

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Potencial Antagônico de *Trichoderma* spp.  
associados a dsRNA contra *Colletotrichum*  
*guaranicola* (Albuq.)**

GIRLENE SOARES DE FIGUEIRÊDO

Manaus – AM  
2010

**Girlene Soares de Figueirêdo**

**Potencial Antagônico de *Trichoderma* spp.  
associados a dsRNA contra *Colletotrichum*  
*guaranicola* (Albuq.)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Biotecnologia

Orientador:

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Co-orientadora:

Dra. Ágata Cristiane Huppert Giancoli

Manaus – AM

2010

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAM

F475p Figueirêdo, Girlene Soares de  
Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. associados a dsRNA contra  
*Colletotrichum guaranicola* (Albuq). / Girlene Soares de Figueirêdo. –  
Manaus, AM : UFAM, 2010.  
78 f. : il. color. ; 30 cm

Inclui referências.

Dissertação (Doutor em Biotecnologia). Universidade Federal do  
Amazonas. Orientador: Dr. João Lúcio de Azevedo.

1. Trichoderma 2. Fungos fitopatogênicos 3. Pragas agrícolas –  
Controle biológico 3. [Guaraná](#) - Doenças e pragas - Controle biológico  
4. Antracnose I. Azevedo, João Lúcio de (Orient.) II. Título

CDU (2007): 632.952:582.746.46 (043.3)

## GIRLENE SOARES DE FIGUEIRÊDO

Tese de doutorado sob o título **Potencial Antagônico de *Trichoderma* spp. associados a dsRNA contra *Colletotrichum guaranicola* (Albuq.)**, defendida e aprovada em 25 de agosto de 2010, em Manaus, Amazonas, pela banca examinadora constituída pelos doutores:

---

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo  
Centro de Biotecnologia da Amazônia –CBA  
Orientador

---

Dra. Mayra Kassawara Martins  
Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA

---

Dr. Francisco André Ossamu Tanaka  
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queirós – ESALQ

---

Profa. Dra. Leonor Alves de Oliveira da Silva  
Universidade Federal do Amazonas– UFAM

---

Profa. Dra. Cristina Sayuri Maki  
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

**DEDICO**

*Aos meus pais, José Norberto Soares e  
Raimunda Soares, que em todos os momentos de  
minha vida acreditaram na minha vitória.  
Às minhas filhas Isabela e Ana Júlia,  
minhas maiores conquistas.*

**OFEREÇO**

*A Lívio Carvalho de Figueirêdo, meu esposo e  
Girleide Soares, minha irmã querida  
pelo apoio constante e carinho.*

# ***AGRADECIMENTOS***

Ao meu orientador, Dr. João Lúcio de Azevedo pelo apoio incondicional a realização deste trabalho.

A Dra. Ágata, minha co-orientadora, por todas as sugestões valiosas.

Aos Drs. José Odair Pereira e Spartaco Astolfi-Filho, coordenadores da Pós-Graduação em Biotecnologia por toda ajuda concedida.

A Iranise B. B. Torres, que me guiou nos meus primeiros passos rumo a pesquisa.

A todos os professores da Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos Drs. Elliot Watanabe Kitajima e Francisco Tanaka pela disponibilidade do laboratório de microscopia eletrônica e imensa colaboração.

Aos colegas da Pós-Graduação: Michella, Michely, Gabi, Ana Paula, Fabiano, Katerine, pelos momentos de descontração e amizade.

Aos professores e colegas do Laboratório de Genética – LAGEM: Rozana Galvão, Pedro Queiroz, Aline Rondon e Luciana pelos conselhos dados e amizade.

Aos inúmeros colegas que se somaram a minha lista durante a realização desta pesquisa, em especial: Cris Maki, Mayra Kassawara, Ágata, Katerine e tantos outros.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma maneira com esta pesquisa: Obrigada!

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;  
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.  
As facilidades nos impedem de caminhar.  
Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”*

***Chico Xavier***

# RESUMO

O guaraná (*Paulinia cupana*) é uma das mais importantes culturas do Estado do Amazonas. Comercialmente, sua utilização é maior nos refrigerantes gaseificados, no entanto, a indústria do guaraná vem crescendo e diversificando seus produtos, inclusive no mercado internacional. A principal doença que afeta a cultura do guaraná é a antracnose, sendo seu agente etiológico o fitopatógeno *Colletotrichum guaranicola*. A principal forma de controle da antracnose é o emprego de fungicidas químicos, porém, em algumas regiões, que adquiriram o reconhecimento de cultura orgânica, esta medida de controle não se adequa às necessidades da produção. As espécies do gênero *Trichoderma*, são antagonistas utilizadas eficazmente no controle biológico de algumas espécies fitopatogênicas, incluindo o gênero *Colletotrichum*. A presença de dsRNAs é frequente em fungos, sendo relatada na literatura muitas pesquisas associando-os com vários aspectos nestes hospedeiros: fenótipos hipovirulentos, alterações morfológicas, o fenótipo “killer” em leveduras, ou ainda, a nenhuma alteração nestes microrganismos. Esta pesquisa teve por objetivos investigar a presença e influência de dsRNA sobre o potencial antagonístico de *Trichoderma* spp. contra *C. guaranicola*. Foram analisados 100 isolados de *Trichoderma* spp., sendo que apenas um apresentou dsRNA. A espécie foi determinada por sequenciamento da região ITS do rDNA e seus aspectos micromorfológicos (microscopia óptica e eletrônica de varredura) como *Trichoderma asperellum*. Procedeu-se a purificação deste material por meio de cromatografia em coluna de celulose e a digestão com nucleases (DNase I e nuclease S1). Para analisar a possível interferência destas partículas no potencial antagonístico dos isolados de *Trichoderma*, eliminou-se o dsRNA do isolado infectado com a substância desoxicolato de sódio, adicionada ao meio BDA na concentração de 200 mg/mL. Testes de antagonismo *in vitro* (pelo método de pareamento em placa), revelaram diferença entre as linhagens isógenas (com e sem dsRNA) contra o fitopatógeno. O teste *in vivo*, pelo método de adição de esporos de antagonista e fitopatógenos em plantas de *Mucuna aterrima*, não apresentou diferença estatística entre as linhagens. Morfológicamente houve alterações entre os isolados com e sem dsRNA, sendo que os sem dsRNA, apresentaram maior crescimento micelial e maior produção de esporos. Diante dos resultados obtidos concluiu-se que o dsRNA presente em *T. asperellum* interfere no seu potencial antagonista em testes *in vitro*, mas não no seu desempenho em testes *in vivo*.

Palavras-chaves: *Trichoderma*, dsRNA, antagonista, *Colletotrichum guaranicola*



# ***ABSTRACT***

Guaraná is one of the most important crops in the state of Amazonas. Commercially, their use is as refrigerant, however, the industry of Guaraná has been growing and diversifying its products, including the foreign market. The main disease that affects the culture of guarana is anthracnose, and its etiologic agent, is the pathogen *Colletotrichum guaranicola*. The main form of anthracnose control is the use of chemical fungicides, but in some regions, which have gained the recognition of organic agriculture, this control measure is not appropriate to the needs of production. Several species of genus *Trichoderma*, are antagonists used effectively in biological control of some plant pathogens, including the genus *Colletotrichum*. The presence of dsRNAs is common in fungi, being reported in the literature many studies associating them with various aspects of these hosts: hipovirulence morphological changes, the phenotype “killer” in yeast, and others changes in these microorganisms. The main objective of this research was investigate the presence and influence of dsRNA on the antagonistic potential of *Trichoderma* spp. against *C. guaranicola*. We analyzed 100 isolates of *Trichoderma* spp., and only one presented dsRNA. The species was determined by sequencing the ITS region of rDNA and its micromorphological aspects (optical and electron microscopy) as *Trichoderma asperellum*. We proceeded to purify this material by column chromatography on cellulose and digestion with nucleases (DNase I and nuclease S1). To analyze the possible interference of these particles in the antagonistic potential of *Trichoderma*, the dsRNA was eliminated with sodium deoxycholate, added to PDA medium at a concentration of 200 mg / mL. Tests of antagonism *in vitro* (by the method of pairing in Petri dishes), showed a difference between inbred strains (with and without dsRNA) against the pathogen. *In vivo* tests, in plants of *Mucuna aterrima*, showed no statistical difference between the isolates with and without dsRNA. Morphological alterations were observed between isolates with and without dsRNA, the absence of dsRNA showed higher mycelial growth and higher production of spores. Based on these results it was concluded that dsRNA present in *T. asperellum* interfere in its potential antagonist *in vitro* tests, but not to its performance *in vivo* tests.

Keywords: *Trichoderma*, dsRNA, antagonist, *Colletotrichum guaranicola* .

# LISTA DE FIGURAS

1	Eletoforese em gel de agarose de ácidos nucléicos totais de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. A seta indica a presença de dsRNA. . . . .	42
2	Perfil eletroforético das amostras recolhidas após cromatografia em coluna de celulose. As amostras de 1 a 4 contêm DNA, dsRNA e RNA; Em 5 a 8, RNA e 9 dsRNAs purificados. . . . .	43
3	Eletoforese em gel de agarose de ácidos nucleicos totais. (1) sem tratamento com nucleases, (2) tratamento com DNase I, (3) tratamento com nuclease S1. . . . .	44
4	Perfil eletroforético do dsRNA de <i>Trichoderma</i> sp. após purificação por cromatografia em coluna de celulose. (M) marcador de peso molecular e (1) amostra purificada . . . . .	44
5	Fotomicroscopia óptica de conidióforos de <i>T. asperellum</i> (400x). . . . .	46
6	Fotomicroscopia eletrônica de varredura de <i>T. asperellum</i> . (A) Conidióforos jovens e (B) conídios ornamentados. . . . .	46
7	Perfil de restrição da região ITS1-5.8S-ITS2 de <i>T. asperellum</i> pela enzima <i>Hinf</i> I. M = marcador de peso molecular; 1 a 10 = isolados do 1º ao 10º repique sucessivo com desoxicolato de sódio. . . . .	47
8	Perfil de restrição da região ITS1-5.8S-ITS2 de <i>T. asperellum</i> pela enzima <i>Msp</i> I. M = marcador de peso molecular; 1 a 10 = isolados do 1º ao 10º repique sucessivo com desoxicolato de sódio. . . . .	48
9	Crescimento em cultivo pareado de <i>T. asperellum</i> (T22) com dsRNA e <i>C. guaranicola</i> . . . . .	49
10	Crescimento em cultivo pareado de <i>T. asperellum</i> (T22) sem dsRNA e <i>C. guaranicola</i> . . . . .	50
11	Pareamentos em placas de Petri entre <i>T. asperellum</i> sem dsRNA e isolados de <i>C. guaranicola</i> . . . . .	51

12	Pareamentos em placas de Petri entre <i>T. asperellum</i> com dsRNA e isolados de <i>C. guaranicola</i> . . . . .	51
13	Curva de crescimento micelial de <i>T. asperellum</i> com e sem dsRNA. . . . .	53
14	Aspecto de lesões causadas por <i>C. guaranicola</i> em mudas de mucuna-preta. . .	56
15	Planta de mucuna-preta aspergida com suspensão de esporos de <i>T. asperellum</i> sem dsRNA. . . . .	57
16	Planta de mucuna-preta aspergida com suspensão de esporos de <i>T. asperellum</i> com dsRNA. . . . .	57
17	Planta de mucuna-preta sem inóculos fúngicos (testemunha). . . . .	58

# ***LISTA DE TABELAS***

1	Lista de micovirus formalmente nomeados e reconhecidos, adaptada de Pearson et al. (2009). . . . .	27
2	Classes de antagonismo para <i>Trichoderma</i> sp. com <i>C. guaranicola</i> , adaptado de Bell, Wells e Markham (1982). . . . .	40
3	Comparação entre a produção de esporos de <i>T. asperellum</i> com e sem dsRNA. . . . .	54
4	Comparação entre as parcelas e subparcelas do teste de antagonismo entre <i>T. asperellum</i> e <i>C. guaranicola in vivo</i> . . . . .	56
5	Isolados utilizados nesta pesquisa . . . . .	75

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>Revisão da Literatura</b>	<b>17</b>
2.1	A Cultura do Guaranazeiro e a Antracnose . . . . .	17
2.2	Controle Biológico de Fungos Fitopatógenos com Espécies de <i>Trichoderma</i> . . .	19
2.3	A Presença de dsRNA em Fungos . . . . .	25
<b>3</b>	<b>Material e Métodos</b>	<b>33</b>
3.1	Espécies Fúngicas Utilizadas na Pesquisa . . . . .	33
3.2	Detecção da Presença de dsRNA em Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. . . .	33
3.2.1	Obtenção do Micélio para Extração do dsRNA e DNA Genômico . . . .	33
3.2.2	Extração do dsRNA e DNA Genômico . . . . .	34
3.3	Purificação do dsRNA . . . . .	34
3.3.1	Cromatografia em Coluna de celulose . . . . .	35
3.3.2	Tratamento com Enzimas (DNase e Nuclease S1) . . . . .	35
3.4	Determinação da espécie em isolados de <i>Trichoderma</i> sp. que apresentarem dsRNA . . . . .	36
3.5	Análise do antagonismo de <i>Trichoderma</i> sp. contra <i>C. guaranicola</i> . . . . .	37
3.5.1	Obtenção de Isolados de <i>Trichoderma</i> sp. Livres de dsRNA (“processo de cura”) . . . . .	37
3.5.2	Confirmação da Eliminação de dsRNA em linhagens isogênicas de <i>Trichoderma</i> sp. . . . .	38

3.5.3	Potencial Antagônico de <i>Trichoderma</i> sp. com e sem dsRNA contra <i>C. guaranicola</i> <i>in vitro</i> . . . . .	38
3.5.4	Análise Morfológica dos Isolados de <i>Trichoderma</i> sp. contendo dsRNA	39
3.5.5	Análise da Transferência Interespecífica de dsRNA . . . . .	40
3.5.6	Potencial Antagônico de <i>Trichoderma</i> sp. com e sem dsRNA contra <i>C. guaranicola</i> <i>in vivo</i> . . . . .	41
<b>4</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>42</b>
4.1	Presença de dsRNA em Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. . . . .	42
4.2	Purificação do dsRNA . . . . .	43
4.3	Análise do Antagonismo de <i>Trichoderma</i> sp. contra <i>C. guaranicola</i> . . . . .	45
4.3.1	Determinação da espécie em isolados de <i>Trichoderma</i> sp. . . . .	45
4.3.2	Obtenção de Isolados de <i>Trichoderma asperellum</i> Livres de dsRNA . . . . .	45
4.3.3	Potencial Antagônico de <i>T. asperellum</i> Infectados ou não com dsRNA contra <i>C. guaranicola</i> <i>in vitro</i> . . . . .	48
4.3.4	Análise Morfológica de <i>T. asperellum</i> Infectados com dsRNA . . . . .	52
4.3.5	Análise da Transferência Interespecífica de dsRNA . . . . .	54
4.3.6	Potencial Antagônico de <i>T. asperellum</i> Associado a dsRNA contra <i>C. guaranicola</i> <i>in vivo</i> . . . . .	55
<b>5</b>	<b>Conclusões</b>	<b>60</b>
	<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>61</b>
	<b>Apêndice A Isolados fúngicos</b>	<b>74</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos ocupam posição de destaque dentre as substâncias químicas empregadas na agricultura pois são adicionadas intencionalmente ao ambiente como forma de erradicar ou controlar algumas espécies indesejáveis.

Para Dores e Freire (1999) muitos são os argumentos usados em favor do uso do controle químico, como por exemplo: aumento na produtividade agrícola e agropecuária; diminuição nas perdas de alimentos; armazenamento e erradicação de vetores entre outros. Entretanto, muitas são as consequências indesejáveis advindas do uso dos defensivos agrícolas, quer como contaminação ambiental, que em última instância atinge a população em geral, quer em saúde ocupacional.

O grupo mais importante de substâncias químicas utilizadas para o controle de doenças de plantas cultivadas é o dos fungicidas (MICHEREFF, 2000). Ware (1980) relata que devido ao fato de não serem completamente seletivos, esses fungicidas químicos também afetam espécies não-alvo presentes no ambiente. Após aplicados na lavoura, seja por via aérea ou misturados ao solo ou ainda às sementes, parte desses defensivos atingirá seu objetivo, enquanto o restante poderá atingir organismos não-alvo, como por exemplo, formas de vida selvagem, insetos predadores, microrganismos do solo e organismos aquáticos, podendo causar vários efeitos adversos, como redução do número de espécies, alterações na produção e comportamental, susceptibilidade a doenças e manifestações biológicas, dentre outros.

O consumo desses produtos é diferente de acordo com as diversas regiões do país, em função da diversidade de atividades agrícolas intensivas e tradicionais. Na região Norte esse consumo é muito pequeno em comparação com as demais regiões, sendo os grandes consumidores as regiões Sudeste e Sul, particularmente os Estados de São Paulo e Rio Grande do Sul, respectivamente (SPADOTTO; GOMES; RODRIGUES, 1998).

O guaranazeiro (*Paullinia cupana*) é uma planta nativa da Amazônia pertencente à família **Sapindaceae**. Em seu estado nativo, pode ser encontrada nas regiões compreendidas entre os rios Amazonas, Maués, Paraná do Ramos e Negro (Estado do Amazonas) e na bacia do Rio

Orinoco (Venezuela), sendo que na Amazônia venezuelana, encontra-se quase que exclusivamente a variedade *cupana*, enquanto que na brasileira, encontra-se a variedade *sorbilis* (Martius). Esta última se difundiu por várias regiões de clima favorável no Brasil (Pará, Acre, Bahia, Mato Grosso e outros). O Brasil é praticamente o único produtor de guaraná do mundo, excetuando-se algumas pequenas áreas plantadas na Amazônia venezuelana e peruana para fins comerciais. A produção concentrou-se durante muito tempo no estado do Amazonas, porém atualmente a Bahia é o maior produtor, devendo-se esse fato principalmente às extensas áreas destinadas ao monocultivo e a grande utilização de defensivos agrícolas (PARENTE; OLIVEIRA-JÚNIOR; COSTA, 2003).

A principal doença que afeta essa cultura é a antracnose, que tem por agente etiológico *Colletotrichum guaranicola*. Segundo dados de Araújo et al. (2007) essa doença contribui para a baixa produtividade de guaraná no Estado do Amazonas, situando-se atualmente em torno de 150 Kg/ha, muito abaixo do potencial da cultura que poderia facilmente atingir 600 Kg/ha. Nesta mesma pesquisa, constatou-se que a antracnose está presente na maioria dos municípios produtores do Estado, prevalecendo nas regiões do Médio Amazonas, portanto, nos municípios de Itacoatiara, Maués, Nova Olinda do Norte, Presidente Figueiredo e Boa Vista do Ramos.

A EMBRAPA Amazônia Ocidental atualmente vem desenvolvendo pesquisas para produção de clones resistentes à antracnose do guaranazeiro, os quais, apresentam outras vantagens em relação às plantas tradicionais, como: produtividade e índice de sobrevivência superiores, além da precocidade no início da produção (TAVARES et al., 2005).

O controle biológico atualmente ocupa um lugar importante dentre as práticas de manejo das doenças de plantas causadas por patógenos fúngicos. Os agentes de biocontrole são referidos como antagonistas, podendo os mesmos atuarem por meio de vários mecanismos de ação como: antibiose, hiperparasitismo, competência e virulência (MICHEREFF, 2000). É de primordial importância conhecer cada um destes mecanismos de ação em detalhes, e estas informações podem ser obtidas por meio de testes *in vitro* ou ainda em estudos sistemáticos em casa de vegetação (*in vivo*) antes de serem testados efetivamente no campo.

O gênero *Trichoderma* apresenta o maior número de espécies empregadas no controle biológico de fungos fitopatógenos (BENÍTEZ; RINCÓN; CODÓN, 2004). Em geral, as espécies do gênero *Trichoderma* apresentam crescimento rápido associado à liberação de metabólitos tóxicos no substrato. Para Michereff (1991), estas características permitem a predominância da população antagonista no ambiente, podendo exercer isolada ou conjuntamente duas atividades importantes do biocontrole, que são a competição e a antibiose. Outra atividade importante presente em um antagonista é o hiperparasitismo, que em fungos é conhecido por micopara-



sitismo. Em espécies de *Trichoderma*, muitas pesquisas relatam a elucidação desse mecanismo com a descoberta de elementos-chave nas vias de sinalização e transdução, além das sequências reguladoras de regiões promotoras de genes relacionados ao micoparasitismo (CORTEZ et al., 1998; MENDOZA-MENDOZA et al., 2003; ZEINLINGER et al., 2005; VITERBO; CHET, 2006; LISBOA; FELIX, 2007; TSENG et al., 2008; MPIKA et al., 2009; VITERBO et al., 2010; SEGARRA et al., 2010).

A interação de espécies de *Trichoderma* com plantas é extensamente descrita por Harman et al. (2004). Para os mesmos autores, existe uma relação de simbiose entre o fungo e a planta, na qual *Trichoderma* spp. promovem um incremento no desenvolvimento das mesmas, especialmente no seu sistema radicular tornando-as mais resistentes ao ataque de patógenos.

A utilização de espécies do gênero *Trichoderma* no controle biológico tem demonstrado grande versatilidade na agricultura. Segundo Roberti et al. (2006), além dos benefícios já relatados, estes microrganismos também podem ser utilizados como biorremediadores, já que degradam alguns grupos de substâncias químicas (pesticidas e fungicidas) de alta persistência no ambiente. Essa ação de biorremediação representa uma grande vantagem quando se utilizam sistemas de controle integrado (controle químico + biológico). Alguns estudos relatam a resistência de *Trichoderma* spp. a alguns fungicidas, sugerindo o controle integrado como uma alternativa que pode diminuir o uso de substâncias químicas na agricultura (PEREIRA et al., 1996; ROBERTI et al., 2006; FIGUEIRÊDO et al., 2010; OLEJNÍKOVA et al., 2010).

Embora muitas pesquisas relatem o sucesso do biocontrole com *Trichoderma*, poucos são os produtos comerciais à base deste antagonista no mercado. No Brasil, apesar de muitas pesquisas serem feitas, estas geralmente são condicionadas ao laboratório e seus resultados geralmente são divulgados apenas em congressos ou publicações científicas.

Outra forma de controle biológico relatada é a associação de dsRNA com o grau de virulência de alguns patógenos de plantas. Estes (dsRNAs) geralmente são vírus de RNA dupla fita comumente denominados de micovírus. Em algumas espécies fitopatógenas esse dsRNA está associado com fenótipos hipovirulentos como: *Cryphonectria parasitica* (ANAGNOSTAKIS, 1982; TURCHETTI; FERRETTI; MARESI, 2008), *Rhizoctonia solani* (CASTANHO; BUTLER, 1978; TSENG et al., 2008), *Sclerotinia sclerotiorum* (BOLAND, 1992; LI et al., 1999), *Leucostoma persoonii* (HAMMAR; FULBRIGHT; ADAMS, 1989) e *Fusarium graminearum* (CHU et al., 2004). O fenótipo de hipovirulência associado a dsRNA em fungos patógenos de plantas pode ser transmissível intraespecificamente por meio de anastomose de hifas em isolados compatíveis (ANAGNOSTAKIS; DAY, 1979).

