

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

***TRICHODERMA* spp.: BIODIVERSIDADE E APLICAÇÃO NO CONTROLE DA
FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO**

RAFAEL OLIVA TROCOLI

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
Novembro – 2013**

TRICHODERMA: BIODIVERSIDADE E APLICAÇÃO NO CONTROLE DA FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO

RAFAEL OLIVA TROCOLI

Engenheiro Agrônomo

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2007

Tese submetida ao Colegiado de Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza

FICHA CATALOGRÁFICA

T843

Trocoli, Rafael Oliva

Trichoderma, biodiversidade e aplicação no controle da fusariose do abacaxizeiro: caracterização molecular de agentes de biocontrole (*Trichoderma* spp.) de *Fusarium guttiforme* / Rafael Oliva Trocoli._ Cruz das Almas, BA, 2013.

104f.; il.

Orientador: Jorge Teodoro de Souza

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Abacaxi – Doenças. 2.Abacaxi – Controle biológico – Mecanismos de ação. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD 634.774



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE
RAFAEL OLIVA TROCOLI

Membro Presidente: Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza
Instituição: UFRB

Membro Externo à Instituição: Profa. Dra. Élide Barbosa Corrêa
Instituição: UEPB

Membro Externo à Instituição: Prof. Dr. Harllen Sandro Alves Silva
Instituição: Embrapa Mandioca e Fruticultura

Membro Externo ao Programa: Prof. Dr. Fabiano Branco Rocha
Instituição: UFRB

Membro Externo à Instituição: Prof. Dr. Herminio Souza Rocha
Instituição: Embrapa Mandioca e Fruticultura

Homologada em / /

*À minha noiva Larissa pela paciência,
Dedicação, amor e companheirismo sempre.*

OFEREÇO

*À minha mãe Vera Lúcia Oliva Trocoli
Pelo primoroso exemplo de caráter,
Dedicação ao trabalho e objetivos de vida
Focados no bem comum de todos.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós- Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano, pela oportunidade de realização do curso;

A minha família, principalmente a minha mãe Vera Oliva Trocoli e Larissa pelo amor e carinho – fundamentais para esta conquista;

Ao Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza pelo profissionalismo, competência profissional, entusiasmo e contribuições essenciais durante o processo de orientação;

Ao Dr. Aristóteles Pires de Matos pelos ensinamentos desde a época de iniciação científica até os dias atuais- incontestável exemplo de dedicação ao trabalho e grande ser humano;

Ao Dr. Miguel Angel Dita Rodriguez pelo compromisso com a ciência e disposição para auxiliar em qualquer tempo;

Aos colegas de curso pelos momentos agradáveis que tornaram a realização deste trabalho muito mais prazerosa, além da gratificante amizade fundamentada na união de todos e objetivos em comum;

Aos amigos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano pelos inúmeros incentivos e convívio prazeroso no ambiente de trabalho, além de momentos de descontração;

Aos técnicos e estagiários do Laboratório de Genética Microbiana da UFRB pelo apoio no desenvolvimento dos trabalhos;

A todos que colaboraram e vibraram com essa conquista.

“O mais importante de tudo é nunca deixar de se perguntar. A curiosidade tem sua própria razão de existir.”

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO01

CAPÍTULO 1

Isolamento e seleção de *Trichoderma* spp. para o controle da fusariose do abacaxizeiro15

CAPÍTULO 2

Trichoderma spp. vs *Fusarium guttiforme*: influência sobre a produção de frutos de abacaxizeiro 'Pérola'41

CAPÍTULO 3

Caracterização molecular de agentes de biocontrole (*Trichoderma* spp.) de *Fusarium guttiforme*65

ANEXOS93

TRICHODERMA: BIODIVERSIDADE E APLICAÇÃO NO CONTROLE DA FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO

Autor: Rafael Oliva Trocoli

Orientador: Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza

RESUMO: O abacaxizeiro (*Ananas comosus*) representa uma das poucas alternativas agrícolas de geração de renda para agricultores familiares do semiárido do Nordeste brasileiro. A fusariose do abacaxizeiro, doença causada por *Fusarium guttiforme* (*Fgt*), ocasiona elevadas perdas na produção, sendo este o principal fator limitante para a cultura. O uso de fungos do gênero *Trichoderma*, que têm demonstrado resultados robustos no controle de vários fitopatógenos constitui uma alternativa de controle. Todavia, pesquisas dessa natureza com foco no biocontrole de *Fgt* são escassas. Neste estudo, *Trichoderma* spp. foram isolados de espécies vegetais da Caatinga. Os isolados com maior potencial de biocontrole de *Fgt* foram selecionados por meio de testes *in vitro* e em casa de vegetação (Capítulo 1). Em campo, os isolados TC77 (953,30 gramas), TC26 (951,05 g) e TC36 (927,23g) apresentaram os maiores índices de controle da doença expresso em peso médio de fruto (Capítulo 2). Análises BOX-PCR dos isolados de *Trichoderma* spp. originaram 14 grupos genéticos (Grg), os quais foram submetidos a testes de biocontrole de *Fgt in vitro*. Nestes, o Grg 3 (TC09), Grg 9 (TC10) e Grg 5 (TC14) demonstraram os melhores desempenhos na redução da colonização do patógeno. Sequências de fragmentos da região ITS e do gene TEF1- α de cada isolado foram usadas nas análises filogenéticas. Os isolados TC26 e TC36 (Grg10) foram identificados como *T. koningiopsis*, e o isolado TC77 (Grg09) como *T. atroviride*. Independente do potencial de biocontrole, outras cinco espécies foram identificadas entre os isolados estudados: *T. virens*; *T. longibrachiatum*; *T. dorotheae*; *T. cremeum*; e *T. stromaticum*. Prováveis novas espécies foram representadas pelos isolados TC06, TC23, TC26 e TC93 (Capítulo 3). Futuramente, formulações desses isolados poderão ser usadas em escala comercial, o que justifica novos estudos com foco na sua precisa identificação e descrição de novas espécies.

Palavras-chaves: Abacaxi, *translation elongation factor*, Controle biológico.

TRICHODERMA: BIODIVERSITY AND APPLICATION IN THE CONTROL OF PINEAPPLE FUSARIOSIS

Author: Rafael Oliva Trocoli

Advisor: Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza

ABSTRACT: Pineapple (*Ananas comosus*) is one of the few agricultural alternatives for the Brazilian Northeast. Pineapple fusariosis caused by *Fusarium guttiforme* (*Fgt*) causes severe losses and is the main limiting factor for pineapple production. *Trichoderma* spp. have been successfully applied in the control of various plant pathogens and for this reason is considered to be an alternative to chemical. However, research aiming at the biocontrol of *Fgt* is scarce. In this research, *Trichoderma* spp. were isolated from plant species of the Caatinga and tested against *Fgt*. Isolates with potential for biological control were selected by *in vitro* and greenhouse tests (Chapter 1). In the field, isolates TC77 (953.30 g), TC26 (951.05 g) and TC36 (927.23) provided higher rates of disease control as expressed in average fruit weight (Chapter 2). BOX-PCR analysis of *Trichoderma* spp. originated 14 genetic groups (Grg), which were tested for biocontrol of *Fgt in vitro*. Grg 3 (TC09), Grg 9 (TC10) and Grg 5 (TC14) showed higher capacity to reduce pathogen colonization. Fragment of ITS region of rDNA and *translation and elongation factor 1 alpha* of the RNA of each isolate were used in a preliminary phylogenetic analyzes. The TC26 and TC36 (Grg10) isolates were identified as *T. koningiopsis* and isolated TC77 (Grg09) as *T. atroviride*. *Trichoderma longibrachiatum* and other 6 undescribed species were found among the isolates studied. New species were represented by isolates TC06, TC23, TC26 and TC93. In the near future formulations of these isolates may be used commercially, which justifies new studies aimed at the identification and description of the new species.

