

**Aspectos relacionados ao controle
biológico do mofo branco causado por
*Sclerotinia sclerotiorum***

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 168

**Aspectos relacionados ao controle
biológico do mofo branco causado por
*Sclerotinia sclerotiorum***

Danillo Oliveira de Alvarenga

Paulo Roberto Queiroz

Alice Marinho de Almeida

Sueli Corrêa Marques de Mello

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-
3624 <http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Lara Pereira Machado*

Editoração eletrônica:

1ª edição

1ª impressão (2007):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

A 838 Aspectos relacionados ao controle biológico do mofo branco causado por
Sclerotinia sclerotiorum / Danillo Oliveira de Alvarenga ... [et al.]. -- Brasília, DF:
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

24 p. -- (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos
e Biotecnologia, 1676 - 1340; 168).

1. *Sclerotinia sclerotiorum* - mofo branco - controle biológico. I. Alvarenga,
Danillo Oliveira de. II. Série.

632.96 - CDD 21.

Aspectos relacionados ao controle biológico do mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*

Danillo Oliveira de Alvarenga¹

Paulo Roberto Queiroz²

Alice Marinho de Almeida³

Sueli Corrêa Marques de Mello⁴

Resumo

Um estudo foi desenvolvido com o objetivo de determinar aspectos envolvidos no controle biológico do mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, com o uso de *Trichodema*. Várias linhagens de *T. harzianum* foram testadas *in vitro* e *in vivo* contra o patógeno. A linhagem que mostrou mais baixa capacidade antagonista nestes ensaios, CEN240, foi então comparada fisiologicamente e sob pressão de seleção por Benomil, com linhagens de capacidade antagonista previamente conhecida, ou seja, CEN168, CEN198, CEN222 e CEN266 (alto antagonismo) e CEN246 (baixo antagonismo) quanto à produção de enzimas quitinolíticas, glucanásicas e proteásicas. Os fungos não diferiram quanto à atividade enzimática. O tratamento do solo com a linhagem CEN219 resultou em um incremento da proporção de plantas sadias (para cerca de 90-95%). As linhagens CEN168, CEN246, CEN262 e CEN266 poderão possibilitar um manejo integrado com fungicidas do grupo dos Benzimidazóis. Os resultados indicaram que o potencial de biocontrole, no caso do isolado CEN168, não está correlacionado com atividade enzimática em filtrado de cultura. Futuros trabalhos deverão focar no mecanismo de modos de ação envolvidos.

Palavras-chave: enzimas quitinolíticas, micoparasitismo, controle biológico, mofo branco de feijoeiro e da soja.

¹ Biólogo, graduando, Centro Universitário de Brasília - UniCEUB

² Biólogo, Ph.D., Centro Universitário de Brasília - UniCEUB

³ Bióloga, graduanda, Centro Universitário de Brasília - UniCEUB

⁴ Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

ABSTRACT

A study was carried out in order to determine aspects related to biological control of the white mold caused by *Sclerotinia sclerotiorum*, using *Trichoderma*. Several *T. harzianum* lineages were tested *in vitro* e *in vivo* against the pathogen. The lineage that showed lower antagonistic capability in these essays, CEN240, was then compared in terms of the physiology and under selection pressure by Benomil, with lineages of antagonistic capability previously known as CEN168, CEN198, CEN222 e CEN266 (high antagonism) and CEN246 (low antagonism) as regards chitinases, glucanases and proteases. Similar results were observed with the fungi in terms of enzymatic activities. Treating the soil with CEN 219 lineage resulted in an increase in the more proportion of healthy plants (to about 90-95%). The lineages CEN168, CEN246, CEN262 and CEN266 could be used for the integrated management of the disease with Benzimidazoles fungicides. Our findings indicated that the potential in biocontrol in the CEN168 lineage case is not correlated with enzymatic activities in culture filtrate. Future investigation will focus on the mechanism of mode of action involved.

Additional keywords: chitinolytic enzymes, micoparasitism, biological control, white mold of bean and soybean.

INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* [L.] Merrill) e o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (Fabales: Fabaceae) encontram-se entre as principais espécies cultivadas em todo o mundo. Especialmente para a população da América Latina, onde é amplamente consumido, o feijão constitui fonte de baixo custo de proteínas, carboidratos, lipídios, minerais, vitaminas e fibras (MESSINA, 1999). A soja, por sua vez, está entre as culturas de maior expressão mundial. Nesse cenário, o Brasil se destaca como primeiro produtor de feijão e segundo produtor de soja (Embrapa, 2006a, 2006b).

Um dos grandes obstáculos para a produção dessas duas leguminosas tem sido o mofo branco, doença causada pelo ascomiceto *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary (Helotiales: Sclerotiniaceae). Trata-se de um patógeno não específico já relatado em 361 espécies de plantas, agrupadas dentro de 64 famílias. Sua ocorrência abrange praticamente todos os países do mundo, com perdas na produção de até 100 % (PURDY, 1979).

O mofo branco causa diversos sintomas, tais como podridões de pré e pós-emergência, tombamento de plântulas, murcha de folhas, podridão do colo, da raiz e da coroa e necrose total dos tecidos (KIMATI et al., 2005). Sob condições de umidade, caracteriza-se pela presença de um micélio branco e contonoso na superfície externa das plantas. Alta umidade relativa do ar associada a temperatura entre 25 °C e 30 °C são favoráveis ao patógeno.

A disseminação de *S. sclerotiorum* ocorre por meio de esclerócios, estruturas quiescentes que permanecem viáveis no solo por longos períodos de tempo até que as condições ambientais se tornem favoráveis para sua germinação. Os esclerócios podem germinar e provocar dois tipos de infecção: a) miceliogênica, na qual o micélio germina de esclerócios no solo e coloniza o colo e as raízes da planta; e b) carpogênica, quando apotécios se originam dos esclerócios e produzem ascósporos, que irão atingir a parte aérea. O micélio então invade as células e os espaços intercelulares, podendo alcançar o sistema vascular (LUMSDEN, 1979). O ciclo da doença se completa com a formação de novos esclerócios.

A colonização ocorre associada à liberação de enzimas capazes de degradar a parede celular das células hospedeiras. Acredita-se que a enorme variedade de celulases, hemicelulases e pectinases produzidas por este fungo seja um dos fatores que contribuem para a sua falta de especificidade (RIOU et al., 1991).

