem somente pelas aberturas (extremidades) das vassouras, ou também pelo ‘lenho’ (parte central) das mesmas. Três isolados de *Ts* foram utilizados para este teste e observou-se que, quando aplicados nas aberturas das vassouras (pontas livres), apresentaram colonização e esporulação superior à aplicação de esporos feita na parte central (meio) das vassouras (Figura 8), sendo estas com as extremidades fechadas cobertas com parafina. Considerando os três isolados simultaneamente, observou-se uma tendência de aumento na frequência de esporulação de *Ts* com aplicação central após 12 dias de incubação, enquanto que o padrão encontrado

para aplicações nas extremidades foi semelhante em 6 e 12 dias (Figura 8). Isto sugere que o tempo que o *Ts* leva para penetrar e desenvolver-se internamente na vassoura é maior quando a aplicação é central, provavelmente devido à existência da casca (lenho) a ser ultrapassado pelo micélio de *Ts*. Essas informações podem ser consideradas importantes metodologicamente para instruir outros pesquisadores quanto aos parâmetros gerais de avaliação a serem considerados, dependendo do objetivo da pesquisa e da forma como a aplicação de esporos será feita.

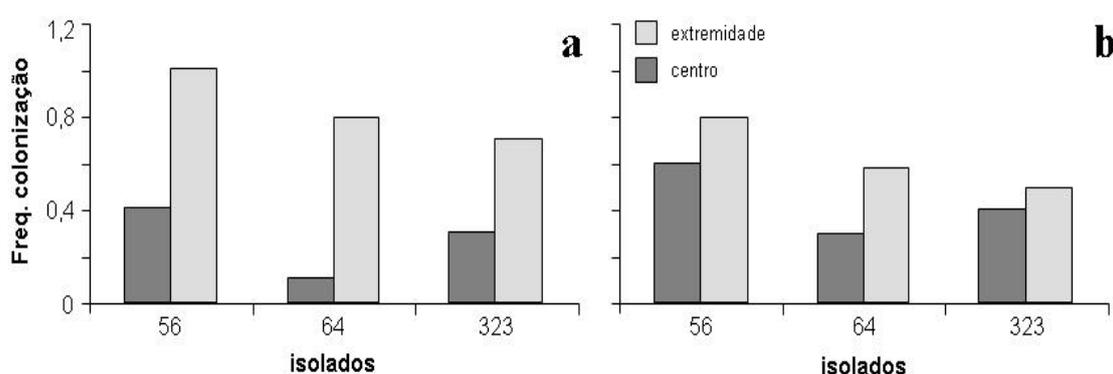


Figura 8. Frequência de esporulação de *T. stromaticum* em vassouras com aplicação da suspensão de esporos por dois métodos distintos; resultados após 6 dias (a) e 12 dias de incubação (b).

4.4. CARACTERIZAÇÃO DA VELOCIDADE DE COLONIZAÇÃO (AGRESSIVIDADE) DE VASSOURAS POR DIFERENTES ISOLADOS DE *T. stromaticum*

A partir dos resultados obtidos com o ponto de aplicação inicial dos esporos (item 4.3.) e com o intuito de verificar a possibilidade de se estabelecer uma metodologia *in vitro* para selecionar isolados de *Ts* que correlacionassem adequadamente com os resultados dos experimentos de campo, procedeu-se neste experimento com a comparação dos isolados quanto às suas respectivas velocidades para colonizar, a partir da aplicação dos esporos em uma das extremidades, uma maior distância dentro das vassouras. Estas, antes de participar do experimento, haviam sido previamente selecionadas para presença de *Cp*, através de câmara úmida (ver item 3.1.2.). A velocidade de colonização foi

assumida, portanto, como a 'agressividade' que cada isolado possui ao exercer o micoparasitismo. Em nossas condições experimentais, essa agressividade foi medida de acordo com a quantidade de fragmentos que foram colonizados pelo *Ts*, pois se esperava que isolados mais agressivos colonizassem um maior número de fragmentos (atingindo mais longe da extremidade de aplicação) e, portanto, seriam os mais eficientes no controle biológico.

Conforme evidenciado na Figura 9, a variação entre os três ensaios demonstrou diferenças médias de agressividade dos isolados entre si, tanto para os pertencentes ao grupo genético I quanto para os do grupo II, mas que, provavelmente, não são estatisticamente significativas, como se pode inferir a partir dos desvios padrões apresentados. Além disso, a ordem de agressividade apresentada pelos isolados no gráfico (Figura 9a) não reflete os respectivos resultados de campo (Figura 9b), e não houve associação dos níveis de agressividade com nenhum dos grupos genéticos especificamente. Quando se considerou cada experimento como repetição, os dados também indicaram que houve uma variabilidade experimental muito grande que não foi possível controlar, causando as diferenças não significativas entre os tratamentos (Figura 9a). Este fato foi confirmado através de testes estatísticos de comparações de médias feitos para cada um dos três experimentos conduzidos, verificando-se um *ranking* diferente em cada ensaio para os mesmos isolados testados (Tabela 4). Como este teste não apresentou correlação dos isolados em relação aos resultados do experimento de campo, considerando os três ensaios separadamente (Tabela 4) ou em conjunto (Figura 9), isto indica que esta metodologia não foi adequada para diferenciar os isolados quanto ao grau de agressividade e, tampouco, para servir como método de seleção substituto aos experimentos de campo. Esta variabilidade experimental nos três experimentos, apesar das condições climáticas laboratoriais serem controladas, pode ter ocorrido devido principalmente a impossibilidade de se uniformizar as vassouras selecionadas para o teste, no que se refere a idade da vassoura, a quantidade de micélio de *Cp* presente e o espaço ocupado por este.

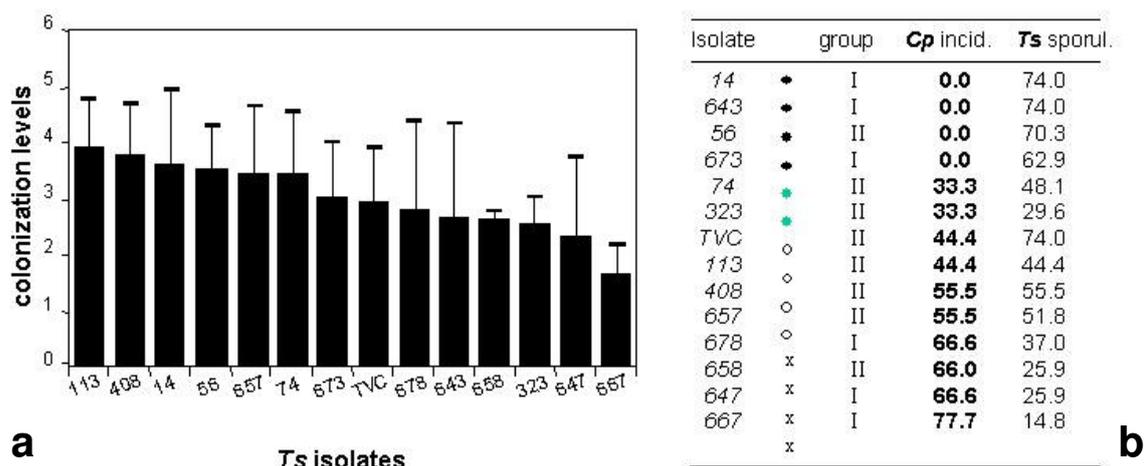


Figura 9. Análise de agressividade em vassouras-secas de 14 isolados de *T. stromaticum* contrastantes no efeito de biocontrole a campo. (a) Número médio de pedaços de vassoura colonizados por isolado; (b) ordem decrescente de eficiência de biocontrole para os isolados, de acordo com os resultados do experimento de campo nº 1.