Keywords: Pineapple, *translation and elongation factor*, biological control

INTRODUÇÃO

1.1. O abacaxizeiro

Os primeiros estudos apontam que o abacaxizeiro é originário de uma região compreendida entre 15° N e 30° S de latitude e 40° L e 60° W de longitude, correspondendo às zonas central e sul do Brasil, o nordeste da Argentina e do Paraguai (JOHNSON, 1935; SMITH, 1939; COLLINS, 1960). Botanicamente a planta se caracteriza como uma monocotiledônea, herbácea, perene, pertencente à família Bromeliaceae, a qual abriga aproximadamente, 56 gêneros e 3.010 espécies desta família. A maioria das espécies dessa família é encontrada em condições naturais de regiões tropicais e subtropicais das Américas (CABRAL et al., 2004; LUTHER, 2004; CLEMENT et al., 2010).

Em 2003, uma nova classificação botânica da família Bromeliaceae passou a reconhecer que o gênero *Ananas* fosse composto apenas por duas espécies: *Ananas macrodontes*, chamado de gravatá de rede, anteriormente classificado como *Pseudananas sagenarius*; e *Ananas comosus*, conhecido como ananás ou abacaxizeiro comum. Na espécie *Ananas comosus* estão incluídas cinco variedades botânicas: *Ananas comosus* var. *ananassoides*, *Ananas comosus* var. *paraguazensis*, *Ananas comosus* var. *erectifolius*, *Ananas comosus* var. *bracteatus* e *Ananas comosus* var. *comosus* (COPPENS D'EECKENBRUGGE & LEAL, 2003).

Ananas comosus var. *comosus* representa todas as cultivares plantadas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (CABRAL et al., 2004). Nas regiões produtoras do mundo, as principais cultivares utilizadas são: 'Smooth Cayenne', 'Pérola', 'Perolera', 'Singapore Spanish', 'Queen', 'Primavera', 'Jupi' e 'Golden' (Figura 1). No Brasil, há o predomínio de três cultivares, 'Pérola', 'Smooth Cayenne' e 'Jupi'. Além dessas, outros materiais têm sido introduzidas em algumas regiões específicas do Brasil, como 'Roxo de Tefé', "Gigante de

Tarauacá', entre outras cultivadas na região Amazônica (MATOS & REINHARDT, 2009).

No Brasil, híbridos como 'Imperial' (Figura 1), 'Vitória' e BRS Ajubá, têm sido gerados pelo programa de melhoramento genético do abacaxi, coordenado pela Embrapa Mandioca e Fruticultura (CABRAL & MATOS, 2009a; CABRAL & MATOS, 2009b). Estima-se que 70% da produção mundial correspondem à 'Smooth Cayenne'. Entretanto, no Brasil, nas principais regiões produtoras há predomínio de abacaxizeiro 'Pérola', embora suscetível à fusariose, principal problema da cultura no Brasil.

1.2. Aspectos socioeconômicos da abacaxicultura nacional

Com uma produção de 1,44 milhão de toneladas de frutos em 55,9 mil hectares cultivados, atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de abacaxi. O Nordeste brasileiro responde por quase 50% dessa produção, sendo o Estado da Bahia o quarto produtor nacional (IBGE, 2012). A atividade agrícola exerce importante papel socioeconômico onde é praticada, pelo que contribui para a geração de emprego e renda, além da fixação do homem no campo (MATOS & REINHARDT, 2009).

Na Bahia, a abacaxicultura é presente em diversas regiões, apresentando aumento expressivo na área cultivada na região Sul, a exemplo do que se verifica nas regiões produtoras de Una e Porto Seguro, onde esta cultura vem ganhando importância econômica significativa. Em adição, a cultura vem sendo implantada em outras microrregiões do Estado, como é o caso da região semiárida, incluindo municípios como Miguel Calmon e Jaguarari.

Mesmo ocupando a posição de maior produtor mundial de abacaxi, o Brasil apresenta baixos índices de produtividade quando comparado a de outros países produtores. Por exemplo, a abacaxicultura brasileira possui rendimento médio de frutos igual a 26,09 t.ha⁻¹ (IBGE, 2012), enquanto que na Indonésia, sétimo maior produtor mundial, a produtividade média é em torno de 61,1 t.ha⁻¹ (FAOSTAT, 2010).

Vários fatores são relacionados à baixa produtividade da abacaxicultura brasileira, como, fatores ambientais adversos, práticas culturais inadequadas e

principalmente problemas fitossanitários. Destes, a fusariose do abacaxizeiro, doença causada pelo fungo *Fusarium guttiforme* (NIRENBERG & O'DONNELL, 1998), é o principal fator limitante da cultura (MATOS & REINHARDT, 2009).

Em geral, a estratégia de integração de práticas culturais que desfavoreçam o ataque do patógeno com o uso de cultivares resistentes tem sido a principal recomendação dos centros nacionais de pesquisa e Universidades. Diante da relevância da doença, estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de buscar alternativas de controle.

1.3. Fusariose do abacaxizeiro

Relatada pela primeira vez em 1962 no Brasil, infectando frutos da cultivar 'Smooth Cayenne' em plantios no Estado de São Paulo (KIMATI & TOKESHI, 1964), a fusariose do abacaxizeiro está presente em praticamente todas as regiões produtoras do país, constituindo a doença mais destrutiva da cultura. Além do Brasil, a fusariose já foi detectada em plantios de abacaxi na Bolívia (MATOS et al., 1992) e em frutos comercializados no Chile (MONTEALEGRE e LUCHSINGER, 1990).

As perdas em produção de frutos ocasionadas pela doença podem atingir até 80%, a depender da cultivar, da região produtora, bem como da época de plantio. O patógeno também pode infectar, aproximadamente, 40% do material de plantio e matar cerca de 20% das plantas infectadas antes delas atingirem a época de colheita. O cenário ainda é mais preocupante em virtude de as cultivares mais plantadas, como, 'Smooth Cayenne', 'Golden' e principalmente 'Pérola', a mais cultivada no Brasil, apresentarem suscetibilidade ao patógeno (MATOS, 1999; MATOS & REINHARDT, 2009; MATOS & SANCHES, 2009).

O agente causal da fusariose do abacaxizeiro é o fungo *Fusarium guttiforme* (NIRENBERG & O'DONNELL, 1998). Também são sinônimas de *F. guttiforme*: *Fusarium subglutinans* Nelson, Tousson & Marasas comb. nov.; *Fusarium moniliforme* Sheld var. *subglutinans* WR & GR; *Fusarium sacchari* (Butter) Gams var. *subglutinans*; *Fusarium moniliforme* Sheldon emend., (MATOS, 1999). A fase teleomórfica denominada *Gibberella fujikuroi* (Saw.)

Wollenw. var. *subglutinans* Edw. ainda não foi detectada naturalmente sobre abacaxi (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

Em condições de laboratório *F. guttiforme* apresenta inicialmente crescimento micelial branco, que passa a róseo-alaranjado, mas algumas vezes observa-se coloração violeta. O fungo produz microconídios com formato oval no micélio aéreo e macroconídios com parede delgada e formato cilíndrico. A produção de microconídios em polifialides e a ausência de clamidósporos são características marcantes de *F. guttiforme* (MATOS, 1999; LESLIE & SUMMERELL, 2006).