A produção de ácido oxálico também está relacionada com a virulência de *S. sclerotiorum*. Apesar de ainda não se conhecerem seus mecanismos exatos de ação, o ácido oxálico,

além de propiciar um pH adequado para ação de suas enzimas, interfere com a produção de ácido abscísico e desregula as células-guarda dos estômatos, provocando a murcha das folhas, e pode ser diretamente tóxico às plantas, enfraquecendo suas defesas e suprimindo a explosão oxidativa (CESSNA et al., 2000; GUIMARÃES e STOTZ, 2004).

Para controle do mofo branco, são empregados fungicidas químicos; entretanto, este não é um método ideal, pois, além de ineficaz, o uso de destes produtos causa danos ambientais e à saúde humana. Estima-se que apenas 1 % do volume total de agrotóxicos aplicados realmente atinge o alvo (RAVEN et al., 2001). Ademais, os microrganismos são submetidos a uma pressão de seleção, com vantagem para aqueles resistentes aos produtos utilizados, resultando na predominância destes no ambiente (JACK et al., 1991). Desse modo, a busca por técnicas menos agressivas e mais eficientes no manejo da doença tem dirigido a atenção para o controle biológico.

O gênero *Trichoderma* Pers. (Hypocreales: Hypocreaceae) constitui hoje o grupo de agentes de biocontrole de fungos fitopatogênicos mais estudado. O rápido crescimento micelial, a alta produção de conídios, a síntese de diversos antibióticos e a capacidade de viver de diversas formas (saprotrófica, simbiote ou micoparasita) são características que o tornam atraente para esse fim. Esse gênero está distribuído mundialmente, com algumas espécies restritas geograficamente e outras se apresentando como cosmopolitas. Dentre estas espécies, *T. harzianum* é a que apresenta o maior número de indivíduos e a maior disseminação (SAMUELS, 2006).

Trichoderma pode se associar com raízes de plantas, por mecanismos similares àqueles de fungos micorrízicos. Ao penetrar raízes, induz a produção de substâncias antimicrobianas, às quais ele próprio apresenta tolerância, resultando na indução de resistência da planta (BENÍTEZ et al., 2004) a diversos patógenos. De forma complementar, o fungo simbiote produz enzimas, proteínas, oligossacarídeos e outras substâncias que provocam mudanças metabólicas na planta e aumentam a sua resistência a bactérias, fungos e vírus (HARMAN et al., 2004).

As interações com a planta são apenas um dos diversos mecanismos de controle de doenças por *Trichoderma*, que também se apresenta como um ótimo competidor por espaço, oxigênio, água e nutrientes, restringindo o desenvolvimento de outros microrganismos pela falta destes (MELO, 1996). Pode, ainda, alterar o pH do solo por meio da secreção de ácidos orgânicos, o que afeta a atividade de outros microorganismos, além de inibir a produção de fatores de virulência (BENÍTEZ et al., 2004).

A antibiose é outro mecanismo que desempenha importante papel nas interações de controle biológico, e ocorre por meio da produção de metabólitos secundários que inibem o crescimento ou a germinação de esporos do fitopatógeno. Muitas linhagens de *Trichoderma* produzem metabólitos voláteis e não voláteis com atividade antimicrobiana (GHISALBERTI e ROWLAND, 1993).

Por último, *Trichoderma* pode agir de forma direta sobre os fungos fitopatogênicos por meio da interação conhecida como micoparasitismo. De todos os mecanismos de controle de doenças de plantas, este é o mais complexo e com o maior número de etapas envolvidas (LIMA et al., 1998).

A interação micoparasita se inicia por quimiotropismo, quando substâncias químicas produzidas pelo patógeno estimulam o crescimento das hifas do antagonista na sua direção (CHET et al., 1988). Ao entrarem em contato, lectinas do potencial hospedeiro se ligam a carboidratos da parede celular de *Trichoderma* (ELAD et al., 1983). Esta ligação química provoca uma transdução de sinal, com a ativação de proteínas G, que irão induzir o aumento de AMP cíclico (AMPc) intracelular. O AMPc atua como segundo mensageiro, provocando divisão nuclear e rearranjo de citoesqueleto, induzindo o enrolamento do micélio do antagonista ao redor das hifas do hospedeiro e a formação de apressórios e estruturas em formato de gancho (OMERO et al., 1999).

Acredita-se que, após o reconhecimento e a resposta morfológica ao hospedeiro, um decréscimo nos níveis de AMPc induzem a expressão enzimática do antagonista (ROCHA-RAMÍREZ et al., 2002; SILVA et al., 2004). A penetração de *Trichoderma* no lúmen das hifas do hospedeiro irá depender da taxa de secreção de enzimas hidrolíticas extracelulares, que degradam a parede celular do fungo e geram orifícios no local dos apressórios, permitindo a invasão do interior do corpo do hospedeiro. A secreção enzimática constitui uma etapa essencial no biocontrole de fungos (HARAN et al., 1995).

Os protoplastos dos fungos são protegidos por parede celular, a qual seleciona o fluxo de materiais, protege o organismo contra ambientes hostis e constitui um obstáculo para possíveis parasitas. A parede celular de fungos é constituída principalmente por quitina, β -1,3-glucana e proteínas. O sucesso da digestão das células do hospedeiro pelo agente de controle biológico irá depender de sua habilidade de produzir enzimas capazes de degradar esta barreira primária. Entre as proteínas com ação enzimática secretadas por *Trichoderma* durante a interação micoparasita encontram-se quitinases, β -1,4-N-acetilglicosaminidases, β -1,3-glucanases e proteases (LIMA et al., 1998).

Além de sua atuação como agentes de controle biológico, muitas linhagens de *Trichoderma* são naturalmente tolerantes a agrotóxicos pela capacidade de degradá-los, o que possibilita um manejo integrado com adoção de produtos químicos e biológicos simultaneamente. Nessa estratégia, doses do pesticida reduzidas a níveis sub-letais enfraquecem as estruturas do fitopatógeno, tornando-o mais susceptível a ação do antagonista e, após ter desempenhado sua função, é biodegradado pelo agente de controle biológico (MELO et al., 2001). Esta é uma habilidade interessante de certos fungos do gênero *Trichoderma*, pois além de se possibilitarem a redução no uso de agrotóxicos, podem degradar xenobióticos, atuando dessa forma, na biorremediação de solos poluídos (ESPOSITO e SILVA, 1998).