Apesar da presença de dsRNA ser frequente em fungos, a grande maioria dos relatos de

ocorrência é referida a fitopatógenos, restando poucos dados na literatura disponíveis sobre a influência desses dsRNAs em espécies empregadas no controle biológico. Ainda assim, as poucas pesquisas divulgadas se referem a fungos entomopatogênicos como: *Metarhizium anisopliae* (LEAL et al., 1994; BOGO et al., 1996) *M. flavoviride* (MARTINS et al., 1999) e *Paecilomyces fumosoroseus* (AZEVEDO et al., 2000). Na literatura são escassos os trabalhos com fungos antagonistas a fitopatógenos associados com micovírus, sendo que Cheng et al. (2003) relatam a ocorrência de dsRNA associado a *Coniothyrium minitans*, uma espécie antagonista de fungos fitopatógenos que produzem esclerócios, principalmente espécies de *Sclerotinia* e *Sclerotium cepivorum*. Entretanto, essa pesquisa é restrita à caracterização do dsRNA e sua influência em aspectos morfológicos de *C. minitans*, não analisando o potencial antagonista dessa espécie.

Este trabalho tem como objetivos, pesquisar a ocorrência de dsRNA em *Trichoderma* spp., analisando a influência destes elementos ao seu potencial antagônico contra o fitopatógeno *Colletotrichum guaranicola*, agente causal da antracnose do guaranazeiro.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 A Cultura do Guaranazeiro e a Antracnose**

O guaraná é um produto típico da Amazônia, conhecido no Brasil e no exterior, muito apreciado por suas qualidades energéticas e gastronômicas. É produzido somente no Brasil, porém, sua origem amazônica (e no estado do Amazonas, em particular) não impediu que essa espécie vegetal se difundisse por outros Estados brasileiros, os quais superaram o Amazonas em produtividade. Mesmo assim, o cenário atual indica o crescimento sustentado da produção de sementes de guaraná no Amazonas, com base na distribuição de mudas resistentes a doenças e de alta produtividade pela EMBRAPA-Amazônia Ocidental e na implantação de projetos empresariais de cultivo que tendem a adotar padrões agrícolas tecnificados (PARENTE; OLIVEIRA-JÚNIOR; COSTA, 2003).

O guaranazeiro é uma planta arbustiva, semi-ereta, trepadeira e lenhosa, que, em seu habitat, se apóia nas árvores da floresta, atingindo altura entre 9 e 10 metros. Possui folhas grandes de verde acentuado e frutifica em cachos. O fruto é redondo, preto e brilhante, assumindo a forma de uma cápsula deiscente de 1 a 3 válvulas (sementes). Quando maduro, o fruto torna-se vermelho ou amarelo e as sementes são envolvidas por uma substância branca (arilo). Possui crescimento lento, a produção inicia em torno de três ou quatro anos, porém atingem a produção máxima por volta do quinto ano, sendo recomendado o consorciamento com outras culturas que possam contribuir para amortizar os custos de implantação dessa cultura ao gerarem outras fontes de renda ao produtor (TAVARES et al., 2005).

O guaranazeiro floresce nos meses mais secos, e o amadurecimento de seus frutos ocorre de dois a três meses depois. A colheita é feita, em média, durante cinco vezes ao ano, manualmente, com o auxílio de uma tesoura de poda, coletando-se somente os frutos maduros (abertos) de 2 em 2 dias ou cortando-se os cachos inteiros que já apresentam mais da metade dos frutos abertos e com coloração avermelhada (ERICKSON; CORRÊA; ESCOBAR, 1984) .

O guaraná ganhou *status* de cultura rentável, após aprovação da lei 5.823, de 14/11/1972,

que passou a garantir uma quantidade mínima de 0,2g e máxima de 2g de sementes de guaraná, em extrato, por litro de refrigerantes à base de guaraná (SOUSA, 2003). Na indústria de beneficiamento do guaraná, os produtos finais de maior aceitação pelos mercados brasileiro e estrangeiro são os refrigerantes gaseificados à base de guaraná, entretanto, a transformação industrial do guaraná em xarope, bastão, artesanato e, principalmente, em pó, abre amplas perspectivas mercadológicas para investidores com foco no crescente mercado regional e brasileiro, necessitando, para que isto se concretize, de plantios próprios livres de pragas e doenças, fornecendo sementes de guaraná de boa qualidade (ARAÚJO et al., 2007).

Um estudo detalhado de viabilidade econômica feito pela SUFRAMA (Superintendência da Zona Franca de Manaus), por Parente, Oliveira-Júnior e Costa (2003), analisou três condições primordiais para estabelecer áreas propícias a investimentos para a cultura do guaraná: condições edafo-climáticas, de escoamento da produção e de fornecimento de matéria-prima. Neste estudo detectou-se que as áreas mais propícias para investimento em plantio e agroindustrialização do guaraná, no estado do Amazonas, são os municípios de Maués, Urucará, Presidente Figueiredo, Parintins e Coari.

O guaraná se difundiu como fitoterápico rico em cafeína e estimulante do sistema nervoso central. Pesquisas comprovam que além da cafeína, a semente é rica em amido, proteínas, óleo fixo, substâncias aromáticas, resinosas e pépticas (ESPINOLA et al., 1997). Freitas et al. (2007) caracterizou genética e molecularmente o guaranazeiro, comprovando que a espécie possui 210 cromossomos, agrupados em dois conjuntos, sendo um tetraplóide e o outro hexaplóide. O estudo molecular feito a partir de biblioteca de cDNA do fruto do guaranazeiro, revelou a presença de enzimas de interesse, como a N-metiltransferase, relacionando-a em similaridade com a encontrada no cacau (*Theobroma cacao*).

No ano de 2006 os dados estatísticos fornecidos pelo PAM (Produção Agrícola Municipal) divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e estatística, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2007), quanto à cultura do guaraná em todo o Brasil, revelou que o Amazonas tem a maior área destinada ao plantio do guaraná com 8.029 hectares, no entanto, a área colhida no Estado do Amazonas foi de 5.703 hectares, sendo que no Estado da Bahia, a área destinada ao plantio e a área colhida foi de 6.313 hectares. Para Araújo et al. (2007), essa perda considerável em produtividade se deve, em grande parte, a doenças que atacam essa cultura no Amazonas, sendo a principal delas a antracnose. O agente etiológico da antracnose é um fungo do gênero *Colletotrichum*, cujos primeiros registros identificaram o patógeno como *C. gloeosporioides*, no entanto, na pesquisa feita por Albuquerque (1961), constatou-se que se trata de uma nova espécie, denominada de *Colletotrichum guaranicola*. Bentes e Barreto (2004) conduziram um

trabalho de reavaliação taxonômica desse fungo, baseado em características morfológicas, confirmando a espécie como *C. guaranicola*. Sutton (1992) não considera *C. guaranicola*, como uma nova espécie do gênero *Colletotrichum*.

O Gênero *Colletotrichum* compreende várias espécies pertencentes a classe dos ascomicetos, causando doenças em uma gama extensiva de hospedeiros. As espécies deste gênero apresentam diversas estratégias na invasão dos tecidos de plantas, que vão de hemicelular hemibiotrófica a intramural intracelular necrotrófica. Além disso, estes patógenos desenvolvem uma série de estruturas de infecção especializadas, incluindo tubos germinativos, apressórios, haustórios, hifas intracelulares necrotróficas secundárias e acérvulos (LINS; ABREU; ALVES, 2007).

A antracnose ataca a planta em qualquer estágio de desenvolvimento de forma altamente destrutiva. Nas plantas atacadas, o fungo induz o crestamento (queima) em folhas jovens, com sua subsequente queda. Em folhas novas, ainda em crescimento e antes da maturidade, os sintomas são lesões necróticas com formato variável de circular a elíptico, caracterizando o quadro da antracnose. Quando numerosas, essas lesões causam deformações e enrolamento das folhas, principalmente quando atingem as nervuras. Folhas maduras ou velhas não são infectadas. Ataques sucessivos deste fungo induzem a morte descendente dos ramos e por fim, de toda a planta. O uso de fungicidas é a estratégia de controle mais prontamente disponível no controle da antracnose. Com base em experimentos executados no Campo Experimental da Embrapa Amazônia Ocidental em Maués, os fungicidas azoxistrobin 0,1 L/ha, azoxistrobin 0,1 L/ha + difenoconazol 0,162 L/ha, tiofanato metílico 0,425 kg/ha, tebuconazol 0,16 L/ha e flutriafol 0,125 L/ha são os mais utilizados no controle da antracnose do guaranazeiro (TAVARES et al., 2005).

## **2.2 Controle Biológico de Fungos Fitopatógenos com Espécies de *Trichoderma***

Durante os últimos 30 anos, poucas áreas dentro da fitopatologia têm atraído tanto interesse quanto o uso de microrganismos para o controle de fitopatógenos. O grande interesse despertado para o controle biológico de patógenos de plantas é uma resposta, em grande parte, à crescente preocupação da sociedade acerca do uso de pesticidas químicos. Os governos de muitos países estão cada dia mais conscientes da problemática que muitos pesticidas químicos causam ao ambiente, assim como aos agricultores e consumidores desses produtos.

Chain (1995) relatou que mais de 70 pesticidas, incluindo fumigantes do solo, são detec-

tados em águas do subsolo em 38 estados americanos, e uma pesquisa publicada pela Agência de Estudos de Proteção Ambiental norte americana, indica que 3 a 6 mil casos de câncer são induzidos anualmente por resíduos de pesticidas em alimentos e outros 50 a 100 casos, pela exposição durante sua aplicação.

Segundo Alves (1998), a incorporação do controle biológico como parte de um programa de controle integrado reduz os riscos legais ambientais e públicos, advindos do uso de produtos químicos. O controle biológico pode representar uma alternativa ao uso de alguns fungicidas, entretanto, é mais demorado e requer conhecimentos específicos acerca da biologia do patógeno e seus antagonistas. Outra desvantagem do controle biológico é que, algumas vezes, a falta de um resultado imediato é confundida com ineficiência.

Benítez, Rincón e Codón (2004) consideram as espécies de *Trichoderma* as mais empregadas para o biocontrole de doenças de plantas cultivadas economicamente. De fato, muitos estudos têm sido feitos relatando a eficiência desses organismos (PAPAVIZAS, 1985; CHET, 1990; ELAD, 1996; BENÍTEZ; RINCÓN; CODÓN, 2004; FIGUEIRÊDO, 2005; VITERBO; CHET, 2006; LISBOA; FELIX, 2007; TSENG et al., 2008; SAVAZZINI et al., 2008; ROSA; HERRERA, 2009; MARCELLO et al., 2010).

Espécies de *Trichoderma* desenvolveram mecanismos para atacar e parasitar outros fungos e assim, aproveitar uma fonte nutricional adicional. Harman e Björkman (1998) relatam vários mecanismos empregados no biocontrole por *Trichoderma*: micoparasitismo, antibiose, competição por nutrientes e espaço, desativação das enzimas do patógeno, tolerância a estresses por parte da planta, solubilização e absorção de nutrientes inorgânicos, e resistência induzida. Para Michereff (2000), destes mecanismos, os quatro primeiros têm ação direta do antagonista sobre o patógeno e os demais são indiretos, já que, sua ação é induzir ou impulsionar mecanismos de defesa fisiológicos e bioquímicos da planta.

Benítez, Rincón e Codón (2004) demonstraram que o crescimento rápido associado à liberação de metabólitos tóxicos no substrato permite a predominância da população antagonista no ambiente, podendo exercer a competição e/ou a antibiose.

De acordo com Esposito e Silva (1998), o gênero *Trichoderma* é amplamente utilizado devido aos seus múltiplos usos na agricultura, como fungicida biológico, estimulador do crescimento em plantas ou ainda biorremediador, já que degrada alguns grupos de pesticidas químicos de alta persistência no ambiente.

Segundo Lorito (1998), o micoparasitismo é um processo complexo que inclui uma série de eventos sucessivos que são: crescimento quimiotrófico, reconhecimento entre o biocontrolador

e o patógeno, adesão (após o reconhecimento o biocontrolador envolve e adere-se às hifas do patógeno), e degradação parcial ou total da parede celular do patógeno por meio de enzimas micolíticas secretadas pelo biocontrolador. Cherif e Berihamou (1990) e Manocha e Balasubramanian (1994) afirmam que espécies de *Trichoderma* secretam enzimas como: glicanases, quitinases, lipases e proteases que degradam a parede celular de outros fungos e Papavizas (1985) relata que estes organismos produzem antibióticos como a gliotoxina, a viridina e a tricodermina, que são tóxicas a várias outras espécies fúngicas.

Algumas espécies de *Trichoderma* podem incrementar a taxa de crescimento e desenvolvimento das plantas, em especial seu sistema radicular, tornando-as mais resistentes a condições adversas (HARMAN et al., 2004). Os mesmos autores relatam em suas pesquisas que raízes de plantas colonizadas por uma linhagem de *Trichoderma*, conhecida por T22, requerem 40% menos fertilizantes nitrogenados com relação às raízes não colonizadas.

Silveira et al. (1994), objetivando selecionar isolados de *Trichoderma* spp. com o potencial de biocontrole sobre isolados de *Sclerotium rolfsii*, no Estado de Pernambuco, observaram que isolados de *Trichoderma* spp. testados demonstraram capacidade variável de inibir o crescimento micelial e produção de esclerócios de *S. rolfsii*, sendo *T. harzianum* o que apresentou maior potencial.

Reis et al. (1995), com o objetivo de selecionarem isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, observaram que de 41 isolados de *Trichoderma* aplicados na forma de pó biológico em covas de semeadura em casa-de-vegetação 15 foram capazes de reduzir em mais de 20% a severidade da doença. Esse resultado assemelha-se aos obtidos para o controle de *F. oxysporum* f. sp. *melonis* e *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* com *T. harzianum* (SIVAN et al., 1985); *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *F. roseum* com um isolado de *T. harzianum* (SIVAN; CHET, 1986); *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* com isolados de *T. harzianum* e *T. viride* (LUNDBERG; UNESTAN, 1980) e *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* com isolados de *Trichoderma* spp. (SILVA, 1992).

Noronha et al. (1996) selecionaram isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* em feijoeiro, testando alguns candidatos antagonistas pertencentes ao gênero *Trichoderma* em laboratório (tratamento de sementes) e em campo. Quando aplicados via tratamento de sementes ou do solo, sob diferentes densidades de inóculo de *R. solani*, *T. harzianum* apresentou os melhores níveis de controle de doença, superando o fungicida Quintozene quando aplicados às sementes. Em condições de campo, não houve controle efetivo de *R. solani* pelo tratamento do solo com o isolado de *T. harzianum* ou com Quintozene.

Cardoso, Silva e Marques (1997) pesquisaram alguns isolados de *Trichoderma*, com o

objetivo de suprimirem enfermidades causadas por *Fusarium solani* em podridões de raiz de plântulas de feijoeiro em condições controladas (casa de vegetação). Estes pesquisadores verificaram que um isolado de *Trichoderma* foi capaz de reduzir os sintomas provocados pelo patógeno, resultados que corroboram os de Cardoso e Faleiro (1991).

A utilização de *Trichoderma* no controle da antracnose do maracujazeiro, que tem por agente etiológico *Colletotrichum gloeosporioides*, foi estudada por Rocha e Oliveira (1998), que avaliaram o biocontrole por *Trichoderma in vitro* e *in vivo*. Para o biocontrole em frutos, obtiveram resultados pouco satisfatórios, baseados na análise do diâmetro das áreas necrosadas, em que se utilizou frutos inoculados com linhagens de *Trichoderma* e *Colletotrichum* e as testemunhas contendo apenas fitopatógenos (*Colletotrichum gloeosporioides*). Houveram diferenças de ação biocontroladora entre isolados de antagonista de mesmo gênero e de mesma espécie, o que já havia sido observado por Wells e Bell (1979), e por Bell, Wells e Markham (1982).

May e Kimati (1999) propuseram em suas pesquisas, o controle biológico de *Phytophthora parasitica* em mudas de citros no Estado de São Paulo. Foram feitas duas avaliações para verificar a atividade antagônica dos isolados de *Trichoderma in vitro*. Uma foi quanto ao hiperparasitismo e a outra, para verificar a produção de substâncias antagônicas que inibiam ou prejudicavam o desenvolvimento do patógeno. Ambos testes revelaram a eficiência em reduzir o crescimento do patógeno, com diferenças estatisticamente significativas com relação à testemunha.

Jackisch e Menezes (1999) estudaram o efeito de *Trichoderma* spp. no controle de *Pythium aphanidermatum* em fumo e observaram que todas as espécies de *Trichoderma* avaliadas nesta pesquisa, exerceram efeito inibitório sobre o crescimento de *Pythium aphanidermatum*, não havendo diferença significativa entre a eficiência dos antagonistas. Observações feitas quanto às características culturais nos pareamentos em placas, mostraram a ocorrência de sobreposição da colônia de *Pythium*, esporulação sobre *Pythium* e formação de um halo de separação.

Grigoletti Júnior et al. (2000) em suas pesquisas, avaliaram o antagonismo de *Trichoderma* contra *Cylindrocladium spathulatum*, agente causal da pinta-preta da erva-mate. Os resultados obtidos foram promissores, revelando por meio de teste em laboratório pelo método de pareamento de culturas, que todos os isolados utilizados no estudo apresentaram um elevado potencial de antagonismo.

Lobo Júnior e Abreu (2000) estudaram a inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas incluindo espécies de *Trichoderma* em diferentes temperaturas e pHs, e observaram que todos os isolados foram capazes de inibir o crescimento micelial do patógeno, demonstrando assim, a



produção de metabólitos voláteis que foram prejudiciais ao crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*. Illipronti Júnior e Machado (1997) verificaram que o controle desse patógeno em culturas de feijão e soja foi eficiente com fungos do gênero *Trichoderma*, à exceção de *T. hamatum* em soja. Cassiolo, Baker e Melo (1996) estudaram o parasitismo de *Sclerotinia sclerotiorum* e *S. minor* por mutantes resistentes de *T. harzianum* resistentes ao Benomil em aipo com o objetivo de selecionar de forma rápida, linhagens eficientes de *Trichoderma* spp. no controle desses patógenos; detectaram diferenças estatísticas significativas quanto ao comportamento antagônico de mutantes contra *S. minor* e *S. sclerotiorum*, resultando em interferência no crescimento micelial dos patógenos e diminuição das lesões ocorridas na cultura devido ao antagonismo eficiente de alguns mutantes de *Trichoderma*.

Patricio, Kimati e Barros (2001) fizeram uma seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *P. aphanidermatum* em pepino em casa-de-vegetação, verificando o controle do tombamento em plântulas de pepino, com a aplicação de seis isolados de *Trichoderma* spp. e dos fungicidas metalaxil + mancozeb com relação às testemunhas.

Moreira et al. (2002) utilizaram o controle biológico por *Trichoderma* em *Monillinia fructicola*, agente causal da podridão parda do pêssego. Na avaliação *in vitro* da atividade antagônica dos isolados de *Trichoderma*, os mesmos autores avaliaram essa atividade por dois mecanismos: o hiperparasitismo e o antagonismo, revelando que, no teste de pareamento de colônias (hiperparasitismo), a maioria dos isolados apresentaram um potencial de antagonismo satisfatório. Observando-se os resultados de detecção de antibiose, verificaram um percentual acima de 60% de inibição de *M. fructicola*. Sobre os mecanismos de antagonismo, Bettiol (1995) cita como característica importante para um antagonista atuar por mais de um mecanismo, como ocorreu nos resultados obtidos por Moreira et al. (2002).

Sanz et al. (2004) avaliaram algumas espécies de *Trichoderma* quanto à produção de enzimas degradadoras de parede celular fúngica. Este estudo demonstrou haver correlação entre os tipos de enzimas produzidas e as espécies de *Trichoderma* produtoras. Foram encontrados 27 alelos envolvidos em cinco tipos de atividades enzimáticas, sendo: 13 alelos envolvidos com a  $\beta$ -1,3-glicanase; 4 com a  $\beta$ -1,6-glicanase; 3 com celulases; 9 com proteases e 8 com quitinases. A análise da região ITS, permitiu agrupar os isolados da seguinte forma: Grupo I (inclui todos os *T. harzianum*, exceto uma linhagem que foi agrupada no II), este grupo foi o que apresentou maior polifomorfismo; Grupo II (um *T. harzianum*, todos os isolados de *T. viride*, *T. atroviride* e *T. koningii*) e no Grupo III todos os isolados de *T. hamatum*, *T. asperellum* e *T. longibrachiatum*.

Benítez, Rincón e Codón (2004) fizeram um estudo de variabilidade genética de 69 isolados de *Trichoderma* spp. Para esta pesquisa, utilizaram o sequenciamento da região ITS (ITS 1) dos

isolados e também a sequência do gene *tefl*. A análise da região ITS, resultou em 21 tipos de sequências e do gene *tefl* 17. Mais de 50% dos isolados foram agrupados em *T. harzianum* e *T. inhamatum*, 16% *T. virens* e os 34% restantes agruparam em *T. viride*, *T. asperellum*, *T. atroviride* e *T. koningii*.

O controle integrado pode ser uma alternativa viável ao uso exclusivo do controle químico. Figueirêdo (2005) testou a resistência de *T. harzianum* a alguns fungicidas químicos e comprovou que este antagonista é resistente às altas concentrações das substâncias testadas. Roberti et al. (2006) testaram a sensibilidade de linhagens de *Trichoderma* empregadas no biocontrole com alguns fungicidas químicos utilizados no controle de vários fitopatógenos. A maioria das linhagens apresentou baixa sensibilidade aos fungicidas testados. De acordo com Olejníková et al. (2010), a resistência em uma linhagem mutante de *Trichoderma* sp. ao fungicida Benomil, resultou em aumento da capacidade de micoparasitismo deste fungo.

Viterbo e Chet (2006) caracterizaram o gene *tsHyd1* presente na interação entre *T. asperellum* com raízes de plantas. A sequência desse gene apresenta similaridade com proteínas da família das hidrofobinas, presentes em fungos. Estudos complementares para expressão de uma proteína recombinante estão sendo feitos para análises posteriores.