Tabela 4. Comparação dos resultados das análises estatísticas para os três ensaios de agressividade em vassouras-secas com 16 isolados de *T. stromaticum*, contrastantes no biocontrole a campo (experimento nº 1).

isolado	ensaio nº 1			ensaio nº 2			ensaio nº 3		
	média ¹	signific ²	rank ³	média	signific.	rank	média	signific.	rank
14	4,6	AB	2	4,1	A	3	2,1	BC	8
56	3,5	ABC	8	2,8	AB	11	4,3	AB	2
64	3,5	ABC	9	3,5	AB	6	1,8	C	10
74	2,3	BCD	13	3,5	AB	7	4,5	A	1
113	4,3	ABC	4	4,5	A	1	3,0	ABC	3
323	2,6	ABCD	10	2,1	AB	14	3,0	ABC	4
408	4,1	ABC	5	4,5	A	2	2,8	ABC	6
639	0,8	D	16	3,0	AB	9	-	-	-
643	3,8	ABC	7	3,5	AB	8	0,8	C	13
647	2,6	ABCD	11	3,6	AB	4	0,8	C	14
657	4,8	A	1	2,6	AB	13	3,0	ABC	5
658	2,5	ABCD	12	2,8	AB	12	2,6	ABC	7
666	2,3	BCD	14	3,6	AB	5	-	-	-
667	2,1	CD	15	1,1	B	16	1,8	C	11
673	4,0	ABC	6	3,0	AB	10	2,1	BC	9
678	4,6	AB	3	2,0	AB	15	1,8	C	12

¹ Média de agressividade de 6 vassouras por isolado, correspondendo ao nº do último segmento (de 2 cm) de vassoura, a partir da extremidade inoculada, no qual ainda foi encontrado *T. stromaticum* (valores maiores = maior 'agressividade'; ver Metodologia, item 3.2.3.).

² Teste de médias (Tukey a 5%) tal que isolados com mesmas letras não diferem estatisticamente, dentro do ensaio.

³ Números indicam a posição (ordem) de classificação dos isolados, no ensaio, de acordo com a média.

4.5. SECREÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS POR ISOLADOS DE *T.stromaticum* EM MEIOS DE CULTURA COM DUAS FONTES DE CARBONO DIFERENTES

Considerando que muitas das proteínas (enzimas hidrolíticas) envolvidas nos mecanismos de micoparasitismo de agentes antagônicos são secretadas no meio externo (STEYAERT et al., 2003; VISWANATHAN et al., 2003), verificou-se o efeito de duas diferentes fontes de carbono em meio de cultura líquida – glicose e pó micelial seco de *Cp* – no comportamento comparado de 13 isolados de *Ts* quanto à quantidade de proteína total secretada no sobrenadante, após 6 dias de cultura. Este tempo foi utilizado ao longo do trabalho porque, além de ser necessário um mesmo período de cultura para o procedimento de escrutínio e comparação de um grande número de isolados, havia indicação em experimentos preliminares como sendo um tempo adequado, pois a produção de micélio (aumento de massa) praticamente estabiliza nesse tempo e nos dias seguintes de incubação (dados não mostrados).

Conforme mostrado na Tabela 5, pôde-se observar que, para os 13 isolados testados de *Ts*, houve aparente variação na quantidade de proteína total secretada entre os isolados; contudo, análises de variância (ANOVA) para os isolados com repetições de crescimento em relação aos parâmetros ‘conc. sobrenadante’ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e ‘proteína total sobrenadante’ ($\mu\text{g.g}^{-1}$) indicaram não haver diferença significativa ($P>0,3$) entre isolados, dentro de cada meio de cultura testado; uma análise comparativa entre as médias e erros padrões apresentados corrobora esse resultado. Isso sugere que, quanto ao parâmetro de secreção de proteínas totais no sobrenadante, os isolados comportam-se de maneira semelhante entre si para um mesmo meio de cultura. Apesar de que para os outros seis isolados testados só se dispõe de dados para uma única cultura (repetição), vale destacar que o 647 e o 678 (ambos da classe ‘E’ e do grupo I) apresentaram níveis de secreção de proteínas acentuadamente maiores quando crescidos em meio com glicose, fora da faixa geral de variação dos demais nesse meio (Tabela 5). Entretanto, a obtenção de mais dados (repetições) para esses isolados, bem como para outros do grupo I e classe ‘E’, seria necessária para esclarecer se esse grupo de isolados, de fato, caracteriza-se por maior secreção de proteínas totais nesse meio e nesse tempo de cultura.

Tabela 5. Rendimento de proteína total secretada no sobrenadante de 13 isolados de *T. stromaticum* de distintos grupos genéticos e fenótipos de biocontrole, crescidos em cultura líquida com glicose ou pó micelial seco de *M. perniciososa* como fontes de carbono, depois de seis dias de cultura.

Isol.	gr.	fen.	rep.	absorbância (595 nm)		conc. amostra ¹ (ug.mL ⁻¹)		conc. sobrenadante ² (ug.mL ⁻¹)		peso seco micélio (g)		proteína total sobrenadante ³ (ug.g ⁻¹)	
				glicose	pó-Cp	glicose	pó-Cp	glicose	pó-Cp	glicose	pó-Cp	glicose	pó-Cp
14	I	A	1	0,332	0,065	6,58	0,69			1,33	0,76		
			2	0,149	0,386	2,36	3,45			1,24	0,84		
			3	0,178	0,247	2,49	2,81	0,64 ± 0,23	0,39 ± 0,14	0,94	0,80	316,65 ± 91,61	284,25 ± 98,24
56	II	A	1	0,226	0,332	4,22	6,53			3,85	0,45		
			2	0,115	0,341	2,2	3,24			2,27	0,48		
			3	0,177	0,412	2,49	3,57	0,50 ± 0,10	0,74 ± 0,17	3,06	0,47	95,97 ± 8,16	964,62 ± 244,72
64	II	D	1	0,293	0,174	5,69	3,13			3,56	0,26		
			2	0,464	0,278	3,81	2,95			2,31	0,5		
			3	0,464	0,298	3,81	3,04	0,74 ± 0,10	0,51 ± 0,01	2,02	0,38	171,13 ± 8,87	864,62 ± 180,12
323	II	C	1	0,226	0,999	4,28	21,01			1,35	0,76		
			2	0,451	0,136	3,75	2,3			4,07	0,47		
			3	0,744	0,224	5,09	2,7	0,73 ± 0,06	1,45 ± 1,03	2,71	0,62	199,00 ± 65,16	1230,95 ± 766,90
639	I	D	1	0,407	0,302	8,09	6,81			1,56	0,34		
			2	0,086	0,125	2,07	2,25			3,26	0,54		
			3	0,168	0,164	2,45	2,43	0,70 ± 0,32	0,64 ± 0,25	1,66	0,44	243,23 ± 139,81	990,63 ± 507,67
643	I	A	1	0,534	0,078	10,9	0,97			2,5	0,53		
			2	0,123	0,383	2,24	3,43			2,73	0,49		
			3	0,179	0,085	2,5	2,07	0,87 ± 0,47	0,36 ± 0,12	2,62	0,51	204,55 ± 115,79	429,63 ± 149,71
658	II	E	1	0,446	0,078	8,98	1,08			1,73	0,75		
			2	0,405	0,414	3,53	3,58			3,76	0,63		
			3	0,521	0,143	4,07	2,33	0,92 ± 0,29	0,39 ± 0,12	2,74	0,69	253,74 ± 133,59	349,98 ± 122,63
113	II	D	-	0,153	0,204	2,79	4,89	0,47	0,82	0,78	0,7	357,69	698,57
647	I	E	-	0,662	0,241	13,85	4,65	2,31	0,78	1,54	0,53	899,35	877,36
657	II	D	-	0,101	0,092	1,64	1,51	0,27	0,25	0,82	0,6	200,00	251,67
667	I	E	-	0,226	0,078	4,17	1,1	0,70	0,18	0,69	0,71	604,35	154,93
673	I	A	-	0,089	0,323	1,32	6,34	0,22	1,06	0,55	0,55	240,00	1152,73
678	I	E	-	0,592	0,293	12,31	5,71	2,05	0,95	0,51	0,87	2413,7	656,32

¹ Concentração de proteínas totais nos 2 mL de amostra avaliada por Bradford, cujos valores correspondem à aplicação da equação da reta de regressão dos pontos avaliados na curva padrão de BSA (ver item 3.3.3).

² Valores de concentração de proteínas totais secretadas nos sobrenadantes (média ± erro padrão, quando há repetições – ver 4ª coluna da Tabela); os valores tabelados foram obtidos tomando-se os dados de concentração da amostra e multiplicando-se por 40 (fator de diluição) para obter as concentrações dos estoques; estas, por sua vez, foram divididas pelo fator 240, que é o n° de vezes que o total de proteínas precipitadas dos sobrenadantes foram concentradas (= 600mL cultura / 2,5 mL tampão PBS - ver item 3.3.2).