Mediante cuidadosa seleção de linhagens que leva em conta aspectos de sua biossegurança (por meio de estudos de impacto ambiental), *Trichoderma* apresenta pouco risco para seres humanos e outros animais. A possibilidade de aliar sua ação promotora de crescimento de plantas e remediadora de solos contaminados à sua capacidade como agente de biocontrole torna ainda mais atraente o emprego de *Trichoderma* em programas de controle biológico.

Diante do que foi dito, conduziu-se este trabalho para o estudo de linhagens de *Trichoderma* spp. existentes na coleção de fungos agentes de controle biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), com respeito ao seu antagonismo contra o patógeno *S. sclerotiorum*, visando à disponibilização futura de isolados dessa coleção para o desenvolvimento de biofungicida.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos descritos neste trabalho foram realizados durante o ano de 2006, no Laboratório de Fitopatologia, componente do Núcleo Temático de Controle Biológico (NTCB) do CENARGEN.

1 – Seleção de potenciais agentes de biocontrole

1.1 – Antagonismo *in vitro*

Para avaliação do antagonismo, foram testadas 10 linhagens de *T. harzianum* (CEN219, CEN234, CEN235, CEN236, CEN237, CEN238, CEN239, CEN240, CEN241 e CEN257) em confronto com uma linhagem de *S. sclerotiorum*, utilizando a técnica de cultivo pareado.

Discos de 9 mm de diâmetro contendo micélio do antagonista foram inoculados a 1 cm da borda de placas de Petri com meio a base de batata – dextrose – ágar (BDA). No outro extremo da placa, também a 1 cm da borda, foi inoculado um disco com o micélio do patógeno. As placas foram incubadas em câmara BOD (Fanem Modelo 347), com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Prepararam-se quatro placas de cada isolado, as quais foram distribuídas ao acaso na BOD. Medidas do crescimento micelial foram tomadas a cada dois dias e, após 14 dias, foi realizada a avaliação final, com o auxílio da escala proposta por Bell et al. (1982), pela qual são atribuídas notas de 1 a 5, onde: classe 1 = colonização de toda a superfície do meio por *Trichoderma*, este sobrepondo a colônia do patógeno; classe 2 = colonização de pelo menos 2/3 da superfície do meio por *Trichoderma*, ainda sobrepondo a colônia do patógeno; classe 3 = colonização de mais de 1/3 e menos de 2/3 da superfície do meio por ambos, *Trichoderma* e antagonista, sem sobreposição de um pelo outro; classe 4 = colonização de 2/3 da superfície do meio pelo patógeno, este resistindo à invasão por *Trichoderma* e 5 = colonização de toda a superfície do meio pelo patógeno, este sobrepondo a colônia de *Trichoderma*. De acordo com essa classificação, linhagens com notas menores ou iguais a 2 são consideradas altamente antagonistas.

1.2 – Antagonismo *in vivo*

Este experimento foi conduzido em casa de vegetação, onde a umidade relativa variou de 70 a 100 % e a temperatura de 20 a 35 °C. Utilizaram-se as mesmas linhagens de *T. harzianum* e *S. sclerotiorum* do ensaio anterior, as quais foram repicadas para erlenmeyers de 250 mL contendo arroz parboilizado com umidade a 60 %. Após sete dias de crescimento, os fungos foram inoculados em solo estéril acondicionado em vasos de 3 kg de capacidade. A inoculação do solo com *T. harzianum* e *S. sclerotiorum* ocorreu simultaneamente, utilizando-se 10 g de arroz colonizado por kg de solo. Em seguida, foram distribuídas 10 sementes de soja ou feijão por vaso. Vasos, cujo solo recebeu apenas o patógeno foram utilizados como testemunhas. O delineamento experimental foi em blocos inteiramente ao acaso, com três repetições. Foram incluídos, ainda como testemunhas, vasos cujo solo foi tratado apenas com *Trichoderma* e sem nenhum dos tratamentos.

2 – Estudos de atividade micoparasítica

2.1 – Seleção das linhagens de *Trichoderma* para estudo

Neste experimento foram utilizadas, além da linhagem CEN240, outras sete linhagens de *Trichoderma* spp. anteriormente avaliadas quanto ao potencial de biocontrole *Sclerotium*

rolfsii Sacc., também em feijão e soja, onde quatro foram classificadas como melhores (CEN168, CEN198, CEN222 e CEN266) e três (CEN206, CEN246 e CEN262) como piores, em termos de capacidade antagonistas.

2.2 – Avaliação fisiológica

Discos de ágar de 9 mm de diâmetro colonizado com o fungo foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio BDA e mantidos em incubadora à temperatura de 25 °C com fotoperíodo de 12 horas. A cada 24 horas, ocorreu a medição do diâmetro de colônia e, após 7 dias, foi realizada a contagem da produção total de conídios ao microscópio ótico, com auxílio de uma câmara de Neubauer. Os experimentos foram conduzidos com três repetições.

2.3 – Crescimento em meio contendo Benomil como fator de pressão de seleção

Discos de ágar de 9 mm de diâmetro colonizado com fungo foram inoculados em placas de Petri, contendo meio de cultura BDA adicionado de Benomil (Du Pont, Inc.), nas concentrações de 0, 1, 2 e 5 µg.mL⁻¹. O ensaio foi conduzido com três repetições de cada uma das oito linhagens utilizadas. As placas foram incubadas nas condições descritas anteriormente. As avaliações ocorreram pela análise do desenvolvimento micelial em intervalos de tempo de 24 h, 48 h e 72 h.

2.4 – Estudo de micoparasitismo

2.4.1 – Crescimento em meio líquido

Dentre as linhagens utilizadas nos três ensaios anteriores, foram selecionados linhagens de *T. harzianum* CEN168, CEN240 e CEN246 para estes estudos. Para produção da biomassa fúngica, foram transferidas suspensões de conídios (1,0 x 10⁶ conídios.mL⁻¹) para frascos de 250 mL, contendo 50 mL de meio completo (PONTECORVO, 1953), constituído de KCl 0,5 g.L⁻¹, KH₂PO₄ 1,5 g.L⁻¹, MgSO₄ 0,5 g.L⁻¹, NaNO₃ 6 g.L⁻¹, caseína 1,5 g.L⁻¹, extrato de levedura 0,5 g.L⁻¹, glicose 10 g.L⁻¹, peptona 20 g.L⁻¹, FeSO₄ 0,001 g.L⁻¹ e ZnSO₄ 0,001 g.L⁻¹, com pH de 6,5. A incubação ocorreu a 27 °C em agitação de 150 rpm.