A  $\beta$ -1,6-glicanase é uma enzima presente em diversos fungos filamentosos, porém o seu papel fisiológico não é bem conhecido (DJONOVÍÉ; POZO; KENERLEY, 2006). Em pesquisas feitas por estes mesmos pesquisadores o gene *tubgn3* está relacionado à expressão dessa glicanase. Em bioensaios com plantas, a deleção desse gene causou uma redução significativa no controle de sintomas em plantas inoculadas com *Pythium ultimum* e o agente de biocontrole *T. virens*.

Lisboa e Felix (2007) purificaram e caracterizaram uma  $\beta$ -glicanase produzida por *T. harzianum*, demonstrando a importância da mesma em seu potencial como biocontrolador. O teste para determinar a ação dessa enzima foi conduzido em um experimento contra o fitopatógeno *Moniliophora pernicioso*, demonstrando a eficiência da  $\beta$ -glicanase na lise da parede celular desse fitopatógeno.

Abdel-Fattah et al. (2007) demonstraram que o mecanismo envolvido no controle de *Bipolaris oryzae*, um fitopatógeno da cultura do arroz, por *T. harzianum* é o micoparasitismo.

Liu e Yang (2007) clonaram e conduziram a expressão heteróloga da protease aspártica SA76, relacionando-a com os mecanismos de biocontrole em *T. harzianum*. A região codificadora do gene dessa proteína, com 1.593pb, codificou um polipeptídeo de 530 aminoácidos e a análise por Northern blot, indicou que SA76 foi induzida em resposta à presença de substrato

à base de parede celular de fungos.

Savazzini et al. (2008) descrevem um protocolo para detecção de *T. atroviride* SC1 em solo, a qual apresenta desempenho satisfatório contra patógenos radiculares, como *Armillaria* spp. Nesta pesquisa, foi desenvolvido um iniciador específico para esta linhagem, além de uma sonda com base em mutação para o gene da endoquitinase.

As enzimas produzidas por *Trichoderma* spp. são requisitos necessários para a eficiência desse antagonista, porém a maioria dos dados da literatura são restritos àquelas reconhecidas importantes na degradação da parede celular de alguns fitopatógenos. Com o objetivo de conhecer outras proteínas envolvidas no biocontrole, Tseng et al. (2008) fizeram o estudo proteômico da interação de *T. harzianum* ETS323 com *Rhizoctonia solani*. A pesquisa revelou a presença de quitinases, celulasas, xilanases,  $\beta$ -1,3-glicanases,  $\beta$ -1,6-glicanases, manases e proteases.

De acordo com Santiago et al. (2009), *T. asperellum* exerce influência na catálise de enzimas que contém ferro, correlacionando o aumento da atividade destas enzimas, com a redução do teor de ferro livre, utilizado na síntese da clorofila em *Lupinus albus* (tremoço branco).

A interferência do íon ferro no antagonismo de *Trichoderma asperellum* contra *Fusarium oxysporum* foi testada em plantas de tomate por Segarra et al. (2010). O resultado obtido revelou que em baixas concentrações de ferro o antagonismo é mais eficiente.

Uma nova abordagem para o emprego de substâncias produzidas por *Trichoderma* foi mencionada nos estudos de You et al. (2010). A substância trichoderone, presente em um isolado marinho de *Trichoderma* sp., apresentou potente atividade citotóxica à células tumorais, diferente do ocorrido para as células normais.

## 2.3 A Presença de dsRNA em Fungos

RNA dupla fita (dsRNA) é comumente encontrado em fungos e geralmente estando associados a partículas virais (BUCK, 1986) (Tabela 1). Por não se conhecer o mecanismo de infecção e nem vetores naturais nesse processo, muitos pesquisadores se referem a esses dsRNAs como micovírus que causam infecções latentes em seus hospedeiros fúngicos ou como não infecciosos.

O primeiro relato da presença de micovírus de dsRNA em fungos, foi descrito por Hollings em 1962, em cogumelos cultiváveis (HOLLINGS, 1962 apud PEARSON et al., 2009)

Para Ghabrial (1998), estes são transmitidos na natureza intracelularmente por meio de

anastomoses de hifas e heterocariose ou por meio de esporos. Os micovírus são claramente bem sucedidos, sendo encontrados em muitas taxa fúngicas. Devido a essa falta de infectividade com partículas livres, estes têm sido descritos como não infecciosos, endógenos ou até mesmo como vírus hereditários, o que o mesmo autor considera errôneo.

De acordo com Pearson et al. (2009), a grande maioria dos micovírus descobertos têm genoma de RNA. Os vírus de RNA, em geral, são propensos a erros no processo de duplicação. Domingo e Holland (1997) afirmam que a taxa de mutação em vírus de RNA é de um erro a cada  $10^3$  e  $10^5$  nucleotídeos por ciclo de duplicação, conseqüentemente, os vírus de RNA constituem um grupo complexo e altamente dinâmico evolutivamente.

As infecções assintomáticas de micovírus em seus hospedeiros fúngicos são comumente observadas. Este fato, levou muitos pesquisadores a propor que os micovírus não exerciam qualquer efeito sobre a biologia dos fungos (GHABRIAL; NIBERT, 2009). No entanto, a ausência de sintomas em um conjunto de condições não exclui a possibilidade de que o vírus possa induzir sintomas sob outras condições. Por exemplo, uma comparação entre a taxa de crescimento micelial e a produção de esporos em *Aspergillus* spp. foi estatisticamente maior nos isógenos livres de dsRNA (DIEPENINGEN; DEBETS; HOEKSTRA, 2006).

A forma como esses micovírus se apresentam em seus hospedeiros é bastante complexa, existindo diferenças bastante significativas com relação ao tamanho do genoma ou a forma de apresentação do mesmo (íntegro ou fragmentado). Em um estudo de revisão sobre vírus de dsRNA, MERTENS (2004) relatou as cinco famílias mais comuns que foram identificadas infectando fungos. São elas:

***Hypoviridae*** - genoma de um segmento, com vesículas de 50-80nm que não possuem capsídeo protéico;

***Totiviridae*** - genoma de um segmento e com capsídeo icosaédrico de 30-40 nm de diâmetro;

***Chrysoviridae*** - genoma com quatro segmentos, com capsídeo protéico icosaédrico de 30-40nm de diâmetro;

Estas três famílias citadas são exclusivas de fungos.

***Partiviridae*** - genoma com dois segmentos, com capsídeo protéico icosaédrico de 30-40 nm de diâmetro.

Nesta família os hospedeiros podem ser fungos e plantas;

***Reoviridae*** - genoma de 10, 11 ou 12 segmentos, empacotados em capsídeos proteicos icosaédricos de 70-90 nm de diâmetro.

Esta última família é muito numerosa, sendo que seus hospedeiros podem ser: fungos, plantas, artrópodos, peixes, répteis, pássaros e mamíferos.

Tabela 1: Lista de micovirus formalmente nomeados e reconhecidos, adaptada de Pearson et al. (2009).

Genoma	Família	Gênero	Espécie	Morfologia
dsDNA		Rhizidiiovirus	<i>Rhizidiomyces virus (RhiV)</i>	Isométrico, 60 nm, não encapsulado
ss(+)-RNA	Barnaviridae	Barnavirus	<i>Mushroom bacilliform virus (MBV)</i>	Bacilliforme, 19×50 nm, não encapsuladas
	Narnaviridae	Mitovirus	<i>Cryphonectria mitovirus 1</i> <i>Ophiostoma mitovirus 3a</i> <i>Ophiostoma mitovirus 4</i> <i>Ophiostoma mitovirus 5</i> <i>Ophiostoma mitovirus 6</i> <i>Gremmeniella mitovirus S</i> <i>Ophiostoma mitovirus 1a</i> <i>Ophiostoma mitovirus 1b</i> <i>Ophiostoma mitovirus 2</i> <i>Ophiostoma mitovirus 3b</i>	Partículas não verdadeiras, vírions constituídos de um complexo de nucleoproteínas não encapsulados
		Narnavirus	<i>Saccharomyces 20S RNA narnavirus</i> <i>Saccharomyces 23S RNA narnavirus</i>	Partículas não verdadeiras, complexo de nucleoproteínas, não encapsulados
	Não determinado	Não determinado	<i>Rhizoctonia virus M2</i> <i>Botrytis cinerea virus F</i> <i>Diaporthe RNA virus</i>	Não apresentam partículas Flexuosas, 600-650 nm Não apresentam partículas
	Pseudoviridae	Hemivirus	<i>Candida albicans Tca2 virus</i> <i>Candida albicans Tca5 virus</i> <i>Saccharomyces paradoxus Ty5 virus</i>	Isométricas para quase isométricas, 30-40 nm, não encapsuladas
		Pseudovirus	<i>Saccharomyces cerevisiae Ty1 virus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae Ty2 virus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae Ty4 virus</i>	Isométricas para quase isométricas, 30-40 nm, não encapsuladas
	Metaviridae	Metavirus	<i>Cladosporium fulvum T-1 virus</i> <i>Fusarium oxysporum Skippy virus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae Ty3 virus</i> <i>Schizosaccharomyces pombe Tj1 virus</i> <i>Schizosaccharomyces pombe Tj2 virus</i>	Ovoides, 50 nm, irregulares, complexo de nucleoproteínas encapsuladas
dsRNA	Chrysoviridae	Chrysovirus	<i>Helminthosporium victoriae virus 145S</i>  <i>Penicillium brevicompactus virus</i> <i>Penicillium chrysogenum virus</i> <i>Penicillium cyaneo-fulvum virus</i> <i>Agaricus bisporus virus 1</i>	Isométricos, 30-35 nm, não encapsuladas múltiplos componentes
	Hypoviridae*	Hypovirus	<i>Cryphonectria hypovirus 1</i> <i>Cryphonectria hypovirus 2</i> <i>Cryphonectria hypovirus 3</i> <i>Cryphonectria hypovirus 4</i>	Vesículas pleomórficas, 50-80 nm
	Partitiviridae	Partitivirus	<i>Agaricus bisporus virus 4</i>  <i>Aspergillus ochraceous virus</i> <i>Atkinsonella hypoxylon virus</i> <i>Discula destructiva virus 2</i> <i>Fusarium poae virus</i>	Isométricas, 30-40 nm, não encapsuladas

Continua...

Lista de fungos e espécies virais. Continuação...

Genoma	Família	Gênero	Espécie	Morfologia
			<i>Fusarium solani virus 1</i>	
			<i>Gaeumannomyces graminis virus 019/</i>	
			<i>Gaeumannomyces graminis virus T1-A</i>	
			<i>Gremmeniella abietina RNA virus MS1</i>	
			<i>Helicobasidium mompa virus</i>	
			<i>Heterobasidion annosum virus</i>	
			<i>Penicillium stoloniferum virus S</i>	
			<i>Rhizoctonia solani virus 717</i>	
			<i>Diplocarpon rosae virus</i>	
			<i>Penicillium stoloniferum virus F</i>	
			<i>Phialophora radicola virus 2-2-A</i>	
	Reoviridae	Mycoreovirus	<i>Mycoreovirus-1</i>	Partículas isométricas, 80 nm, não encapsuladas
			<i>Mycoreovirus-2</i>	
			<i>Mycoreovirus-3</i>	
	Totiviridae	Totivirus	<i>Helminthosporium victoriae virus 190S</i>	Partículas isométricas, 30-40 nm, não encapsuladas
			<i>Saccharomyces cerevisiae virus L-A (L1)</i>	
			<i>Saccharomyces cerevisiae virus L-BC (La)</i>	
			<i>Ustilago maydis virus H1</i>	
			<i>Aspergillus foetidus virus S</i>	
			<i>Aspergillus niger virus S</i>	
			<i>Gaeumannomyces graminis virus 87-1-H</i>	
			<i>Mycogone perniciosa virus</i>	
	Não determinado	Não determinado	<i>Agaricus bisporus virus 1</i>	Partículas isométricas, 25 nm não encapsuladas
			<i>Allomyces arbuscula virus (AAV)</i>	Partículas isométricas, 40 nm, não encapsuladas
			<i>Aspergillus foetidus virus F (AFV-F)</i>	Partículas isométricas, 40-42 nm, não encapsuladas
			<i>Botrytis cinerea virus-CVg25</i>	Partículas isométricas, 40 nm, não encapsuladas
			<i>Colletotrichum lindemuthianum virus</i>	Partículas isométricas, 30 nm, não encapsuladas
			<i>Fusarium graminearum virus DK21</i>	Não virions
			<i>Gaeumannomyces graminis virus 45/101-C</i>	Partículas isométricas, 29 nm, não encapsuladas
			<i>Helminthosporium maydis virus</i>	Partículas isométricas, 48 nm, não encapsuladas
			<i>LaFrance isometric virus</i>	Partículas isométricas, 36 nm, não encapsuladas
			<i>Lentinus edodes virus</i>	Partículas isométricas, 39 nm, não encapsuladas
			<i>Perconia circinata virus</i>	Partículas isométricas, 32 nm, não encapsuladas

Como antes mencionado, esses elementos genéticos (dsRNA) ocorrem em muitas espécies de fungos. Na grande maioria das pesquisas realizadas, esses dsRNAs estão associados com o potencial de virulência de fungos fitopatogênicos, propiciando uma forma de controle biológico (ANAGNOSTAKIS, 1982; DALZOTO et al., 2006). Em outros, têm sido relacionados a diver-

sas alterações fenotípicas nos seus hospedeiros (DAY et al., 1977; ZHOU; BOLAND, 1999), ou ainda, não estão relacionados a qualquer tipo de alteração (morfológica ou fisiológica) em seus hospedeiros fúngicos (IKEDA et al., 2004)

A obtenção de linhagens hipovirulentas de fungos fitopatógenos foi relatada em várias espécies, sendo que os maiores avanços neste sentido foram obtidos em pesquisas com a espécie *Cryphonectria parasitica* (ANAGNOSTAKIS, 1982; TURCHETTI; FERRETTI; MARESI, 2008).

Anagnostakis (1990) e Sotirovski et al. (2006) comprovaram que isolados de *C. parasitica* contendo dsRNA, transmitem-no por meio de anastomose de hifas entre isolados compatíveis. Frequentemente, isolados comprovadamente hipovirulentos associados a dsRNA, apresentavam redução do crescimento micelial e/ou alteração na pigmentação (NUSS; KOLTIN, 1990). Entretanto, nem sempre tais alterações fenotípicas são evidenciadas na presença de dsRNA em *C. parasitica*. Evidências da existência de associação entre a presença de dsRNA e a virulência de isolados de *C. parasitica* na natureza constam nos relatos de Anagnostakis (1990) e Fulbright (1984), verificando que após o tratamento com cicloexamida, os isolados de *C. parasitica* apresentavam-se livres de dsRNA, o que os autores designavam de “cura”, comprovando desta maneira, que quando os isolados não apresentavam dsRNA ocorria uma diminuição da virulência e mudanças morfológicas no aspecto da colônia.

Durante 15 anos Turchetti, Ferretti e Maresi (2008) monitoraram uma área na Itália para um estudo sobre a propagação natural da espécie *C. parasitica* comprovadamente hipovirulenta, em teste *in vitro* contendo dsRNA. Análises periódicas sobre a ocorrência da doença do castanheiro foram feitas e constatou-se que ocorreu a disseminação do caráter hipovirulento associado a dsRNA nas espécies fúngicas encontradas na área monitorada.

Castanho e Butler (1978) relataram que isolados de *Rhizoctonia solani*, patógeno causador de doenças radiculares em muitas espécies vegetais, infectados com dsRNA apresentavam-se hipovirulentos, o que o autor denominou de “doença da Rhizoctonia”. A análise de um dos isolados “doente” revelou a presença de três segmentos de dsRNA de tamanhos distintos. No entanto, em pesquisas posteriores conduzidas por Bharathan e Tavantzis (1990), Kousik, Snow e Valverde (1994) e Bharathan et al. (2005), não foi encontrada uma correlação significativa entre a presença de dsRNA e a hipovirulência em *R. solani*. Muitos estudos têm demonstrado que dsRNA são de ocorrência bastante comum em *R. solani*. Bharathan et al. (2005) constataram a presença de dsRNA em 36 isolados desta espécie em estudos de caracterização destes dsRNAs, quanto ao número de fragmentos, tamanho e sequência molecular.

Tooley, Hewings e Falkenstein (1989) verificaram a ocorrência de dsRNA em 14 isolados de *Phytophthora infestans*. Foram identificados quatro segmentos de dsRNA e os testes realizados

com esses isolados revelaram níveis de virulência bastante altos, revelando não haver correlação entre o dsRNA encontrado e hipovirulência em *P. infestans*.

Hipovirulência associada a dsRNA também foi descrita para espécies do gênero *Sclerotinia*. Zhou e Boland (1997) avaliaram 132 isolados de *S. homeocarpa* e observaram que em quatro isolados o fenótipo hipovirulento estava associado com a presença de dsRNA. Além da hipovirulência, esses isolados apresentavam crescimento lento, formando colônias pequenas com margens atípicas e ausência ou diminuição na formação de esclerócios. A transmissão do fenótipo hipovirulento de um isolado hipovirulento a um virulento ocorreu no pareamento entre colônias com a formação de anastomoses de hifas. Quando se obteve culturas sem dsRNA de um isolado hipovirulento por meio de tratamento curativo utilizando cicloexamida, as subculturas cresceram rapidamente apresentando morfologia típica e se revelaram altamente virulentos em testes de patogenicidade a folhas de grama. Melzer, Ikeda e Boland (2002) estudaram a transmissão interespecífica de dsRNA e hipovirulência de *S. minor* para *S. sclerotiorum* por meio de anastomose de hifas, sendo este o primeiro relato de transmissão de fenótipo hipovirulento em espécies distintas.

Em espécies do gênero *Fusarium*, alguns estudos detectaram a presença de dsRNA ou partículas semelhantes a vírus (VLPs), no entanto, poucos trabalhos relacionaram dsRNA com virulência neste gênero (KILIC; GRIFFIN, 1998).

Outras espécies de fitopatógenos fúngicos com grau de virulência comprovadamente associado a dsRNA são: *Ophiostoma ulmi* (NUSS; KOLTIN, 1990); *Leucostoma peroonii* (HAMMAR; FULBRIGHT; ADAMS, 1989), *Cryphonectria cubensis* (VANZYL et al., 1999) e *Didymella bryoniae* (URS; MAYHEW; ROBERTS, 2004).

A presença de dsRNA associada ao grau de virulência em fungos patógenos de plantas é relatado constantemente na literatura, já no que diz respeito a fungos utilizados no controle biológico, poucos estudos foram realizados, ainda assim, os poucos estudos feitos referem-se a fungos entomopatogênicos.

Inglis e Valadares-Inglis (1997) descreveram um método rápido para isolamento de dsRNA em espécies de *Paecilomyces*, verificando a ocorrência do mesmo em abundância em *P. fumosoroseus*, *P. lilacinus*, *P. farinosus* e *P. amoenoroseus* em contraste com a menor proporção de *Metarhizium anisopliae* infectados por dsRNA, encontrado por Leal et al. (1994). Para Inglis e Valadares-Inglis (1997), esse fato é atribuído à eficiência do método de isolamento de dsRNA empregado.

Martins et al. (1999) avaliaram a virulência de *Metarhizium flavoviride* infectados por



dsRNA e concluíram que apesar de não haver diferença estatística significativa entre o grau de virulência de *M. flavoviride* e a presença de dsRNA, os mesmos autores observaram um aumento na virulência dos indivíduos infectados com dsRNA. Os autores alertam ainda, para a necessidade de estudos adicionais com o objetivo de melhor compreender os mecanismos de interferência desses dsRNAs no crescimento, conidiogênese, persistência e outros mecanismos que possam interferir na performance de *M. flavoviride* como agente de controle biológico.

Azevedo et al. (2000) detectaram bandas de dsRNA em três isolados de *Paecilomyces fumosoroseus*, os quais foram submetidos a testes de virulência contra a mosca branca *Bemisia tabaci* biotipo B. Ao contrário do que ocorre para vários fungos fitopatógenos, esses fragmentos de dsRNA não causaram hipovirulência em *P. fumosoroseus*.

Frazzon et al. (2000) estudaram o controle *in vitro* de *Boophilus microplus* por isolados de *M. anisopliae*, sendo que, muitos desses isolados estavam infectados com dsRNA. A comparação entre os isolados infectados e os livres de dsRNA, revelou que em geral, os isolados livres de dsRNA apresentavam maior eficiência, entretanto, esse fato não pode ser claramente afirmado, pois muitos outros diferentes fatores co-existiam para se afirmar tal comparação.

Cheng et al. (2003) caracterizaram molecularmente o dsRNA de um patógeno produtor de esclerócios (*Coniothyrium minitans*). Após sequenciamento, classificaram o micovírus na família *Totiviridae* e análises posteriores comprovaram que os mesmos estão associados a alterações morfológicas em linhagens isogênicas livres de dsRNA de *C. minitans*.

Hillman et al. (2004) descreveram a purificação e caracterização molecular parcial de um vírus em *C. parasitica*. A análise da sequência de três segmentos grandes, indicam que o vírus está intimamente relacionado com espécies do gênero *Coltivirus*, os quais são comumente encontrados infectando mamíferos.

A presença de dsRNA em *Helicobasidium mompa* foi relatada por Osaki et al. (2005), sendo que a análise do sequenciamento do genoma desse micovírus apontou a semelhança destes com membros do gênero *Mitovirus*, pertencente a família *Narnaviridae*.

A ocorrência do hipovírus1 em *C. parasitica* isolado de castanheiro na Macedônia, foi investigada por Sotirovski et al. (2006). Como esse vírus já havia sido relatado em muitos trabalhos por toda a Europa, os pesquisadores analisaram efeitos como hipovirulência em diferentes populações de *C. parasitica* e comprovaram a associação desse vírus com o caráter hipovirulento.

Em populações naturais de *Epichloe festucae*, foi relatada uma frequência de 36,4 % de isolados infectados com um *Totivirus*. O sequenciamento desse vírus, evidenciou que o mesmo

possuía 5.109pb. Estudos de transmissão entre linhagens compatíveis, revelaram que o vírus é transmissível por meio de esporos assexuados, porém essa transmissão não foi eficiente em esporos sexuais (ROMO et al., 2007). Para Tiago (2001), os micovírus não têm habilidade para lisar as células do hospedeiro, sendo que o único mecanismo natural de transmissão é o citoplasmático, talvez este fato explique o motivo pelo qual, em alguns isolados não é detectada a presença de dsRNA, já que fungos filamentosos possuem um sistema de auto-reconhecimento regulado geneticamente, que impede a fusão de hifas entre linhagens incompatíveis. De acordo com McCABE, PFEIFFER e ALFEN (1999) este sistema de incompatibilidade vegetativa, limita a transmissão dos micovírus através da reprodução sexual em populações fúngicas.