³ Valores médios (± erro padrão) de proteína total do sobrenadante (somente para os isolados com repetições). Os valores tabelados (em ug.g⁻¹) foram obtidos a partir da quantidade total de proteínas (em ug) no sobrenadante [= concentração do sobrenadante (ug.mL⁻¹) x volume total da cultura (600 mL)], dividida pelo peso seco (em 'g') do micélio correspondente; esse procedimento assegura a comparabilidade entre isolados, pois assume que a secreção de proteínas é aproximadamente proporcional a massa de micélio produzida num dado tempo de cultura.

Entretanto, é relevante notar que, conforme ANOVA realizada para o parâmetro 'peso seco de micélio' (g) que mede produção de massa micelial, houve diferença muito significativa ($P < 0,01$) entre os sete isolados com repetições somente quando crescidos em meio contendo pó-de-*Cp*. Isso sugere que potenciais diferenças fisiológicas entre isolados nivelam-se quando os mesmos são submetidos a meios com fontes de carbono prontamente disponível (por ex. glicose). Além disso, observa-se que, enquanto os valores de concentração de proteínas no sobrenadante foram no geral comparáveis entre os meios de cultura (Tabela 5), o peso seco de micélio para glicose tendeu a ser maior do que para pó-de-*Cp*, o que explica os valores relativos de proteína total secretada por micélio serem maiores para este último. Esse resultado é interessante, pois indica que os isolados de *Ts* crescidos em meio contendo compostos derivados de seu hospedeiro (*Cp*), no tempo de 6 dias de cultura, secretam relativamente mais proteínas que se crescidos em meio com glicose. Dito de outra forma, os isolados de *Ts* durante seu crescimento em meio com glicose (fonte de energia prontamente disponível) estariam confirmando a existência de mecanismos de repressão catabólica da síntese de proteínas secretáveis no meio externo (NORONHA et al., 2000; KUBICEK et al., 2001; MACH; ZEILINGER, 2002), refletindo, assim, na menor quantidade relativa de proteína total encontrada para os isolados crescidos em meio com glicose (Tabela 5).

Vale citar que as diferenças significativas entre as médias de peso seco micelial observadas entre os isolados crescidos em pó-de-*Cp* (Tukey a 1%) não indicaram nenhuma associação aparente com os grupos genéticos I e II, nem com classes de biocontrole (dados não mostrados). Contudo, essa informação e o fato de que a variação experimental geral observada não foi desprezível sugerem que um conjunto maior de isolados (e de repetições por isolado) seria necessário para avaliar melhor essa questão. É importante observar também que o método de contagem de esporos em Câmara de Neubauer para inoculação dos meios (ao invés de discos de papel contendo esporos) também poderia, talvez, diminuir a variação experimental observada, apesar de que a faixa de variação de peso seco de micélio entre repetições e isolados foi de mesma magnitude, dentro de cada meio testado (Tabela 5); isso sugere que a variação de taxas de crescimento do

fungo observadas fazem parte deste sistema de estudo, nessas condições experimentais.

4.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DAS PROTEÍNAS TOTAIS SECRETADAS NOS SOBRENADANTES DOS ISOLADOS DE *T. stromaticum* NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE BASIDIÓSPOROS DE *M. pernicioso*

Sabendo-se que enzimas hidrolíticas secretadas no meio externo participam ativamente do processo de micoparasitismo de *Ts*, degradando componentes de parede celular dos hospedeiros (STEYAERT et al., 2003; KUBICEK et al., 2001; CHET et al., 1998), utilizamos as proteínas precipitadas dos sobrenadantes e quantificadas nos dois meios de cultura em testes de inibição da germinação de basidiosporos de *Cp*, visando dar uma idéia qualitativa das proteínas totais secretadas (ver item anterior) em relação ao potencial de controle biológico dos isolados correspondentes. Utilizou-se as proteínas totais de isolados representantes de classes contrastantes de biocontrole (A e D+E), com ambos os grupos genéticos representados em cada classe, sendo que para o tratamento controle foi adicionado apenas água aos basidiosporos. Como não se possuía informações prévias sobre qual quantidade de proteínas totais em nosso sistema de estudo permitiriam comparar os efeitos na germinação de basidiósporos, optou-se por utilizar quantidades progressivas de proteínas totais para cada isolado, buscando-se distanciar as quantidades extremas em 100 vezes. Para a quantidade mais baixa de proteínas totais utilizadas (0,1 µg), para ambas as fontes de carbono testadas, os percentuais de germinação foram semelhantes ao do controle, isto é, ao redor de 80% (Figura 10). A partir desse ponto, foi observado um decréscimo progressivo no percentual de basidiosporos germinados à medida que aumentava a quantidade protéica. Os resultados demonstraram que este efeito inibitório na germinação para os representantes da classe 'A' foi verificado em maior evidência em relação à classe 'D+E', para as maiores quantidades de proteína total utilizada nos dois meios de cultura, reforçando assim, em relação ao experimento de campo, o bom antagonismo dos isolados pertencentes à classe A. Em geral, observou-se que no meio com

glicose, para ambas as classes de biocontrole, o número de basidiosporos não germinados foi superior em relação ao meio com pó micelial de *Cp*. Além disso, a variação experimental observada pelos erros padrões dos percentuais médios de germinação de basidiósporos (Figura 10) foi compatível com o número de isolados utilizados (cinco) como representantes de cada classe. Observou-se, portanto, que a fração proteínas totais secretadas nos sobrenadantes de *Ts* possui componente(s) capazes de bloquear a germinação de basidiosporos de *Cp* e que esse bloqueio associa-se de forma consistente com as classes de biocontrole definidas a campo. Esse resultado sugere que, ao menos quando se considera as classes mais contrastantes entre si, a inibição da germinação de basidiosporos do patógeno é capaz de discriminar adequadamente os antagonistas bons dos ruins, sendo, então um parâmetro *in vitro* com potencial de uso no escrutínio antecipado em laboratório por isolados mais eficientes no Controle Biológico de *Cp* a campo.

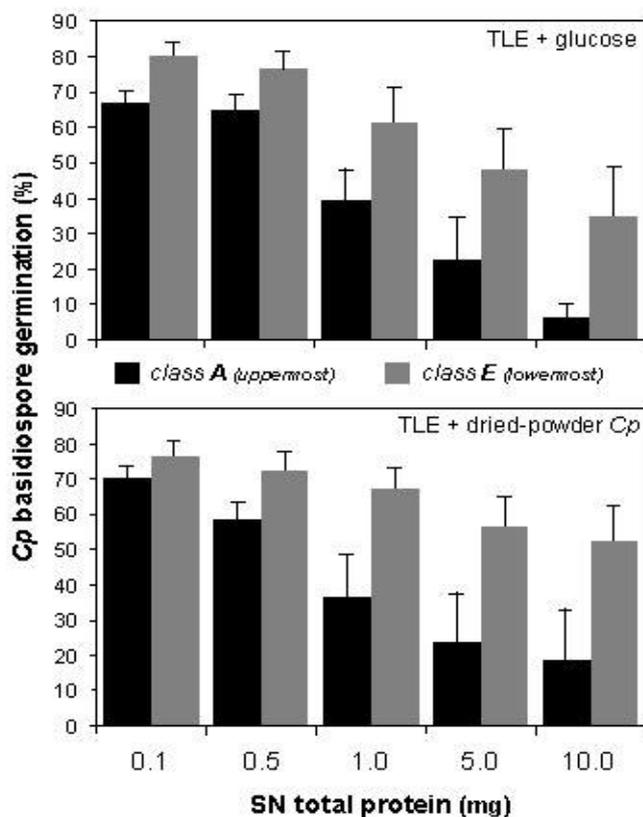


Figura 10. Efeito inibitório na germinação de basidiosporos de *M. perniciosus* das proteínas totais secretadas no sobrenadante de isolados de *T. stromaticum*, crescidos em meio de cultura com duas fontes de carbono e pertencentes a classes contrastantes de biocontrole a campo.

Conforme verificado a seguir (item 4.8), a análise de regressão-correlação realizada para esses parâmetros *in vitro* e a campo corroboraram essa possibilidade. Se levarmos em consideração que não houve diferença significativa de secreção de proteínas totais no sobrenadantes entre os isolados testados para um mesmo meio de cultura (Tabela 5), e que a maior secreção relativa de proteínas por massa de micélio ocorreu no meio com pó-de-*Cp*, é reforçada a idéia de que as diferenças entre isolados quanto à inibição de germinação de basidiosporos foram qualitativas, isto é, isolado-específicas e associadas às classes contrastantes de biocontrole, independente da fonte de carbono usada no meio de cultura. Novamente, nas condições investigadas, não se identificou associação desse parâmetro *in vitro* com os grupos genéticos de *Ts*.