2.4.2 – Indução enzimática

Para a indução enzimática, a biomassa obtida após 48 h de incubação foi transferida para meio mínimo (OKON et al., 1973), constituído por KCl 0,2 g.L⁻¹, KH₂PO₄ 0,9 g.L⁻¹, MgSO₄ 0,2 g.L⁻¹, NH₄NO₃ 1 g.L⁻¹, FeSO₄ 0,002 g.L⁻¹ e ZnSO₄ 0,002 g.L⁻¹ suplementado com

quitina $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ como única fonte de carbono. O pH do meio foi ajustado para 6,3. A incubação ocorreu a $27 \text{ }^{\circ}\text{C}$, em agitação de 150 rpm. Após 48 horas, as amostras foram submetidas à filtração a vácuo, colhendo-se o filtrado, que foi sob refrigeração a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de uso. A produção de biomassa e a indução ocorreram em triplicata.

2.4.3 – Determinações bioquímicas

A – Dosagem de proteína total

A dosagem de proteína total das amostras obtidas após a indução ocorreu segundo a metodologia descrita por Bradford (1976), em que, em um tubo de ensaio, foram adicionados $700 \text{ }\mu\text{L}$ de água destilada, $100 \text{ }\mu\text{L}$ do filtrado e $200 \text{ }\mu\text{L}$ do reagente de Bradford (BIORAD), seguindo-se a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm . Como branco, água destilada foi utilizada no lugar do filtrado.

B - Dosagem de quitinase

A dosagem de quitinase foi realizada conforme metodologia de Molano et al. (1977), modificada por Queiroz (2000), onde $500 \text{ }\mu\text{L}$ de quitina e $500 \text{ }\mu\text{L}$ da amostra foram adicionados a tubos plásticos de $1,5 \text{ mL}$ e incubados por 24 horas a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, sob agitação de 150 rpm, seguida de centrifugação a $12000 \times g$ por 5 minutos. Após esse procedimento, $500 \text{ }\mu\text{L}$ do sobrenadante da reação foram transferidos para tubos de ensaio contendo 1 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e fervidos por 5 minutos, conforme Miller (1959). Como brancos, foram utilizadas enzima desnaturada e quitina dissolvida em água. A determinação da liberação de açúcares redutores da reação ocorreu pela quantificação da absorbância das amostras em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 550 nm .

C - Determinação de N-acetilglicosaminidases

Para a quantificação da produção de N-acetilglicosaminidases, foi utilizada a metodologia descrita por Yabuki et al. (1986), modificada por Queiroz (2000), em que um tubo de ensaio contendo $50 \text{ }\mu\text{L}$ da amostra, $350 \text{ }\mu\text{L}$ de tampão fosfato de sódio 10 mM pH 6,0 e $100 \text{ }\mu\text{L}$ de substrato (p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosamina 5 mM dissolvidos em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 6,0), foi mantido em banho-maria a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. Após esse período, adicionou-se 1 mL de Na_2CO_3 250 mM . Como brancos, foram utilizados enzima desnaturada e substrato dissolvido em água. A leitura da absorbância do ensaio ocorreu em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 405 nm .

D - Determinação de β -1,3-glucanases

A determinação de β -1,3-glucanases ocorreu segundo descrito por Elad et al. (1982), modificado por Queiroz (2000), onde 250 μ L de laminarina (laminarina 0,2 % dissolvida em tampão acetato de sódio 60mM (pH 5,0) foram adicionados a 500 μ L de amostra e mantidos em banho-maria a 37 °C por 1 hora. Enzimas desnaturadas e substrato dissolvido em água foram utilizados como brancos. Após esse período de incubação, 500 μ L da reação foram transferidos para tubos de ensaio adicionando-se 1 mL de reagente DNS, seguindo-se fervura por 5 minutos. A leitura da absorbância do ensaio ocorreu em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 550 nm.

E - Dosagem de protease

Utilizou-se o método proposto por Kunitz (1946) modificado por Queiroz (2000) para a dosagem de atividade proteolítica, onde 500 μ L de caseína (caseína 1 % em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 e MgCl₂ 0,1M) foram adicionados a 500 μ L de amostra, sendo mantidos em banho-maria a 37 °C durante 1 hora. A reação foi então interrompida com 100 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 50 % durante 1 hora a -20 °C. Após este período, seguiu-se a centrifugação a 12000xg durante 5 minutos. Para a determinação da quantidade de triptofano, tirosina e fenilalanina liberadas, procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 280 nm.

2.5 – Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey, com probabilidade a 5 %.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antagonismo *in vitro*

De acordo com a escala de Bell et al. (1982), os isolados de *Trichoderma* foram ordenados com valores de 1 a 3, em relação à ação antagonista contra *S. sclerotiorum* (Tabela 1).

Tabela 1 – Ação antagonista de *Trichoderma* spp. sobre *S. sclerotiorum* expressa em graus da escala de Bell et al. (1982), valores médios de inibição do crescimento e do número de esclerócios formados pelo patógenos.

Linhagem	Notas médias	Inibição de crescimento (%)	Nº de esclerócios por placa
CEN219	1	83,75a*	00,00a*
CEN234	1	78,75ab	2,75ab
CEN235	1	87,50a	4,00ab
CEN236	2	61,25ab	15,00abc
CEN237	2	60,00ab	2,75ab
CEN238	2	76,25ab	6,00ab
CEN239	2	67,50ab	19,25bc
CEN240	3	43,75b	31,50c
CEN241	3	51,25ab	27,50c
CEN257	3	45,00b	24,75c
Testemunha	–	00,00c	63,50d

*Valores seguidos pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 0,05.

As linhagens de *T. harzianum* CEN219, CEN234 e CEN235 (com maioria das notas igual a 1) mostraram-se altamente antagônicas a *S. sclerotiorum* pelo método de cultivo pareado. Entretanto, todos os isolados inibiram o crescimento e a formação de esclerócios do patógenos, em comparação com a testemunha. Alguns isolados, como CEN257 e CEN240, apresentaram notas intermediárias (iguais a 3) na escala, ou seja, ao ocuparem o espaço físico, eles foram capazes apenas de deter a expansão de *S. sclerotiorum*. Nenhuma das linhagens testadas apresentou nota maior ou igual a 4, o que caracterizaria inibição de *Trichoderma* pelo patógeno. As notas atribuídas correlacionaram-se com os percentuais de inibição de crescimento e de produção de esclerócios do patógeno, para a maioria das linhagens.