Algumas interações entre fungos e micovírus podem ser benéficas. Certas espécies de leveduras secretam toxinas de natureza protéica ou glicoprotéica de baixa massa molecular, denominada toxina “killer”. Estas toxinas matam células de leveduras do mesmo gênero ou de gêneros relacionados, sendo as mesmas imunes a sua própria toxina (SCHMITT; BREINIG, 2002). Nos processos fermentativos, o caráter “killer” pode ser usado para combater leveduras contaminantes selvagens. O fenótipo “killer” em leveduras como *Sacharomyces cerevisiae* e *Trichosporon* sp. foram associados a presença de dsRNA por Schmitt e Breinig (2002) e Fuente-fria et al. (2008).

Márquez, Redman e Rodriguez (2007), relacionaram a tolerância a temperaturas elevadas em *Dichantheium lanuginosum* (gramínea) a presença de *Curvularia protuberata*, somente quando este endófito está infectado com micovírus de dsRNA.

Uma pesquisa feita por Herrero, Marquez e Zabalgozcoa (2009) em 103 isolados fúngicos endofíticos de gramíneas, demonstrou que 22,6% destes, apresentam dsRNA. De acordo com estes pesquisadores, estes micovírus parecem “transitar” nesta população fúngica.

Himeno et al. (2010) detectaram a presença de pequenos RNAs de interferência (siRNA), para as fitas positiva e negativa do micovírus MoV2, em *Magnaporthe oryzae*, sugerindo que a maquinaria celular de silenciamento de RNA funciona contra o mesmo.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho de pesquisa foi desenvolvido nos Laboratórios de Genética de Microrganismos (LAGEN), Laboratório de Produtos Bioativos de Origem Microbiana e no Laboratório de Tecnologias do DNA Recombinante, todos integrantes do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPG-BIOTEC), com sede na Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

### **3.1 Espécies Fúngicas Utilizadas na Pesquisa**

Foram utilizados 6 (seis) isolados de *Colletotrichum guaranicola* (PGM1, PGM3, PGM5, PGM6, PGM7 e PGM10) obtidos de plantas de guaraná com sintomas de antracnose (coletados na Fazenda Experimental da UFAM) e 100 isolados de *Trichoderma* spp. provenientes de diversas coleções de culturas (Tabela 5, em anexo).

### **3.2 Detecção da Presença de dsRNA em Isolados de *Trichoderma* spp.**

Todos os isolados fúngicos de possíveis antagonistas utilizados nesta pesquisa foram analisados quanto à presença de RNA de fita dupla (dsRNA).

#### **3.2.1 Obtenção do Micélio para Extração do dsRNA e DNA Genômico**

Colônias puras dos isolados com quatro dias de crescimento, mantidas à TA (temperatura ambiente) em tubos de ensaio foram acrescidas de 5 mL de solução de tween 80 em solução aquosa a 1% (v/v). Os tubos foram posteriormente agitados em vortex para liberação dos conídios, e cerca de 0,5 mL dessa suspensão foram transferidas para frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100mL de meio BD líquido (Batata + Dextrose). Após a inoculação, os frascos foram mantidos sob agitação de 120 rpm à TA ( $28\pm 2^\circ\text{C}$ ), por 48 horas para cresci-

mento micelial. Passado esse período, o micélio foi coletado por filtração à vácuo, lavado em água destilada esterilizada e estocado à  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração.

### 3.2.2 Extração do dsRNA e DNA Genômico

A extração dos ácidos nucleicos, a partir do micélio de *Trichoderma* spp., foi realizada conforme a técnica descrita por Raeder e Broda (1985). O micélio foi triturado com nitrogênio líquido até a sua completa pulverização e transferido para microtubos onde se adicionou  $800\ \mu\text{L}$  de tampão de extração (Tris-HCl 200 mM pH 8,0; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; Dodecil sulfato de sódio 1%). Após homogeneização, os microtubos foram incubados por 15 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, foram realizadas as extrações com fenol saturado, um volume de clorofane (fenol + clorofil – proporção 1:1) e um volume de clorofil (clorofórmio + álcool isoamílico – proporção 24:1) intercaladas por centrifugação a  $16.100\ g$  por 15 minutos. Após cada centrifugação, transferiu-se a fase aquosa para novos microtubos, onde foram acrescentados os reagentes. Da fase aquosa resultante da última centrifugação, os ácidos nucléicos foram precipitados com NaCl 0,3 M e dois volumes de etanol absoluto resfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$  e deixados aproximadamente por 12 horas, em congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Os microtubos foram submetidos novamente à centrifugação e o sobrenadante descartado, o precipitado foi lavado com etanol 70%, seco em câmara de fluxo laminar e resuspenso em tampão TE pH 8,0 (Tris-HCl 1 M e EDTA 0,5 M).

Uma eletroforese em gel de agarose a 0,8% foi realizada a 3 V/cm entre os eletrodos, utilizando-se tampão de corrida Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5 X juntamente com o marcador de peso molecular (1Kb GeneRuler DNA ladder, Fermentas) em concentrações conhecidas para a avaliação da extração e verificação da existência de bandas extras. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio a  $0,5\ \mu\text{g}/\text{mL}$  durante 30 minutos, observado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado.

## 3.3 Purificação do dsRNA

Após a visualização em gel de agarose de bandas extras no material analisado (ácidos nucleicos extraídos de isolados de *Trichoderma*), estas bandas foram parcialmente purificadas, utilizando-se de técnicas de purificação de dsRNA segundo os métodos descritos por Morris e Dodds (1979) e Azevedo et al. (2000).

### 3.3.1 Cromatografia em Coluna de celulose

Após a extração, o dsRNA foi purificado por cromatografia em coluna de celulose, método descrito por Morris e Dodds (1979), com algumas modificações. A coluna de celulose foi montada em seringa descartável esterilizada de 10 mL, onde 2,5 g de celulose microgranulada foram uniformemente distribuída. Após a montagem, a coluna foi equilibrada com sucessivas lavagens com tampão STE (0,1 M NaCl, 0,05 M Tris, 0,001 M Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,0) contendo 15% de etanol. A amostra foi aplicada e em seguida procedeu-se à lavagem com STE-15% de etanol para a remoção de DNA e RNA fita simples (esse material foi coletado em microtubos para uma posterior análise em espectrofotômetro). O dsRNA que permaneceu retido na coluna foi eluído da mesma com STE sem etanol e coletado em microtubos para leitura em espectrofotômetro. O dsRNA foi precipitado pela adição de 0,1 volume de acetato de sódio a 3 M e dois volumes de etanol absoluto resfriado a -20°C e mantidos por (aproximadamente 12 horas, em congelador a -20°C). O precipitado foi coletado por centrifugação a 16.100 g por 15 min, o sobrenadante descartado, lavado com etanol 70%, seco em câmara de fluxo laminar e resuspenso em tampão TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0).

Uma eletroforese em gel de agarose a 0,8% foi realizada a 3 V/cm entre os eletrodos, utilizando-se tampão de corrida Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5 X juntamente com o marcador de peso molecular (1Kb GeneRuler DNA ladder, Fermentas) para a avaliação da purificação do dsRNA. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio a 0,5 µg/mL durante 30 minutos, observado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado.

### 3.3.2 Tratamento com Enzimas (DNase e Nuclease S1)

As amostras, após purificadas, foram tratadas com DNase e Nuclease S1 para determinar sua natureza molecular. Para digestão por nuclease S1, 35 U/µg da enzima foram adicionadas e a reação foi incubada a 37°C por 30 min. Para a digestão pela DNase I, as amostras foram tratadas com a enzima a 20 µg/mL em 30 mM MgCl<sub>2</sub> a 37°C por 20 minutos, seguido por 15 minutos a 65°C para a inativação da enzima. Os resultados das digestões foram observados em eletroforese em gel de agarose a 0,8% como descrito anteriormente.

## 3.4 Determinação da espécie em isolados de *Trichoderma* sp. que apresentarem dsRNA

### Aspectos Micromorfológicos

Para determinação da espécie, foram realizadas observações dos aspectos micromorfológicos deste isolado, por meio de microcultivo em lâmina e microscopia eletrônica de varredura. A linhagem de *Trichoderma* sp. (T22) foi crescida em placa de Petri contendo meio BDA. Pequenos fragmentos do meio de cultura foram cortados e transferidos para solução de fixação contendo 25% de glutaraldeído, 10% de paraformaldeído em tampão cacodilato (0,2M pH 7,2) com CaCl (0,1M). Após 1-2 horas os fragmentos foram lavados por 10 minutos com tampão cacodilato a 0,05 M e pós fixado com tetróxido de ósmio (1%) pelo período de 1 hora. Os fragmentos foram novamente lavados rapidamente em água destilada e desidratados em série gradiente de acetona (10 minutos). Os fragmentos de ágar contendo as estruturas fúngicas foram levados para secagem a ponto crítico no aparelho Balzers CPD 030 e em seguida montados em stubbs e metalizados com ouro no aparelho MED 010 - Balzers e observados no microscópio eletrônico de varredura Leo 435 VP, no Laboratório de Microscopia eletrônica da ESALQ de Piracicaba (GIANCOLI; AZEVEDO; PIZZIRANI-KLEINER, 2010).

Adicionalmente, foram analisadas preparações histológicas, por microscopia eletrônica de transmissão, com o objetivo de visualizar possíveis partículas virais intracelulares. Para esta técnica, as hifas e esporos do fungo cultivados em meio sólido foram retirados com agulha esterilizada e, dentro de tubo tipo Eppendorff contendo esferas de vidro, foram macerados em tampão cacodilato a 0,05M. Gotas da solução do macerado foram colocadas em contato com telas cobertas com Formvar e com película de carbono para aderir as possíveis partículas de micovírus presentes na solução. Após 15 minutos, foram lavadas em duas gotas de água para remover o tampão e contrastadas com acetato de uranila a 3%. As telas foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão 'Zeiss EM900' e fotodocumentadas digitalmente (GIANCOLI; AZEVEDO; PIZZIRANI-KLEINER, 2010).

### Sequenciamento

Nesta etapa a região ITS do rDNA foi amplificada e sequenciada utilizando-se os iniciadores ou *primers* universais ITS1 (5' GCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' GCCTC-CGCTTATTGATATGC 3') (WHITE et al., 1990).

A reação de amplificação foi realizada para um volume final de 25  $\mu$ L nas seguintes

condições: água Milli-Q esterilizada (qsp), 12,5 pmols de cada *primer*, separadamente, tampão para PCR 1 X, 200  $\mu$ M de dNTP, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 1,25 U de Taq polimerase e cerca de 50 ng de DNA da amostra. A amplificação foi realizada em termociclador programado para realizar: uma desnaturação inicial de sete minutos a 94°C; 30 ciclos de um minuto e trinta segundos a 94°C (desnaturação), dois minutos a 45°C (anelamento), três minutos a 72°C (extensão) e sete minutos a 72°C para extensão final.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0%, corados com brometo de etídio, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados. Após confirmação da amplificação, este material foi submetido a sequenciamento, em sequenciador automático MEGABACE<sup>TM</sup>1000, e os dados obtidos, foram submetidos a análise de BLAST (ALTSCHUL et al., 1990), para determinar a similaridade com sequências depositadas em banco de dados do GenBank (BENSON et al., 2008).

### **3.5 Análise do antagonismo de *Trichoderma* sp. contra *C. guaranicola***

Os isolados de *Trichoderma* sp. contendo ou não dsRNA, foram analisados quanto ao seu potencial antagonístico contra *C. guaranicola*.

#### **3.5.1 Obtenção de Isolados de *Trichoderma* sp. Livres de dsRNA (“processo de cura”)**

Para obtenção de isolados “livres” de dsRNA, procedeu-se da seguinte forma: de culturas puras de *Trichoderma* sp. crescidas por 7 (sete) dias em placas de Petri em meio BDA, foram retirados fragmentos miceliais da margem de crescimento da colônia e transferidos para placas de Petri contendo meio BDA acrescido de desoxicolato de sódio na concentração de 200 mg/L. Como controle, também foram inoculados fragmentos miceliais em meio BDA sem desoxicolato de sódio. Todas as placas foram incubadas a 28°C em incubadora BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio), por um período de 4 dias. Após esse período de crescimento, fragmentos de hifas e/ou esporos dessas colônias crescidas foram retirados e feitas subculturas em placas contendo meio BDA com desoxicolato de sódio na mesma concentração, em repiques sucessivos (até o décimo repique). Em seguida, foram feitos repiques em placas de Petri, contendo meio de cultura (BDA) livre de desoxicolato de sódio. Após o crescimento das novas colônias, estas foram avaliadas quanto à presença de dsRNA por meio de extração de ácidos nucleicos totais.

### 3.5.2 Confirmação da Eliminação de dsRNA em linhagens isogênicas de *Trichoderma sp.*

Para confirmar a eliminação do dsRNA, os isolados (com e sem dsRNA) foram submetidos a análise do polimorfismo da região ITS do DNA ribossômico nuclear para confirmação de que o isolado sem dsRNA é uma linhagem isogênica do infectado com dsRNA.

Nesta etapa, a região ITS do rDNA foi amplificada utilizando-se os *primers* universais ITS1 (5' GCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' GCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (WHITE et al., 1990).

A reação de amplificação foi realizada para um volume final de 25  $\mu$ L nas seguintes condições: água Milli-Q esterilizada (qsp), 12,5 pmols de cada *primer*, separadamente, tampão para PCR 1 X, 200  $\mu$ M de dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,25 U de Taq polimerase e cerca de 50 ng de DNA da amostra. A amplificação foi realizada em termociclador programado para realizar: uma desnaturação inicial de sete minutos a 94°C; 30 ciclos de um minuto e trinta segundos a 94°C (desnaturação), dois minutos a 45°C (anelamento), três minutos a 72°C (extensão) e sete minutos a 72°C para extensão final.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0%, corado com brometo de etídio, visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado. Após confirmação da amplificação, os produtos desta reação foram digeridos pelas enzimas de restrição: *Hae*III, *Hinf*I e *Msp*I, conforme protocolo estabelecido pelo fabricante (Fermentas). Os fragmentos resultantes deste processo foram separados em gel de agarose a 2,0%, corados em solução de brometo de etídio, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados.

### 3.5.3 Potencial Antagônico de *Trichoderma sp.* com e sem dsRNA contra *C. guaranicola in vitro*

#### Determinação da Taxa de Crescimento Micelial dos Isolados

Para se determinar a taxa de crescimento micelial dos isolados fúngicos, foram preparadas culturas destes isolados, transferindo-se discos de micélio-ágar de 5 mm de diâmetro, retirados das margens das colônias e depositados próximos à borda de placas de Petri (1 cm) contendo meio BDA, com quatro repetições para cada isolado. Diariamente realizaram-se mensurações do diâmetro das colônias em duas direções diametralmente opostas com auxílio de uma régua milimetrada, até o período necessário para que cada isolado atingisse a metade da placa de Petri,



aplicando a seguinte fórmula adaptada de Lilly e Barnet (1951):

$$Tc = (C_{lii} - C_{li}) / (t_{ii} - T_i) \quad (3.1)$$

Onde:

Tc – taxa de crescimento micelial

C<sub>li</sub> – crescimento radial da colônia obtida no tempo i

C<sub>lii</sub> – crescimento radial da colônia obtida no tempo ii

T<sub>i</sub> – tempo em que se realizou a primeira leitura

T<sub>ii</sub> – tempo em que se realizou a segunda leitura.

#### **Pareamento entre Isolados de *Trichoderma sp.* e *C. guaranicola***

Para se determinar o potencial antagônico do isolado de *Trichoderma sp.* (com e sem dsRNA) contra *C. guaranicola* foi empregado o método de pareamento entre o possível antagonista e fitopatógeno, descrito por Dennis e Webster (1971), que consiste em inocular em placas de Petri, discos de micélio-ágar do fitopatógeno e do antagonista em pontos equidistantes 7 cm entre si e a 1 cm da borda da placa, considerando-se a taxa de crescimento micelial de cada isolado, de tal forma que possibilite as colônias alcançarem simultaneamente o centro da placa. Foram feitas mensurações diárias do crescimento micelial das colônias uma em direção à outra e após o encontro das mesmas, bem como a sobreposição de um pelo outro (se houver).

A avaliação do potencial antagônico consistiu no enquadramento dos isolados em classes de antagonismo baseado na escala de Bell, Wells e Markham (1982) (Tabela 2).

#### **3.5.4 Análise Morfológica dos Isolados de *Trichoderma sp.* contendo dsRNA**

Foram avaliadas as taxas de crescimento micelial e níveis de esporulação dos isolados com ou sem dsRNA. Para isso, discos de meio BDA (5 mm em diâmetro) contendo micélio de colônias com 7 dias foram transferidos para o centro de placas de Petri com BDA, em triplicatas. Para a análise do crescimento micelial dos isolados, as placas foram incubadas a temperatura ambiente (TA), por um período necessário para que um dos isolados atinja a borda da placa, mas não ultrapassando um período máximo de 10 dias. As mensurações obtidas foram utilizadas para construção da curva de crescimento micelial dos isolados.

Tabela 2. Classes de antagonismo para *Trichoderma* sp. com *C. guaranicola*, adaptado de Bell, Wells e Markham (1982).

Classe	Característica
1	<i>Trichoderma</i> cresce e cobre completamente toda a colônia de <i>C. guaranicola</i> e a superfície do meio
2	<i>Trichoderma</i> cresce e cobre dois-terços do meio
3	O antagonista e o fitopatógeno colonizam cada um, metade da superfície do meio e nenhum parece dominar o outro
4	<i>C. guaranicola</i> coloniza dois-terços da superfície do meio
5	<i>C. guaranicola</i> cresce e cobre completamente toda a colônia de <i>Trichoderma</i> e a superfície do meio

Para análise da esporulação dos isolados, as placas foram incubadas à temperatura ambiente (TA) e, após um período de 7 dias, adicionou-se 10 mL de solução aquosa Tween 80 a 1% (v/v) e os esporos suspensos pela ação de raspagem suave da colônia com lâmina de vidro. A suspensão de esporos foi ajustada para 15 mL na mesma solução de Tween 80 a 1%, agitada para dispersar os esporos e a concentração foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias obtidas comparadas estatisticamente pelo teste de Tuckey a uma significância de 5%.

### 3.5.5 Análise da Transferência Interespecífica de dsRNA

Para testar a transmissão vertical (interespecífica de dsRNA), foram co-cultivados os isolados de *Trichoderma* sp. contendo dsRNA e um isolado de *Trichoderma harzianum*, já caracterizado em pesquisas anteriores como antagonista eficiente por Figueirêdo et al. (2010). A seguir procedeu-se o método de pareamento em placas de Petri, descrito anteriormente no item 3.5.3. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por um período de 5-7 dias e em seguida, feitas subculturas de regiões de contato entre os isolados e à distância de 3 cm dessa região. As subculturas foram examinadas quanto a presença de dsRNA por meio de extração dos ácidos nucléicos totais, como descrito anteriormente, para confirmar a presença de dsRNA.

### 3.5.6 Potencial Antagônico de *Trichoderma* sp. com e sem dsRNA contra *C. guaranicola* *in vivo*

Os isolados de *Trichoderma* sp. contendo dsRNA e “curados”, foram testados quanto ao seu potencial antagônico contra *C. guaranicola* em teste *in vivo* (casa-de-vegetação).

O isolado do fitopatógeno utilizado neste experimento foi escolhido baseado nos resultados obtidos na avaliação do teste de antagonismo *in vitro*. A espécie vegetal utilizada para esta avaliação foi *Mucuna aterrima* (mucuna-preta). Nesta etapa da pesquisa procedeu-se como descrito a seguir: sementes de *M. aterrima* foram semeadas após desinfestação, em sacos plásticos contendo substrato comercial Plantmax<sup>MR</sup>. Dez dias após a germinação das sementes, procedeu-se a aplicação do patógeno e antagonistas. Ambos foram aplicados sob a forma de suspensão de esporos (numa concentração de  $10^4$  esporos/mL), sendo aspergido 2 mL por planta, exceto as plantas que receberam o tratamento conjunto de fitopatógeno e antagonista (4 mL). As plantas foram mantidas em casa de vegetação até a avaliação dos resultados, que ocorreu após 96 horas contadas a partir da inoculação com a suspensão de esporos. A avaliação consistiu na observação e quantificação (porcentagem) das folhas infectadas. As plantas controle (testemunhas), foram aspergidas com água destilada autoclavada com solução aquosa de Tween 80 a 1% (v/v) em substituição da aplicação da suspensão de esporos fúngicos.

O delineamento experimental foi realizado em parcelas subdivididas, com duas parcelas e 3 subparcelas (2x3), com dez repetições para cada tratamento. As parcelas foram representadas por: (1) com patógeno, (2) sem patógeno; e as subparcelas por: (1) sem *Trichoderma*, (2) *Trichoderma* com dsRNA e (3) *Trichoderma* sem dsRNA.

Os dados foram estatisticamente analisados aplicando-se análise de variância e teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Presença de dsRNA em Isolados de *Trichoderma* spp.

Foram analisados 100 (cem) isolados de *Trichoderma* de diversas localizações (ver Tabela 5) quanto a presença de dsRNA por meio de extração de ácidos nucleicos totais. Apenas um destes apresentou fragmentos intermediários de ácidos nucleicos referentes a dsRNA (Figura 1).

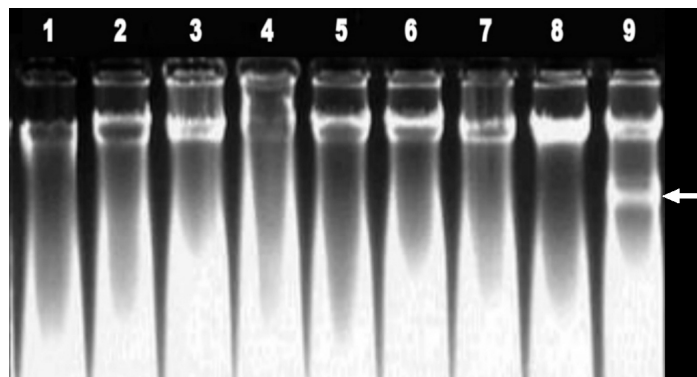


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose de ácidos nucléicos totais de isolados de *Trichoderma* spp. A seta indica a presença de dsRNA.

Registros de literatura confirmam que a presença de dsRNA é comum nas espécies fúngicas pesquisadas. Segundo Buck (1986) mais de 100 espécies fúngicas já foram pesquisadas quanto à presença de micovírus, sendo a grande maioria destes, identificados como vírus de dsRNA. Ikeda et al. (2004) relataram a presença de dsRNA em 19 % (82 de 424 isolados) em *Rosellinia necatrix* provenientes de plantas com sintomas de doenças radiculares causadas por este fitopatógeno. Em pesquisa posterior, os mesmos pesquisadores (IKEDA et al., 2005) encontraram um percentual semelhante (25 %), para esta espécie nas mesmas condições de isolamento. Porém, para isolados de solo (não associados a sintomas de plantas doentes), esse

percentual chegou a 44 %. Em *Pseudocercospora griseola* agente causal da mancha-angular do feijoeiro comum *Phaseolus vulgaris*, a incidência foi de 63 % (31 de 49 isolados) em plantas de feijão apresentando sintomas da doença (LIMA et al., 2010). Em 204 isolados de *Heterobasidion annosum* pesquisados por Ihrmark et al. (2002), apenas 8 continham dsRNA (aproximadamente 4 %).