4.7. ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE QUITINASE E GLUCANASE NA FRAÇÃO PROTEÍNA TOTAL DE ISOLADOS DE *T. stromaticum*

Considerando (i) que os resultados anteriores sugeriam a existência de componentes bloqueadores da germinação de basidiosporos de *Cp* presentes na fração proteínas totais secretadas nos sobrenadantes de *Ts*, e (ii) que boa parte da atividade de antagonismo para os isolados de *Ts* pode ser devida à ação de enzimas hidrolíticas secretadas pelos fungos (por ex., quitinolíticas, glucanolíticas, proteolíticas) (BENITEZ et al., 2004; STEYAERT et al., 2003), avaliações da presença de duas dessas atividades nas proteínas totais dos sobrenadantes (extraídas de forma padronizada no 6^o dia de cultura para todos os isolados – ver item 3.3.1) poderiam fornecer importantes informações acerca dos potenciais efeitos dessas enzimas na inibição de germinação de basidiosporos de *Cp* (DE LA CRUZ et al., 1995) e, portanto, da natureza bioquímica do controle biológico exercido.

Para os estoques de proteínas totais extraídas dos isolados de *Ts*, que haviam crescido previamente em meio líquido contendo glicose ou pó micelial de *Cp* por 6 dias (item 3.3.1.), as atividades de quitinase e glucanase foram medidas por reações enzimáticas cujos produtos das digestões foram avaliados por espectrofotometria, de acordo com metodologia específica (ver item 3.3.5.). É

importante mencionar que as amostras protéicas mais concentradas (precipitadas por um método que preserva adequadamente as propriedades biológicas das proteínas – ver item 3.3.2) permitiram uma avaliação mais rápida e adequada das atividades, dentro da sensibilidade da técnica de medição. Além disso, os efeitos de inibição de germinação de basidiosporos de *Cp* só puderam ser avaliados adequadamente a partir das proteínas totais dos sobrenadantes concentradas (dados não mostrados), justificando, então, estudar as atividades enzimáticas citadas nesse material.

Considerando que as concentrações de proteínas obtidas nas extrações puderam ser adequadamente estimadas para os isolados (Tabela 5), e que se optou por adicionar volumes iguais de amostras protéicas concentradas nas reações (ver item 3.3.5) com o intuito de tornar o processo mais rápido operacionalmente, a multiplicação desses valores permitiu verificar a quantidade efetiva de proteínas (em μg) adicionadas por tubo de reação. Assim, num primeiro momento, comparou-se as atividades relativas de quitinase e glucanase na fração proteína total do sobrenadante para os isolados sob estudo, expressando os valores de atividade com base na quantidade total de proteína aplicada na reação (Tabela 6), o que nos permitiu avaliar os extratos de forma qualitativa, indicando maiores ou menores atividades específicas para as frações por isolado. A partir dos resultados obtidos, verificou-se uma variação dessas atividades enzimáticas entre os isolados nos dois meios testados, mas que se sugere não ser significativa, ao se observar comparativamente as médias e erros padrões apresentados (Tabela 6). Além disso, pode-se considerar como elevada a variabilidade experimental observada entre as repetições para alguns isolados e atividades, o que pode ter sido causada pelo fato de que só se obteve duas repetições para cinco dos oito isolados testados; é provável que mais informações (mais isolados e repetições) poderiam ajudar a controlar melhor a variabilidade experimental desse sistema. Os resultados obtidos, contudo, estão sugerindo que possíveis variações entre os perfis qualitativos de secreção das enzimas aqui estudadas para os isolados (e, provavelmente, também entre períodos de cultura de um mesmo isolado), ocorrem de uma forma independente da quantidade de proteínas totais secretadas, pois não há correspondência da ordem (*ranking*) das médias dos isolados para atividades enzimáticas (Tabelas 6) em relação à

Tabela 6: Atividades relativas de glucanase e quitinase na fração proteína total secretada no sobrenadante de 8 isolados de *Ts*, representativos de 2 grupos genéticos e diferentes classes fenotípicas de biocontrole, normalizada com base na quantidade de proteína aplicada na reação.

Isol. grup. fen. rep.	glucanase				quitinase							
	meio c/ glicose		meio c/ pó-Cp		meio c/ glicose		meio c/ pó-Cp					
	OD ¹ (595nm)	Atividade ² (OD.ug ⁻¹)	OD (595nm)	Atividade (OD.ug ⁻¹)	OD (595nm)	Atividade (OD.ug ⁻¹)	OD (595nm)	Atividade (OD.ug ⁻¹)				
64	II	D	1	0,271	0,60	0,49	1,99	0,257	2,27	0,146	2,38	
			2	0,312	1,02	0,632	2,67	0,394	5,17	0,46	7,77	
			3	0,065	0,21	0,61 ± 0,234	0,309	1,27	1,98 ± 0,403	0,578	7,59	5,01 ± 1,538
56	II	A	1	0,212	0,64	0,496	0,95	0,111	1,34	0,441	3,37	
			2	0,112	0,63	0,635	2,45	0,537	12,15	0,256	3,94	
			3	0,064	0,32	0,53 ± 0,105	0,629	2,32	1,91 ± 0,48	0,588	11,80	8,43 ± 3,547
323	II	C	1	0,413	1,24	0,372	0,22	0,32	3,85	0,101	0,24	
			2	0,232	0,77	0,558	3,03	0,535	7,13	0,507	11,00	
			3	0,13	0,32	0,78 ± 0,265	0,543	2,57	1,94 ± 0,868	0,565	5,64	5,54 ± 0,949
658	II	E	1	0,382	0,54	0,754	4,05	0,463	2,60	0,056	1,20	
			2	0,491	1,73	1,14 ± 0,6	0,384	1,34	2,70 ± 1,356	0,535	7,56	5,08 ± 2,483
639	I	D	1	0,016	0,02	0,721	1,53	0,127	0,79	0,134	1,14	
			2	0,083	1,00	0,51 ± 0,488	0,499	2,77	2,15 ± 0,617	0,06	2,89	1,84 ± 1,051
643	I	A	1	0,639	0,74	0,766	4,62	0,36	1,66	0,195	4,70	
			2	0,081	0,45	0,59 ± 0,142	0,017	0,06	2,34 ± 2,279	0,309	6,88	4,27 ± 2,612
667	I	E	1	0,05	0,15	0,259	1,41	0,167	2,01	0,277	6,02	
			2	0,164	0,94	0,55 ± 0,396	0,055	0,76	1,08 ± 0,325	0,08	1,84	1,92 ± 0,085
14	I	A	1	0,648	1,24	0,099	0,36	0,237	1,81	0,105	1,52	
			2	0,138	0,73	0,98 ± 0,255	0,063	0,29	0,32 ± 0,036	0,373	7,89	4,85 ± 3,036

¹ Corresponde à diferença da 'densidade óptica' lida no espectrofotômetro entre os valores de absorbância da reação e o respectivo valor do 'branco' para cada repetição; tanto os valores brancos quanto os de atividades caíram dentro da faixa de linearidade da Lei de Lambert-Beer.

² Medida de atividade enzimática relativa, correspondendo à leitura de absorbância a 595 nm no espectrofotômetro por unidade de massa de proteína total aplicada na reação da amostra, para cada repetição (ver item 3.3.5); os valores obtidos foram multiplicados por um fator de '10⁵' para gerar os valores apresentados. Valores médios por isolado (± erro padrão) são apresentados à direita dos valores de atividade individuais por repetição.

secreção de proteínas (Tabela 5). Interessantemente, o parâmetro ‘atividade de quitinase em meio com glicose’ apresentou bons níveis de correlação com parâmetros de campo (ver item 4.8 a seguir).

