



Utilização de *Trichoderma* no Controle de Fungos Fitopatogênicos

ISSN 0102 0110
Deembro, 2007

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

Documentos 241

Utilização de *Trichoderma* no Controle de Fungos Fitopatogênicos

Coordenadora-Geral

**Silva, J.B.T.
Mello, S.C.M.**

***Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2007***

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*

Editoração eletrônica: *Daniele Alves Loiola*

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

U 89 Utilização de *Trichoderma* no controle de fungos fitopatogênicos: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia / J. B. T. Silva, S. C. M. Mello (coordenadores). -- Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.
17 p. -- (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 0102 - 0110; 241).

1. *Trichoderma* - controle de fungos. 2. Fungos fitopatogênicos. 3. Controle biológico. I. Silva, J. B. T. II. Mello, S. C. M. III. Série.

632.96 - CDD 21.

Autores

João Batista Tavares da Silva
Biólogo, Dr., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
jtavares@cenargen.embrapa.br

Sueli Correa Marquese de Mello
Fitopatologista, Dr., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
smello@cenargen.embrapa.br

Utilização de *Trichoderma* no Controle de Fungos Fitopatogênicos

**Silva, J.B.T.
Mello, S.C.M.**

Introdução

Os microrganismos apresentam uma grande diversidade, envolvendo grupos taxonomicamente distintos de agentes (vírus, bactéria, fungos, protozoários etc). Eles são encontrados tanto no ambiente natural quanto naqueles alterados pela intervenção humana, uma vez que sua variabilidade fisiológica, versatilidade metabólica e habilidade de sobreviver em pequenos nichos os tornam menos vulneráveis à depredação dos habitats do que os organismos mais complexos (Glazer & Nikaido, 1995). Na natureza, populações de microrganismos interagem com outras populações de organismos e representam o repertório mais rico em diversidade química e molecular, constituindo a base de processos ecológicos, como os ciclos geoquímicos e a cadeia trófica, além de manterem relações vitais entre si e com os organismos superiores (Zilli et al, 2003). Assim, a diversidade microbiana é importante na decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, agregação do solo e controle de patógenos dentro do ecossistema (Kennedy, 1999),

Em relação aos fungos, estes apresentam-se como um grupo amplo e diverso, com distribuição cosmopolita. A maioria das, aproximadamente, 100.000 espécies de fungos conhecidos é saprófita; em torno de 8.000 causam doenças em uma ou mais espécies vegetais (fitopatogênicos) e somente 100 são patogênicas aos humanos e animais (Manfio, 2000). Os fungos fitopatogênicos causam redução da taxa de crescimento e desenvolvimento da planta, motivada por danos na parte área, caule ou radicular, influenciando na diminuição e qualidade dos produtos (Isaac, 1992).

Microrganismos antagonistas

Nos últimos anos, tem-se notado uma crescente preocupação, em todo o mundo, com os problemas ambientais decorrentes das diversas atividades humanas, incluindo a agricultura. Essa preocupação vem resultando na busca por tecnologias de produção rentáveis, socialmente justas e com um enfoque ecológico. Para responder a esta demanda, a pesquisa científica tem avançado no desenvolvimento de soluções apoiadas em processos biológicos naturais. Nesse contexto, o controle biológico constitui alternativa cada vez mais importante, uma vez que, na agricultura convencional, utilizado de forma complementar, contribui para a redução do uso dos agrotóxicos, enquanto na agricultura orgânica, insere-se em substituição a estes produtos.

Uma das funções que envolvem a população dos microrganismos não fitopatogênicos da filosfera, rizosfera e espermofosfera está relacionada com a interferência no desenvolvimento de fitopatógenos (Luz,

1991). Na natureza há interações contínuas entre os potenciais patógenos e seus antagonistas, onde o controle biológico funciona naturalmente.

Dentre os vários exemplos de microrganismos antagonistas usados contra fungos fitopatogênicos, podem ser citados: *Dicyma pulvinata* no controle do mal-da-serigueira (Mello et al, 2005), *Gliocadium* no controle de *Phytophthora* (Smith et al, 1990), *Trichoderma harzianum* no controle de vassoura-de-bruxa do cacaueiro (De Marco et al, 2000). Vale salientar que 90% dos antagonistas utilizados há participação de diferentes espécies do gênero *Trichoderma* (Benitez, 2004). O comportamento desses fungos como antagonistas é essencial para seu efetivo uso em biocontrole, pois podem atuar utilizando vários mecanismos (Küçük & Kivanç, 2003).

Dentre os fungos filamentosos, os do gênero *Trichoderma* são reconhecidamente os hiperparasitas mais importantes e mais estudados, pois exibe variabilidade entre as linhagens com relação a atividade de biocontrole, espectro de ação contra hospedeiros, propriedades fisiológicas e bioquímicas, como também, adaptabilidade ecológica e ambiental (Silva, 2000). Esse hiperparasita tem a fase sexuada no Phylum Ascomycota, Classe Euasmycetes, Ordem Hypocreales, Família Hypocreaceae, gênero Hypocrea (Monte, 2001), sendo as espécies *T. Harzianum*, *T. virens*, e *T. viride* as mais utilizadas como agentes de controle biológico de fitopatógenos (Hermosa et al, 2000). Segundo esses autores algumas espécies de *Trichoderma* são morfologicamente similares ao estágio anomórfico (fase sexuada), apresentando proximidade taxonômica. Entretanto muitas das linhagens, incluindo as utilizadas para biocontrole, são classificadas como fungo imperfeito (Monte, 2001). *Trichoderma* também coloniza materiais de plantas herbáceas e lenhosas, onde o estágio sexual teleomorfo freqüentemente tem sido encontrado (Harman et al, 2004).