A maior capacidade de inibição de crescimento micelial de *S. sclerotiorum* foi verificada com as linhagens CEN219 e CEN235 que, entretanto, não diferiram significativamente de outros cinco isolados. Para concluir, o fato de os isolados CEN219, CEN234, CEN235, CEN236, CEN237 e CEN238 serem mais hábeis em inibir a formação de esclerócios de *S. sclerotiorum* é um dado a ser considerado em trabalhos futuros, uma vez que estes constituem importante forma de sobrevivência e disseminação do patógeno no campo (FERRAZ e CAFÉ FILHO, 1998).

Antagonismo *in vivo*

As mesmas linhagens de *Trichoderma* utilizadas no experimento anterior, ao serem avaliados contra *S. sclerotiorum* em casa de vegetação, apresentaram diferentes níveis de controle (Figura 1).

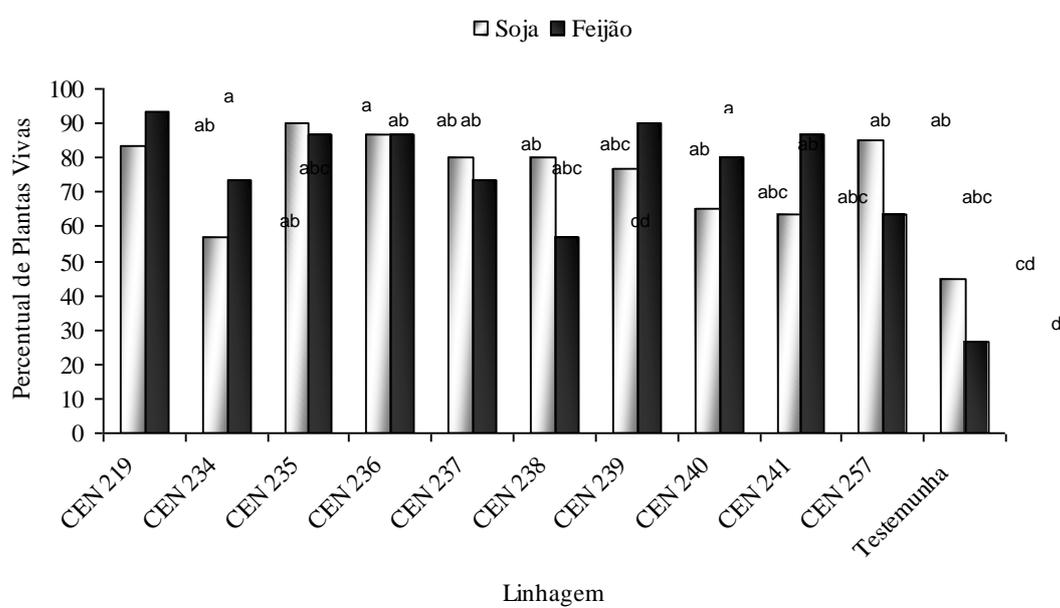


Figura 1 – Valores médios de plantas vivas obtidos em solo infestado com *S. sclerotiorum* e tratado com diferentes isolados de *Trichoderma harzianum*. Barras de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 0,05.

As linhagens CEN219, CEN235, CEN236 e CEN239 apresentaram maiores valores médios de plantas vivas, tanto de feijão como de soja, significando percentuais de biocontrole de *S. sclerotiorum* superiores a 80 %. Em soja, se destacaram CEN219, CEN235, CEN236 e CEN237, CEN238, CEN239 e CEN257 (Figura 1).

Observaram-se algumas diferenças marcantes para capacidade de controle biológico do mofo branco, nas duas culturas, considerando-se uma mesma linhagem de *Trichoderma*. Neste aspecto, destacaram-se duas linhagens, com as quais se obtiveram taxas de controle muito semelhantes (CEN235) ou iguais (CEN236). Há uma grande complexidade no relacionamento da planta com os microorganismos que habitam a rizosfera (HANDELSMAN e STABB, 1996), daí essa variabilidade na supressão de patógeno por um mesmo antagonista, mesmo não se tratando de interações altamente específicas, como neste caso.

As duas espécies vegetais utilizadas neste estudo (*G. max* e *P. vulgaris*), apesar de serem classificadas na mesma família botânica, não possuem as mesmas características fisiológicas e apresentam distintos graus de resposta ao invasor, além de terem formas diferentes de interação com os antagonistas (STÖSSEL e MAGNOLATO, 1983; PROCÓPIO et al., 2004). A capacidade de vigilância e detecção de invasores varia entre as espécies de plantas, assim como os microorganismos e sua capacidade de produção de elicitores, moléculas que provocam a reação das defesas das plantas (KNOGGE, 1996). Além disso, a defesa localizada ou sistêmica pode ocorrer em resposta ao patógeno ou pode ser induzida por *T. harzianum* (DE MEYER et al., 1998). Todos estes fatores exercem grande influência sobre o grau de intensidade da doença e, conseqüentemente, sobre a taxa de controle biológico por *T. harzianum*. Portanto, a variação obtida dentro do ensaio pode ser resultante da interação entre patógeno, antagonista e as diferentes hospedeiras.

Avaliação fisiológica

A linhagem CEN240, que apresentou um dos mais baixos desempenhos comparativamente nos ensaios anteriores, foi escolhida para os estudos fisiológicos juntamente com outras sete linhagens previamente testadas em casa de vegetação, ou seja, quatro linhagens que apresentaram percentual de antagonismo maior que 90 %, (CEN168, CEN198, CEN222 e CEN266) e três linhagens, cujos porcentuais foram inferiores a 50 % (CEN206, CEN246 e CEN262).

No tocante ao crescimento micelial, todas as oito linhagens de *Trichoderma* spp. cobriram toda a superfície do meio de cultura, após 72 horas de cultivo. Sete dias de cultivo foram suficientes para separar as linhagens em dois grupos, levando-se em conta a maior e menor taxa de esporulação (Tabela 3).

Todas as linhagens utilizadas apresentaram crescimento rápido, característica esta importante quando se trata de um agente de controle biológico, tanto do ponto de vista da produção em larga escala (PERES e MELO, 1995) como da vantagem competitiva. Entretanto, crescimento micelial rápido não correspondeu necessariamente a maior capacidade de esporulação. Por outro lado, não há indícios de que esses dois fatores estejam relacionados com antagonismo.

Tabela 3 - Variabilidade de crescimento micelial e produção de conídios de linhagens de *Trichoderma*.