Considerando o fato de se ter obtido diferença significativa entre isolados quanto ao peso seco de micélio produzido (Tabela 5), uma forma alternativa de expressar os valores de atividades relativas foi considerá-los em função do peso seco de micélio (Tabela 7). Nesse caso, buscou-se uma avaliação mais quantitativa entre os isolados, comparando-os por unidade de massa micelial produzida num mesmo tempo de cultura; ademais, assumira-se que essa seria uma melhor metodologia para controlar melhor as variações experimentais entre os isolados (o que, de fato, não foi o caso devido às diferenças significativas observadas para peso seco de micélio em meio com pó-de-*Cp* – ver item 4.5). No geral, houve variabilidade das duas atividades entre os isolados, nos dois meios de cultura, mas de uma maneira diferente, com um *ranking* de médias alterado em relação aos obtidos na Tabela 6. Além disso, a observação comparada entre médias e erros padrões por atividade, num mesmo meio de cultura, sugerem que houve diferença significativa entre isolados para glucanase medida em meio com pó-de-*Cp* (Tabela 7). Essa diferença, contudo, não reflete as diferenças quanto ao peso seco de micélio produzido (Tabela 5), pois os *rankings* de médias em cada caso foi distinto; isso reforça a idéia de que produção quantitativa de micélio e atividades enzimáticas secretadas nos sobrenadantes por isolado não seriam necessariamente vinculadas. Considerando que representantes de ambos os grupos genéticos estavam presentes nesses testes, não se encontrou nenhuma relação aparente dessas atividades com os grupos I e II, apesar de que o número de isolados testados nesse sentido foi muito baixo, sugerindo cautela nessas conclusões, apesar de que estudos anteriores já apontaram nessa direção (SOUZA et al., 2006).

Por outro lado, os resultados de atividades enzimáticas relativas de quitinase e glucanase expressas em função do peso seco de micélio foram claros em evidenciar a provável ocorrência do fenômeno de repressão catabólica (KUBICEK et al., 2001) atuando na regulação da expressão gênica para essas duas enzimas, ao menos para alguns dos isolados de *Ts* sob estudo crescidos em meio com glicose (Tabela 7). Pela análise comparativa das médias e erros padrões

Tabela 7: Atividades relativas de glucanase e quitinase na fração proteína total secretada no sobrenadante de 8 isolados de *Ts*, representativos de 2 grupos genéticos e diferentes classes fenotípicas de biocontrole, normalizada com base na quantidade de peso seco de micélio obtido após seis dias de cultura dos isolados.

Isol.	grup.	fen.	rep.	meio c/ glicose						meio c/ pó-Cp					
				Qdade total prot. ¹		glucanase		quitinase		Qdade total prot. (ug)		glucanase		quitinase	
				(ug)	Atividade ²	(OD.g ⁻¹)	Atividade (OD.g ⁻¹)	(ug)	Atividade (OD.g ⁻¹)	(ug)	Atividade (OD.g ⁻¹)	(ug)	Atividade (OD.g ⁻¹)	(ug)	Atividade (OD.g ⁻¹)
64	II	D	1	569	0,95		3,62		313	24,00		28,60			
			2	381	1,69		8,53		295	15,75		45,84			
			3	381	0,40	1,02 ± 0,372	14,31	8,82 ± 3,088	304	10,18	16,64 ± 4,014	37,30	37,25 ± 4,977		
56	II	A	1	422	0,70		1,46		653	13,77		48,96			
			2	220	0,61		11,77		324	16,51		26,63			
			3	249	0,26	0,52 ± 0,134	9,60	7,61 ± 3,138	357	17,85	16,04 ± 1,201	46,64	40,74 ± 7,091		
323	II	C	1	428	3,94		12,21		2101	6,17		6,70			
			2	375	0,71		6,57		230	14,81		53,82			
			3	509	0,61	1,75 ± 1,093	10,60	9,79 ± 1,676	270	11,29	10,76 ± 2,507	48,73	36,42 ± 14,93		
658	II	E	1	898	2,78		13,48		108	5,84		1,73			
			2	353	1,63	2,20 ± 0,575	7,10	10,29 ± 3,188	358	7,62	6,73 ± 0,891	16,67	9,20 ± 7,466		
639	I	D	1	809	0,13		4,09		681	30,67		22,80			
			2	207	0,63	0,38 ± 0,253	1,84	2,96 ± 1,127	225	11,53	21,10 ± 9,574	12,20	17,50 ± 5,304		
643	I	A	1	1090	3,21		7,23		97	8,46		8,61			
			2	224	0,37	1,79 ± 1,418	5,65	6,44 ± 0,79	343	0,43	4,44 ± 4,011	38,67	23,64 ± 15,03		
667	I	E	1	417	0,91		12,15		110	2,18		9,33			
			2	164	1,89	1,40 ± 0,488	3,68	7,91 ± 4,233	634	8,73	5,46 ± 3,276	241,34	125,3 ± 116		
14	I	A	1	658	6,13		8,97		69	0,33		1,38			
			2	236	1,39	3,76 ± 2,372	15,01	11,99 ± 3,019	345	1,17	0,75 ± 0,424	6,71	4,04 ± 2,664		

¹ Quantidade total de proteínas secretadas, estimadas pela multiplicação entre a sua concentração nos respectivos sobrenadantes (ug.mL⁻¹, ver Tabela 5) e o volume de meio (600 mL).

² Medida de atividade enzimática relativa (média ± erro padrão), normalizada por peso seco de micélio produzido em cultura após 6 dias de incubação. Os valores tabelados foram obtidos multiplicando-se os valores de atividade da Tabela 6 (OD.ug⁻¹) pela quantidade total de proteínas secretadas, correspondendo à 'atividade total da massa de proteínas'; esta, por sua vez, foi dividida pelo peso seco micelial (em g). Os valores obtidos nesse passo foram multiplicados por um fator de '10²' para gerar os valores apresentados.

apresentados entre meios de cultura (para um mesmo tipo de atividade), as diferenças observadas mostraram um decréscimo significativo de ambas as atividades para os isolados 64, 56 e 639, e somente da atividade de glucanase para o 323 e 658, quando os compostos pertencentes ao hospedeiro do micoparasita (pó-de-*Cp*) usados como fonte de carbono para crescimento foram substituídos por outra prontamente disponível e metabolizável, isto é, glicose. Apesar da comparação entre as médias dos demais isolados e atividades sugerir esse decréscimo (exceto para o 14, onde se observa aumento para ambas atividades em meio com glicose), os erros padrões não permitem inferir significância estatística. Evidentemente, indução de expressão por substrato (compostos do hospedeiro existentes no pó-de-*Cp*) é outra alternativa válida para explicar tal variação de atividade enzimática entre os meios e que pode estar ocorrendo simultaneamente com a repressão catabólica (NORONHA et al., 2000). No geral, esses resultados são importantes não somente para confirmar a existência de mecanismos de indução dessas enzimas pela presença de compostos do hospedeiro, mas também para corroborar a provável ação dessas enzimas nos mecanismos de micoparasitismo de *Ts* (BENITEZ et al., 2004; STEYAERT et al., 2003; VISWANATHAN et al., 2003).

Diante dos resultados das Tabelas 6 e 7, verificou-se que o nível de variação experimental geral foi alta; conforme dito anteriormente (item 4.5), este fato talvez pudesse ter sido minimizado caso a quantidade de esporos aplicados nos meios de cultura (ver itens 3.3.1 e 4.5) fosse melhor uniformizada entre repetições de crescimento, e o número de repetições por isolado e de isolados por classe fenotípica (e, ou grupo genético) fossem aumentados. Novamente, contudo, deve-se ressaltar a possibilidade de que a variação encontrada seja intrínseca ao sistema sob estudo, podendo ser devida a diferenças fisiológicas temporais entre os isolados em cultura e associadas a potenciais interações específicas entre os isolados e as fontes de carbono no meio de cultura. Experimentos desenhados para avaliar essa possibilidade estão sendo iniciados pelo grupo de pesquisa, a partir dos resultados deste trabalho.