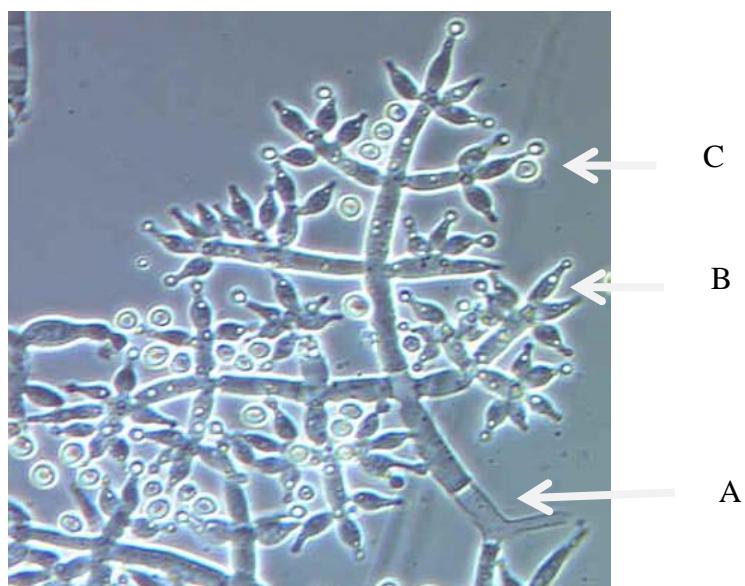


Figura 1. *Trichoderma harzianum*: a) conidióforo ramificado,

b) células conidiogênicas, c) conídios.

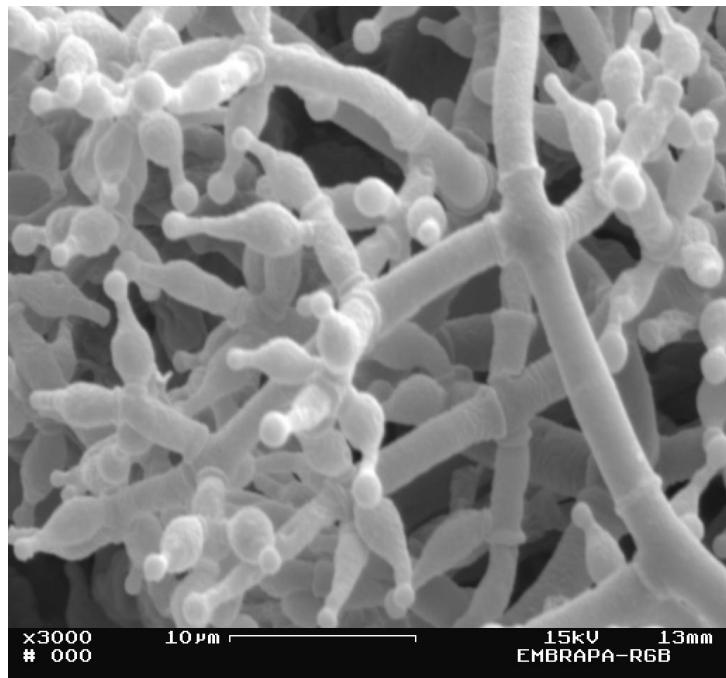


Figura 2. Microscopia eletrônica de *Trichoderma harzianum* mostrando as mesmas estruturas da Fig. 1

Através de características morfológicas, a identificação como gênero *Trichoderma* tem sido relativamente fácil (Küçük & Kivanç, 2003), mas o conceito de espécie, embora essencial em vista das controvertidas propriedades dos taxa deste gênero (muitas das análises morfológicas têm levado a erros), tem sido problemático utilizando os métodos tradicionais (Druzhinina & Kubicek, 2005). Segundo Chet (1987), os isolados que são micoparasitas e utilizados no controle biológico de fitopatógenos têm sido geralmente classificados como pertencentes à espécie *T. harzianum*. Entretanto, Hermosa et al (2000) demonstraram que 17 dos isolados pertencem pelo menos a quatro diferentes espécies: *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum* e *T. longibrachiatum*. Druzhinina & Kubicek (2005) apresentaram uma atualização na taxonomia e filogenia de 88 taxa (que ocorrem como 14 holomorfos, 49 telemorfos e 25 anamorfos na natureza) do gênero *Trichoderma/Hyprocrea* que tem sido confirmado pelos resultados da combinação das características morfológicas, fisiológicas e genéticas (Chaverri et al, 2001).

Os fungos do gênero *Trichoderma* são filamentosos, presentes em todos os tipos de solo e diversos outros ambientes como a rizosfera, matéria orgânica, etc e são reconhecidos como agentes de biocontrole de patógenos de plantas (Herman, 2000; Harman et al, 2004), atuando principalmente em raízes de muitas plantas cultivadas, na biodegradação de compostos clorofenólicos e em bioremediação no solo (Espósito & Silva, 1998). Alguns deles são economicamente importantes por causa da produção de enzimas industriais (celulases e hemicelulases) e antibióticos, mas também podem causar enfermidade em cogumelos produzidos comercialmente (Espósito & Silva, 1998). Em certos casos, eles podem exercer efeitos adversos sobre fungos micorrízicos arbuscolares, que são endosimbiontes de raízes de muitas plantas

(Wyss et al, 1992). Relatos de *Trichoderma* como patógeno oportunista de mamíferos imunocomprometidos, incluindo os humanos (Kredics et al, 2003) são raros e quase sempre envolvem pacientes com problemas renais e pulmonares crônicos, neutropenia e amiloidoses (Groll & Walsh, 2001).