Neste estudo, a frequência foi de apenas 1 %, menor do que as relatadas em pesquisas sobre a presença de dsRNA em fungos. Este fato pode estar relacionado a origem dos isolados analisados. Dos 100 isolados, 89 pertenciam a coleções de culturas, portanto mantidos sob condições de estocagem e métodos de preservação, que requerem a constante manipulação em repiques sucessivos. Para Lima et al. (2010) estas condições podem favorecer a “cura” de isolados infectados, por meio da perda espontânea de fragmentos de dsRNA durante a conidiogênese.

## 4.2 Purificação do dsRNA

O método de purificação por cromatografia em coluna de celulose demonstrou eficiência na purificação de fragmentos de ácidos nucleicos associados a dsRNA no isolado de *Trichoderma* sp. (Figura 2). O tratamento com nucleases comprovou a resistência do material purificado à DNase e Nuclease S1 (Figura 3).

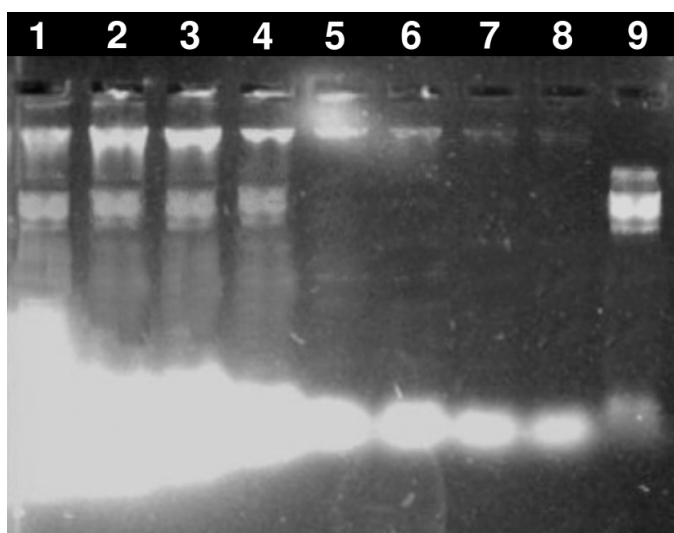


Figura 2. Perfil eletroforético das amostras recolhidas após cromatografia em coluna de celulose. As amostras de 1 a 4 contêm DNA, dsRNA e RNA; Em 5 a 8, RNA e 9 dsRNAs purificados.

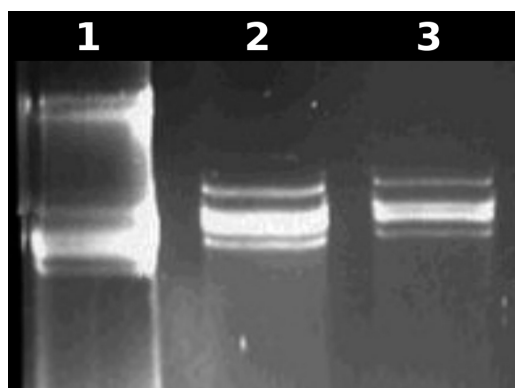


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose de ácidos nucleicos totais. (1) sem tratamento com nucleases, (2) tratamento com DNase I, (3) tratamento com nuclease S1.

O dsRNA encontrado em *Trichoderma* sp. apresentou quatro fragmentos de tamanhos distintos: aproximadamente 2750pb, 2400pb, 2300pb e 2200pb (Figura 4).

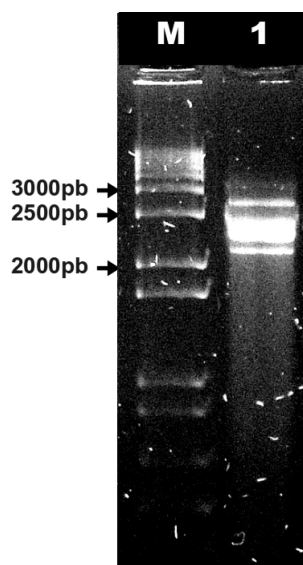


Figura 4. Perfil eletroforético do dsRNA de *Trichoderma* sp. após purificação por cromatografia em coluna de celulose. (M) marcador de peso molecular e (1) amostra purificada

Dods (1984) cita que os métodos utilizados para purificação do dsRNA são: (1) método de centrifugação em gradientes de sacarose; (2) cromatográficos em coluna de celulose, cristais de hidroxapatita ou dietilaminometilcelulose; (3) degradação enzimática por DNase e RNase fita simples e (4) precipitação de dsRNA em diferentes concentrações de sais como cloreto de etídio ou acetato de sódio. Segundo o mesmo autor, o método mais prático é a separação por cromatografia em coluna de celulose, pois associa rapidez, simplicidade e eficiência.

Alguns pesquisadores utilizaram o método de precipitação de dsRNA em diferentes concentrações de sais para a purificação de dsRNA (ARAKAWA; NAKAMURA; UETAKENAOYUKI, 2002; IKEDA et al., 2005; CASTRO et al., 1999). Bogo et al. (1996) utilizaram o método em gradiente de sacarose. Martins et al. (1999), Dalzoto et al. (2006), Azevedo et al. (2000) purificaram o dsRNA por meio de digestão com enzimas (Nuclease S1 e DNase), outros pesquisadores, utilizaram como método de purificação a cromatografia em coluna de celulose (VANZYL et al., 1999; CHENG et al., 2003; HILLMAN et al., 2004; TSAI; PEARSON; BEEVER, 2004; BHARATHAN et al., 2005; ROMO et al., 2007).

### **4.3 Análise do Antagonismo de *Trichoderma sp.* contra *C. guaranicola***

#### **4.3.1 Determinação da espécie em isolados de *Trichoderma sp.***

A sequência da região ITS1-5.8S-ITS2 (obtida por sequenciamento), obteve maior similaridade por meio de análise de BLAST, com a sequência de *Trichoderma asperellum* depositada em banco de dados do Genbank.

Nas condições a que foram submetidas nesta pesquisa (meio BDA, a TA e após 72h) este isolado fúngico, apresentou macroscopicamente colônias com micélio aéreo de aspecto cotonoso, com a presença abundante de massa de conídios verde escuro, distribuídos em anéis concêntricos e a presença de pústulas mais claras (tons esverdeados). Microscopicamente (Microscopia óptica (Figura 5) e eletrônica de varredura (Figura 6)) observou-se: conídios globosos a subglobosos e ornamentados medindo cerca de 2,5-6,0  $\mu\text{m}$ ; conidióforos de aspecto simétrico terminando em duas ou mais fiáldes(geralmente 4), pouco ramificadas de aspecto ampuliforme medindo 4,5-6,5 $\mu\text{m}$  em diâmetro e 12-25  $\mu\text{m}$  em comprimento. Segundo Samuels et al. (2010), as características acima descritas estão de acordo com as encontradas para a espécie *T. asperellum*.

A análise por microscopia eletrônica de transmissão não revelou a presença de partículas semelhantes a vírus, o que reforça a teoria de que o dsRNA em *T. asperellum* se encontra desprovido de cápsula proteica.

#### **4.3.2 Obtenção de Isolados de *Trichoderma asperellum* Livres de dsRNA**

A substância testada (desoxicolato de sódio) foi eficiente na cura do isolado na concentração de 200 mg/ L. A confirmação deste processo de “cura” por meio da extração de ácidos nucleicos

totais revelou a inexistência de bandas de dsRNA em *T. asperellum* em todos os repiques (1º ao 10º repique sucessivo). A análise periódica (a cada 90 dias por 1 ano) do último repique confirmou a inexistência destas bandas em *T. asperellum*. A análise molecular para confirmar a isogenia dos isolados (digestão com enzimas de restrição) demonstrou o mesmo perfil de restrição, como se observa nas Figuras 7 e 8.

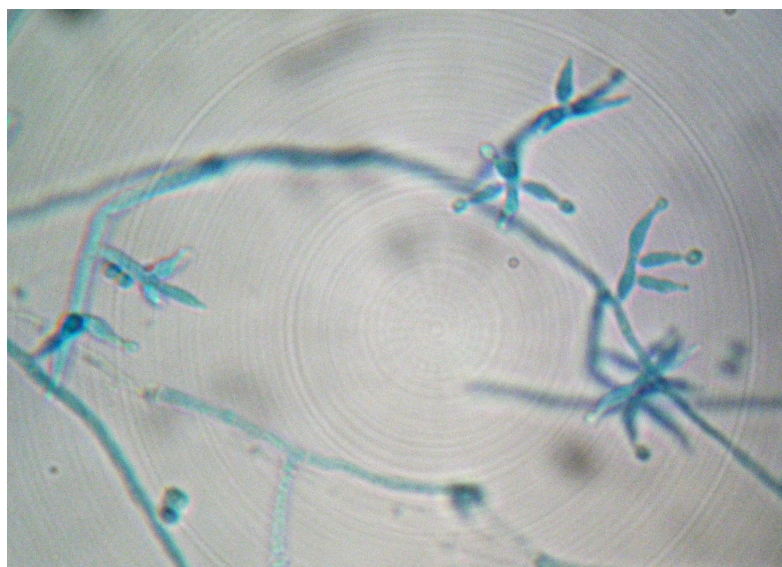


Figura 5. Fotomicroscopia óptica de conidióforos de *T. asperellum* (400x).

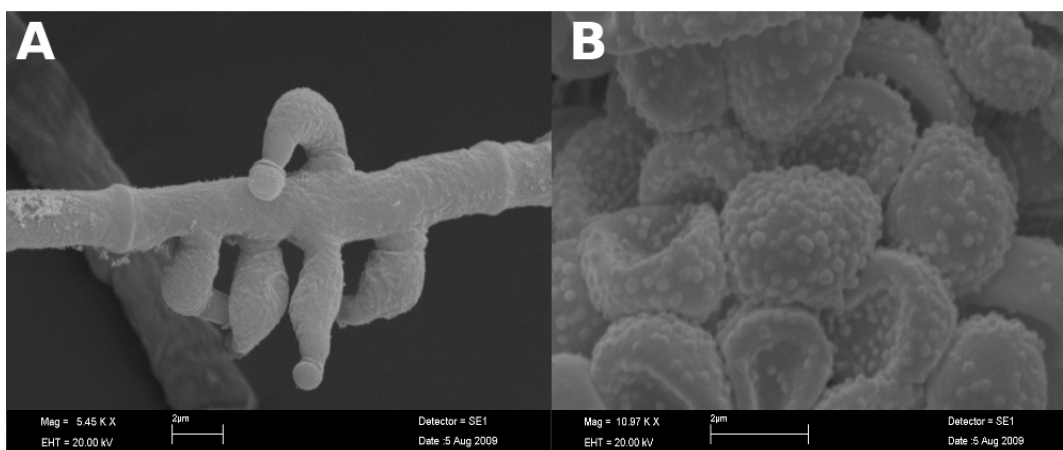


Figura 6. Fotomicroscopia eletrônica de varredura de *T. asperellum*. (A) Conidióforos jovens e (B) conídios ornamentados.

Muitos métodos são descritos na literatura para este processo, sendo os mais utilizados: tratamentos com cicloexamida, acridina, subculturas monospóricas, incubação em temperaturas



elevadas, irradiação com UV e subculturas de extremidades de hifas. Para alguns pesquisadores a etapa de “cura” é um processo complexo, segundo Martins et al. (1999), o tratamento com cicloexamida em *Metharizium flavoviride* não foi eficiente para a eliminação de dsRNA. O mesmo resultado foi observado para *Helicobasidium mompa* e *Rosellinia necatrix* por Ikeda et al. (2004). Para Lima et al. (2010) a cicloexamida foi eficiente no tratamento de alguns isolados de *Pseudocercospora griseola* que apresentaram fragmentos de tamanhos pequenos (1,0-2,2 Kb), o mesmo não ocorrendo para isolados da mesma espécie com fragmentos maiores. Dalzoto et al. (2006) relata sucesso na “cura” de *Beauveria bassiana* com cicloexamida. Segundo Kilic e Griffin (1998), a utilização da cicloexamida é um método eficiente de “cura” do dsRNA em *Fusarium oxysporum*.

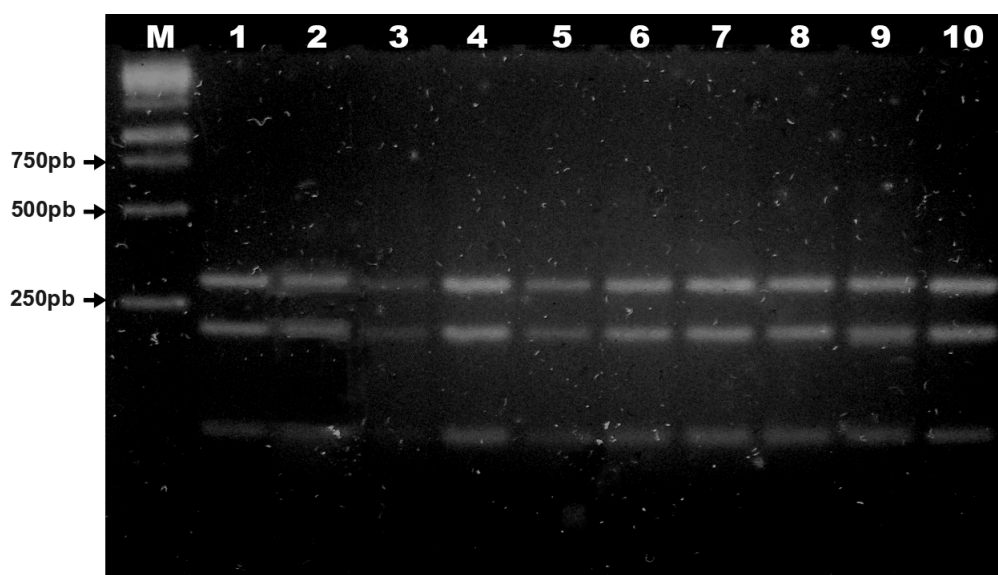


Figura 7. Perfil de restrição da região ITS1-5.8S-ITS2 de *T. asperellum* pela enzima *Hinf*I. M = marcador de peso molecular; 1 a 10 = isolados do 1<sup>o</sup> ao 10<sup>o</sup> repique sucessivo com desoxicolato de sódio.

Os efeitos do aumento das concentrações de desoxicolato de sódio em “Semliki vírus forest” foram analisados por Helenius et al. (1976). Os resultados comprovaram que o desoxicolato de sódio em pequenas concentrações ( $0,9 \pm 0,1$  mM), provoca a ruptura da membrana viral, liberando as proteínas de capsídeo, praticamente isentas de fosfolipídeos.

O desoxicolato de sódio é um tipo de detergente amplamente utilizado em laboratórios como inibidor de crescimento de alguns microrganismos. Normalmente é utilizado adicionado aos meios de cultura em pequenas concentrações. Segundo Subuddhi e Mishra (2007), essa substância é comprovadamente eficiente na quebra de membranas em vesículas à base de di-

palmitolfosfatidilcolina (DPPC). Ghabrial e Nibert (2009) afirmam que muitas espécies de micovírus associados a dsRNA são desprovidos de cápsula proteica (não encapsulados). Partículas virais desta natureza segundo Nuss et al. (2002) encontram-se nas células em vesículas ou associados a organelas circundadas por membranas (principalmente complexo de Golgi). Neste caso a “cura” utilizando-se desoxicolato de sódio em *T. asperellum* pode ser atribuída a desestruturação de membranas, incluindo vesículas contendo dsRNA, em células de *T. asperellum*.

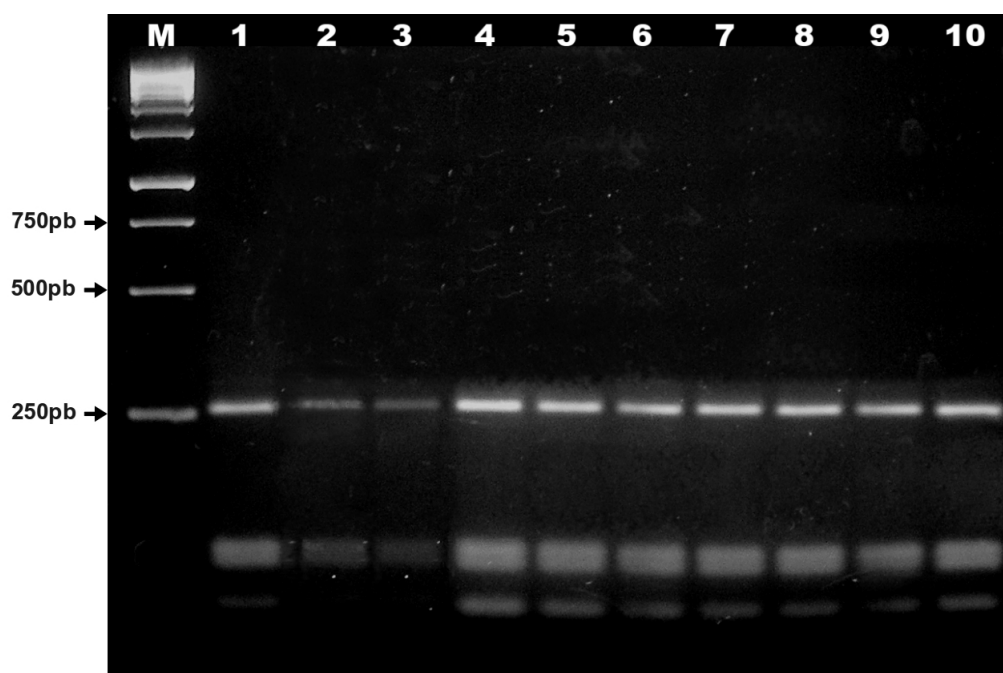


Figura 8. Perfil de restrição da região ITS1-5.8S-ITS2 de *T. asperellum* pela enzima *MspI*. M = marcador de peso molecular; 1 a 10 = isolados do 1<sup>o</sup> ao 10<sup>o</sup> repique sucessivo com desoxicolato de sódio.

#### 4.3.3 Potencial Antagônico de *T. asperellum* Infectados ou não com dsRNA contra *C. guaranicola in vitro*

O teste de antagonismo *in vitro* entre os isolados de *T. asperellum* com e sem dsRNA e do fitopatógeno *C. guaranicola* permitiu a separação em classes de antagonismo de acordo com a eficiência destes isolados. A comparação entre os isolados de *T. asperellum* com dsRNA e sem dsRNA demonstrou que a presença destes elementos influenciaram em alguns aspectos, de forma negativa o potencial antagonista nesta espécie (Figuras 9 e 10).

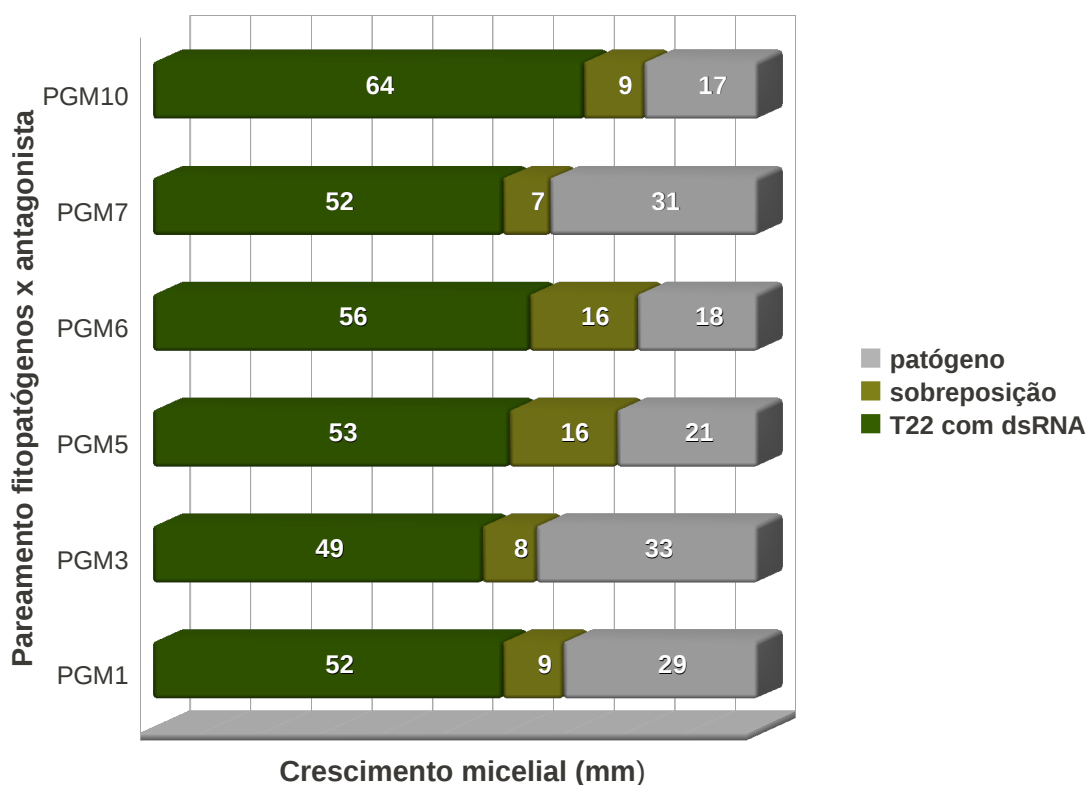


Figura 9. Crescimento em cultivo pareado de *T. asperellum* (T22) com dsRNA e *C. guaranicola*.

Todos os isolados antagonistas sem dsRNA (“curados”) foram agrupados na classe 2 (Figura 11), segundo a escala de antagonismo adaptada de Bell, Wells e Markham (1982), diferente do ocorrido com o pareamento com *T. asperellum* com dsRNA que pertenceram a classe 3 (Figura 12).

Os isolados de *T. asperellum* pertencentes à classe 2 de antagonismo (sem dsRNA), apresentaram diferenças quanto à taxa de crescimento micelial (pré-estabelecida para o pareamento) na colonização da placa de Petri durante o teste de antagonismo, demonstrando deste modo, que as interações entre *T. asperellum* e *C. guaranicola* modificam o padrão de comportamento destes organismos. Em todos os pareamentos observou-se aumento do ritmo de crescimento do antagonista e diminuição na velocidade de crescimento do fitopatógeno. Benítez, Rincón e Codón (2004) e Vinale et al. (2008) afirmam que esta característica é muito vantajosa para os antagonistas na disputa por área colonizada, pois vencendo a competição por espaço e nutrientes o antagonista está exercendo uma das formas de biocontrole.