4.8. ANÁLISE DE REGRESSÃO-CORRELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS *IN VITRO* E DADOS DE BIOCONTROLE A CAMPO

Com objetivo de verificar se algum dos resultados obtidos para os parâmetros *in vitro* poderiam servir para prever (ainda que aproximadamente) o comportamento de biocontrole obtido para os isolados de *Ts* a campo (item 4.1), realizou-se análises de regressão-correlação. A partir dos resultados apresentados no item 4.6, avaliou-se o nível de correlação entre os percentuais de germinação dos basidiósporos de *Cp*, pela ação das proteínas totais secretadas pelos isolados de *Ts* nos meios de cultura com duas fontes de carbono (Figura 10), e os três parâmetros de campo indicadores da ação de biocontrole contra *Cp*, isto é, esporulação de *Ts* e incidência e severidade residual do fitopatógeno após o tratamento com o antagonista (Tabela 1). Observou-se que meio com glicose tendeu a distinguir melhor os grupos classificatórios, pois os valores encontrados para os respectivos coeficientes de correlação são maiores (Tabela 8). Como se poderia esperar, incidência e severidade residual são parâmetros associados ao *Cp*, assim como o percentual de basidiósporos germinados; portanto, espera-se que sejam diretamente proporcionais. Por outro lado, como os índices de esporulação de *Ts* é um parâmetro associado ao antagonismo a *Cp* (Figura 7), espera-se que sejam inversamente proporcionais à quantidade de basidiosporos germinados. Desse modo, os sinais encontrados para os coeficientes de correlação R possuem sentido biológico, confirmando o nível de associação encontrado entre os pares de dados. Conforme se observa na Tabela 8, os menores valores encontrados para R envolvendo meio com pó micelial de *Cp* estão de acordo com os resultados apresentados na Figura 10, em que a discriminação de isolados contrastantes nesse meio foi um pouco menor. Assim, a inibição de basidiosporos de *Cp* através da ação de proteínas totais secretadas nos sobrenadantes foi um parâmetro *in vitro* que se correlacionou satisfatoriamente com os resultados obtidos em campo, associando, portanto, este procedimento molecular (bioquímico) a um comportamento biológico de antagonismo entre fungos em condições de campo. Portanto, pode-se considerar essa associação bastante útil para o estabelecimento de uma metodologia

confiável para escrutínio de isolados mais eficientes no Controle Biológico da vassoura-de-bruxa do cacauero.

Tabela 8. Correlação¹ entre percentuais de germinação de basidiosporos de *M. pernicioso*, tratados com proteína total secretada no sobrenadante de 10 isolados de *T. stromaticum*, representantes de diferentes classes de biocontrole², e os respectivos parâmetros por isolado avaliados a campo (experimento nº 1)³.

Parâmetros de campo	Fontes de carbono no meio de cultura de <i>Ts</i>	
	Glicose	Pó micelial seco de <i>Cp</i>
Incidência residual de <i>Cp</i>	0,614	0,398
Severidade residual de <i>Cp</i>	0,717	0,346
Esporulação de <i>Ts</i>	-0,653	-0,425

¹ Os dados da tabela correspondem aos coeficientes de correlação (*R*) entre os pares de parâmetros indicados.

² O número de isolados usados foram quatro para classe A, dois para classe C e quatro para classe E, num total de 10 pares de dados que compuseram cada matriz de correlação.

³ Corresponderam aos valores individuais obtidos no experimento nº 1 para os isolados de *Ts* utilizados como representantes das classes.

Em outro conjunto de análises de regressão-correlação, procurou-se verificar se as atividades relativas das enzimas hidrolíticas aqui estudadas (item 4.7), bastante relevantes no processo de micoparasitismo (LORITO, 1998; DE LA CRUZ et al., 1995) associavam-se diretamente com os parâmetros de biocontrole observados no campo (ver item 4.1); isto é, se era possível comparar isolados contrastantes fenotipicamente e identificar alguma associação desses fenótipos com as atividades enzimáticas *in vitro*, de forma semelhante com o que ocorreu com o parâmetro inibição de germinação de basidiósporos de *Cp* (Tabela 8 e item 4.6). Além disso, se também houvesse essa correlação das atividades de

quitinase e glucanase com os percentuais de germinação de basidiósporos, isso poderia explicar, ao menos em parte, a ação bloqueadora das proteínas totais nessa germinação. Conforme os coeficientes de correlação apresentados na Tabela 9, verificou-se que a atividade enzimática que apresentou nível de correlação adequado com os parâmetros de campo e com a germinação de basidiosporos *in vitro* foi a de quitinase produzida em meio com glicose. Esse resultado vem corroborar, assim, o resultado anterior de que meio de cultura com glicose apresentou-se como mais adequado para escrutinar *in vitro* os isolados de *Ts* com maior potencial de biocontrole a campo (Figura 10, Tabela 8). Além disso, a atividade de quitinase presente nas proteínas totais extraídas dos isolados, e correlacionada com a inibição de germinação de basidiósporos (Tabela 9), sugere que pelo menos esta atividade enzimática está consistentemente presente para explicar este efeito de inibição para proteínas totais secretadas no sobrenadante de meio com glicose. Esses resultados confirmam os dados da literatura a respeito da importância dessa atividade hidrolítica de parede celular de fungos na ação micoparasítica entre agentes de biocontrole antagonistas de fitopatógenos (REY et al., 2004; STEYAERT et al., 2003; LORITO, 1998)

Dentro das condições experimentais analisadas, observamos que os valores para os coeficientes de correlação foram maiores quando os parâmetros de biocontrole no campo foram associados às atividades relativas de quitinase expressas em relação à por massa protéica na reação, do que quando expressas por peso seco de micélio (Tabela 9). Isso faz sentido se considerarmos que no primeiro caso temos um parâmetro qualitativo para diferenciar isolados com um único fator de variação envolvido (atividade na fração proteína total secretada); no segundo, a dispersão foi maior, pois incluiu dois fatores de variação simultaneamente – proteína total e crescimento micelial (peso seco de micélio) – que demonstraram comportarem-se de forma independente (Tabelas 5, 6 e 7). As demais atividades avaliadas, isto é, quitinase em meio com pó de *Cp* e glucanase em ambos os meios, apresentaram valores de correlação baixos ou com sinal invertido em relação ao esperado para que existisse significado biológico para a

Tabela 9. Análise de correlação entre parâmetros de biocontrole (a campo e *in vitro*) e atividades de quitinase e glucanase da fração 'proteínas totais' secretadas no sobrenadante de culturas de isolados de *Ts* pertencentes a diferentes classes fenotípicas. ¹

Parâmetros de biocontrole	Ativ. quitinase		Ativ. glucanase	
	glicose	pó de <i>Cp</i>	glicose	pó de <i>Cp</i>
<i>Atividade relativa por massa protéica na reação (Tabela 6)</i>				
campo ²				
% esporulação <i>Ts</i>	0,568	-0,384	-0,059	-0,175
% incidência residual <i>Cp</i>	- 0,614	0,394	0,036	0,209
% severidade residual <i>Cp</i>	- 0,670	0,563	- 0,073	0,02
<i>in vitro</i> ³				
% germ. basidiosp. <i>Cp</i> (glicose)	- 0,596	0,348	0,167	0,165
% germ. basidiosp. <i>Cp</i> (pó de <i>Cp</i>)	- 0,315	- 0,03	0,312	0,620
<i>Atividade relativa por peso micelial do isolado (Tabela 7)</i>				
campo				
% esporulação <i>Ts</i>	0,241	-0,403	0,215	-0,115
% incidência residual <i>Cp</i>	- 0,169	0,474	- 0,274	0,192
% severidade residual <i>Cp</i>	- 0,180	0,673	- 0,233	0,039
<i>in vitro</i>				
% germ. basidiosp. <i>Cp</i> (glicose)	- 0,139	0,411	0,054	- 0,362
% germ. basidiosp. <i>Cp</i> (pó de <i>Cp</i>)	- 0,218	- 0,03	- 0,195	0,111

¹ Os isolados e valores usados para compor os pares de dados desta análise foram os mesmos das Tabela 6 e 7. Os dados no corpo da tabela representam os coeficientes de correlação '*R*' para os pares de dados correspondentes (indicados na coluna da esquerda e na linha superior); foram calculados a partir da raiz quadrada dos respectivos coeficientes de regressão linear '*R*²' para os modelos que descrevem as dispersões dos pontos. Os valores de *R* que aparecem em negrito no corpo desta tabela correspondem àqueles cujo sinal representa uma associação (correlação) contendo significado biológico correto para nossas hipóteses de trabalho.

² Ver Tabela 1.

³ Ver Figura 10 e Tabela 8.

associação de dados (ver texto anterior). Essas atividades demonstraram, portanto, não serem bons parâmetros para escrutínio *in vitro* do comportamento a campo, ao menos nas condições experimentais utilizadas. Uma possível razão

para explicar essa ausência de correlação seria o fato de que poucos isolados (pares de dados) foram testados, visto que a variabilidade experimental intrínseca neste tipo de avaliação tendeu a ser elevada, conforme dito anteriormente.