Linhagem	Crescimento Micelial (cm)			Produção de Conídios
	24h	48h	72h	
CEN168	2,55	8,67	9,00	5,048 x 10 ⁹ a
CEN198	2,30	7,31	9,00	8,625 x 10 ⁷ b
CEN206	2,60	7,80	9,00	3,450 x 10 ⁷ b
CEN222	2,71	7,86	9,00	1,425 x 10 ⁷ b
CEN240	2,56	7,23	9,00	1,283 x 10 ⁹ ab
CEN246	2,42	7,72	9,00	5,130 x 10 ⁹ a
CEN262	3,09	8,78	9,00	3,428 x 10 ⁹ ab
CEN266	3,02	8,59	9,00	3,353 x 10 ⁹ ab

Crescimento sob pressão de seleção

A avaliação do efeito de fungicidas mostrou que a linhagem CEN168, apesar de ter apresentado certa redução de crescimento, possui tolerância a concentrações de até 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Benomil (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores médios de crescimento micelial de linhagens de *Trichoderma* após 72 horas de cultivo em meio contendo diferentes concentrações de Benomil.

Linhagem	Crescimento micelial (cm) frente às concentrações de Benomil			
	0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
CEN 168	9,00a	9,00a	5,70a	1,88a
CEN 198	9,00a	8,68a	4,25abc	0,90c
CEN 206	9,00a	8,65a	1,67d	0,90c
CEN 222	9,00a	7,96a	2,28cd	1,02c
CEN 240	9,00a	8,85a	2,40bcd	0,90c
CEN 246	9,00a	8,95a	5,30a	1,53b
CEN 262	9,00a	9,00a	4,68ab	1,55b
CEN 266	9,00a	7,95a	3,87abcd	1,55b

O fungicida Benomil age ligando-se aos microtúbulos citoplasmáticos, inibindo a mitose de fungos (DAVIDSE, 1986). A tolerância a Benomil pode estar relacionada à baixa afinidade entre o fungicida e a β -tubulina presente no citoplasma dos fungos testados, ou ser resultante de uma capacidade de metabolização do agrotóxico (QUEIROZ, 2000). Com exceção de CEN240, as linhagens que apresentaram valores mais elevados de produção de conídios resistiram ao fungicida; desse modo, é possível que a capacidade de esporulação

esteja diretamente relacionada com tolerância ao fungicida. Este dado é importante do ponto de vista prático e merece estudos mais aprofundados, pois acena para a possibilidade de integração do uso de fungicidas do grupo dos benzimidazóis e o agente de biocontrole, ou ainda, para o emprego dessas na biorremediação de solos contaminados por Benomil.

Estudos comparativos de micoparasitismo

Análises de microscopia eletrônica têm confirmado a capacidade de *T. harzianum* em parasitar *S. sclerotiorum* (INBAR et al., 1996). Entretanto, *T. harzianum* apresenta muitos outros mecanismos de inibição de fitopatógenos. Para verificar se o micoparasitismo é o mecanismo de ação preferencial no biocontrole por *T. harzianum*, CEN240, uma linhagem de baixa capacidade antagonista, foi comparada com outras duas linhagens, CEN168, de alta capacidade antagonista (maior que 90 %), e CEN246 (capacidade menor que 50 %). Na avaliação bioquímica, o crescimento em meio de cultura com quitina como única fonte de carbono provocou uma baixa produção de proteínas extracelulares por CEN168. Em contrapartida, CEN240 e CEN246 apresentaram altas taxas de secreção de polipeptídios nos filtrados, como pôde ser verificado pela sua dosagem protéica, ilustrada na Figura 2.

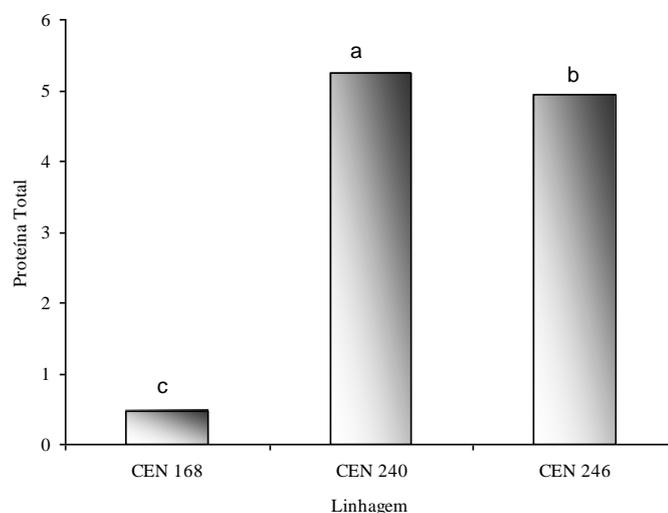


Figura 2 - Dosagem de proteína total extracelular nas amostras obtidas após a indução enzimática.

A indução de expressão enzimática foi bem-sucedida, permitindo a dosagem de atividade nos filtrados. Apesar de quitina ter sido utilizada como única fonte de carbono, constatou-se baixa produção de quitinases; entretanto, N-acetilglicosaminidases, também envolvidas com a degradação de quitina, estiveram presentes em grande quantidade (Figura 3).

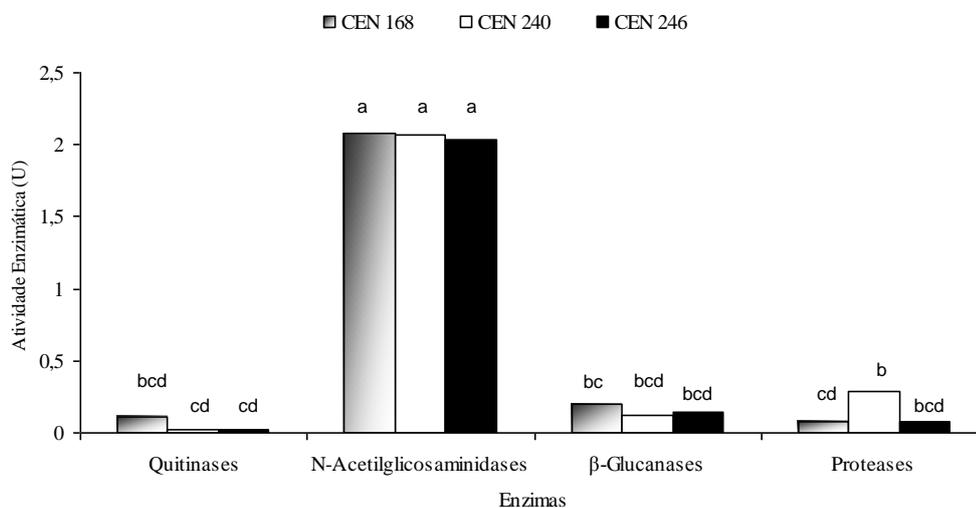


Figura 3 - Detecção de atividade enzimática de *T. harzianum* em meio contendo quitina como única fonte de carbono.