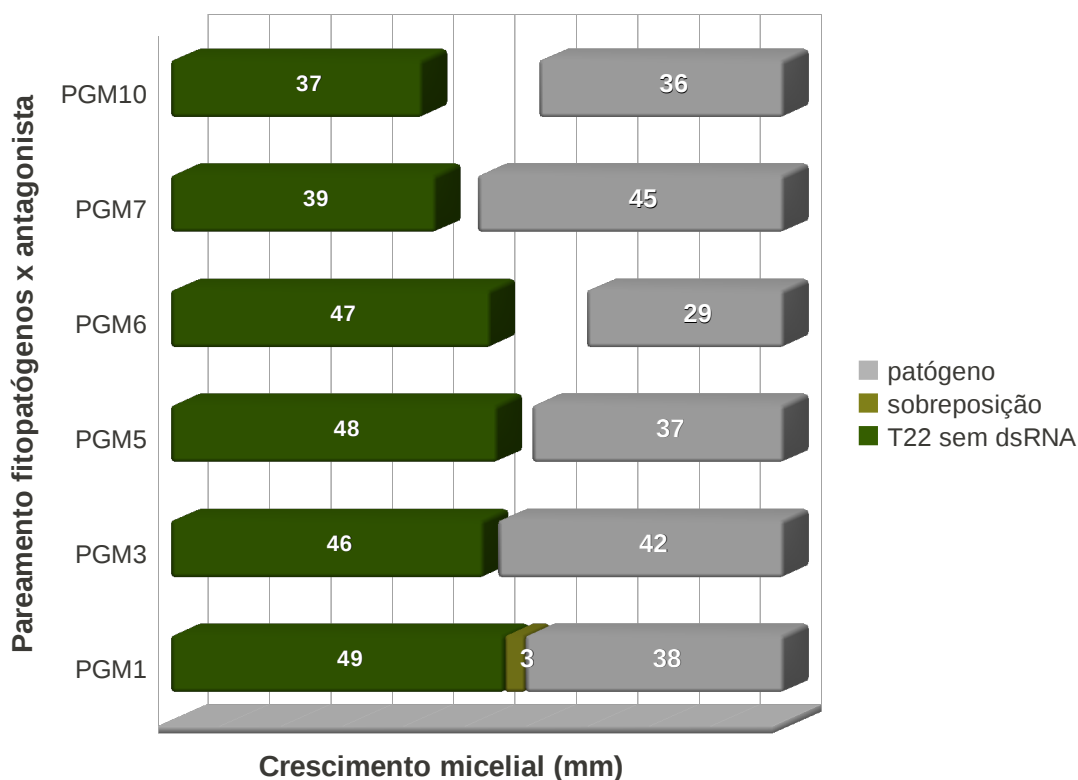


Figura 10. Crescimento em cultivo pareado de *T. asperellum* (T22) sem dsRNA e *C. guaranicola*.

Além desta alteração no crescimento micelial, pôde ser observado também um significativo aumento na produção de esporos, fato que ocorreu em todos os pareamentos entre T22 sem dsRNA e o fitopatógeno *C. guaranicola*. Batista (2002) ressalta que essa característica é favorável aos antagonistas, pois é desejável que estes produzam novos inóculos na presença do patógeno, impedindo assim a ação dos mesmos, por aumento da densidade do inóculo.

A inibição do crescimento micelial de *C. guaranicola* ocorreu em maior intensidade com os isolados PGM10, PGM6 e PGM5, que colonizaram menos de 1/3 da placa e sofreram sobreposição por *T. asperellum* sem dsRNA. Muitas espécies do gênero *Trichoderma* podem produzir diversos metabólitos secundários voláteis ou não voláteis, com amplo espectro de atividade antimicrobiana. Bonfim (2007) detectou a produção de alguns metabólitos voláteis por *T. harzianum*. Esta espécie tem sido muito pesquisada como agente de biocontrole apresentando resultados satisfatórios quanto aos principais mecanismos de antagonismo descritos em fungos (competição, micoparasitismo e antibiose). Viterbo e Chet (2006) relacionaram o gene *tashyd1* com a produção de hidrofobinas em *T. asperellum*. Segundo esta pesquisa, as hidrofobinas são expressas pelo antagonista em plantas que apresentam sintomas de doenças radiculares causadas

por *Rhizoctonia* spp., associando a produção destas moléculas com o potencial antagonista em *T. asperellum*.

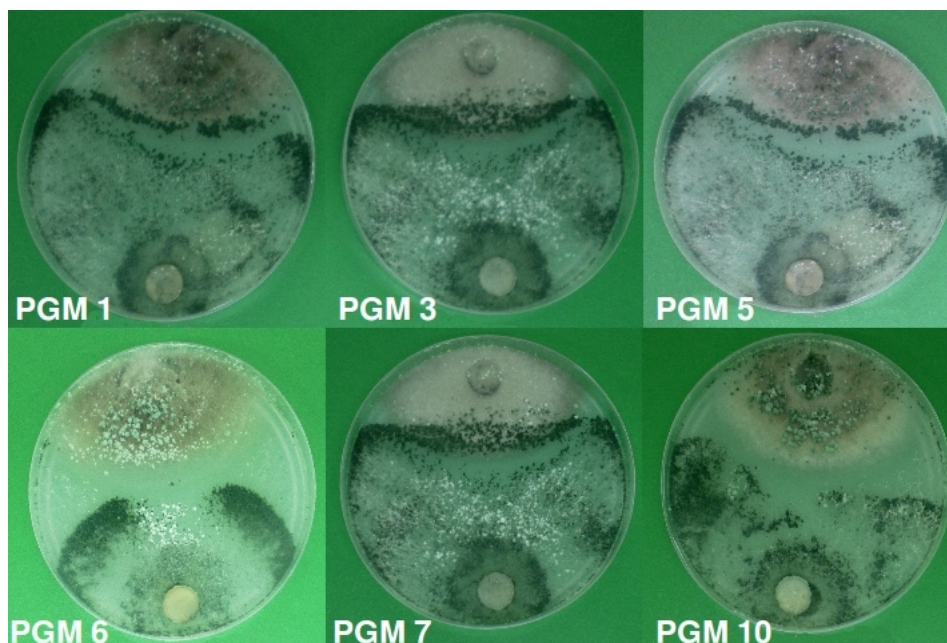


Figura 11. Pareamentos em placas de Petri entre *T. asperellum* sem dsRNA e isolados de *C. guaranicola*.

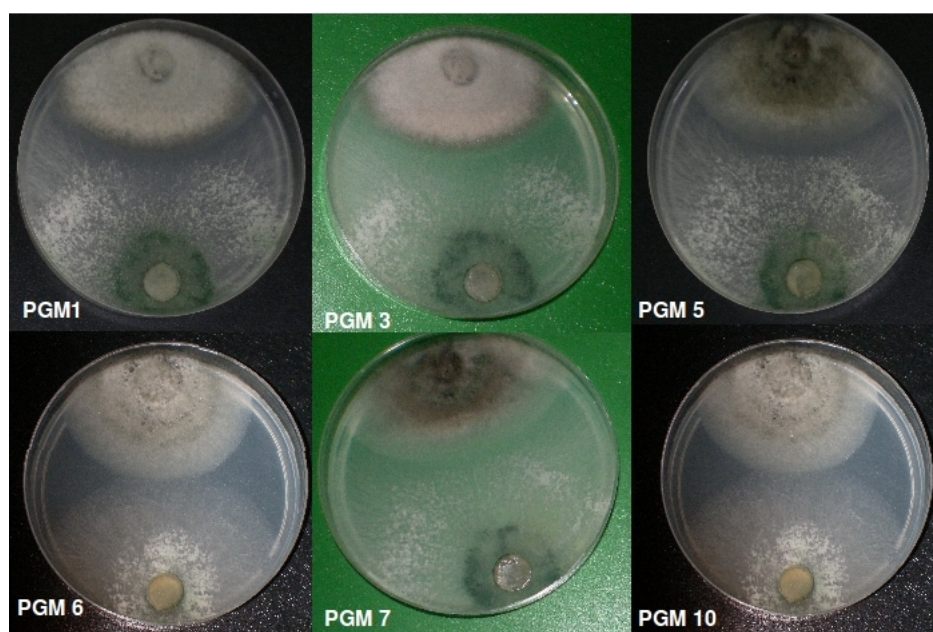


Figura 12. Pareamentos em placas de Petri entre *T. asperellum* com dsRNA e isolados de *C. guaranicola*.

O efeito das substâncias antibióticas produzidas por espécies antagonistas são variados. Campbell (1989) afirma, que entre os efeitos provocados por substâncias antibióticas liberadas por antagonistas, podem ser observadas: as reduções ou paralisações do crescimento micelial e esporulação, redução na germinação de esporos, além de distorções na hifa e endólise.

Também foram observadas alterações morfológicas relevantes no fitopatógeno (em todos os pareamentos com T22 sem dsRNA), tais como: a formação de acérvulos em menor proporção e diminuição visível da produção de conídios. Estudos de interação antagonista entre espécies de *Trichoderma* e *Sclerotinia sclerotiorum* feitos por Figueirêdo et al. (2010) relevaram a interferência de *Trichoderma* na formação de esclerócios de *S. sclerotiorum*, verificando uma redução do número de esclerócios formados.

Durante a análise microscópica dos pareamentos foi observada grande quantidade de hifas sem conteúdo protoplasmático, sugerindo micoparasitismo necrotrófico. Cook e Baker (1983), Trutmann e Keane (1990) afirmam que em muitos casos de antagonismo, as espécies de *Trichoderma* podem ser classificadas como parasitas necrotróficos, pois matam seu hospedeiro utilizando os nutrientes extravasados da hifa morta. Benítez, Rincón e Codón (2004) comenta que existem etapas sucessivas que envolvem o micoparasitismo de fungos patógenos por espécies de *Trichoderma*. Estas etapas são: crescimento quimiotrófico (onde exudatos do patógeno atraem o antagonista); reconhecimento entre o fitopatógeno e o antagonista; adesão das hifas do patógeno pelo antagonista e por fim a degradação, onde o antagonista utiliza-se de enzimas como proteases e quitinases para degradar e penetrar na parede celular do patógeno. De acordo com Brunner, Peterbauer e Mach (2003) a enzima 73-KDA N-acetyl- $\beta$ -D-glicosaminidase está relacionada aos genes envolvidos na indução da quitinase, sendo esta enzima a de maior relevância para o biocontrole pois está relacionada com a degradação da parede das células fúngicas.

#### 4.3.4 Análise Morfológica de *T. asperellum* Infectados com dsRNA

A análise do crescimento micelial dos isolados revelou discreta diferença entre os isolados de *T. asperellum* com dsRNA e sem dsRNA, sendo que, o isolado “curado” apresentou uma taxa de crescimento maior (Figura 13). Este resultado foi observado já nas primeiras 24 horas após a inoculação, pois estes isolados, atingiram a borda de uma placa de Petri em 72 horas, para os isolados com dsRNA, o tempo foi de 120 horas.

Quanto à produção de conídios, a aplicação de teste estatístico (análise de variância e teste de Tukey a 5 %) revelou em *T. asperellum* sem dsRNA uma maior produção (Tabela 3).

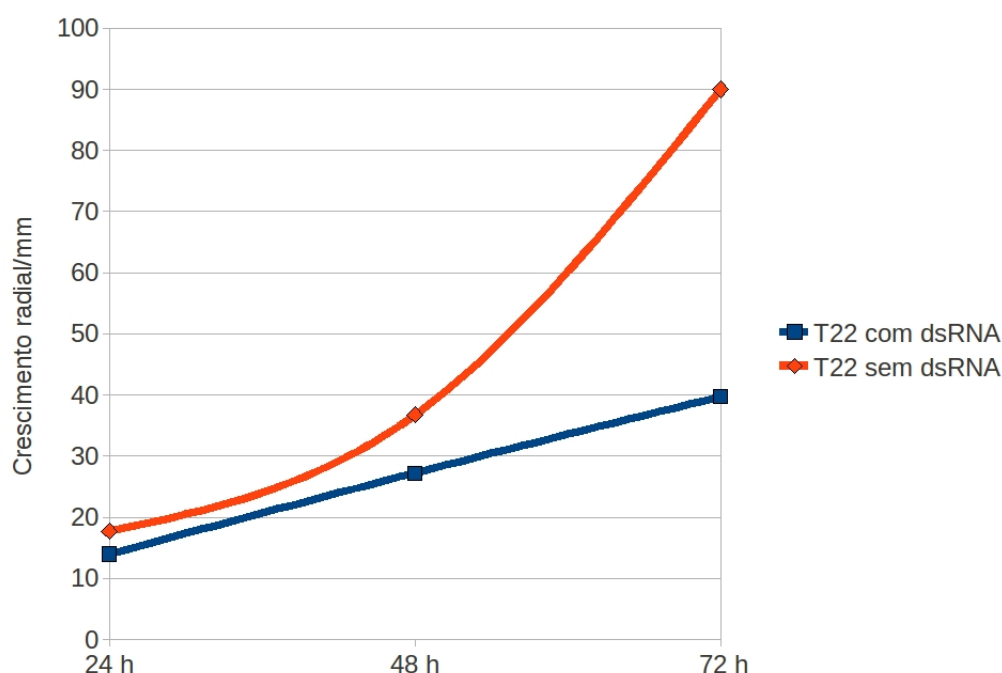


Figura 13. Curva de crescimento micelial de *T. asperellum* com e sem dsRNA.

Há vários relatos na literatura que descrevem a influência de dsRNA em espécies fúngicas (PUNJA, 1994; ZHOU; BOLAND, 1999; CHU et al., 2002; CASTRO et al., 2003; DIEPENINGEN; DEBETS; HOEKSTRA, 2006; SILVA, 2008). Quanto a influência destas partículas na produção de esporos e crescimento micelial, Silva (2008) observou que, em grande parte de seus isolados de *Guignardia citricarpa*, houve uma redução do crescimento micelial, fato que o autor atribue também ao modo de “cura” empregado, já que foi utilizada cicloexamida, e *G. citricarpa* é altamente sensível a mesma. Resultado semelhante foi encontrado por Punja (1994) em *Chalara elegans*. Contrariamente aos resultados das pesquisas acima citadas, Ihrmark, Stenstrom e Stenlid (2004) atribuem a baixa germinação de basidiosporos em *Heterobasidion annosum* à presença de dsRNA. De modo semelhante, Castro et al. (2003) demonstraram a redução da produção de conídios além da baixa atividade de lacases em *Botrytis cinerea*. A redução na produção de conídios e crescimento micelial também são observadas afetando *Fusarium graminearum* (CHU et al., 2002).

Tabela 3. Comparação entre a produção de esporos de *T. asperellum* com e sem dsRNA.

<b>Isolado</b>	<b>Médias</b>
T22 com dsRNA	6.86384 b
T22 sem dsRNA	7.18187 a

Médias Transformadas por  $y = \log x$  seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

#### 4.3.5 Análise da Transferência Interespecífica de dsRNA

Não foi observada a transferência interespecífica (transmissão vertical) de dsRNA, entre *T. asperellum* infectado com dsRNA e *T. harzianum* - 3601. Os fungos filamentosos como os do gênero *Trichoderma* crescem em redes hifais extensamente ramificadas e multicelulares. De acordo com Glass, Jacobson e Patrick (2000), um fungo individualizado pode ser visto como um sistema fluido e dinâmico, caracterizado pelo crescimento por extensão de pontas de hifas, ramificações e fusões destas hifas (anastomoses). Estas anastomoses permitem a comunicação entre os compartimentos hifais e deste modo, estes organismos podem trocar compostos celulares. Porém, este mecanismo não é comum a todos os fungos e embora existam vantagens neste processo, Debets, Yang e Griffiths (1994) relataram a existência de mecanismos genéticos que restringem a formação de heterocários em espécies geneticamente incompatíveis. Este mecanismo é chamado incompatibilidade vegetativa, ou somática ou ainda de incompatibilidade de heterocário. Para Debets, Yang e Griffiths (1994) esse mecanismo é benéfico em fungos, pois impede a transmissão de elementos citoplasmáticos infecciosos como vírus de dsRNA.

Roca et al. (2004) observaram a anastomose conidial entre espécies diferentes de *Colletotrichum*. Barcellos e Pizzirani-Kleiner (2003) caracterizaram geneticamente a compatibilidade entre linhagens de *T. pseudokoningii* por anastomose de hifas. O resultado demonstrou que os parentais obtidos eram instáveis quanto a heterocariose, mas a fusão dos compartimentos hifais transcorreu com sucesso.

Ihrmark et al. (2002) obteve a transmissão de dsRNA entre grupos compatíveis (transmissão horizontal) e incompatíveis (transmissão vertical) entre isolados de *Heterobasidion annosum*, embora essa transmissão tenha sido bem menor para o último grupo. Entre as espécies *Sclerotinia sclerotiorum* e *S. minor* a transmissão de dsRNA foi bem sucedida, segundo consta no trabalho de Melzer, Ikeda e Boland (2002). Ikeda et al. (2004) também com-



provaram que fragmentos de dsRNA menores que 3,5 Kb, são transmitidos entre *Helicobasidium mompa* e *Rosellinia necatrix*.

Relatos da transmissão entre isolados de mesma espécie é comum na literatura, conforme relatado por Castro et al. (2003), Bharathan et al. (2005), Ikeda et al. (2005) e Sotirovski et al. (2006).

Durante o pareamento em placa, observou-se a formação de barreiras de crescimento dividindo nitidamente as colônias de *T. asperellum* e *T. harzianum*. Segundo Glass, Jacobson e Patrick (2000), o mecanismo de anastomose de hifas é dividido em três estados fisiológicos: pré-contato, pós-contato e pós-fusão. A formação destas barreiras provavelmente está associada a região de pré-contato, pois, para Prosser (1994), as hifas nas regiões periféricas das colônias exibem autotropismo negativo, ou repulsão, a qual mantém uma distância entre as pontas das hifas em crescimento. Este pré-contato se dá em resposta a sinais químicos (ainda desconhecidos) emitidos por espécies compatíveis, na ausência destes, a anastomose não ocorre (PROSSER, 1994 apud BARCELLOS; PIZZIRANI-KLEINER, 2003).

#### **4.3.6 Potencial Antagônico de *T. asperellum* Associado a dsRNA contra *C. guaranicola* *in vivo***

Após o reisolamento a partir de lesões presentes nas folhas de mucuna-preta (*Mucuna aterrima*), obteve-se colônias fúngicas, que apresentaram aspectos macroscópicos e microscópicos da espécie *C. guaranicola*.

As correspondentes estatísticas analisadas, demonstraram que todos os tratamentos realizados, foram estatisticamente semelhantes em relação às testemunhas, exceto o tratamento em que se aplicou apenas o fitopatógeno, que se diferenciou dos demais (Tabela 4). Neste último, todas as plantas apresentaram lesões necróticas amarronzadas características da ação do fitopatógeno (Figura 14). Em contrapartida, nos tratamentos em que se aplicou o fitopatógeno e o antagonista, apenas uma planta (PGM5 X T22 sem dsRNA) apresentaram discretas lesões (Figuras 15, 16 e 17).

A ação biocontroladora de espécies do gênero *Trichoderma* é bem relatada para muitas espécies de fitopatógenos, incluindo o gênero *Colletotrichum*. Rocha e Oliveira (1998) avaliaram o biocontrole por espécies de *Trichoderma in vivo* contra *Colletotrichum gloeosporioides* obtendo resultados considerados pelos pesquisadores como pouco satisfatórios. De modo semelhante, Kupper, Gimenez-fernandez e Goes (2003), consideraram o controle da antracnose em citros, sob condições de campo, por *T. viride*, *T. pseudokoningii* e *T. aureoviride* ineficientes,

apresentando o mesmo comportamento da testemunha. No entanto, Freeman et al. (2004), consideram a ação de espécies de *Trichoderma* contra *C. acutatum* eficientes no controle da antracnose do morango. O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*), quando tratado com *T. asperellum* para controle de fitopatógenos, apresentou índices de produtividade superiores (cerca de 70 %) em relação às plantas não tratadas, comprovando deste modo a eficiência de *T. asperellum* como antagonista de *Colletotrichum acutatum* (LOBO JÚNIOR; BRANDÃO; GERALDINE, 2009).

Tabela 4. Comparação entre as parcelas e subparcelas do teste de antagonismo entre *T. asperellum* e *C. guaranicola* in vivo.

Parcelas	Subparcelas		
	Testemunha	T22 com dsRNA	T22 sem dsRNA
Sem patógeno	00.0000 bA	0.0000 aA	0.0000 aA
Com patógeno	25.1430 aA	1.1110 aB	0.0000 aB

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na vertical e minúscula na horizontal não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.



Figura 14. Aspecto de lesões causadas por *C. guaranicola* em mudas de mucuna-preta.



Figura 15. Planta de mucuna-preta aspergida com suspensão de esporos de *T. asperellum* sem dsRNA.



Figura 16. Planta de mucuna-preta aspergida com suspensão de esporos de *T. asperellum* com dsRNA.



Figura 17. Planta de mucuna-preta sem inóculos fúngicos (testemunha).

Com relação à presença ou ausência de dsRNA não se observou diferenças no potencial antagonístico em *T. asperellum*. O estudo do efeito de dsRNA em fungos são variados. A maior parte das pesquisas os associa com hipovirulência em espécies fitopatogênicas como: *Chryphonectria parasitica* (NUSS, 2005); *Ophiostoma ulmi* (DOHERTY et al., 2007); *Helicobasidium mompa* (SUZAKI et al., 2005); *Heterobasidion annosum* (IHRMARK; STENSTROM; STENLID, 2004) e *Botrytis cinerea* (WU et al., 2007). Não há registros na literatura a cerca da presença de dsRNA em espécies do gênero *Trichoderma*. Alguns trabalhos se concentram em espécies entomopatogênicas, empregadas no controle biológico (BOGO et al., 1996; MELZER; BIDOCHKA, 1998; MARTINS et al., 1999; AZEVEDO et al., 2000; BIDOCHKA et al., 2000; TIAGO et al., 2004; DALZOTO et al., 2006).

A virulência de *Metarhizium anisopliae* foi testada por Melzer e Bidochka (1998) contra *Gryllus domesticus*, e os resultados revelaram um aumento significativo para as linhagens livres de dsRNA. No entanto, para Martins et al. (1999) em *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* o potencial de virulência contra *Rhammatocerus schistocercoides* (gafanhoto) não é associado

a presença de dsRNA, semelhante resultado foi observado por Azevedo et al. (2000) no entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus*, testados quanto à virulência contra a mosca branca, *Bemisia tabaci*. Tiago et al. (2004) constataram não haver influência de dsRNA sobre a atividade de proteases e virulência em *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Paecilomyces fumosoroseus* sobre *Euschistus heros* (percevejo sugador). Entretanto, Dalzoto et al. (2006) observaram que a média de mortalidade contra o mesmo inseto *Euschistus heros* foi reduzida em linhagens de *Beauveria bassiana* contendo dsRNA quando comparadas com linhagens isogênicas livres de dsRNA.