É importante salientar que, apesar da atividade de quitinase parecer ser a mais importante nesse caso, ela não é exclusiva como enzima hidrolítica atuante no controle biológico (STEYAERT et al., 2003; DE MARCO; FELIX, 2002; CHET et al., 1998). A existência de atividade glucanolítica nas frações estudadas, mais o nível de variação encontrado nos experimentos sugerem que cada isolado pode possuir um padrão fisiológico qualitativo, quantitativo e temporal específico de secreção de enzimas hidrolíticas, em meios de cultura com diferentes fontes de carbono (KUBICEK et al., 2001; HJELJORD; TRONSMO, 1998); o entendimento desses padrões pode levar a compreensão de pelo menos parte dos mecanismos de ação de biocontrole de *Ts* sobre *Cp*. Por essa razão, uma investigação mais criteriosa dessa variação temporal, utilizando-se mais pontos de tempo de cultura para observar os padrões bioquímicos (e verificar a potencial associação destes com os efeitos de biocontrole a campo) está sendo iniciada pelo grupo de pesquisa. Vale ressaltar que a medição das atividades enzimáticas em apenas um único ponto de crescimento da cultura (6 dias de incubação) tem como vantagem operacionalizar mais facilmente os procedimentos de escrutínio de isolados (objetivo central deste trabalho), mas não permitiu identificar as potenciais diferenças fisiológicas temporais acima citadas.

Em suma, nas condições experimentais utilizadas, a atividade de quitinase, presente nos sobrenadantes de *Ts* cultivados em meio com glicose como fonte de carbono, apareceu como parâmetro *in vitro*, de natureza molecular (bioquímica), que não somente pôde explicar ao menos parte dos efeitos de inibição da germinação de basidiósporos de *Cp* pelas proteínas totais de *Ts* secretadas, mas também identificar antecipadamente isolados de *Ts* mais promissores no antagonismo e, portanto, no biocontrole de *Cp*. A realização de testes e experimentos semelhantes aos apresentados neste trabalho com isolados novos de *Ts*, ainda não testados, bem como com um número maior de isolados por classe de biocontrole e de repetições por isolado poderão validar a metodologia geral aqui apresentada de escrutínio por isolados de *Ts* mais eficientes para aplicação em controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacaueteiro a campo.

5. CONCLUSÕES

- A esporulação de *T. stromaticum* (*Ts*) sobre vassouras no campo pode ser usada como um indicador adequado para a maiores ou menores eficiências de biocontrole sobre *M. pernicioso* (*Cp*).
- Não houve diferença no comportamento biológico dos isolados dos grupos genéticos I e II, pertencentes à mesma classe de biocontrole, em todos os experimentos realizados.
- Apenas o perfil quantitativo de proteínas secretadas pelos isolados de *Ts* não é um indicador de maior ou menor antagonismo a *Cp* e, portanto, de maior eficiência potencial no controle biológico.
- Há diferenças qualitativas nos perfis de proteínas totais secretadas pelos isolados de *Ts*, tanto na inibição da germinação de basidiósporos de *Cp* quanto em algumas atividades enzimáticas específicas detectáveis, sendo que algumas dessas diferenças correlacionaram-se ao comportamento fenotípico dos isolados quanto ao antagonismo a *Cp*, em condições de campo.
- A maioria dos isolados apresentaram, relativamente à massa micelial produzida, aumento significativo de secreção de proteínas totais e de atividades de quitinase e glucanase quando a fonte de carbono foi substituída de glicose por pó-de-*Cp*, evidenciando os fenômenos de regulação da expressão gênica por repressão catabólica e indução por substrato.
- Para se realizar escrutínio por isolados novos mais eficientes, é necessário realizar análise de grupos, definindo-se classes fenotípicas de Controle Biológico.

- Para se realizar escrutínio e seleção de isolados em uma coleção, a partir de parâmetros *in vitro* que reflitam adequadamente os resultados de campo, pode-se utilizar a inibição de germinação de basidiósporos de *Cp* pela fração proteína total secretada nos sobrenadantes de cultura de *Ts*, ou a atividade de quitinase nessa fração, com 6 dias de cultura em meio com glicose.
- O meio de cultura que usa glicose como fonte de carbono é o mais satisfatório para os procedimentos relativos à metodologia de escrutínio por isolados de *Ts* mais eficientes no controle biológico da vassoura-de-bruxa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIME, M.C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v. 97, p. 1012-22, 2005.

ALVES, S.A.M. Epidemiologia da vassoura-de-bruxa [*Crinipellis pernicios* (Stahel) Singer] em cacauzeiros enxertados em Uruçuca, Bahia. (**Dissertação de Mestrado**). Piracicaba-SP: Escola Superior de Agronomia Luís de Queiroz, 70 p., 2002.

ANDERBRHAN, T.; HAMMERSTONE, J.F.; ROMANCZYK, L.J., FURTEK, D.B. Sensitivity of *Crinipellis pernicios* to procyanidins from *Theobroma cacao* L. **Physiol Mol Plant Pathol**, v. 46, p. 339-348, 1995.

ANDERBRHAN, T.; MADDISON, A.C.; ARIAS, R.; MAFFIA, L.A. Disease gradients of *Crinipellis pernicios*. In: **Disease management in cocoa: Comparative epidemiology of witches' broom disease** (RUDGARD, S.A.; ANDERBRHAN, T.; MADDISON, A.C., eds). London, UK, Chapman & Hall. p. 157-64, 1993.

ANDERBRHAN, T. Rain water as factor in the dissemination of basidiospores of *Crinipellis pernicios* (Stahel) Singer within cacao trees. In: **International Cocoa Research Conference**. Cocoa Producers Alliance, Lagos, p.367-69, 1987.

ANDERBRHAN, T. Studies on the epidemiology and control of witches' broom disease of cocoa in the Brazilian Amazon. In: **9th International Cocoa Research Conference**. Lome, Togo, 12-18 February, pp 395-402, 1984.

ARRUDA, M.C.C.; FERREIRA, M.A.S.V.; MILLER, R.N.G.; RESENDE, M.L.V.; FELIPE, M.S.S. Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis pernicios* in different geographic origins and hosts. **Mycol Res**, v. 107, p. 25-37, 2003.

BASTOS, C.N. Mycoparasitic nature of the antagonism between *Trichoderma viride* and *Crinipellis pernicios*. **Fitopatol Bras**, v. 21, p. 50-54, 1996.

BAKER, K.F.; COOK, R.J. **Biological control of Plant pathogens**. San Francisco, W.H. Freeman, 433 p., 1974.

BARRETO, M.R.; LOGUERCIO, L.L.; VALICENTE, F.H., PAIVA, E. Insecticidal activity of culture supernatants from *Bacillus thuringiensis* Berliner strains against *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **An Soc Entomol Bras**, v. 28, p. 675-85, 1999.

BENITEZ, T.; LIMÓN, C.; DELGADO-JARANA, J.; REY, M. Glucanolytic and other enzymes and their genes. In: **Trichoderma and Gliocladium – enzymes**,

biological control and commercial applications (HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P., eds). London, Taylor & Francis, vol 2, pp. 101-27, 1998.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. *In* **Manual de Fitopatologia, Princípios e conceitos** (BERGAMIN FILHO, A; KIMATI, H; AMORIM, L., eds). 3^a ed. São Paulo, Agronômica Ceres, v. 1, p. 717-27, 1995.

BEZERRA, J.L.; COSTA, J.C.B.; FALEIRO, F.G.; BASTOS, C.N.; BEZERRA, K.M.T; MENEZES, P.V.S. *Hypocrea stromatica* sp. nov. Teleomorfo de *Trichoderma stromaticum*. **Fitopatol Bras**, v. 25, p.85, 2002 (Suplemento).

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, 1976.

CHANLIAUD, E.; DE SILVA, J.; STRONGITHARM, B.; JERONIMIDIS, G.; GIDLEY, M.J. Mechanical effects of plant cell wall enzymes on cellulose/xyloglucan composites. **Plant J**, v. 38, p. 27-37, 2004.

CHAVERRI, P.; SAMUELS, G. J.; STEWART, E. L. *Hypocrea virens* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma virens*. **Mycologia**, v. 93, p.1113-24, 2001.

CHERIF, M.; BENHAMOU, N. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. radicle-lycopersici. **Phytopathology**, v. 80, p. 1406-14, 1990.

CHET, I.; BENHAMOU, N.; HARAN, S. Mycoparasitism and lytic enzymes. *In*: **Trichoderma and Gliocladium – enzymes, biological control and commercial applications** (HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P., eds). London, Taylor & Francis, vol. 2, p. 153-72. 1998.