Trichoderma é um fungo com alta capacidade de tolerar ampla faixa de temperatura (McBeath & Adelma, 1991), sendo mais efetivos em temperaturas próximas a 25 °C (Hjeljord et al, 2001); é um antagonista altamente variável (Mihuta-Grimm & Rowe, 1986); são eficientes produtores de enzimas polissacaridases, proteases e lipases, as quais podem ter aplicações industriais e, na natureza, estão envolvidas na degradação de parede celular do patógeno (Chérif & Benhamou, 1990), como as quitinases (Lima et al, 1997); bem como consumir outros fungos, matéria orgânica e nutrientes secretados pelas raízes. Isolados de *Trichoderma* são conhecidos por suas características oligotróficas e, em condições de laboratório, esses fungos colonizam mesmo em substratos extremamente pobre em nutrientes (Hjeljord et al, 2001).

Trichoderma no controle biológico

A preocupação sobre o efeito na saúde humana e na contaminação ambiental associada com o uso excessivo de fungicidas no controle de doenças de plantas, assim como o aparecimento de populações de fitopatógenos resistentes aos produtos químicos de uso freqüente na maioria das culturas, tem contribuído no aumento do interesse em alternativas como o uso do controle biológico.

Desde o trabalho realizado por Weindling & Fawcett (1936) no controle de *Rhizoctonia solani* em citros, diversas linhagens de *Trichoderma* tem sido reportados ser efetivo no biocontrole de doenças de plantas provocadas por fungos (Ait-Lahsen et al., 2001). O fungo *Trichoderma* é um agente de controle biológico por ser antagonista a vários fungos fitopatogênicos, podendo exercer o controle de indiretamente, competindo por espaço e nutrientes, modificando as condições ambientais, produzindo antibióticos, inativando as enzimas do patógeno ou, diretamente, mediante o micoparasitismo (Benitez et al, 2004). Mas, a ação das enzimas hidrolíticas sobre os fitopatógenos é considerado o principal mecanismo envolvendo o processo desse antagonista (Ait-Lahsen et al., 2001).

A aplicação de *Trichoderma* no solo em casa de vegetação ou no campo, reduziu a severidade de doenças, como também aumentou o crescimento da planta (Harmann, 2000). O sucesso do *Trichoderma* é devido a sua alta capacidade reprodutiva, habilidade de sobreviver sob condições desfavoráveis, eficiência na utilização de nutrientes, capacidade de modificar a rizosfera, alta agressividade contra fungos fitopatogênicos, e a eficiência em promover o crescimento (Benitez, 2004), além de estimular os mecanismos de defesa da planta (De Meyer et al, 1998; Yedidia et al, 2001).

O uso de *Trichoderma* tem sido efetivo contra patógenos radiculares como: nematóide da raiz *Meloidogine javanica* (Sharon et al, 2001), *Pythium* (Naseby et al, 2000; Thrane et al, 2000), *Rhizoctonia* (Cúndom et al, 2003), *Phytophthora* (Etebarian et al, 2000, Ezziyyani et al, 2007) etc e patógenos da parte aérea, como: *Venturia* spp., *Botrytis* (Hjeljord et al, 2001, Lisboa et al, 2007), *Crinipellis perniciosa*, agente causal da vassoura-de-bruxa do cacau (Sanogo et al, 2002), dentre outros. Podem, também, ser utilizados no controle de fitopatógenos de produtos de pós-colheita, como tubérculos (Okibo & Ikediugwu, 2000), frutos (Batta, 2004) e na proteção de sementes (Burns & Benson, 2000; Harman et al, 1980). No controle

de diversas doenças de plantas pode-se usar somente uma espécie de *Trichoderma* como, por exemplo, *Trichoderma harzianum*, ou em combinação com outras espécies do mesmo gênero (Ozbay & Newman, 2004).

Mecanismos de biocontrole pelo *Trichoderma* spp.

O mecanismo pelo qual espécies de *Trichoderma* reconhecem e atacam fungos fitopatogênicos é desconhecido, apesar de que alguns determinantes desses mecanismos já foram identificados (Grinyer, 2005). No processo de controle biológico esses mecanismos podem ser representados pelos efeitos diretos e indiretos causados pelo agente de biocontrole no fitopatógeno. No caso do gênero *Trichoderma*, os efeitos diretos incluem:

- a) Antibiose: Muitas espécies de *Trichoderma* e *Gliocladium* são conhecidas produtoras de diversos metabólitos secundários, voláteis e não voláteis, com amplo espectro de atividade antimicrobiana. Esse mecanismo vem sendo economicamente explorado com alguns produtos comerciais (Punja & Utkhede, 2003). Vários autores têm mostrado que essas espécies podem secretar diversos antibióticos antifúngicos como as pironas, isocianatos, tricotecenos, dentre outros (Schirmbock et al, 1994).
- b) Competição pelos nutrientes e espaço físico: Microrganismos que têm capacidade de competir por sítios de infecção e usar nutrientes disponíveis podem deslocar o patógeno por impedir a germinação de propágulos ou a sua infecção (Punja & Utkhrde, 2003). As espécies de *Trichoderma* são geralmente consideradas competidoras agressivas, apresentando rápido crescimento e colonização, excluindo muitos patógenos. A eficiência da inibição do fitopatógeno pelo *Trichoderma* parece estar também relacionada a altas taxas e acumulação de CO₂ realizadas pelo antagonista (Marchetti et al, 1992).
- c) Micoparasitismo: Entre os modos de ação é o que mais se destaca, pela complexidade e número de etapas envolvidas (Lima et al, 2001). Esse mecanismo consiste na utilização do fitopatógeno como alimento para seu antagonista. *Trichoderma* spp. cresce em direção ao outro fungo, enrola nas hifas do fungo alvo em uma reação mediada por lecitinas e degrada a sua parede celular pela secreção de enzimas líticas, limitando o crescimento e atividade do fitopatogênico (Chet, 1992). As enzimas hidrolíticas extracelulares produzidas por *Trichoderma* são consideradas de importância determinante na habilidade antagonista desse fungo (Thane et al, 2000). O papel de cada proteína no complexo enzimático do *Trichoderma* parece ser diferente, sendo que enzimas com modos de ação de diversos ou complementares são exigências para um maior efeito antifúngico sobre diferentes fitopatógenos (Lorito et al, 1993). Essas enzimas são quitanasas, celulasas, glucanasas e proteasas que quebram as estruturas dos fungos parasitados, e são características comuns em muitos agentes de biocontrole (Lorito et al, 1996).
- d) Inativação das enzimas do fitopatógeno: As enzimas de alguns fitopatógenos são responsáveis pela hidrólise dos componentes pécticos da parede celular das plantas. Quando presente, *Trichoderma harzianum* por exemplo, secreta proteases sobre a superfície da planta que inibem a ação das enzimas hidrolíticas desses fitopatógenos (Elad et al, 1999).

Os efeitos indiretos incluem a indução de resistência: plantas são capazes de produzir uma resposta imune após uma primeira infecção por patógenos, que é conhecida como resistência sistêmica adquirida-SAR (van Loon et al, 1998). Linhagens de fungos do gênero *Trichoderma* colonizam e penetram tecidos da raiz

de planta, iniciando uma série de alterações morfológicas e bioquímicas na planta, consideradas como parte de defesa da planta e que, no final, leva a mesma a induzir uma SAR (Bailey & Lumsden, 1998). A ativação do sistema de defesa da planta na associação da raiz tratada com *T. harzianum* foi sugerida por Yedidia et al (1999). Outros efeitos indiretos também são citados como a tolerância ao estresse devida ao desenvolvimento de raízes e tronco, bem como a solubilização e absorção de nutrientes inorgânicos. Os mecanismos não são excludentes, mas atuam sinergicamente no controle dos patógenos. A importância relativa de cada um deles depende de cada interação antagonista-patógeno e das condições ambientais (Harman & Kubicek, 1998).

Apesar de nenhum agente de biocontrole utilizar todos os mecanismos, as informações disponíveis indicam que quase todos os processos envolvidos no controle biológico são causados por complexos multigênicos (Lu et al, 2004; Grinyer et al, 2005).

Produtos comerciais utilizando *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* apresenta grande diversidade genética. Isolados podem ser usados para produzir material de interesse comercial e ecológico, como enzimas que degradam celulose e quitina, produtos para biocontrole etc (De Marco et al, 2003; Lima et al, 2001; Harman et al, 2004).

No desenvolvimento de produtos de biocontrole, há necessidade de vários passos, como: coleta, isolamento, identificação e caracterização do microrganismo; desenvolvimento da produção em meios de cultivo; otimização do processo fermentativo e escalonamento dos processos; estudos de formulação e aplicação em campo; obtenção do Registro Especial Temporário (RET); registro e comercialização do produto.

Segundo Harman et al (1991), na produção de biomassa de *Trichoderma* spp. é desejável: primeiro, que a produção seja a preços competitivos e preferencialmente em meios líquidos; segundo, que a biomassa seja preservada contra contaminantes, o que requer secagem ou formulações; terceiro, que o produto seja eficaz e com taxas altas de germinação; quarto, que a formulação realizada seja efetiva nas condições do ambiente a ser empregado; e quinto, que tenha uma longa vida de prateleira.

Apesar da existência de mais de 70 anos de estudos com espécies de *Trichoderma*, só recentemente, isolados desse fungo passaram a ser disponibilizados comercialmente (Hermosa et al, 2000). Os métodos de produção massal de *Trichoderma* podem ser artesanais realizados pelos próprios agricultores, ou industriais, com mais tecnologia e complexidade e, talvez com uma maior produtividade, como por exemplo, no uso do método de encapsulação (Mafia et al, 2003). Mas, a armazenagem tem sido um dos fatores limitantes para assegurar que os agentes de biocontrole sejam comercialmente viáveis (Hanson & Howell, 2002 ou 2001)

Segundo Monte (2001), citado por Ozbay & Newman (2004), produtos comerciais contendo linhagens de *T. harzianum* já estão no mercado ou esperando registro, a saber:

- BioFungus (Bélgica) para uso contra *Sclerotinia*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium*, *Verticillium*.
- Binab-T (Suécia), a base de *T. harzianum*, para controle de doenças de raiz (Paulitz & Belanger, 2001).
- Root Pro (Israel) para uso contra *R. solani*, *Pythium* spp., *Fusarium* spp. e *Sclerotinia rolfsii*.