## 5 CONCLUSÕES

- O dsRNA presente no isolado T22 de *Trichoderma asperellum* apresenta um genoma dividido em 4 fragmentos de tamanhos diferentes.
- O método de purificação em coluna de celulose é eficiente para purificação parcial de dsRNA em *T. asperellum*.
- O dsRNA, presente no isolado T22 de *T. asperellum*, se encontra desprovido de cápsula proteica.
- O dsRNA não é transmitido por pareamento em placa entre o isolado T22 de *T. asperellum* e *T. harzianum*.
- A presença de dsRNA em *T. asperellum* tem influência sobre a esporulação e seu crescimento micelial, em ambos os casos ocorrendo diminuição.
- O dsRNA presente no isolado T22 de *T. asperellum* influencia de forma negativa em seu potencial antagônico, em testes *in vitro*, contra *C. guaranicola*. Para os testes *in vivo* o mesmo não influencia o potencial antagônico de *T. asperellum*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-FATTAH, G.; SHABANA, Y.; ISMAIL, A. E.; RASHAD, Y. M. *Trichoderma harzianum* : a biocontrol agent against *Bipolaris oryzae*. **Mycopathologia**, v. 164, p. 81–89, 2007.
- ALBUQUERQUE, F. C. **Antracnose do Guaraná**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/Serviço de Informação Agrícola, 1961. 22 p.
- ALTSCHUL, S.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.; LIPMAN, D. Basic local alignment search tool. **Journal Molecular Biology**, v. 215, p. 403–410, 1990.
- ALVES, S. B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ/USP, 1998. 1163 p.
- ANAGNOSTAKIS, S. L. Biological control of chestnut blight. **Science**, v. 215, p. 466–471, 1982.
- \_\_\_\_\_. Improved chestnut tree condition maintained in two Connecticut plots after treatments with hypovirulent strains of the chestnut blight fungus. **Forest Science**, v. 36, p. 113–124, 1990.
- ANAGNOSTAKIS, S. L.; DAY, P. R. Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica*. **Phytopathology**, v. 69, p. 1226–1229, 1979.
- ARAKAWA, M.; NAKAMURA, H.; UETAKENAOYUKI, Y. Presence and distribution of double-stranded RNA elements in the white root rot fungus *Rosellinia necatrix*. **Mycoscience**, v. 43, p. 21–26, 2002.
- ARAÚJO, J. C. A.; PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L. A. M. R.; MOREIRA, A. Antracnose do guaranazeiro e seu controle. **Comunicado Técnico**, Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, n. 46, p. 4, 2007.
- AZEVEDO, A. C. S.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; FARIA, M. R.; FUNGARO, M. H. P. Effects of double-stranded RNA on virulence of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the silverleaf whitefly, *Bemisia tabaci* strain b (Homoptera: Aleyrodidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 61–63, 2000.
- BARCELLOS, F. G.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Genetic characterization of somatic recombination *Trichoderma pseudokoningii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 152–156, 2003.
- BATISTA, D. C. **Manejo integrado da murcha de fusário do maracujazeiro**. 89 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) — Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2002.

- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plants pathogens. **Phytopathology**, v. 72, p. 379–382, 1982.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, p. 249–260, 2004.
- BENSON, D. A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; WHEELER, D. L. Genbank. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. D25–D30, 2008.
- BENTES, J. L. S.; BARRETO, R. W. Reavaliação taxonômica de *Colletotrichum guaranicola* albuq. agente causal da antracnose do guaranazeiro. **Acta Amazonica**, v. 34, p. 129–131, 2004.
- BETTIOL, W. Controle biológico. In: KIMATI, T. H.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 717–727.
- BHARATHAN, N.; SASO, H.; GUDIPATI, L.; WHITED, K.; ANTHONY, K. Double-stranded RNA: distribution and analysis among isolates of *Rhizoctonia solani* ag-2 to -13. **Plant Pathology**, v. 54, p. 196–203, 2005.
- BHARATHAN, N.; TAVANTZIS, S. M. Assesment of genetic relatedness among double stranded RNAs from isolates of *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v. 80, p. 631–635, 1990.
- BIDOCHKA, M. J.; MELZER, M. J.; LAVENDER, T. M.; KAMP, A. M. Genetically related isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* harbour homologous dsRNA viruses. **Mycological Research**, v. 104, p. 1094–1097, 2000. Part 9.
- BOGO, M. R.; QUEIROZ, M. V.; GIMÈNEZ, D. M.; AZEVEDO, J. L.; SCHRANK, A. Double-stranded RNA and isometric virus-like particles in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, v. 100, p. 1468–1472, 1996.
- BOLAND, G. J. Hypovirulence and double-stranded RNA in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal Plant Pathology**, v. 14, p. 10–17, 1992.
- BONFIM, M. P. **Antagonismo *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo**. Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Vitória da Conquista-BA, 2007.
- BRUNNER, K.; PETERBAUER, C. K.; MACH, R. L. The nag1-*N*-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essencial for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. **Current Genetics**, v. 43, p. 289–295, 2003.
- BUCK, K. W. Fungal virology - an overview. In: BUCK, K. W. (Ed.). **Fungal Virology**. Boca Raton: CRC, 1986. p. 1–84.
- CAMPBELL, R. **Biological Control of Microbial Plant Pathology**. Sidney: C.U.P., 1989. 218 p.
- CARDOSO, J. E.; FALEIRO, V. O. Avaliação simultânea de agentes microbiológicos para controle de podridões de plântulas do feijoeiro comum. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 4., 1991, Campinas, SP. **Resumos...** Campinas, SP, 1991. p. 14.



- CARDOSO, J. E.; SILVA, S. A. G.; MARQUES, E. E. Controle químico e biológico das podridões radiculares do feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 39–44, 1997.
- CASSIOLATO, A. M. R.; BAKER, R.; MELO, I. S. Parasitismo de *Sclerotinia sclerotiorum* por mutantes de *Trichoderma harzianum* em segmentos de aipo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, 1996.
- CASTANHO, B.; BUTLER, E. E. *Rhizoctonia* decline: studies on hypovirulence and potential use in biological control. **Phytopathology**, v. 68, p. 1511–1514, 1978.
- CASTRO, M.; KRAMER, K.; VALDIVIA, L.; ORTIZ, S.; BENAVENTE, J.; CASTILLO, A. A new double-stranded RNA mycovirus from *Botrytis cinerea*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 175, p. 95–99, 1999.
- CASTRO, M.; KRAMER, K.; VALDIVIA, L.; ORTIZ, S.; CASTILLO, A. A double-stranded RNA mycovirus confers hypovirulence-associated traits to *Botrytis cinerea*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 228, p. 87–91, 2003.
- CHAIN, A. Impacto ambiental de agroquímicos e biopesticidas. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 8, p. 9–10, 1995.
- CHENG, H.; JIANG, D. H.; FU, Y. P.; LI, G. Q.; PENG, Y. L.; GHABRIAL, S. A. Molecular characterization of a dsRNA totivirus infecting the sclerotial parasite *Coniothyrium minitans*. **Virus Research**, v. 93, p. 41–50, 2003.
- CHERIF, M.; BERIHAMOU, N. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Phytopathology**, v. 80, p. 1406–1914, 1990.
- CHET, I. Biological control of soil-borne plant pathogens. In: HORNBY, D. (Ed.). **Biological control of soil-borne plant pathogens**. Wallingtonford: CAB international, 1990. p. 15–25.
- CHU, Y. M.; JEON, J. J.; YEA, S. J.; KIM, Y. H.; YUN, S. H.; LEE, Y. W.; KIM, K. H. Double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2529–2534, 2002.
- CHU, Y. M.; LIM, W. S.; YEA, S. J.; CHO, J. D.; LEE, Y. W.; KIM, K. H. Complexity of dsRNA mycovirus isolated from *Fusarium graminearum*. **Virus Genes**, v. 28, p. 135–143, 2004.
- COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens**. St. Paul: ASP Press, 1983. 539 p.
- CORTEZ, C.; GUTIERREZ, A.; OLMEDO, V.; INBAR, J.; CHET, L.; HERRERA-ESTRELLA, A. The expression of genes involved in parasitism by *Trichoderma harzianum* is triggered by a diffusible factor. **Molecular & General Genetics**, v. 260, p. 218–225, 1998.
- DALZOTO, P. R.; GLIENKE-BLANCO, C.; KAVA-CORDEIRO, V.; RIBEIRO, J. Z.; KITAJIMA, E. W.; AZEVEDO, J. L. Horizontal transfer and hypovirulence associated with double-stranded RNA in *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, v. 11, p. 1475–1481, 2006.

- DAY, P. R.; DODDS, J. A.; ELLISTON, J. E.; JAYNES, R. A.; ANAGNOSTAKIS, S. L. Double-stranded RNA in *Endothia parasitica*. **Phytopathology**, v. 67, p. 1393–1396, 1977.
- DEBETS, T. F.; YANG, X.; GRIFFITHS, A. Vegetative incompatibility in *Neurospora*: its effect on horizontal transfer of mitochondrial plasmids and senescence in natural populations. **Current Genetics**, v. 26, p. 113–119, 1994.
- DENNIS, C. J.; WEBSTER, J. Antagonism properties of species-groups of *Trichoderma*, III. hyphal interaction. **Transactions of British Mycological Society**, v. 57, p. 363–369, 1971.
- DIEPENINGEN, A. D. van; DEBETS, A. J. M.; HOEKSTRA, R. F. Dynamics of dsRNA mycoviruses in black *Aspergillus* populations. **Fungal Genetics and Biology**, v. 43, p. 446–452, 2006.
- DJONOVÍÉ, S.; POZO, M. J.; KENERLEY, C. M. Tvbg3, a b-1,6-glucanase from the biocontrol fungus *Trichoderma virens*, is involved in mycoparasitism and control of *Pythium ultimum*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7661–7670, 2006.
- DODS, J. A. Plant viral double-stranded RNA. **Annual Review of Phytopathology**, v. 22, p. 151–168, 1984.
- DOHERTY, M.; SANGANEE, K.; KOZLAKIDIS, Z.; COUTTS, R. H. A.; BRASIER, C. M.; BUCK, K. W. Molecular characterization of a totivirus and a partivirus from the genus *Ophiostoma*. **Journal of Phytopathology**, v. 155, p. 188–192, 2007.
- DOMINGO, E.; HOLLAND, J. RNA virus mutations and fitness for survival. **Annual Review of Microbiology**, v. 51, p. 151–178, 1997.
- DORES, E. F. G. C.; FREIRE, L. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas: Vias de contaminação e dinâmica dos pesticidas no ambiente aquático. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 9, p. 1–18, 1999.
- ELAD, Y. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. **European Journal of Plant Pathology**, v. 102, p. 719–732, 1996.
- ERICKSON, H. T.; CORRÊA, M. P. F.; ESCOBAR, J. R. Guaraná (*Paullinia cupana*) as a commercial crop in brazilian amazonia. **Economic Botany**, v. 38, p. 273–286, 1984.
- ESPINOLA, E. B.; DIAS, R. F.; MATTEI, R.; CARLINI, E. A. Pharmacological activity of guarana (*Paullinia cupana* mart.) in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, p. 223–229, 1997.
- ESPOSITO, E.; SILVA, M. Systematics and envirolmental application of the genus *Trichoderma*. **Critical Review in Microbiology**, v. 24, p. 89–99, 1998.
- FIGUEIRÊDO, G. S. **Controle biológico de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma* spp. e *Ulocladium atrum* e patogenicidade ao feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).** 52 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) — Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2005.
- FIGUEIRÊDO, G. S.; FIGUEIRÊDO, L. C.; CAVALCANTI, F. C. N.; SANTOS, A. C.; COSTA, A. F.; OLIVEIRA, N. T. Biological and chemical control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma* spp. and *Ulocladium atrum* and pathogenicity to bean plants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 1–9, 2010.

- FRAZZON, A. P. G.; ITABAJARA, S. V. J.; MASUDA, A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 94, p. 117–125, 2000.
- FREEMAN, S.; MINZ, D.; KOLESNIK, I.; BARBUL, O.; ZVEIBIL, A.; MAYMON, M.; NITZANI, Y.; KIRSHNER, B.; RAV-DAVID, D.; BILU, A.; DAG, A.; SHAFIR, S.; ELAD, Y. *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 361–370, 2004.
- FREITAS, D. V.; CARVALHO, C. R.; NASCIMENTO-FILHO, F. J.; ASTOLFI-FILHO, S. Karyotype with 210 chromosomes in guaraná (*Paullinia cupana* ‘sorbilis’). **Journal of Plant Research**, v. 120, p. 399–404, 2007.
- FUENTEFRÍA, A. M.; SUBH, O. I.; LANDELL, M. F.; FAGANELLO, J.; SCHRANKA, A.; VAINSTEIN, M. H.; BLACKWELL, M. *Trichosporon insectorum* sp. nov., a new anamorphic basidiomycetous killer yeast. **Mycological Research**, v. 112, p. 93–99, 2008.
- FULBRIGHT, D. W. Effect of eliminating dsRNA in hypovirulent *Endothia parasitica*. **Phytopathology**, v. 74, p. 722–724, 1984.
- GHABRIAL, S. A. Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. **Virus Genes**, v. 16, p. 119–131, 1998.
- GHABRIAL, S. A.; NIBERT, M. L. Victorivirus, a new genus of fungal viruses in the family totiviridae. **Archive Virology**, v. 154, p. 373–379, 2009.
- GIANCOLI, A. C. H.; AZEVEDO, J. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Cytological characterization of an *Aspergillus nidulans* mutant from a strain with chromosomal duplication. **Journal of Microbiology**, v. 41, p. 264–269, 2010.
- GLASS, N. L.; JACOBSON, D. J.; PATRICK, K. T. S. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. **Annual Review of Genetics**, v. 34, p. 165–186, 2000.
- GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; GOMES, N. S. B.; AUER, C. G.; SANTOS, A. F. Avaliação *in vitro* de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. à *Cylindrocladium sphaulatum*, agente causal da pinta-preta da erva-mate. **EMBRAPA**, v. 95, p. 1–3, 2000.
- HAMMAR, S.; FULBRIGHT, D. W.; ADAMS, G. C. Association of double-stranded RNA with low virulence in an isolate of *Leucostoma persoonii*. **Phytopathology**, v. 79, p. 568–572, 1989.
- HARMAN, G. E.; BJÖRKMAN, T. Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. In: HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. (Eds.). **Enzymes, biological control and commercial application: *Trichoderma* and *Gliocladium*: *Trichoderma* and *Gliocladium***. London: Taylor and Francis, 1998. v. 2, p. 229–265.
- HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews**, v. 2, p. 43–56, 2004.

- HELENIUS, A.; FRIES, E.; GAROF, H.; SIMONS, K. Solubilization of the semliki forest virus membrane with sodium deoxycholate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 436, p. 319–334, 1976.
- HERRERO, N.; MARQUEZ, S.; ZABALGOGEAZCOA, I. Mycoviruses are common among different species of endophytic fungi of grasses. **Archives of Virology**, v. 154, p. 327–330, 2009.
- HILLMAN, B. I.; SUPYANI, S.; KONDO, H.; SUZUKI, N. A reovirus of the fungus *Cryphonectria parasitica* that is infectious as particles and related to the coltivirus genus of animal pathogens. **Journal of Virology**, v. 78, p. 892–898, 2004.
- HIMENO, M.; MAEJIMA, K.; KOMATSU, K.; OZEKI, J.; HASHIMOTO, M.; SATOSHI, K.; KAGIWADA, S.; YAMAJI, Y.; NAMBA, S. Significantly low level of small RNA accumulation derived from an encapsidated mycovirus with dsRNA genome. **Virology**, v. 396, p. 69–75, 2010.
- HOLLINGS, M. Viruses associated with dieback disease of cultivated mushrooms. **Nature**, v. 196, p. 962–965, 1962.
- IHRMARK, K.; JOHANNESSON, H.; STENSTROM, E.; STENLID, J. Transmission of double-stranded RNA in *Heterobasidion annosum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 36, p. 147–154, 2002.
- IHRMARK, K.; STENSTROM, E.; STENLID, J. Double-stranded RNA transmission through basidiospores of *Heterobasidion annosum*. **Mycological Research**, v. 108, p. 149–153, 2004. Part 2.
- IKEDA, K.; NAKAMURA, H.; ARAKAWA, M.; MATSUMOTO, N. Diversity and vertical transmission of double stranded RNA elements in root rot pathogens of tree, *Helicobasidium mompa* and *Rosellinia necatrix*. **Mycological Research**, v. 108, p. 626–634, 2004.
- IKEDA, K.; NAKAMURA, H.; ARAKAWA, M.; KOIWA, T.; MATSUMOTO, N. Dynamics of double-stranded RNA segments in a *Helicobasidium mompa* clone from a tulip tree plantation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, p. 293–301, 2005.
- ILLIPRONTI JÚNIOR, R. A.; MACHADO, J. C. Antagonismo de fungos a *Sclerotinia sclerotiorum* em soja e feijão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, 1997.
- INGLIS, P. W.; VALADARES-INGLIS, M. C. Rapid isolation of double-stranded RNAs from entomopathogenic species of the fungus *Paecilomyces* using a commercial minicolumn system. **Journal of Virological Methods**, v. 67, p. 113–116, 1997.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal**. Rio de Janeiro, RJ: IBGE, 2007. 133 p.
- JACKISCH, N. B.; MENEZES, M. Efeito de *Trichoderma* spp. no controle de *Pythium aphanidermatum* em fumo (*Nicotiana tabacum*). **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 161–164, 1999.
- KILIC, O.; GRIFFIN, G. J. Effect of dsRNA-containing and dsRNA-free hypovirulent isolates of *Fusarium oxysporum* on severity of Fusarium seedling disease of soybean in naturally infested soil. **Plant and Soil**, v. 201, p. 125–135, 1998.

- KOUSIK, C. S.; SNOW, J. P.; VALVERDE, R. A. Comparison of double stranded RNA components and virulence among isolates of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA and AG-1 IB. **Phytopathology**, v. 84, p. 44–49, 1994.
- KUPPER, K. C.; GIMENE-FERNANDEZ, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 251–257, 2003.
- LEAL, S. C. M.; BERTIOLI, D. J.; BALL, B. V.; BUTT, T. M. Presence of double-stranded RNAs and virus-like particles in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science Technology**, v. 4, p. 89–94, 1994.
- LI, G. Q.; JIANG, D. H.; WANG, D. B.; ZHOU, B.; RIMMER, R. Double-stranded RNAs associated with hypovirulence of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Progress in Natural Science**, v. 9, p. 837–841, 1999.
- LILLY, V. G.; BARNET, H. L. **Physiology of the fungi**. New York: McGraw-Hill, 1951. 464 p.
- LIMA, S. S.; ABADIO, A. K. R.; ARAUJO, E. F.; KITAJIMA, E. W.; SARTORATO, A.; QUEIROZ, M. V. de. Mycovirus in *Pseudocercospora griseola*, the causal agent of angular leaf spot in common bean. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 56, p. 395–365, 2010.
- LINS, S. R. O.; ABREU, M.; ALVES, E. Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp. em plântulas de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 36–42, 2007.
- LISBOA, J.; FELIX, C. R. Purification and characterization of a  $\beta$ -glucanase produced by *Trichoderma harzianum* showing biocontrol potential. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 21–29, 2007.
- LIU, Y.; YANG, Q. Cloning and heterologous expression of aspartic protease SA76 related to biocontrol in *Trichoderma harzianum*. **Research Letters**, v. 277, p. 173–181, 2007.
- LOBO JÚNIOR, M.; ABREU, M. S. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. **Ciência Agrotécnica**, v. 24, p. 521–526, 2000.
- LOBO JÚNIOR, M.; BRANDÃO, R. S.; GERALDINE, A. M. **Produtividade do Feijoeiro Comum, em Campo, em Tratamentos com *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma asperellum***. Santo Antônio de Goiás, GO, 2009.
- LORITO, M. Chitinolytic enzymes and their genes. In: HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. (Eds.). **Enzymes, biological control and commercial application: *Trichoderma* and *Gliocladium***. London: Taylor and Francis, 1998. v. 2, p. 73–99.
- LUNDBERG, M.; UNESTAN, T. Antagonism against *Fomes annosus* - comparison between different test method *in vitro* and *in vivo*. **Mycopathologia**, v. 70, p. 107–115, 1980.
- MANOCHA, M. S.; BALASUBRAMANIAN, R. Fungal chitinases: their properties and roles in morphogenesis, mycoparasitism and control of pathogenic fungi. In: PERINI, O.; ONELLETTE, G. (Eds.). **Most wall alterations by parasitic fungi**. Minnesota: American Phytopathologic Society, 1994. p. 81–90.

- MARCELLO, C. M.; STEINDORFF, A. S.; NASCIMENTO, R. S.; BATAUSB, L. A. M.; SILAVA, S. P.; ULHOAB, I. S. Expression analysis of the exo-b-1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. **Microbiological Research**, v. 165, p. 75–81, 2010.
- MÁRQUEZ, L.; REDMAN, R.; RODRIGUEZ, R. R. M. A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. **Science**, v. 315, p. 513–515, 2007.
- MARTINS, M. K.; FURLANETO, M. C.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; FARIA, M. R.; FUNGARO, M. H. P. Double-stranded RNA in the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride*. **Current Genetics**, v. 36, p. 94–97, 1999.
- MAY, L. L.; KIMATI, H. Controle biológico de *Phytophthora parasitica* em mudas de citros. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 18–23, 1999.
- MCCABE, P.; PFEIFFER, P.; ALFEN, N. V. The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. **Trends in Microbiology**, v. 7, p. 377–381, 1999.
- MELZER, M. J.; BIDOCHKA, M. J. Diversity of double-stranded RNA viruses within populations of entomopathogenic fungi and potential implications for fungal growth and virulence. **Mycologia**, v. 90, p. 586–594, 1998.
- MELZER, M. S.; IKEDA, S. S.; BOLAND, G. J. Interspecific transmission of double-stranded RNA and hypovirulence from *Sclerotinia sclerotiorum* to *S. minor*. **Phytopathology**, v. 92, p. 780–784, 2002.
- MENDOZA-MENDOZA, A.; POZO, M. J.; GRZEGORSKI, D.; MARTINEZ, P.; GARCIA, J. M.; OLMEDO-MONFIL, V.; CORTES, C.; KENERLEY, C.; HERRERA-ESTRELLA, A. Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma* through inactivation of a mitogen-activated protein kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 15965–15970, 2003.
- MERTENS, P. The dsRNA viruses. **Virus Research**, v. 101, p. 3–13, 2004.
- MICHEREFF, S. J. **Patogenicidade e biocontrole de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils., agente da antracnose do sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench.] através de *Trichoderma***. 157 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) — Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 1991.
- MICHEREFF, S. J. **Controle químico de doenças de plantas**. [S.l.], 2000. Disponível em: <[www.ufrpe.br:6789/fitopatologia/ControleQuimicodedoencasdePlantas.pdf](http://www.ufrpe.br:6789/fitopatologia/ControleQuimicodedoencasdePlantas.pdf)>. Acesso em: 23 ago. 2009.
- MOREIRA, L. M.; MAY, L. L.; VALDEBENITO, R. M.; LIMA, M. L. R. Z. C.; POSSAMAI, J. C. Controle em pós-colheita de *Monilia fructicola* em pêssegos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 395–398, 2002.
- MORRIS, T.; DODDS, J. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. **Phytopathology**, v. 69, p. 854–858, 1979.