Também se constatou a secreção de β -glucanases e proteases, apesar de baixa. Para a quantificação de proteínas com atividade enzimática, considerou-se uma unidade enzimática (U) como a quantidade de enzima necessária para provocar a mudança de 1 nm de absorbância por hora.

Acredita-se que o micoparasitismo seja resultante de sinergismo entre os diferentes tipos de enzimas produzidas, e não somente da produção de uma hidrolase específica (ELAD, 2000). Há um ciclo que oscila entre aumento e queda na expressão de enzimas específicas em relação ao tempo (HARAN et al., 1996b).

A taxa de produção de enzimas hidrolíticas secretadas por *Trichoderma* quando em contato com o hospedeiro em potencial são as principais responsáveis pelo micoparasitismo, podendo ser utilizada como um critério para a seleção de bons micoparasitas (DE MARCO, 1999). Dentre os mecanismos que podem ser desencadeados durante o processo de controle biológico por micoparasitismo, destaca-se o sistema quitinolítico (HARAN et al., 1996a). A quitina (um polímero de N-acetilglicosaminas conectadas por ligações β -1,4) é o principal componente da parede celular de ascomicetos, seguida por β -1,3-glucana e proteínas (LIMA et al., 1998). Desse modo, entre as enzimas envolvidas no micoparasitismo, encontram-se quitinasas, β -1,4-N-acetilglicosaminidases, β -1,3-glucanases e proteases.

Com base nestas informações, a indução de expressão enzimática se baseou no sistema quitinolítico, com a utilização de meio de cultura com quitina como única fonte de carbono,

não sendo de interesse para este trabalho a indução com outros substratos. Devido ao seu alto preço e à grande dificuldade de obtenção, os métodos originais de dosagem enzimática dos filtrados foram modificados, visando à economia de reagentes (QUEIROZ, 2000).

O filtrado de CEN168 apresentou uma baixa dosagem de proteínas em comparação com CEN240, com a maior produção de proteínas extracelulares, e CEN246, a segunda posição. Entretanto, estes dados não se refletiram na dosagem de atividade enzimática. As linhagens testadas não diferiram estatisticamente quanto à secreção de enzimas hidrolíticas: foi verificada uma alta produção de N-acetilglicosaminidases e baixa de quitinases, β -glucanases e proteases. Entretanto, todas as linhagens de *T. harzianum* utilizadas obtiveram uma produção semelhante de enzimas.

A alta atividade de N-acetilglicosaminidase e baixa produção de quitinases apresentadas pelas linhagens foram resultados também obtidos por De Marco (1999) com a linhagem *T. harzianum* Tcq após 48 horas de crescimento em meio de cultura contendo quitina como única fonte de carbono. Estudando linhagens de *Trichoderma* de comprovada atividade antagonista, De Marco et al. (2003) verificaram que *T. harzianum* 1051 apresentava alta expressão enzimática, enquanto *Trichoderma* sp. TVC e *T. harzianum* 39.1 produziam baixa quantidade de hidrolases micoparasíticas.

A análise bioquímica diferiu do esperado, onde CEN168 apresentaria uma alta dosagem protéica e alta atividade enzimática, e CEN240 e CEN246, baixa dosagem de proteínas e de atividade enzimática nos filtrados. Os dados obtidos indicam que talvez o critério enzimático não seja prioritário para as linhagens utilizadas nesse experimento e o antagonismo de *T. harzianum* CEN168 possa ser resultante de antibiose ou indução de resistência nas plantas. Maiores estudos devem ser realizados, visando determinar qual o fator de maior influência no controle biológico de *S. sclerotiorum* por *T. harzianum*.

CONCLUSÕES

1. As linhagens de *Trichoderma* utilizadas nesse estudo apresentaram capacidade de inibir a infecção de soja e feijão por *S. sclerotiorum*, causador do mofo branco.
2. Uma mesma linhagem de *T. harzianum* pode apresentar ação variada em diferentes espécies de plantas, mesmo quando micoparasitando a mesma linhagem de fungo fitopatogênico.
3. Algumas das linhagens de *Trichoderma* utilizadas neste trabalho mostraram ser tolerantes ao fungicida Benomil e devem ser estudadas em maior profundidade quanto a este aspecto, pois uma vez confirmado este resultado, poderão ser úteis em programas de manejo integrado ou de biorremediação de solos contaminados.

4. Micoparasitismo parece não constituir o mecanismo principal de controle biológico utilizado por essas linhagens de *Trichoderma*, especialmente no caso da linhagem de *T. harzianum* CEN168, utilizada nos ensaios enzimáticos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem: Anna Flávia Fernandes de Araujo, pelo auxílio no laboratório, Dra. Luzia Helena Corrêa Lima, pelo empréstimo de materiais e reagentes e a equipe do Laboratório de Bacteriologia (NTCB – CENARGEN), por permitir o acesso a espectrofotômetro e centrífugas.

REFERÊNCIAS

- BELL, D. H.; WELLS, D. H.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 72, n. 3, p. 379-382, 1982.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMON, M. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Madrid, v. 7, n. 4, p. 249-260, 2004.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of proteins using the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CESSNA, S. G.; SEARS, V. E.; DICKMAN, M. B.; LOW, P. S. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, Suppresses the oxidative burst of the host plant. **The Plant Cell**, Rockville, US, v. 12, p. 2191-2199, 2000.
- CHET, I.; HARMAN, G. E.; BAKER, R. *Trichoderma hamatum*: its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. **Microbial Ecology**, New York, v. 7, p. 29-38, 1988.
- DAVIDSE, L. C. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, US, v. 24, p. 43-65, 1986.
- DE MARCO, J. L. **Produção de hidrolases por isolados de *Trichoderma* sp. com potencial antagonico contra *Crinipellis perniciosa* e caracterização de uma quitinase e uma protease.** 1999. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- DE MARCO, J. L.; VALADARES-INGLIS, M. C.; FELIX, C. R. Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches-broom of cocoa. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p. 33-38, 2003.
- DE MEYER, G.; BIGIRIMANA, J.; ELAD, Y.; HÖFTE, M. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, NL, v. 104, n. 3, p. 219-286, 1998.
- ELAD, Y. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. **Crop Protection**, Guildford, GB, v. 19, p. 709-714, 2000.