- RooTShield (conhecido também como Bio-Trek T-22G e formulado a base de *T. harzianum*) (Estados Unidos) para uso no controle de *Pythium* spp., *R. solani*, *Fusarium* spp. (Paulitz & Belanger, 2001).
- SoilGard (anteriormente Gliocard) utilizado para o controle de damping-off diseases causado por *Pythium* spp. e *Rhizoctonia* spp. *T. virens* é o ingrediente ativo no produto deste produto comercial (Lumsden et al, 1993).
- Supersivit, a base de *T. harzianum* (Dinamarca e República Tcheca) rotulado para controlar vários fungos (Paulitz & Belanger, 2001).
- Trichodex (Israel) para uso contra *Botrytis* de hortaliças e videira.
- Trichofung (Espanha) para uso contra vários fungos fitopatogênicos.
- Trichoject, Trichopel, Trichodowels e Trichoseal (Nova Zelândia) para o controle de *Armillaria*, *Botryosphaeria*, *Chondrostereum*, *Fusarium*, *Nectria*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*.
- TUSAL (Espanha) usado para o controle de doenças causadas por *Pythium*, *Phoma* e *Rhizoctonia* de beterraba e alface.
- Trichdex7 (Israel), comercializado com as cepas de *T. harzianum* (Paulitz & Belanger, 2001)
 - Trichoderma 2000 (Israel) para *R. solani*, *S. rolfsii*, *Pythium* spp. e *Fusarium* spp.
 - Trieco (India) para uso contra *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp., *Fusarium* spp., podridão da raiz, podridão de mudas, damping-off etc.

No Brasil, diversos produtos à base de *Trichoderma* já foram lançados como, por exemplo: Biomix (mix de *Trichoderma* spp.), utilizado para o controle de Oídio, *Uncinula necator*, em videira (www.cptasa.embrapa.br); Binab T (a base de *T. harzianum*), utilizado contra *Botrytis cinerea* (Ribeiro et al, 2001); Biotrich (contendo *Trichoderma* spp.), com ação preventiva sobre os fungos fitopatógenos *Rhizoctonia*, *Sclerotina*, *Fusarium*, *Phytiuum*, *Phomopsis* e *Rosilinia* (www.anponline.org.br); Trichonat EF e Trichonat PM (a base de *Trichoderma* spp.) contra *Botrytys*, *Phytophtora*, *Verticillium*, *Colletotrichum*, *Armillaria*, *Rhizopus*, *Crinipelis* (www.naturalrural.com.br); ECCB 2001 Solo, formulado para o controle de doenças da raiz e ECCB 2001 Aéreo, para doenças da parte aérea da planta, ambos produtos a base de *Trichoderma* spp. (www.eccb.com.br); Trichodermil (contendo *Trichoderma* spp.) produzido pela Itaforte (www.itaforte.com.br) foi o primeiro produto registrado no Brasil. Há, também, o Tricovab, à base de *Trichoderma stromaticum*, produzido pela CEPLAC e fornecidos a baixo custo para produtores de cacau para controle de *Crinipelis perniciosa*, agente etiológico da vassoura-de-bruxa (Niella, 2005). Os produtos à base de *Trichoderma* também já estão sendo testados em sistemas hidropônicos (Cipriano et al, 2005). Apesar desse número de produtos a base de fungos do gênero *Trichoderma*, há necessidade do controle do uso desses produtos, verificando o grau de satisfação dos produtores, a qualidade do produto, as condições de transporte e armazenamento, bem como a existência de registro, para que o produtor não se decepcione com o produto.

Perspectivas

A manipulação genética de plantas utilizando uma ou mais enzimas líticas de fungos micoparasíticos pode ser uma das grandes ferramentas para aumentar a resistência da planta a patógenos (Viterbo et al, 2002).

Rey et al (2000), demonstraram em testes in vitro que linhagens de *T. harzianum*, transformadas com genes de hidrolasas, apresentaram uma capacidade antifúngica sobre *Rhizoctonia solani* superior ao da linhagem silvestre. Transformação utilizando genes de resistência a fungicidas tem sido realizado em *T. harzianum* (Silva, 2000). Brunner et al (2005) mostraram que a transformação de *T. atroviride*, utilizando gene de resistência, pode aumentar sua capacidade como agente de biocontrole. Esses autores informaram, também, as perspectivas de utilização desses microrganismos como vetores, no intuito de prover plantas com moléculas que possam aumentar a resistência a patógenos.

Projetos de pesquisas têm sido conduzidos no intuito de identificar genes e produtos (proteínas) de fungos filamentosos, como os do gênero *Trichoderma*, para obter produtos com valor biotecnológico, por exemplo, com atividade anti-fúngica, bem como para uso terapêutico (Grinyer et al, 2004a). Segundo esses autores, a identificação dessas proteínas permite a realização do mapeamento proteômico celular dos fungos e das mitocôndrias (Grinyer et al, 2004b). A comunidade européia também tem financiando projetos que envolvam o desenvolvimento integrado do genoma funcional com abordagem proteômica, procurando novos métodos para realização de “screening” por atividades biológicas, no intuito de obter uma rápida exploração de genes e produtos potenciais. As tecnologias derivadas dos estudos funcionais do genoma do *Trichoderma* teriam aplicações em agroindústria, atividades ambientais e médicas, inovações no controle de pragas agrícolas, além de se encontrar novos antibióticos, uso industrial de enzimas envolvendo processamento de substâncias derivadas de plantas, incluindo alimentação animal, compostagem e bioremediação (http://ec.europa.eu/research/quality-of-life/cell-factory/volume2/projects/qlk3-2002-02032_en.html).