Fusarium guttiforme inicia a interação com o hospedeiro após a chegada dos seus propágulos na superfície da planta. As flores abertas nas inflorescências constituem os principais sítios de infecção. Em mudas, plantas adultas e frutos, ferimentos mecânicos na superfície do hospedeiro, provenientes do crescimento natural da planta ou resultante da ação de fatores bióticos e abióticos, também constituem importantes sítios de infecção para *F. guttiforme*. Mudanças tipo filhote aderidas à planta mãe são infectadas naturalmente (MATOS, 1978).

Até o momento, os eventos que se sucedem à chegada do patógeno na superfície do hospedeiro, tais como, germinação, penetração e colonização dos tecidos, inerentes ao patossistema *F. guttiforme* x abacaxizeiro, ainda não foram documentados, isto, em decorrência da escassez de estudos epidemiológicos e histopatológicos com essa finalidade.

O patógeno sobrevive em material propagativo, em restos culturais e em plantios abandonados, sobretudo naqueles onde a incidência da doença tenha sido elevada. Mudanças infectadas usadas em novos plantios constituem as fontes iniciais de inóculo no campo. Em adição, *F. guttiforme* pode sobreviver na superfície das folhas sem causar infecção, o que garante a presença de inóculo antes dos sítios de infecção se apresentarem favoráveis à penetração e colonização do patógeno (MATOS, 1987; MATOS & REINHARDT, 2009).

Por outro lado, a ausência de clamidósporos limita a sobrevivência de *F. guttiforme* no solo quando o mesmo não interage com o abacaxizeiro. Aliado a isto, o fato de mudas saudáveis não apresentarem infecção pelo patógeno, mesmo

quando plantadas em áreas com histórico da doença, reforça a hipótese que o solo é um veículo inexpressivo na sobrevivência de *F. guttiforme* (MATOS, 1999). Por isso, a movimentação de material propagativo infectado pelo patógeno constitui-se como principal veículo de disseminação da fusariose do abacaxizeiro, tanto em curtas quanto em longas distâncias.

Após a infecção, *Fusarium guttiforme* provoca podridão mole e exsudação de uma substância gomosa através dos tecidos colonizados (MATOS & REINHARDT, 2009). Tanto nas plantas quanto nas mudas, a infecção se localiza no talo, progredindo para a base aclorofilada das folhas, restringindo-se a essa região. Nos frutos, os sintomas caracterizam-se pela exsudação de goma através das cavidades florais, e internamente, a polpa apresenta-se apodrecida. Além disso, as plantas infectadas também podem expressar sintomas externos, tais como: curvatura e encurtamento do talo; modificações na filotaxia, aumentando o número de folhas por espiral; redução no comprimento das folhas, e no desenvolvimento geral da planta; morte do meristema apical; modificações na arquitetura da planta que passa a ter a aparência de funil; e clorose (MATOS, 1999) (Figura 1).

Em geral, a lesão incitada pelo patógeno no talo da planta reduz a condução de água, sais minerais e fotossintatos, resultando progressivamente em enfezamento, clorose, murcha e morte do hospedeiro (Figura 1). Sobretudo, as mudas, especialmente do tipo filhote, quando submetidas à alta intensidade de ataque podem morrer e secar ainda aderidas a planta mãe (MATOS, 1999).

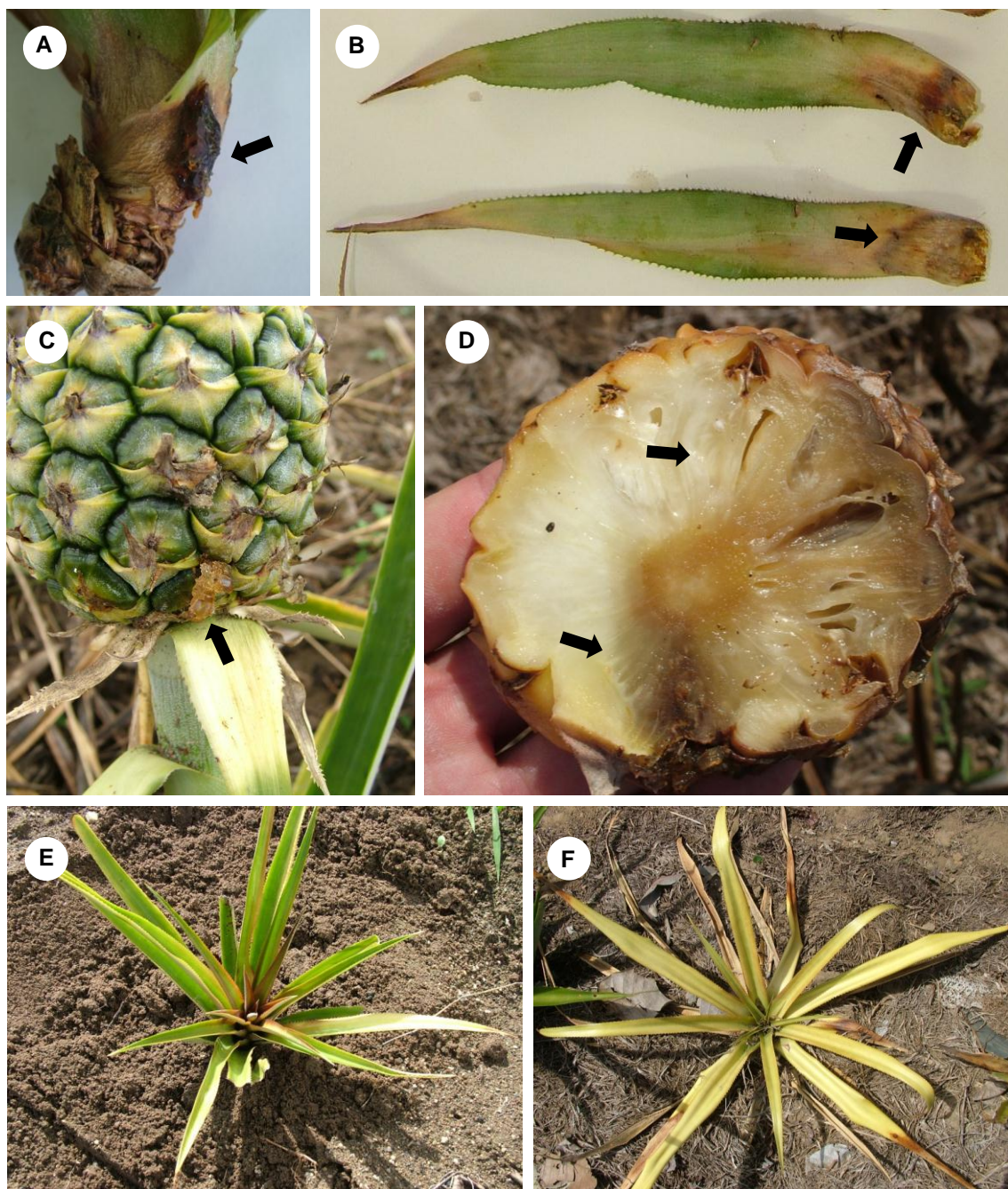


Figura 1. Sintomas da fusariose do abacaxizeiro em mudas, plantas adultas e frutos. **(A)** muda apresentando exsudação de resina em resposta à infecção de *F. guttiforme*; **(B)** folhas de abacaxizeiro 'Pérola' com infecção na base aclorofilada; **(C)** fruto apresentando exsudação de resina através das cavidades florais; **(D)** fruto com polpa apodrecida internamente; **(E)** planta com alteração na filotaxia; **(F)** planta morta.