- MPIKA, J.; KÉBÉ, I. B.; ISSALI, A. E.; N'GUESSAN, F. K.; DRUZHININA, S.; KOMON-ZÉLAZOWSKA, M.; KUBICEK, C. P.; AKÉ, S. Antagonist potential of *Trichoderma* indigenous isolates for biological control of *Phytophthora palmivora* the causative agent of black pod disease on cocoa (*Theobroma cacao* L.) in côte d'ivoire. **African Journal of Biotechnology**, v. 20, p. 5280–5293, 2009.
- NORONHA, M. A.; SOBRINHO, S. A.; SILVEIRA, N. S. S.; MARIANO, R. L. R.; MARANHÃO, E. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* em feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 22, p. 156–162, 1996.
- NUSS, D. L. Hypovirulence: mycoviruses at the fungal-plant interface. **Nature Review Microbiology**, v. 3, p. 632–642, 2005.
- NUSS, D. L.; CHEN, B.; GELETKA, L. M.; PARSLEY, T. B. Engineering hypoviruses for fundamental and practical applications. In: TAVANTZIS, S. M. (Ed.). **dsRNA genetics elements: concepts and applications in agriculture, forestry, and medicine**. New York: CRC, 2002. p. 145–164.
- NUSS, D. L.; KOLTIN, Y. Significance of dsRNA genetic elements in plant pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, p. 37–58, 1990.
- OLEJNÍKOVA, P.; ONDRUSOVÁ, Z.; KRYSŤOFOVÁ, S.; HUDECOVÁ, D. Benomyl-resistant mutant strain of *Trichoderma* sp. with increased mycoparasitic activity. **Folia Microbiology**, v. 55, p. 102–104, 2010.
- OSAKI, H.; NAKAMURA, H.; NOMURA, K.; MATSUMOTO, N.; YOSHIDA, K. Nucleotide sequence of a mitochondrial RNA virus from the plant pathogenic fungus, *Helicobasidium mompa* Tanaka. **Virus Research**, v. 107, p. 39–46, 2005.
- PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol: biology, ecology and potential for biocontrol. **Annual Reviews of Phytopathology**, v. 23, p. 23–54, 1985.
- PARENTE, V. M.; OLIVEIRA-JÚNIOR, A. R.; COSTA, A. M. **Potencialidades Regionais: estudo de viabilidade econômica – guaraná**. Manaus, AM, 2003. 34 p.
- PATRICIO, F. R. A.; KIMATI, H.; BARROS, B. C. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Phytophthora aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopathologica**, v. 27, p. 223–229, 2001.
- PEARSON, M. N.; BEEVER, R. E.; BOINE, B.; ARTHUR, K. Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, p. 115–128, 2009.
- PEREIRA, J. C. R.; CHAVES, G. M.; MATSUOKA, L. Z. K.; NA, R. S.-A.; VALE, F. X. R. Controle integrado de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, p. 254–260, 1996.
- PROSSER, J. I. The kinetics of filamentous growth and branching. In: GOW, N. A.; GADD, G. M. (Eds.). **Growing Fungus**. London: Chapman and Hall, 1994. p. 301–318.
- PUNJA, Z. Influence of double-stranded RNA on growth, sporulation, pathogenicity, and survival of *Chalara elegans*. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 1009–1014, 1994.

- RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1, p. 17–20, 1985.
- REIS, A.; OLIVEIRA, S. M.; MENEZES, M.; MARIANO, R. L. R. Potencial de isolados de *Trichoderma* para biocontrole da murcha de *Fusarium* do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 21, p. 16–20, 1995.
- ROBERTI, R.; BADIALI, F.; PISI, A.; VERONESI, A.; PANCALDI, D.; CESARI, A. Sensitivity of *Clonostachys rosea* and *Trichoderma* spp. as potential biocontrol agents to pesticides. **Journal of Phytopathology**, v. 154, p. 100–109, 2006.
- ROCA, M. G.; DAVIDE, L. C.; DAVIDE, L. M.; MENDES-COSTA, M. C.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Conidial anastomosis fusion between *Colletotrichum* species. **Mycological Research**, v. 108, p. 1320–1326, 2004.
- ROCHA, J. R. S.; OLIVEIRA, N. T. Controle biológico de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente da antracnose do maracujazeiro (*Passiflora edulis*), com *Trichoderma koningii*. **Summa Phytopathologica**, v. 24, p. 180–183, 1998.
- ROMO, M.; LEUCHTMANN, A.; GARCIA, B.; ZABAGOGEAZCOA, I. A totivirus infecting the mutualistic fungal endophyte *Epichloe festucae*. **Virus Research**, v. 124, p. 38–43, 2007.
- ROSA, D. R.; HERRERA, C. J. L. Evaluation of *Trichoderma* spp. as biocontrol agents against avocado white root. **Biological Control**, v. 51, p. 66–71, 2009.
- SAMUELS, G.; CHAVERRI, P.; FARR, D.; MCCRAY, E. **Trichoderma Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA**. [S.l.], 2010. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>>. Acesso em: 17 jun. 2010.
- SANTIAGO, A.; QUINTERO, J. M.; AVILE, M.; DELGADO, A. Effect of *Trichoderma asperellum* strain t34 on iron nutrition in white lupin. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 41, p. 2453–2459, 2009.
- SANZ, L.; MONTERO, M.; GRONDONA, I.; VIZCAÍNO, J. A.; LLOBELL, A.; HERMOSA, R.; MONTE, E. Cell wall-degrading isoenzyme profiles of *Trichoderma* biocontrol strains show correlation with rDNA taxonomic species. **Current Genetics**, v. 46, p. 277–286, 2004.
- SAVAZZINI, F.; LONGA, C. M. O.; PERTOT, I.; GESSLE, C. Real-time PCR for detection and quantification of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* strain SC1 in soil. **Journal of Microbiological Methods**, v. 73, p. 185–194, 2008.
- SCHMITT, M. J.; BREINIG, F. The viral killer system in yeast: from the molecular biology to application. **FEMS Microbiology Review**, v. 26, p. 257–276, 2002.
- SEGARRA, G.; CASANOVA, E.; AVILÉS, M.; TRILLAS, I. *Trichoderma asperellum* strain t34 controls *Fusarium* wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron. **Fungal Microbiology**, v. 59, p. 141–149, 2010.
- SILVA, F. A. G. **Espécies de *Trichoderma* Pers. Ex. Fr. no biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder e Hansen, agente da fusariose do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. 115 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) — Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 1992.



- SILVA, T. M. **RNA Dupla Fita em *Guignardia citricarpa* e Estimativa do Número de cromossomos**. Dissertação (Mestrado) — Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- SILVEIRA, N. S. S.; MICHEREFF, S. J.; MENEZES, M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Potencial de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *Sclerotium rolfsii* em feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 20, p. 22–25, 1994.
- SIVAN, A.; CHET, I. Biological control of *Fusarium* spp. in cotton, wheat and muskmelon by *Trichoderma harzianum*. **Journal of Phytopatology**, v. 116, p. 39–47, 1986.
- SIVAN, A.; CHET, I.; ZEIDAN, O.; UCKO, O. Application of *Trichoderma harzianum* for biological control of *Fusarium* wilt on melons and *Fusarium* crown rot on tomatoes. **Phytoparasitica**, v. 13, p. 157–168, 1985.
- SOTIROVSKI, K.; MILGROOM, M. G.; RIGLING, D.; HINIGER, U. Occurrence of *Cryphonectria hypovirus 1* in the chesnut blight fungus in Macedonia. **Forest Pathology**, v. 36, p. 136–143, 2006.
- SOUSA, N. R. **Variabilidade genética e estimativas de parâmetros genéticos em germoplasma de guaranazeiro**. 99 f. Tese (Doutorado em Agronomia) — Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2003.
- SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; RODRIGUES, G. F. Uso de agrotóxicos nas diferentes regiões brasileiras: subsídio para a geomedicina. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 8, p. 111–126, 1998.
- SUBUDDHI, U.; MISHRA, A. Effect of sodium deoxycholate and sodium cholate on dppc vesicles: A fluorescence anisotropy study with diphenylhexatriene. **Journal of Chemical Science**, v. 119, p. 169–174, 2007.
- SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford, UK: CAB International, 1992. p. 1–26.
- SUZAKI, K.; IKEDA, K. I.; SASAKI, A.; KANEMATSU, S.; MATSUMOTO, N.; YOSHIDA, K. Horizontal transmission and host-virulence attenuation of totivirus in violet root rot fungus *Helicobasidium mompa*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 71, p. 161–168, 2005.
- TAVARES, A. M.; ATROCH, A. L.; NASCIMENTO-FILHO, F. J.; PEREIRA, J. C. R.; ARAÚJO, J. C. A.; MORAES, L. A. C. **Cultura do Guaranazeiro no Amazonas**. 4. ed. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2005. 40 p. (Sistemas de Produção, 2).
- TIAGO, P. V. **Estudo de proteases degradadoras de cutícula produzidas por *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Paecilomyces fumosoroseus***. Dissertação (Mestrado) — (Mestrado em Microbiologia), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2001.
- TIAGO, P. V.; FUNGARO, M. H. P.; FARIA, M. R.; FURLANETO, M. C. Effects of double-stranded RNA in *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and *Paecilomyces fumosoroseus* on protease activities, conidia production, and virulence. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 335–339, 2004.

TOOLEY, P. W.; HEWINGS, A. D.; FALKENSTEIN, K. F. Detection of double-stranded RNA in *Phytophthora infestans*. **Phytopathology**, v. 79, p. 470–474, 1989.

TRUTMANN, P.; KEANE, P. J. *Trichoderma koningii* as a biological control agent for *Sclerotinia sclerotiorum* in southern Australia. **Soil Biological Biochemistry**, v. 22, p. 43–50, 1990.

TSAI, P. F.; PEARSON, M. N.; BEEVER, R. E. Mycoviruses in *Monilinia fructicola*. **Mycological Research**, v. 108, p. 907–912, 2004.

TSENG, S. C.; LIU, S. Y.; YANG, H.; CHAUR-TSUEN, L. Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ETS 323 in response to *Rhizoctonia solani*. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 6914–6922, 2008.

TURCHETTI, T.; FERRETTI, F.; MARESI, G. Natural spread of *Cryphonectria parasitica* and persistence of hypovirulence in three italian coppiced chestnut stands. **Forest Pathology**, v. 38, p. 227–243, 2008.

URS, R. R.; MAYHEW, D. E.; ROBERTS, P. D. Hypovirulence of *Didymella bryoniae* associated with dsRNA. **Journal of Phytopathology**, v. 152, p. 55–59, 2004.

VANZYL, L. M.; WINGFIELD, M. J.; ALFENAS, A. C.; CROUS, P. W. Hypovirulence detected in brazilian isolates of *Cryphonectria cubensis*. **Plant Pathology**, v. 48, p. 267–272, 1999.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAMB, K.; GHISALBERT, E. L.; MARRAA, R.; WOOA, S. L.; LORITOA, M. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 1–10, 2008.

VITERBO, A.; CHET, I. TasHyd1, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, p. 249–258, 2006.

VITERBO, A.; LANDAU, U.; KIM, S.; CHERNIN1, L.; CHET, I. Characterization of accdeaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* t203. **FEMS Microbiology Letters**, v. 305, p. 42–48, 2010.

WARE, G. W. Effect of pesticides on non-target organisms. **Residue Reviews**, v. 76, p. 173–201, 1980.

WELLS, H. D.; BELL, D. K. Variable antagonist reaction *in vitro* of *Trichoderma harzianum* against several pathogens. **Phytopathology**, v. 69, p. 1048–1049, 1979.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: \_\_\_\_\_. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. 1. ed. New York: Academic Prees, 1990. p. 315–322.

WU, M.; ZHANG, L.; LI, G.; JIANG, D. H.; HOU, M. S.; HUANG, H. C. Hypovirulence and double-stranded RNA in *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, v. 97, p. 1590–1599, 2007.

YOU, J.; DAI, H.; CHEN, Z.; LIU, G.; HE, Z.; SONG, F.; YANG, X.; FU, H.; ZHANG, L.; CHEN, X. Trichoderone, a novel cytotoxic cyclopentenone and cholesta-7,22-diene-3b,5a,6b-triol, with new activities from the marine-derived fungus *Trichoderma* sp. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 37, p. 245–252, 2010.

ZEINLINGER, S.; REITHNER, B.; SCALA, V.; PEISSI, L.; LORITO, M.; MACH, R. L. Signal transduction by tga 3, a novel g protein subunit of *Trichoderma atroviride*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1591–1597, 2005.

ZHOU, T.; BOLAND, G. J. Hypovirulence and double-stranded RNA in *Sclerotinia homoeocarpa*. **Phytopathology**, v. 87, p. 147–156, 1997.

\_\_\_\_\_. Mycelial growth and production of oxalic acid by virulent and hypovirulent isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 21, p. 93–99, 1999.

## ***APÊNDICE A***

### ***ISOLADOS FÚNGICOS***

Tabela 5: Isolados utilizados nesta pesquisa

<b>Número</b>	<b>Espécie</b>	<b>Código</b>	<b>Origem</b>
1	<i>Trichoderma</i> sp.	T-1	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
2	<i>Trichoderma</i> sp.	T-2	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
3	<i>Trichoderma</i> sp.	T-3	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
4	<i>Trichoderma</i> sp.	T-4	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
5	<i>Trichoderma</i> sp.	T-5	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
6	<i>Trichoderma</i> sp.	T-6	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
7	<i>Trichoderma</i> sp.	T-7	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
8	<i>Trichoderma</i> sp.	T-8	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
9	<i>Trichoderma</i> sp.	T-9	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
10	<i>Trichoderma</i> sp.	T-10	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
11	<i>Trichoderma</i> sp.	T-11	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
12	<i>Trichoderma</i> sp.	T-12	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
13	<i>Trichoderma</i> sp.	T-13	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
14	<i>Trichoderma</i> sp.	T-14	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
15	<i>Trichoderma</i> sp.	T-15	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
16	<i>Trichoderma</i> sp.	T-16	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
17	<i>Trichoderma</i> sp.	T-17	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
18	<i>Trichoderma</i> sp.	T-18	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
19	<i>Trichoderma</i> sp.	T-19	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
20	<i>Trichoderma</i> sp.	T-20	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
21	<i>Trichoderma</i> sp.	T-21	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
22	<i>Trichoderma</i> sp.	T-22	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
23	<i>Trichoderma</i> sp.	F. Cit 4.2.4	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
24	<i>Trichoderma</i> sp.	F. Cit 6.2.1	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
25	<i>Trichoderma</i> sp.	CG - 80	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
26	<i>Trichoderma</i> sp.	CG – 87	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
27	<i>Trichoderma</i> sp.	CG – 89	EMBRAPA- Jaguariúna-SP
28	<i>Trichoderma</i> sp.	M U P- 2	FCA-UFAM
29	<i>Trichoderma</i> sp.	M U P- 3	FCA-UFAM
30	<i>Trichoderma</i> sp.	M U P- 4	FCA-UFAM
31	<i>Trichoderma</i> sp.	M U P -6	FCA-UFAM

Continua...

Continuação...

Número	Espécie	Código	Origem
32	<i>Trichoderma</i> sp.	M U P- 8	FCA-UFAM
33	<i>Trichoderma</i> sp.	M U P- 10	FCA-UFAM
34	<i>Trichoderma</i> sp.	L1RB 4	
35	<i>Trichoderma</i> sp.	L1RC 4	
36	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	3	
37	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	15	
38	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	14	
39	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	9	
40	<i>Trichoderma</i> sp.	0	
41	<i>Trichoderma harzianum</i>	3601	URM-UFPE- Recife-PE
42	<i>Trichoderma viride</i>	2820	URM-UFPE- Recife-PE
43	<i>Trichoderma viride</i>	2745	URM-UFPE- Recife-PE
44	<i>Trichoderma aureoviride</i>	4915	URM-UFPE- Recife-PE
45	<i>Trichoderma</i> sp.	DC 3	Biotativos- UFAM
46	<i>Trichoderma</i> sp.	D 10.2	Biotativos- UFAM
47	<i>Trichoderma</i> sp.	DW	Biotativos- UFAM
48	<i>Trichoderma</i> sp.	D1.MC	Biotativos- UFAM
49	<i>Trichoderma</i> sp.	D* MC	Biotativos- UFAM
50	<i>Trichoderma</i> sp.	DW . MC	Biotativos- UFAM
51	<i>Trichoderma</i> sp.	D 5.1.E	Biotativos- UFAM
52	<i>Trichoderma</i> sp.	DC 1	Biotativos- UFAM
53	<i>Trichoderma</i> sp.	DC3 (PM)	Biotativos- UFAM
54	<i>Trichoderma</i> sp.	D5.1 I	Biotativos- UFAM
55	<i>Trichoderma</i> sp.	DC3	Biotativos- UFAM
56	<i>Trichoderma</i> sp.	Ansp 22.1	Biotativos- UFAM
57	<i>Trichoderma</i> sp.	Asp C 31.2 A	Biotativos- UFAM
58	<i>Trichoderma</i> sp.	Asp C 31.2 C	Biotativos- UFAM
59	<i>Trichoderma</i> sp.	Asp R 12.1	Biotativos- UFAM
60	<i>Trichoderma</i> sp.	Asp R 21.2	Biotativos- UFAM
61	<i>Trichoderma</i> sp.	Asp C 3.12 B	Biotativos- UFAM
62	<i>Trichoderma</i> sp.	Mpg 16.13 B	Biotativos- UFAM
63	<i>Trichoderma</i> sp.	Mpg 22.2 A	Biotativos- UFAM

Continua...

Continuação...

<b>Número</b>	<b>Espécie</b>	<b>Código</b>	<b>Origem</b>
64	<i>Trichoderma</i> sp.	M pR 61.1	Biotativos- UFAM
65	<i>Trichoderma</i> sp.	MpC 213.2	Biotativos- UFAM
66	<i>Trichoderma</i> sp.	MpC 113.3	Biotativos- UFAM
67	<i>Trichoderma</i> sp.	MpC 33.1	Biotativos- UFAM
68	<i>Trichoderma</i> sp.	VRC 22 B	Biotativos- UFAM
69	<i>Trichoderma</i> sp.	VRC 23.2	Biotativos- UFAM
70	<i>Trichoderma</i> sp.	VRC 22.2	Biotativos- UFAM
71	<i>Trichoderma</i> sp.	VRC 12.1	Biotativos- UFAM
72	<i>Trichoderma</i> sp.	VA fes	Biotativos- UFAM
73	<i>Trichoderma</i> sp.	VR trb	Biotativos- UFAM
74	<i>Trichoderma</i> sp.	DGC 11.1	Biotativos- UFAM
75	<i>Trichoderma</i> sp.	P 1 c	Endofíticos de Pimenta Longa
76	<i>Trichoderma</i> sp.	P 1 d	Endofíticos de Pimenta Longa
77	<i>Trichoderma</i> sp.	P 1 e	Endofíticos de Pimenta Longa
78	<i>Trichoderma</i> sp.	P 4 b	Endofíticos de Pimenta Longa
79	<i>Trichoderma</i> sp.	P 4 c	Endofíticos de Pimenta Longa
80	<i>Trichoderma</i> sp.	P 5 a	Endofíticos de Pimenta Longa
81	<i>Trichoderma</i> sp.	P 5 b	Endofíticos de Pimenta Longa
82	<i>Trichoderma</i> sp.	P 1 d	Endofíticos de Pimenta Longa
83	<i>Trichoderma</i> sp.	P 5 e	Endofíticos de Pimenta Longa
84	<i>Trichoderma</i> sp.	P 7 b	Endofíticos de Pimenta Longa
85	<i>Trichoderma</i> sp.	P 7 d	Endofíticos de Pimenta Longa
86	<i>Trichoderma</i> sp.	P 9 b	Endofíticos de Pimenta Longa
87	<i>Trichoderma</i> sp.	P 9 c	Endofíticos de Pimenta Longa
88	<i>Trichoderma</i> sp.	P 9 d	Endofíticos de Pimenta Longa
89	<i>Trichoderma</i> sp.	P 11 a	Endofíticos de Pimenta Longa
90	<i>Trichoderma</i> sp.	P 11 b	Endofíticos de Pimenta Longa
91	<i>Trichoderma</i> sp.	P 11 c	Endofíticos de Pimenta Longa
92	<i>Trichoderma</i> sp.	P 11 e	Endofíticos de Pimenta Longa
93	<i>Trichoderma</i> sp.	P 14 b	Endofíticos de Pimenta Longa
94	<i>Trichoderma</i> sp.	P 14 c	Endofíticos de Pimenta Longa
95	<i>Trichoderma</i> sp.	P 16 d 2	Endofíticos de Pimenta Longa

Continua...

Continuação...

<b>Número</b>	<b>Espécie</b>	<b>Código</b>	<b>Origem</b>
96	<i>Trichoderma</i> sp.	P 18 b	Endofíticos de Pimenta Longa
97	<i>Trichoderma</i> sp.	P 26 a	Endofíticos de Pimenta Longa
98	<i>Trichoderma</i> sp.	P 26 c	Endofíticos de Pimenta Longa
99	<i>Trichoderma</i> sp.	P 26 d 2	Endofíticos de Pimenta Longa
100	<i>Trichoderma</i> sp.	P 27 b 23	Endofíticos de Pimenta Longa
101	<i>Colletotrichum guaranicola</i>	PGM – 1.2.3	Genética- UFAM
102	<i>Colletotrichum guaranicola</i>	PGM- 3. 1.2	Genética- UFAM
103	<i>Colletotrichum guaranicola</i>	PGM – 5	Genética- UFAM
104	<i>Colletotrichum guaranicola</i>	PGM – 6	Genética- UFAM
105	<i>Colletotrichum guaranicola</i>	PGM – 7	Genética- UFAM
106	<i>Colletotrichum guaranicola</i>	PGM- 10	Genética- UFAM