O gênero *Trichoderma*, apesar das dificuldades em sua classificação é um fungo de fácil cultivo e de manutenção. A produção tem sido realizada, tanto em meio sólido utilizando arroz parboilizado como em meio líquido. Há perspectivas de aumento da sua eficiência de cultivo em meio líquido, o que poderá elevar a capacidade de produção desse fungo, bem como da diminuição de custos. Um outro ponto se relaciona ao aumento da vida útil dos biofungicidas, com a secagem dos conídios. Há necessidade de realizar a separação dos conídios do substrato e realizar a extração de água, fazendo com que os conídios permaneçam com 5 a 10% de umidade, aumentando assim o tempo de prateleira.

Um outro ponto importante diz respeito à extração dos conídios do substrato sólido, através de equipamento já disponível no mercado, que possui injeção de ar. Testes com novas formulações utilizando revestimento dos conídios diminuiria os efeitos dos raios ultra-violeta; formulações em óleo emulsionável, facilitaria a diluição e a pulverização dos conídios (Batta, 2004).

Novos equipamentos utilizando ultra-baixo-volume poderão ser empregados em aplicações aéreas, pois utilizaria volumes mais baixo de biofungicidas e daria maior autonomia de vôo para as aeronaves.

Vários outros estudos estão sendo realizados: testes de compatibilidades com outros fungos antagonistas, formulações com gotas eletrostáticas, dentre outros que certamente irão melhorar a performance da ação sobre os fitopatógenos e, com isso, poder competir com os fungicidas químicos. O meio ambiente espera por isso, com certeza!

REFERÊNCIAS

- Ait-Lahsen, H., Soler, A., Rey, M., De la Cruz, J. , Monte, E. & Llobell, A. An antifungal exo- α -1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. **Applied Environmental Microbiology**, 67(12): 5833-9, 2001.
- Bailey, B.A. & Lumsden, R.D. **Direct effects of Trichoderma and Gliocladium on plant growth and resistance to pathogens**. In: *Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, Biological Control and Commercial Applications*. (Eds. C.P. Kubicek, G.E. Harman & K.L. Ondik). Taylor and Francis, London, pp.185-204, 1998.
- Batta, Y.A. Postharvest biological control of apple gray mold by *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in an invert emulsion. **Crop Protection**, 23: 19-26, 2004.
- Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C. & Codón. A.C. **Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains**. International Microbiology, 7(4): 249-260, 2004.
- Brunner, K.; Zeilinger, S.; Ciliento, R.; Woo, S.L.; Lorito, M.; Kubicek, C.P. & Mach, R.L. Improvement of the Fungal Biocontrol Agent *Trichoderma atroviride* To Enhance both Antagonism and Induction of Plant Systemic Disease Resistance. **Applied Environment Microbiology**, 71(7): 3959–3965, 2005.
- Burns, J.R., Benson, D.M. Biocontrol of damping-off of *Catharanthus roseus* caused by *Pythium ultimum* with *Trichoderma virens* and binucleate *Rhizoctonia* fungi. **Plant Disease**, 84(6): 644-648, 2000.
- Chaverri, P., Samuels, G.J. & Stewart, E.L. *Hypocrea virens* sp. Nov., the teleomorph of *Trichoderma virens*. **Mycologia**, 93(6): 1113-1124, 2001.
- Chérif, M. & Benhamou, N. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f.sp. *Rsciscis-lycopersici*. **Phytopathology**, 80(12): 1406-1414, 1990.
- Chet, I. **Trichoderma – application, mode of action, and potential as biocontrol agent of soilborne plant pathogen fungi**. In: Innovative Approaches to Plant Disease Control (I. Chet, ed.), pp.137-160. John Wiley, New York, 1987.
- Chet, I. **Microbial control of plant diseases**. In: Environmental Microbiology. New York: Wiley,-Liss, 1992. p335-354.
- Cipriano, M.A.P., Santos, A.S., Patrício, F.R.A., Freitas, R.P., Zottarelli, C.L.A.P. Potencial de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Pythium aphanidermatum* em sistemas hidropônicos. Arquivos do Instituto Biológico, 72 (Supl. 1):24, 2005
- Cúndom, M.A.; Mazza, S.M. & Gutiérrez, S.A. Short communication. Selection of *Trichoderma* spp. Isolates against *Rhizoctonia solani*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, 1(4):79-81, 2003.
- De Marco, J.L., Lima, L.H.C., Sousa, M.V. De & Felix, C.R. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 16:383-386, 2000.
- De Meyer, G., Bigirimana, J, Elad, Y, & Hofte, M. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, 104: 279-286, 1998.
- Druzhinina, I. & Kubicek, C.P. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters?. **Journal of Zhejiang University SCIENCE**, 6B(2): 100-12, 2005.

Elad, Y., David, D.R., Levi, T., Kapat, A. & Kirshner, B. ***Trichoderma harzianum* T-39-mechanisms of biocontrol of foliar pathogens.** In: Modern fungicides and antifungal compounds II (Eds. H. Lyr, P.E. Russel, H.W. Dehne & H.D. Sisler). Andover Hants, UK: Intercept, pp.459-67, 1999.