1.3.1. Controle da fusariose do abacaxizeiro

O manejo integrado da doença, o qual envolve o emprego simultâneo ou sequencial de diversas ações de controle tem sido a principal estratégia de controle em plantios comerciais. As medidas incluem ações biológicas,

culturais, genéticas, físicas e químicas. Desse modo, o controle integrado da fusariose do abacaxizeiro tem como objetivo principal reduzir a incidência da doença a um nível de dano econômico aceitável (MATOS & CABRAL, 2005).

Nesse sentido, o controle da fusariose do abacaxizeiro, como praticado atualmente, fundamenta-se na integração de várias práticas culturais como: utilização de material propagativo sadio visando a redução de inóculo inicial; monitoramento e erradicação de plantas infectadas durante o ciclo vegetativo; evasão do patógeno mediante tratamento de indução floral em época que possibilite o desenvolvimento do fruto sob condições desfavoráveis à incidência da doença (escape); proteção das inflorescências em desenvolvimento por meio da aplicação de fungicidas (MATOS, 1999; MATOS & REINHARDT, 2009).

De fato, nas principais regiões produtoras, a aplicação de agrotóxicos tem sido intensivamente adotada para o controle da doença. Todavia, o uso frequente desses produtos implica no surgimento de uma série de problemas ambientais, incluindo a contaminação de alimentos, do solo, água entre outros (NORDLUND, 1996). Em adição, o desequilíbrio biológico proporcionado pela aplicação intensiva de agrotóxicos na agricultura causa alterações significativas na ciclagem de nutrientes e de matéria orgânica, ocasiona a eliminação de organismos benéficos e contribui para a redução da biodiversidade (MORANDI & BETTIOL, 2009). Por isso, o controle químico vem se tornando uma prática cada vez menos aceita pelos consumidores.

Especificamente no patossistema abacaxi X *Fusarium guttiforme* tem-se verificado que o uso regular de defensivos mostra-se vulnerável, dado ao risco de resistência do fungo a fungicidas, fato já registrado no caso do benomyl a isolados de *F. guttiforme* (SANTOS et al. 1996). A influência de alta pluviosidade é outro fator que também contribui para a redução da eficiência dos químicos contra fitopatógenos. Por fim, o aumento dos custos de produção em função do uso de fungicidas é outro aspecto negativo relacionado aos agroquímicos. Diante disso, torna-se evidente a necessidade da busca de alternativas que reduzam o emprego de defensivos agrícolas e que sejam menos agressivas ao homem e ao meio ambiente.

Considerando a necessidade de se reduzir o emprego de agroquímicos nos plantios comerciais, novas alternativas de controle de doenças têm sido pesquisadas. Dentre elas, o controle biológico vem sendo intensivamente estudado como ferramenta no combate a diversos fitopatógenos associados a culturas de importância econômica (WALTERS, 2009; SHARMA et al., 2009; ZHAO et al., 2010). Dentro desse contexto, a abacaxicultura brasileira com sua reconhecida relevância socioeconômica também está inserida. Por isso, é indispensável buscar novos métodos de controle da fusariose com baixo custo e menor agressividade ao meio ambiente. Dentre eles, o uso de fungos do gênero *Trichoderma* para o controle biológico da doença constitui-se em uma promissora alternativa. Esses microrganismos são conhecidos pelo seu potencial antagônico contra inúmeros patógenos de plantas (HOWELL, 2003; HARMAN, 2004; SRIVASTAVA et al., 2010).

Por isso, a combinação desses fungos com as práticas de manejo já conhecidas para o controle da fusariose do abacaxizeiro pode constituir-se em uma ferramenta adicional no manejo integrado da doença. Tal estratégia poderá aumentar o potencial de uso desses microrganismos, refletindo na redução de *F. guttiforme*. Entretanto, poucos são os estudos realizados até o momento buscando encontrar agentes de controle biológico da fusariose do abacaxizeiro.

1.4. *Trichoderma* ssp. como agente de controle biológico

Conceitualmente o controle biológico de doenças de plantas pode ser definido como o controle de um patógeno por meio de outro microrganismo (BETTIOL, 1991a). Além deste, conceitos mais abrangentes também são atribuídos. Para Cook & Baker (1983), controle biológico é “a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença, provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem”. As atividades determinantes são representadas por características do patógeno, como, crescimento, virulência, agressividade, além de processos que influenciam o desenvolvimento de sintomas e reprodução. Os organismos

abrangem tanto indivíduos quanto populações avirulentas ou hipovirulentas dentro das espécies patogênicas, além de antagonistas do patógeno.

Para o controle biológico, doença de planta é o resultado da interação entre o hospedeiro, o patógeno e uma diversidade de não-patógenos que também habitam o sítio de infecção (COOK & BAKER, 1983; COOK, 1985). Nas relações ecológicas entre microrganismos, os não-patógenos apresentam potencial para limitar ou aumentar a atividade de outros microrganismos, incluindo patógenos. Sobretudo, podem atuar como naturais indutores de resistência em plantas.

Diversos agentes têm sido relatados no controle biológico de doenças de plantas. Dentre os micro-organismos destacam-se micorrizas (POZO & AZCÓN-AGUILAR, 2007); rizobactérias promotoras de crescimento e biocontroladoras de fitopatógenos (PIETERSE & VAN LOON, 2007; WALTERS, 2009); e fungos, principalmente do gênero *Trichoderma* (WALTERS & DANIELL, 2007; COLLEEN & SINGH, 2009).

A partir de 1940 foi dada grande ênfase às pesquisas com agentes de controle biológico em várias partes do mundo. No Brasil, em 1950, foi publicado o primeiro artigo sobre o tema por Reinaldo Foster. O pesquisador do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), inativou o vírus do mosaico comum do fumo por meio da aplicação de filtrado de culturas de *Trichoderma* spp. (MORANDI & BETTIOL, 2009).

Desde então diversos estudos com foco no uso de *Trichoderma* spp. para o controle biológico de doenças de plantas têm sido realizados no Brasil. O produto comercial Tricovab[®] à base de *Trichoderma stromaticum* antagonista a *Moniliophthora perniciosa* (BEZERRA et al., 2000; OLIVEIRA & LUZ, 2007), é um dos resultados que merece destaque no cenário nacional. Além desse, outros produtos a base de *Trichoderma*, como exemplo do Trichodermil[®] formulado a partir de *Trichoderma harzianum* pela Itaforte Bioprodutos Ltda, também tem sua importância reconhecida.

Apesar dos resultados satisfatórios obtidos em vários trabalhos disponíveis na literatura científica, a maioria das pesquisas realizadas no Brasil

não desenvolve produtos comerciais, bem como não gera patentes e registros nos órgãos federais.

O sucesso de uso desses microrganismos no combate a fitopatógenos deve-se ao fato dos mesmos atuarem por meio de diferentes mecanismos de ação. Dentre os quais, destacam-se o biocontrole por competição, micoparasitismo, produção de sideróforos, antibiose e indução de resistência sistêmica no hospedeiro. Na maioria dos casos de biocontrole de doenças de plantas, dois ou mais desses mecanismos podem ocorrer simultaneamente (HOWELL, 2003; WALTERS, 2009). Em adição, juntamente com a atividade de biocontrole, na maior parte dos casos os agentes também promovem o crescimento de plantas.