ELAD, Y.; BARAK, R.; CHET, I. Possible Roles of Lectins in Mycoparasitism. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 154, n. 3, p. 1431-1435, 1983.

ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 28, p. 719-725, 1982.

EMBRAPA. **Cultivo do feijoeiro comum**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/importancia.htm>>. Acesso em: 01 set. 2006a.

EMBRAPA SOJA. **Soja - dados econômicos**. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=294ecod_pai=17>. Acesso em: 01 set. 2006b.

ESPOSITO, E.; SILVA, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, US, v. 24, n. 2, p. 89-98, 1998.

FERRAZ, L. C. L.; CAFÉ FILHO, A. C. Meios de cultura e fatores culturais para produção de escleródios e apotécios de *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 23, n. 3, p. 364-369, 1998.

GHISALBERTI, E. L.; ROWLAND, C. Y. Antifungal metabolites from *Trichoderma harzianum*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 56, n. 10, p. 1799-1804, 1993.

GUIMARÃES, R. L.; STOTZ, H. U. Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 136, p. 3703-3711, 2004.

HANDELSMAN, J.; STABB, E. Y. Biocontrol of soilborne plant pathogens. **The Plant Cell**, Rockville, US, v. 8, p. 1855-1869, 1996.

HARAN, S.; SCHICKLER, H.; CHET, I. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. **Microbiology**, New York, v. 142, p. 2321-2331, 1996a.

HARAN, S.; SCHICKLER, H.; OPPENHEIN, A.; CHET, I. New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. **Mycological Research**, Cambridge, GB, v. 99, n. 4, p. 441-446, 1995.

HARAN, S.; SCHICKLER, H.; OPPENHEIN, A.; CHET, I. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 86, n. 9, p. 980-985, 1996b.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2004.

INBAR, J.; MENENDEZ, A.; CHET, I. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, US, v. 28, n. 6, p. 757-763, 1996.

JACK, A.; LEWIS, I.; PAPAVIDAS, G. C. Biocontrol of plant diseases: the approach for tomorrow. **Crop Protection**, Guildford, GB, v. 10, p. 95-105, 1991.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; RESENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas**. 4. ed. Piracicaba: Ceres, 2005. v.2, 663 p.

KNOGGE, W. Fungal infection of plants. **The Plant Cell**, Rockville, US, v. 8, p. 1711-1722, 1996.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. **Journal of Genetics and Physiology**, v. 29, p. 149-154, 1946.

LIMA, L. H. C.; DE MARCO, J. L.; FELIX, C. R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Controle biológico**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 1998.

LUMSDEN, R. D. Histology and physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 69, n. 8, p. 890-895, 1979.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 261-295, 1996.

MELO, I. S.; LEVANTEZI, K.; SPESSOTO, A. M.; FEICHTENBERGER, E. Degradação do fungicida metalaxial por linhagens de *Trichoderma* spp. isoladas de solos rizosféricos. In: MELO, I. S.; SILVA, C. M. M. S.; SCRAMIN, S.; SPESSOTO, A. (Org.). **Biodegradação**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2001.

MESSINA, M. J. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 70, p. 439-450, 1999.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOLANO, J.; DURAM, A.; CABIB, E. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 83, p. 648-656, 1977.

OKON, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Effect of Lactose, ethanol and cycloheximide on the translocation pattern of radioactive compounds and on *Sclerotium* formation in *Sclerotium rolfii*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 74, p. 251-258, 1973.

OMERO, C.; INBAR, J.; ROCHA-RAMIREZ, V.; HERRERA-ESTRELA, A.; CHET, I.; HORWITZ, B. A. G Protein activators and cAMP promote mycoparasitic behaviour in *Trichoderma harzianum*. **Mycological Research**, Cambridge, GB, v. 103, n. 12, p. 1637-1642, 1999.

PERES, E.; MELO, I. S. Variabilidade entre isolados de *Trichoderma harzianum*. I – Aspectos citológicos. **Scientia Agricola**, Piracicaba, SP, v. 52, n. 1, p. 56-59, 1995.

PONTECORVO, G. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, New York, n. 5, p. 101-238, 1953.

PROCÓPIO, S. O.; SANTOS, J. B.; SILVA, A. A.; MARTINEZ, C. A.; WERLANG, R. C. Características fisiológicas das culturas de soja e feijão e de três espécies de plantas daninhas. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 2, p. 211-216, 2004.

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host ranges, geographic distribution and impact. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 69, n. 8, p. 875-880, 1979.

QUEIROZ, P. R. **Transformação de *Trichoderma harzianum* com os genes da EGFP e β -Tubulina**. 2000. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RIOU, C.; FREYSSINET, G.; FEVRE, M. Production of cell wall-degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 57, n. 5, p. 1478-1484, 1991.

ROCHA-RAMÍREZ, V.; OMERO, C.; CHET, I.; HORWITZ, B. A.; HERRERA-ESTRELA, A. *Trichoderma atroviride* G-Protein α -Subunit gene Tga1 Is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 4, p. 594-605, 2002.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 96, n. 2, p. 195-206, 2006.

SILVA, R. N.; SILVA, S. P.; BRANDÃO, R. L.; ULHOA, C. J. Regulation of N-acetyl- β -D-glucosaminidase produced by *Trichoderma harzianum*: evidence that cAMP controls its expression. **Research in Microbiology**, Paris, v. 155, p. 667-671, 2004.

SMITH, K. P.; GOODMAN, R. M. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, US, v. 37, p. 473-491, 1999.

STÖSSEL, P.; MAGNOLATO, D. Phytoalexins in *Phaseolus vulgaris* and *Glycine max* induced by chemical treatment microbial contamination and fungal infection. **Experientia**, v. 39, p. 153-154, 1983.

YABUKI, M.; MIZUSHIMA, K.; AMATATOU, T.; ANDO, A.; FUJI, I.; SHIMADA, M.; YAMASHIDA, M. Purification and characterization of chitinase and a chitobiase produced by *Aeromonas hydrophila* subsp. *anaerogenes* A52. **Journal of General Applied Microbiology**, Tokyo, v. 32, p. 25-32, 1986.