COSTA, J.C.B. Progresso da vassoura-de-bruxa em órgãos vegetativos do cacauero em Altamira e Tomé-Açu, PA. (**Dissertação de Mestrado**). Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 122 p., 1993.

COSTA, J.C.B; BASTOS, C.N. Controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauero. *In*: **Anais da VII Reunião de Controle Biológico de Fitopatógenos**, Bento Gonçalves, RS, pp. 45-51, 2001.

DE LA CRUZ, J.; PINTOR-TORO, J.A.; BENITEZ, T.; LLOBELL, A. Purification and characterization of an endo- β -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. **J Bacteriol**, v. 177, p. 1864-71, 1995.

DE MARCO, J.L.; LIMA, L.H.C; SOUZA, M.V.; FELIX, C.R. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. **World J Microbiol Biotechnol**, v.16, p.383-86, 2000.

DE MARCO, J.L.; FELIX, C.R. Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* which controls cocoa plant witches' broom disease. **BMC Biochemistry** 3:3; www.biomedcentral.com/1471-2091/3/3, 2002.

DIAS, L.A.S. **Melhoramento genético do cacauero**. Editora Folha de Viçosa Ltda, 578 p., 2001.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic Plant Pathology Methods**. Boca Raton, CRC Press, 1985. 355p.

ELAD, Y. (Editorial Review) Reasons for the delay in development of biological control of foliar pathogens. **Phytoparasitica**, v. 18, p. 99-105, 1990.

ELAD, Y. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. **Crop Prot**, v. 19, p. 709-14, 2000.

ESPOSITO, E.; SILVA, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. **Critic Rev Microbiol**, v. 24, p. 89-98, 1998.

GÓMEZ, I.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A. Genetic diversity and vegetative compatibility among *Trichoderma harzianum* isolates. **Mol Gen Genet**, v. 256, p. 127-35, 1997.

GRESSEL, J.B; HARTMANN, K.M. Morphogenesis of *Trichoderma*: Action spectrum of photoinduced sporulation. **Planta**, v. 79, p. 271-74, 1968.

GRINYER, J.; HUNT, S.; MCKAY, M.; HERBERT, B.R.; NEVALAINEN, H. Proteomic response of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the walls of *Rhizoctonia solani*. **Curr Genet**, v. 47, p. 381-88, 2005.

HJELJORD, L.; TRONSMO, A. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: **Trichoderma and Gliocladium – enzymes, biological control and commercial applications** (HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P., eds). London, Taylor & Francis, vol 2, pp. 131-51, 1998.

KUBICEK, C.P.; MACH, R.L.; PETERBAUER, C.K.; LORITO, M. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. **J Plant Pathol**, v. 83, p. 11-23, 2001.

KUBICEK, C.P. The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*, structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. **Adv Biochem Engineer Biotechnol**, v. 45, p.1-27, 1992.

JUNQUEIRA, N.T.V; GASPAROTTO, L. Controle biológico de fungos estomáticos causadores de doenças foliares em seringueira. In **Controle biológico de doenças de plantas** (BETTIOL, W., ed). Jaguariúna, CNPDA/EMBRAPA, p. 307-331, 1991.

LANA, T.G. Caracterização genética e fisiológica de *Crinipellis pernicioso*. (**Tese de Doutorado**), Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz, 106 p., 2004.

LOGUERCIO, L.L.; BARRETO, M.R.; ROCHA, T.L.; SANTOS, C.G.; TEIXEIRA, F.F.; PAIVA, E. Combined analysis of supernatant-based feeding bioassays and PCR as a first-tier screening strategy for Vip-derived activities in *Bacillus*

thuringiensis strains effective against tropical fall armyworm. **J Appl Microbiol**, v. 93, p. 269-77, 2002.

LORITO, M. Chitinolytic enzymes and their genes. *In: Trichoderma and Gliocladium – enzymes, biological control and commercial applications* (HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P., eds). London, Taylor & Francis, vol 2, pp. 73-99, 1998.

LORITO, M.; HARMAN, G.E; HAYES, C.K; BRODWAY, R.M; TROSMO, A.; WOO, S.L; PIETRO, A. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*, antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. **Phytopathology**, v. 83, p. 302-07, 1994.

LUMSDEN, R.D; LOCKE, J.C. Biological control of damping-off caused by *Phytophthora ultimum* and *Rhizoctonia solani* in soilless mix. **Phytopathology**, v. 79, p. 361-66, 1989.

MACK, R.L.; ZEILINGER, S. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. **Applied Microbiol Biotechnol**, v. 60, p. 515-22, 2002.

MELO, I.S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. *In Controle biológico de doenças de plantas* (BETTIOL, W., org.), Jaguariúna, EMBRAPA-CNPDA, Cap. 9, p. 388, 1991.

NORONHA, E.F.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P.; ULHOA, C.J. Regulation of 36-kDa L-1,3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 188, p. 19-22, 2000.

PEREIRA, J.L.; RAM, A.; FIGUEREDO, J.M.; ALMEIDA, L.C.C. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotropica**, v. 1, p. 79-81, 1989.

REY, M.; LLOBELL, A.; MONTE, E.; SCALA, F.; LORITO, M. Genomics of *Trichoderma*. *In Applied Micology and Biotechnology, vol 4 - Fungal Genomics* (AURORA, D.K.; KHACHATOURIANS, G.G., eds.). Amsterdam, Elsevier. p. 225-48, 2004.

RIBEIRO Jr., J.I. **Análises estatísticas no SAEG**. Editora UFV, Viçosa (Brasil), 301 p., 2001.

RICARD, J.L. Commercialization of *Trichoderma*-based mycofungicide, some problems and solutions. **Biocontrol News Inform**, v. 2, p.95-98, 1981.

SAMUELS, G.J. *Trichoderma*, a review of biology and systematics of the genus. **Mycol Res**, v. 100, p. 923-35, 1996.

SAMUELS, G.J.; PARDO-SCHULTHEISS, R.; HEBBAR, K.P.; LUMSDEN, R.D.; BASTOS, C.N.; COSTA, J.C.; BEZERRA, J.L. *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. **Mycol Res**, v.104, p. 760-64, 2000.

SANOGO, S.; POMELLA, A.; HEBBAR, P.K.; BAILEY, B.; COSTA, J.C.B.; SAMUELS, G.J.; LUMSDEN, R.D. Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipellis pernicioso* on cacao. **Phytopathology**, v. 92, p. 1032-37, 2002.

SANTOS, L.S. Efeito integrado de fatores meteorológicos na esporulação de *Trichoderma stromaticum*, micoparásita do agente causal da doença vassoura-de-bruxa em cacau. (**Dissertação de Mestrado**). Ilhéus-BA, Universidade Estadual de Santa Cruz, 72 p., 2005.

SILVA, M.S.; LUZ, N.E.; DE ALMEIDA, C.A.; GRAMACHO, P.K.; BEZERRA, L.J. Redescrição da sintomatologia causada por *Crinipellis pernicioso* em cacauero. **Agrotropica**, v. 14, p.1-28, 2002.

SINGER R. A monographic study of the genera "Crinipellis" and "Chaetocalathus." **Lilloa**, v. 8, p. 441-534, 1942.

SOUZA, J.T.; POMELLA, A.W.V.; BOWERS, J.; PIROVANI, C.P.; LOGUERCIO, L.L.; HEBBAR, P. Genetic and Biological Diversity of *Trichoderma stromaticum*, a Mycoparasite of the Cacao Witches' Broom Pathogen. **Phytopathology**, v. 96, p. 61-67, 2006.

STEYAERT, J.M.; RIDGWAY, H.J.; ELAD, Y.; STEWART, A. Genetic basis of mycoparasitism: a mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. **New Zeal J Crop Horti Sci**, v. 31, p. 281-91, 2003.

STIRLING, J., COOK, G.; POPE, A. Chitin and its degradation. *In* **Fungal Wall and hyphal growth**, British Mycological Society, p.169-188, 1979.

SURARIT, R.; GOPAL, P.K; SHEPHERD, M.G. Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*. **J Gen Microbiol**, v. 134, p. 1723-30, 1988.

VISWANATHAN, R.F.; SUNDAR, A.R.F.; PREMKUMARI, S.M.F. Mycolytic effect of extracellular enzymes of antagonistic microbes to *Colletotrichum falcatum*, red rot pathogen of sugarcane. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 19, p. 953-59, 2003.