A despeito do potencial de biocontrole de *Trichoderma* spp. e a relevância da fusariose para a cultura do abacaxi, estudos com foco na obtenção e aplicação desses microrganismos em campo para o controle da doença são escassos. Os métodos usados na seleção dos melhores isolados, bem como na sua introdução em condições naturais de cultivo constituem-se nos principais gargalos para a identificação de potenciais agentes de biocontrole de *F. guttiforme*. Além disso, a adaptação dos agentes de biocontrole em campo é outro fator determinante para o sucesso dos mesmos. Por isso, buscar materiais vegetais que abriguem potenciais agentes de biocontrole, bem como padronizar práticas ideais para a introdução destes no ambiente, é uma estratégia promissora para a obtenção de satisfatórios índices de controle da doença em campo.

O fato de a Caatinga representar um ecossistema com uma considerável biodiversidade, e ao mesmo tempo ser pouco estudado, abre a possibilidade do mesmo constituir uma excelente fonte a ser explorada na busca por agentes de biocontrole. Em teoria, espécies vegetais nativas desse bioma podem abrigar novas espécies de *Trichoderma* spp. endofíticos com potencial de biocontrole em função da sua estabilidade em condições de campo, bem como pela maior eficiência de colonização do hospedeiro. Todavia, pesquisas com foco na identificação de *Trichoderma* spp. associados à espécies vegetais da Caatinga, bem como sua aplicação contra

fitopatógenos também são inexistentes, sobretudo no patossistema abacaxi vs. *F. guttiforme*. Por isso, fica evidente que tal potencial deve ser utilizado para gerar alternativas biotecnológicas para a região semiárida, incluindo o biocontrole da fusariose do abacaxizeiro.

Dessa maneira, os objetivos desse estudo foram: a) isolar *Trichoderma* spp. associados a espécies vegetais da Caatinga e selecionar os fungos obtidos quanto à redução da colonização de *Fusarium guttiforme*, *in vitro* e em casa de vegetação (Capítulo 1); b) verificar em condições de campo, o potencial dos isolados selecionados para o controle da fusariose do abacaxizeiro (Capítulo 2); e c) identificar em nível de espécie os isolados com melhor desempenho de controle, bem como realizar análise de biodiversidade de todos os fungos em estudo (Capítulo 3).

REFERÊNCIAS

- BETTIOL, W. Componentes do Controle Biológico de Doenças de Plantas. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p.1-5, 1991.
- BEZERRA, J. L.; COSTA, J. C. B.; POMELLA, A. W. V.; ALMEIDA, O. C. Como produzir Tricovab para controlar a vassoura-de-bruxa do cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.359, 2000.
- CABRAL, J. R. S.; CASTELLEN, M. da S.; SOUZA, F. V. D.; MATOS, A. P. de.; FERREIRA, F. R. **Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 35p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Circular Técnico, 146). 2004.
- CABRAL, J. R. S.; MATOS, A. P. de. **BRS Ajubá, nova cultivar de abacaxi**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 4p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Comunicado Técnico, 126), 2009a.
- CABRAL, J. R. S.; MATOS, A. P. de. Imperial, a New Pineapple Cultivar Resistant to Fusariosis. **Acta Horticulturae**, v.822, p.47-51, 2009b.
- CLEMENT, C. R.; CRISTO-ARAÚJO, M. de; D'EECKENBRUGGE, G. C.; PEREIRA, A. A.; PICANÇO-RODRIGUES, D. Origin and Domestication of Native Amazonian Crops. **Diversity**, v. 2, p.72-106, 2010.
- COLLEEN, C.; SINGH, T. *In vitro* evaluation of combination of *Trichoderma harzianum* and chitosan for control of sapstain. **Biological Control**, v.50, p.262-266, 2009.

COLLINS, J. L. **The Pineapple: botany, cultivation, and utilization**. London: Leonard Hill, 1960. 294p.

COOK, R. J. Biological control of the pathogens: theory to application. **Phytopathology**, v.75, p.25-29, 1985.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of plant pathogens**. St. Paul, Minnesota: APS Press, American Phytopathological Society, 1983. 539p.

COPPENS D' EECKENBRUGGE, G.; LEAL, F. Morphology, Anatomy and Taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D. P.; PAULL, R. E.; ROHRBACH, K. G. (Eds.). **The Pineapple: Botany, Production and Uses**. Wallingford: CAB International, p.13-32, 2003.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of United Nations. **Agricultural Database**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/381/DesktopDefault.aspx?>> Acessado em: 20 de janeiro de 2010.

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

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v.87, p.4-10, 2003.

IBGE. INSTI. TUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acessado em: 12 de outubro de 2012.

JOHNSON, M.O. **The Pineapple**. Hawaii: Honolulu. 1935. 306p.

KIMATI, H.; TOKESHI, H. Nota sobre a ocorrência de *Fusarium* sp. causando resinose fúngica em abacaxi. **Revista de Agricultura**, v.39, p.131-133, 1964.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* Laboratory Manual**. Blackwell Publishing, 2006. 369p.

LUTHER, H. E. **An alphabetical list of Bromeliad binomials**. 9 ed. Sarasota: The Bromeliad Society International, 2004. 109p.

MATOS, A. P. de. Doença e seu controle. In: CUNHA, DA G. A. P.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. da S. (Eds.). **O abacaxizeiro: Cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p.269-305, 1999.

MATOS, A. P. de. Pineapple fusariosis in Brazil: an overview. **Fruits**, v. 42, n.7/8, p. 417-422, 1987.

MATOS, A. P. de. Métodos de inoculação com *Fusarium moniliforme* Sheld. var. *subglutinans* MR & RG em abacaxi 'Pérola'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.1, p.37-41, 1978.

MATOS, A. P. de; CABRAL, J. R. S. Evaluation of Pineapple Genotypes for Resistance to *Fusarium subglutinans*. **Acta Horticulturae**, v.702, p.73-77, 2006.

MATOS, A. P. de; CABRAL, J. R. S. **Manejo integrado da fusariose do abacaxizeiro**, 2p. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Boletim técnico - Abacaxi em Foco, 32), 2005.

MATOS, A. P. de; MOURICHON, X.; PINON, A. Occurrence of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* on pineapple in Bolívia. **Fruit**, v.47, p.33, 1992.

MATOS, A. P. de; REINHARDT, D. H. Pineapple in Brazil: Characteristics, Research and Perspectives. **Acta Horticulturae**, v.822, p.25-36, 2009.

MATOS, A. P. de; SANCHES, N. F.; TEIXEIRA, F. A.; ELIAS JÚNIOR, J. Integrated Management of Fusariosis in Pineapple Fields under Integrated Production System. **Acta Horticulturae**, v.822, p.199-204, 2009.

MATOS, A. P. de; REINHARDT, D. H. Pineapple in Brazil: Characteristics, Research and Perspectives. **Acta Horticulturae**, v.822, p.25-36, 2009.

MONTEALEGRE, J. R.; LUCHSINGER, L. E. Postharvest rot of pineapple fruits marketed in Chile. **Fitopatologia**, v.25, n.2, p.51-53, 1990.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. p.07-14, 2009.

NIRENBERG, H. I.; K. O'DONNELL. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, v.90, p.434-458, 1998.