Etebarian, H.R.; Scott, E.S. & Wicks, T.J. *Trichoderma harzianum* T39 and *T. virens* DAR 74290 as potential biological control agent for *Phytophthora erythroseptica*. **European Journal of Plant Pathology**, 106: 329-37, 2000.

Espósito, E. & Silva, M. da. Sistemáticas and Environmental Applications of the genus *Trichoderma*. **Critical Reviews In Microbiology**, 24: 89-98, 1998.

Ezziyyani, M.; Requena, M. E.; Egea-Gilbert, C. & Candela, M. E. Biological Control of *Phytophthora* Root Rot of Pepper Using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in Combination. **Journal of Phytopathology**, 155(6): 342-349, 2007.

Glazer, A.N. & Nikaido, H. **Microbial Biotechnology: fundamentals of applied microbiology**. W.H. Freeman and Company (ed.). 662p., 1995.

Grinyer, J.; Hunt, S.; McKay, M.; Herbert, B.R. & Nevalainen, H. Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. **Current Genetic**, 47:381-388, 2005.

Grinyer, J.; McKay, M.; Nevalainen, H. & Herbert, B.R. Fungal proteomics: initial mapping of biological control strain *Trichoderma harzianum*. **Current Genetic**, 45:163-169, 2004a.

Grinyer, J.; McKay, M.; Herbert, B.R. & Nevalainen, H. Fungal proteomics: mapping the mitochondrial proteins of a *Trichoderma harzianum* strain applied for biological control. **Current Genetic**, 45:170-175, 2004b.

Groll, A.H. & Walsh, T.J. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. **Clinical Microbiology Infection**, 7:8-24, 2001.

Hanson, L.E. & Howell, C.R. Biocontrol efficacy and other characteristics of protoplast fusants between *Trichoderma koningii* and *T. virens*. **Mycological Research**, 106(3): 321-28, 2002.

Harman, G.E., Howel, C.R., Viterbo, A. , Chet, I. & Lorito, M. *Trichoderma* species- opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews/Microbiology**, 2: 43-56, 2004.

Harman, G.E. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**. 84: 377-93, 2000.

Harman, G.E. & Kubicek, C.P. ***Trichoderma* and *Gliocladium***. London, Taylor and Francis, 1998.

Harman, G.E., Jin, X., Stasz, T.E., Peruzzotti, A., Leopold, A.C. & Taylor, A.G. Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control. **Biological Control**, 1: 23-28, 1991.

Harman, G.E., Chet, I., Baker, R. *Trichoderma hamatum* effects on seed and seedlings diseases induced in radish and peas by *Pythium* sp. or *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, 70: 1167-1172, 1980.

Hjeljord, L.G., Stensvand, A. & Tronsmo, A. Antagonism of nutrient-activated conidia of *Trichoderma harzianum* (atroviride) P1 against *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, 91(12): 1172-1180, 2001.

Hermosa, M.R., Grondona, I., Iturriaga, E.A., Diaz-Minguez, J.M., Castro, C., Monte, E. & Garcia-Acha, I. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. **Applied Environmental Microbiology**, 66:1890-1898, 2000.

Hoowell, C.R. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, 92(2): 177-180, 2002.

http://europa.eu.int/comm/research/quality-of-life/cell-factory/volume2/projects/qlk3-2002-0232_en.htm

Isaac, S. **Fungal life-style**. In Fungal-Plant interactions. (eds Chapman & Hall), London. 418p., 1992.

Kennedy, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, 74(1):65-76, 1999

Kredics, I., Druzhinina, I., Bisset, J., Zafari, D., Prillinger, H.J., Szakacs, G., Zare, R., Gams, W. & Kubicek, C.P. Clinical importance of the genus *Trichoderma*. A review. **Acta Microbiolog. Immunolog. Hung.**, 50: 105-117, 2003.

Küçük, Ç. & Kivanç, M. Isolation of *Trichoderma* spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological features. **Turk. J. Biol.**, 27: 247-253, 2003.

Lima, L.H.C., Ulhoa, C.J., Fernandes, A.P. & Felix, C.R. Purification of a chitinase from *Trichoderma* sp. And its action on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. **Journal General Applied Microbiology**. 43:31-37, 1997.

Lima, L.H.C., De Marco, J.L.; Queiroz, P.R., Ulhoa, C.J. & Felix, C.R. **Método de purificação de uma endoquitinase de *Trichoderma harzianum* com atividade sobre a parede celular de fungos fitopatogênicos**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 32p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 11).

Lisboa, B.B.; Bochese, C.C.; Vargas, L.K.; Silveira, J.R.P.; Radin, B. & Oliveira, A.M.R. de O. Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na redução da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. **Ciência Rural**, 37(5): 1255-1260, 2007

Lorito, M., Harman, G.E., Hayes, C.K., Brodway, R.M., Woo, S.L. & Di Pietro, A. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*. Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. **Phytopathology**, 83:302-307, 1993.

Lorito, M., Woo, S.L., Ambrosio, M.D., Harman, G.E., Hayes, C.K., Kubicek, C.P. & Scala, F. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 9:206-213, 1996.

Lu, Z., Tombolini, R., Woo, S., Zeilinger, S., Lorito, M. & Jansson, J.K. In vivo study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. **Applied and Environmental Microbiology**, 70(5): 3073-3080, 2004.

Lumsden, R.D., Lewis, J.A. & Locke, J.C. **Managing soilborne plant pathogens with fungal antagonists**. In: Lumsden, R.D., Vaughn, J.L. (eds). Pest Management: biologically based technologies. Washington, D.C.: American Chemical Society, p.196-203, 1993.