NORDLUND, D. A. Biological control, integrated pest management and conceptual models. **Biocontrol News and Information**, v.17, p.35N-44N, 1996.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. Identificação e manejo das principais doenças do cacaueiro no Brasil. In: VALLE, R. R. (Ed.). **Ciência, tecnologia e manejo do cacaueiro**. 1. ed. Itabuna: Gráfica e Editora Vital Ltda, p.123-188, 2007.

PIETERSE, C. M. J.; VAN LOON, L. C. Signalling cascades involved in induced resistance. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (Eds.). **Induced**

Resistance for Plant Disease Control: A Sustainable Approach to Crop Protection. Blackwell Publishing, Oxford, p. 65–88, 2007.

POZO, M. J.; AZCÓN-AGUILAR, C. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, v.10, p.393–398, 2007.

SANTOS, R. L. M. S. **Técnicas de inoculação com *Fusarium subglutinans* em folhas destacadas de abacaxizeiro e estudos da interação patógeno/hospedeiro.** 1996, 45p., Dissertação (Mestrado em Agronomia, Universidade Federal da Bahia). Cruz das Almas, Universidade Federal da Bahia, 1996.

SHARMA, R. R.; DINESH, S.; RAJBIR, S. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biological Control** v.50, p.205–221, 2009.

SMITH, L. B. **Notes on Taxonomy of Ananas and Pseudananas.** Harvard: Botanical Museum Leaflet, p.73-81, 1939.

SRIVASTAVA, R.; KHALID, A.; SINGH, U.S.; SHARMA, A.K. Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt. **Biological Control**, v.53, p.24–31, 2010.

WALTERS, D. R.; DANIELL, T. Microbial induction of resistance to pathogens. In: WALTERS, D., NEWTON, A., LYON, G. (Eds.). **Induced Resistance for Plant Disease Control: A Sustainable Approach to Crop Protection.** Blackwell Publishing, Oxford, p.65–88, 2007.

WALTERS, D. R. Are plants in the field already induced? Implications for practical disease control. **Crop Protection**, v.28, p.459-465, 2009.

ZHAO, Z.; WANG, Q.; WANG, K.; BRIAN, K.; LIU, C.; GU, Y. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. **Bioresource Technology**, v.101, p.292–297, 2010.

CAPÍTULO 1

Isolamento e seleção de *Trichoderma* spp. para o controle da fusariose do abacaxizeiro

¹ Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico: Biological Control.

Isolamento e seleção de *Trichoderma* spp. para o controle da fusariose do abacaxizeiro

Autor: Rafael Oliva Trocoli

Orientador: Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza

RESUMO: A fusariose, doença causada por *Fusarium guttiforme*, provoca perdas consideráveis constituindo o principal fator limitante ao desenvolvimento da abacaxicultura no Brasil. O controle da doença fundamenta-se no uso de variedades resistentes, bem como na aplicação de agroquímicos. Todavia, o uso excessivo de produtos químicos implica no surgimento de uma série de problemas de ordem ambiental, pelo que explica a crescente demanda por métodos alternativos ao uso desses produtos. Dentre as alternativas, fungos do gênero *Trichoderma* têm sido intensivamente estudados com essa finalidade. Dessa forma, visando estudar o potencial de biocontrole da fusariose do abacaxizeiro, 142 isolados endofíticos de *Trichoderma* spp. foram obtidos de diferentes espécies vegetais da Caatinga. A seleção inicial revelou um grupo de 33 isolados, que reduziram significativamente a colonização de *F. guttiforme* sobre discos de talo de abacaxizeiro. No estudo desses em casa de vegetação, um grupo de 27 isolados reduziu significativamente a intensidade da doença em mudas de abacaxi 'Pérola'. Dentre esses, o isolado TC36 apresentou maior eficiência, seguido por TC77 e TC26. Esses isolados são promissores agentes de biocontrole da fusariose do abacaxizeiro, o que justifica o desenvolvimento de estudos mais aprofundados em condições de campo.

Palavras-chaves: *Fusarium guttiforme*, *Ananas comosus*, Controle Biológico.

Isolation and screening of *Trichoderma* spp. to control fusarium wilt of pineapple

Author: Rafael Oliva Trocoli

Advisor: Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza

ABSTRACT: Fusarium wilt, a disease caused by *Fusarium guttiforme* causes considerable losses constituting, the main factor limiting the development of pineapple in Brazil. Disease control is based on the use of resistant varieties, as well as the application of agrochemicals. However, excessive use of chemicals results in the appearance of a series of environmental problems, which explains the growing demand for alternative methods to the use of these products. Among the alternatives, fungi of the genus *Trichoderma* have been intensively studied for this purpose. Thus, to study the potential biocontrol of fusarium wilt of pineapple, 142 isolates of *Trichoderma* spp. obtained from different plant species from the Caatinga were tested. The initial screening revealed a group of 34 isolates, which significantly reduced the colonization of *F. guttiforme* on pineapple stem discs. Greenhouse tests showed that a group of 28 isolates significantly reduced the severity of the disease in seedlings of pineapple 'Pérola'. From these, the most efficient were TC36, TC77 and TC26. These isolates are promising biocontrol agents of fusarium wilt of pineapple, which justifies the implementation of further studies under field conditions.

Keywords: *Fusarium guttiforme*, *Ananas comosus*, Biological control.

1. INTRODUÇÃO

Apesar de o Brasil ser o maior produtor mundial de abacaxi, com uma produção de 1,44 milhão de toneladas em 55,9 mil hectares cultivados, o rendimento médio nacional em torno de 26,09 t.ha⁻¹ (IBGE, 2011) é considerado baixo. Diversos aspectos têm contribuído para este fato, tais como fatores ambientais adversos, práticas culturais inadequadas e principalmente problemas fitossanitários.

A doença conhecida por fusariose do abacaxizeiro, causada pelo fungo *Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell (sin. *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* Nelson, Tousson & Marasas comb. nov.) é considerada o principal fator limitante da cultura no Brasil (MATOS e REINHARDT, 2009). O fato de as cultivares de maior expressão mundial serem suscetíveis, tais como, Smooth Cayenne, Red Spanish, Queen e principalmente Pérola, a mais cultivada no Brasil, agrava ainda mais a situação (MATOS et al., 2009).

A aplicação de fungicidas ainda é o método amplamente usado em plantios comerciais para o controle da doença. Diante dos problemas ambientais causados por esses produtos, o controle biológico que se caracteriza pela introdução de microrganismos não-patogênicos para controlar patógenos (COOK e BAKER, 1983; BETTIOL, 1991), apresenta-se como uma ferramenta alternativa no controle de doenças de plantas. Por isso, tem sido intensivamente estudado nos últimos anos em diversos patossistemas (SHARMA et al., 2009). Dentre os microrganismos estudados, destacam-se fungos do gênero *Trichoderma*.

O potencial desses microrganismos no controle de fitopatógenos tem sido comprovado em diferentes patossistemas (WALTERS & DANIELL, 2007; SOUZA et al., 2008; COLLEEN & SINGH, 2009). Por exemplo, Rojan et al., (2010) relatam a atividade de *Trichoderma viride* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* em casa de vegetação. Além da capacidade de biocontrole, os autores apontam a promoção de crescimento do sistema radicular de plantas de soja em função da aplicação de *T. viride*.

A despeito do potencial de uso de microrganismos no combate de

fitopatógenos, os ensaios *in vitro* visando à seleção de isolados para sua aplicação em campo, ainda, apresentam resultados inconsistentes e sem relação direta com resultados obtidos em condições naturais. A falta de correspondência entre as metodologias usadas em ambas as condições, é o principal fator limitante para a seleção dos melhores isolados com potencial de uso no campo. Por isso, buscar microrganismos que apresentam adaptabilidade sob condições naturais de cultivo comercial das espécies hospedeiras é uma promissora estratégia na seleção de potenciais agentes de biocontrole.

O fato de a Caatinga representar um dos ecossistemas menos estudados do mundo faz com que a torne uma excelente fonte a ser explorada na busca por agentes de biocontrole. Em teoria, espécies vegetais nativas deste bioma podem abrigar novas espécies de *Trichoderma* spp. endofíticos com potencial de biocontrole. Todavia, pesquisas com foco na identificação de *Trichoderma* spp. associados à espécies vegetais da Caatinga, bem como sua aplicação contra fitopatógenos são escassas.

O presente trabalho objetivou isolar *Trichoderma* spp. endofíticos de espécies vegetais da Caatinga, visando: a) obter uma coleção de potenciais agentes de biocontrole; b) verificar a frequência dos isolados em associação com as espécies vegetais; c) selecionar os isolados obtidos quanto à redução da colonização de *F. guttiforme* em discos de talo de abacaxizeiro; e d) verificar em casa de vegetação, o efeito dos isolados selecionados no controle da fusariose do abacaxizeiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de coleta das amostras e espécies vegetais utilizadas

Para a obtenção dos isolados para compor a coleção de *Trichoderma* spp., amostras de espécies vegetais da Caatinga foram coletadas em diferentes áreas. Os locais de coleta constaram de áreas de preservação ambiental localizadas no município de Senhor do Bonfim-BA. As espécies vegetais utilizadas no estudo são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Identificação das espécies vegetais utilizadas para o isolamento de *Trichoderma* spp.

Código ^a	Nome vulgar ^b	Família	Espécie hospedeira
<i>Anc</i>	Gravatá	<i>Bromeliaceae</i>	<i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i>
<i>Asf</i>	Gonçalo Alves	<i>Anacardiaceae</i>	<i>Astronium fraxinifolium</i>
<i>Bov</i>	Bowdichia	<i>Fabaceae</i>	<i>Bowdichia virgilioides</i>
<i>Cap</i>	Catingueira	<i>Fabaceae</i>	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>

^a Código de trabalho das amostras;

^b Nomenclatura popular usada para identificar as espécies vegetais.

2.2 Isolamento e preservação de *Trichoderma* spp. endofíticos

Para o isolamento de *Trichoderma* spp. foram utilizadas amostras de folhas, caules e cascas de diferentes espécies vegetais da Caatinga. No laboratório, as amostras vegetais foram lavadas em água corrente e desinfestadas em álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio (1%) por cinco minutos, seguindo-se de três lavagens em água destilada esterilizada. Após a desinfestação superficial, fragmentos de cada amostra foram transferidos para placa de Petri contendo meio BDA 1/5 (batata - dextrose - ágar). Com a finalidade de constituir contraprova, e consequentemente excluir a possibilidade de isolamento de eventuais microrganismos epifíticos, retirou-se uma alíquota da última água de lavagem, a qual também foi plaqueada em meio BDA 1/5.

As colônias de *Trichoderma* spp. crescidas foram purificadas e preservadas utilizando-se dois métodos distintos: a) em óleo mineral; e b) água esterilizada. Após a preservação, a coleção de estudo foi mantida em câmara fria a 10°C, sendo periodicamente reativada com a finalidade de manter a viabilidade dos isolados. Os isolados preservados em óleo mineral e em água esterilizada foram usados nos testes de biocontrole.

2.3 Atividade antimicrobiana

Por meio do ensaio de antibiose foi verificada a capacidade para inibir o desenvolvimento do patógeno. Após o cultivo dos isolados em 1 mL de meio líquido BD, e incubados no escuro por 72h a 27°C, alíquotas de 100 µL desse meio foram depositadas em perfurações equidistantes, feitas assepticamente com auxílio de furador de rolhas (Ø4mm) em meio BDA, com 5 repetições por tratamento. Em seguida, um disco do patógeno foi transferido para o centro dessas placas e as culturas foram incubadas a 27°C. A avaliação foi realizada após 5 dias, levando em consideração o halo de inibição do patógeno provocada pela presença do antagonista. Para tanto, foi utilizado o programa Image Tool 3.0.

2.4 Obtenção de inóculo de *Fusarium guttiforme*

Para o preparo do inóculo colônias do isolado Fgt72CA-CNPMF de *F. guttiforme* foram crescidas durante sete dias em meio de cultura BDA. Após este período, adicionou-se água destilada esterilizada às placas e com um pincel fino procedeu-se a liberação dos conídios, obtendo-se a suspensão conidial. Visando remover os fragmentos de micélio, a suspensão conidial foi filtrada por duas camadas de gaze. A seguir, a concentração da suspensão foi ajustada para 10^5 conídios.mL⁻¹ mediante contagem de conídios em hemacitômetro tipo Neubauer (MATOS & CABRAL, 2006).

2.5 Avaliação da ação de endofíticos de *Trichoderma* spp. sobre a colonização de *Fusarium guttiforme* em discos de talo de abacaxizeiro ‘Pérola’

2.5.1 Material vegetal

Mudas de abacaxi ‘Pérola’ foram selecionadas quanto ao desenvolvimento fisiológico e qualidade fitossanitária. Dos materiais que atenderam aos critérios de seleção foram retirados discos da região basal, cortados na altura de 3 cm a partir da inserção na planta mãe. Os discos de talo foram lavados em água corrente e desinfestados em álcool 70% por 2 minutos e hipoclorito de sódio a 1% por 5 minutos, seguido de duas lavagens em água destilada esterilizada (TROCOLI, 2010).

2.5.2 Preparo de inóculo de *Trichoderma* spp.

Para a obtenção da suspensão de *Trichoderma* spp., cada isolado foi crescido durante sete dias em meio de cultura BDA (batata – dextrose - ágar) à 25°C. Decorrido este período, adicionou-se água destilada esterilizada às placas e com um pincel fino procedeu-se a liberação dos conídios. Em seguida, a suspensão foi filtrada através de duas camadas de gaze. A concentração da suspensão foi ajustada para 10^8 conídios.mL⁻¹ mediante contagem de conídios em hemacitômetro tipo Neubauer.

2.5.3 Aplicação de *Trichoderma* spp. em discos de tecidos de abacaxizeiro e avaliação da colonização de *Fusarium guttiforme*

Discos de talo de abacaxizeiro, obtidos como descrito anteriormente, foram tratados com 200 µL da suspensão de *Trichoderma* spp. Após dez minutos, período suficiente para a suspensão ter sido totalmente absorvida pelo tecido, procedeu-se a inoculação com 200 µL da suspensão conidial de *Fusarium*

guttiforme (10^5 conídios.mL⁻¹). Considerando o número de isolados a serem testados foram avaliados grupos de 20 isolados por vez. Em todos os grupos, a testemunha consistiu na inoculação de *F. guttiforme* em discos de talo tratados apenas com água destilada esterilizada. Em adição, foram utilizados discos de talo não inoculados como controle visando verificar a eficiência do processo de desinfestação. Após a aplicação dos diferentes tratamentos e inoculação do patógeno os discos foram acondicionados em câmara úmida a 25°C durante 5 dias. A câmara úmida consistiu de potes plásticos descartáveis contendo uma fina camada de papel filtro esterilizado e umedecido com água destilada esterilizada.