Luz, W.C. da. **Controle Biológico das doenças foliares de trigo**. In: Bettoli, W. (Org.). Controle Biológico de doenças de plantas. Jaguariúna, EMBRAPA-CNPDA, p.383-8, 1991.

Mafia, R., Alfenas, A. C., Maffia, L. A., Ventura, G. & Sanfuentes, E.A. Encapsulamento de *Trichoderma inhamatum* para o controle biológico de *Rhizoctonia solani* na propagação clonal de *Eucalyptus*. **Fitopatologia brasileira**, 28(1):101-105, 2003.

Manfio, G.P. **Avaliação do estado atual do conhecimento sobre a diversidade microbiana no Brasil.** SBF/Ministério do Meio Ambiente, 128p, 2000.

Marchetti, R., Nipoti, P., D'ercole, N. & Guerzoni, M.E. Competition at atmosphere level as biocontrol mechanism in *Trichoderma* spp. **Petria**, 2: 137-47, 1992.

McBeath, J. & Adelman, M. Taxonomy of a new *Trichoderma* found in Alaska. Abstract. **Phytopathology**, 81(10); 1151, 1991.

Mello, S.C.M., Melo, D.F. & Ávila, Z.R. de. **Avaliação de pesticidas sobre o crescimento e esporulação de Dycima pulvinata, agente de biocontrole de Microcyclus ulei.** Brasília: CENARGEN/EMBRAPA, 2005. 8p. (Comunicado Técnico, 120).

Mihuta-Grimm, L. & Rowe, C. *Trichoderma* spp. as biocontrol agents of *Rhizoctonia* damping-off of radish in organic soil and comparison of four delivery systems. **Phytopathology**, 76(3): 306-312, 1986.

Monte, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. **International of Microbiology**, 4:1-4, 2001.

Naseby, D.C.; Pascual, J.A. & Lynch, J.M. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Phitium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. **Journal of Applied Microbiology**, 88: 161-9, 2000.

Niella, G.R. Produção massal de *Trichoderma stromaticum* para o controle de vassoura-de-bruxa do cacaueiro. In: Simpósio de Controle Biológico, 9.5 **Anais**...Recife, PE. p.45, 2005.

Okigbo, R.N. & Ikediugwu, F.E.O. Studies on biological control of postharvest rot in yams (*Dioscorea* spp.) using *Trichoderma viride*. **Journal of Phytopathology**, 148: 351-355, 2000.

Ozbay, N. & Newman, S.E. Biological control with *Trichoderma* spp. With emphasis on *T. harzianum*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 7(4): 478-84, 2004.

Paulitz, T.C. & Belanger, R.R. Biological control in greenhouse systems. **Annual Review of Phytopathology**, 39: 103-33, 2001.

Punja, Z.K. & Utkhede, R.S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, 21: 400-7, 2003.

Rey, M., Delgado-Jarana, J., Rincón, A.M., Limón, M.Ca. & Benítez, T. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. **Rev. Iberoam. Micol.**, 17:S31-S36, 2000.

Sanogo, S., Pomellia, A., Hebbar, P.K., Bailey, B., Costa, J.C.B., Samuels, G.J. & Lumsden, R.D. Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipellis perniciosa* on cacao. **Phytopathology**, 92(10): 1032-7, 2002.

Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y.L., Hayes, C.K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G.E. & Kubicek, C. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. **Applied Environmental Microbiology**, 60: 4363-70, 1994.

Sharon, E.; Bar-Eyal, M., Chet, I., Herrera-Estrella, A., Kleinfeld, O. & Spiegel, Y. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Biological Control**, 91(7): 687-693, 2001.

Smith, V.L.; Wilcox, W.F. & Harman, G.E. Potential for biological control of Phytophthora root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. **Phytopathology**, 80(9): 880-885, 1990.

Silva, P.R.Q. da. Transformação de *Trichoderma harzianum* com os genes da proteína fluorescente verde e de resistência ao fungicida benomil. Tese de doutorado, Brasília, UnB, 130p., 2000.

Thrane, C.; Funck Jensen, D. & Tronsmo, A. Substrate colonization, strains competition, enzyme production *in vitro*, and biocontrol of *Pythium ultimum* by *Trichoderma* spp. Isolates P1 and T3. **European Journal of Plant Pathology**, 106: 215-20, 2000.

Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. & Pieterse, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, 36:453-483. 1998.

Viterbo, A., Ramot, O., Chernin, L. & Chet, I. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. In the biocontrol of fungal plant pathogens. **Antonie van Leeuwenhoek**, 81:549-556, 2002.

Weindling, R. & Fawcett, W.S. Experiment in the control of *Rhizoctonia* damping-off of citrus seedling. **Hilgardia**, 10:1-16, 1936.

Wyss, P., Boller, T.H. & Wiemken, A. Testing the effect of biological control agents on the formation of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, 147: 159-62, 1992.

Yedidia, I., Srivastva, A.K., Kapulnik, Y. & Chet, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and growth of cucumber plants. **Plant and Soil**, 235: 235-242, 2001.

Yedidia, I., Benhamou, N. & Chet, I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, 65: 1061-70, 1999.

Zilli, J.E., Rumjaneck, N.G., Xavier, G.R. Coutinho, H.L.C., Neves, M.C.P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, 20(3): 391-411, 2003.