Com o auxílio do programa Image Tool (versão 3.0) avaliou-se a porcentagem de colonização de *F. guttiforme* nos discos de talo de abacaxi tratados com *Trichoderma* spp. O experimento obedeceu ao delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições. Isolados que proporcionaram acima de 90% de inibição foram selecionados e submetidos novamente ao mesmo ensaio para confirmação dos resultados. Os testes foram conduzidos seguindo a mesma metodologia, porém, foram utilizadas 20 repetições para cada tratamento. Em adição, três isolados de *Trichoderma* spp. que não inibiram o crescimento do patógeno foram testados novamente como controle.

2.6 Potencial de endofíticos de *Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole da fusariose do abacaxizeiro em casa de vegetação

2.6.1 Seleção e cultivo de mudas de abacaxizeiro

Mudas, tipo filhote 'Pérola' foram obtidas de plantios comerciais localizados na zona rural do município de Jaguarari, Bahia. As mudas que apresentaram qualidade fitossanitária e tamanho aproximadamente igual a 30 cm foram plantadas em sacos plásticos com capacidade para 3,5 kg de solo. O solo usado nos estudos foi composto por duas partes de latossolo, uma parte de terra preta e uma parte de areia lavada. Visando ao desenvolvimento fisiológico ideal para a condução das fases seguintes do estudo, após o plantio, procedeu-se a adubação das mudas

conforme descrito por Cunha e Reinhardt, (2004). Em seguida, as mudas foram acondicionadas em telado durante 60 dias, sendo a umidade do solo mantida por meio de irrigação periódica.

2.6.2 Aplicação de endofíticos de *Trichoderma* spp. e inoculação do patógeno em mudas de abacaxizeiro

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram aplicados via imersão das mudas em suspensão do inóculo durante 15 minutos, na concentração de 10^8 conídios.mL⁻¹. Antes da inoculação do patógeno, as mudas permaneceram sobre o solo durante 10 minutos com a finalidade de evitar a lavagem da suspensão de inóculo no momento da inoculação. Decorrido esse período, foi verificado que o sistema radicular das mudas apresentava-se visualmente seco. A seguir, as mudas foram inoculadas com uma suspensão de *F. guttiforme* a 10^5 conídios.mL⁻¹ por cinco minutos. Para garantir a eficiência da inoculação, foram feitos ferimentos equidistantes na base das mudas com 2 cm de profundidade e 1 mm de diâmetro conforme descrito por Matos e Cabral (2006). Imediatamente após a inoculação, as mudas foram replantadas e mantidas sob condições de casa de vegetação durante a condução do experimento.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 (dez) plantas por tratamento, sendo cada planta considerada uma repetição. A testemunha foi representada por plantas inoculadas somente com *F. guttiforme*. Em adição, foi utilizado um controle composto por mudas tratadas com água destilada esterilizada.

Após 90 dias, procedeu-se a remoção das mudas e avaliação da severidade da fusariose. A severidade da doença foi determinada utilizando uma escala de notas variando de zero a cinco (Figura 1). Para facilitar a avaliação, cortes longitudinais foram realizados na base das mudas que permitiram a visualização e quantificação dos sintomas internos (MATOS e CABRAL, 2006).



Figura 1. Escala de notas usada para determinar a severidade da fusariose do abacaxizeiro. **(0)** planta sem sintomas; **(1)** início de podridão na base da planta; **(2)** podridão leve, porém a infecção não progride por todo o diâmetro do talo; **(3)** podridão média, porém a infecção não progride verticalmente para as folhas e raízes; **(4)** podridão severa atingindo folhas e raízes; e **(5)** base da muda totalmente apodrecida, ocorrendo morte da planta.

2.7 Análises estatísticas

Com os dados de severidade obtidos nas avaliações em casa de vegetação foi calculado o índice de doença de McKinney utilizando a fórmula a seguir: $ID = [(grau \ da \ escala \times \ frequ\ência) / (N^\circ \ de \ plantas \times \ grau \ m\acute{a}ximo)] \times 100$. Os valores de índice da doença dos tratamentos foram convertidos em proporções com base nos valores do controle (plantas inoculadas com *F. guttiforme*, sem aplicação de agentes de biocontrole). Os dados originais de severidade, avaliada com escala de notas (6 classes) foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, o qual revelou que os dados não seguem uma distribuição normal. Sendo assim, os dados foram submetidos a análises não paramétricas (Kruskal Wallis, 1%), e as médias dos tratamentos analisadas por um teste de comparação múltipla não-paramétrica (5%). Dessa forma, os tratamentos foram “ranqueados” em três grupos distintos. As análises de Kruskal-Wallis e a comparação múltipla não-paramétrica foram realizadas no programa XLSTAT versão 2012.5.01 (ADDINSOFT, 2012).

3. RESULTADOS

Os procedimentos utilizados foram eficientes para o isolamento de *Trichoderma* spp. endofíticos de vegetais da Caatinga. Em total, 142 isolados foram obtidos, os quais constituíram uma coleção de potenciais agentes de biocontrole de doenças de plantas (Figura 1).

Os testes de antagonismo revelaram 16 isolados que inibiram em 100% a colonização de *Fusarium guttiforme* sob condições de laboratório. Destes, oito isolados apresentaram eficiência moderada na redução do patógeno em discos de talo de abacaxizeiro e em casa de vegetação (Tabela 2). Além disso, outros 79 isolados reduziram significativamente a colonização do patógeno entre 40% e 96% *in vitro*. Entretanto, 7 isolados não apresentaram qualquer atividade contra o patógeno em laboratório.

A seleção em discos de talo de abacaxizeiro apontou 12 isolados capazes de reduzir a colonização de *F. guttiforme* em 100%. Neste grupo, verificou-se maior frequência de isolados provenientes de *Astronium fraxinifolium* e *Caesalpinia pyramidalis*. Dentre as espécies vegetais, *A. fraxinifolium* destacou-se, originando 6 isolados (Tabela 2). Trinta e nove isolados não mostraram atividade contra *F. guttiforme* nas condições estudadas.

Com a finalidade de visualizar o efeito dos fungos na redução da colonização de *F. guttiforme* em discos de talo de abacaxizeiro, os 142 isolados foram divididos em três grupos: isolados que proporcionaram redução entre 80 e 100%, entre 41 e 79% e o grupo daquelas que mostraram menos de 40% de redução da colonização. Vinte e seis isolados ficaram alocados no primeiro grupo, quarenta e um no segundo e setenta e cinco isolados no terceiro. Dentro do intervalo entre 80 e 100% houve maior frequência de isolados provenientes de *Astronium fraxinifolium*, Gonçalo Alves (Figura 1B). Esses mesmos intervalos também foram usados para visualizar os resultados dos testes *in vitro*. Nestes, trinta e oito (38) isolados apresentaram redução entre 80 e 100%, cinquenta e sete (57) redução entre 41 e 79%, e quarenta e sete (47) isolados redução inferior a 40%. De modo similar aos testes com discos de talo, *A. fraxinifolium*, originou o maior número de isolados que

promoveram entre 80 e 100% de redução de *Fgt* (Figura 1A).

Dos 23 fungos submetidos aos ensaios de confirmação de resultados, todos apresentaram nível de inibição do patógeno acima de 80%. Os isolados TC36, TC77 e TC26 proporcionaram resultados similares nos dois experimentos, exibindo 100% de inibição de *F. guttiforme* (Tabela 2).

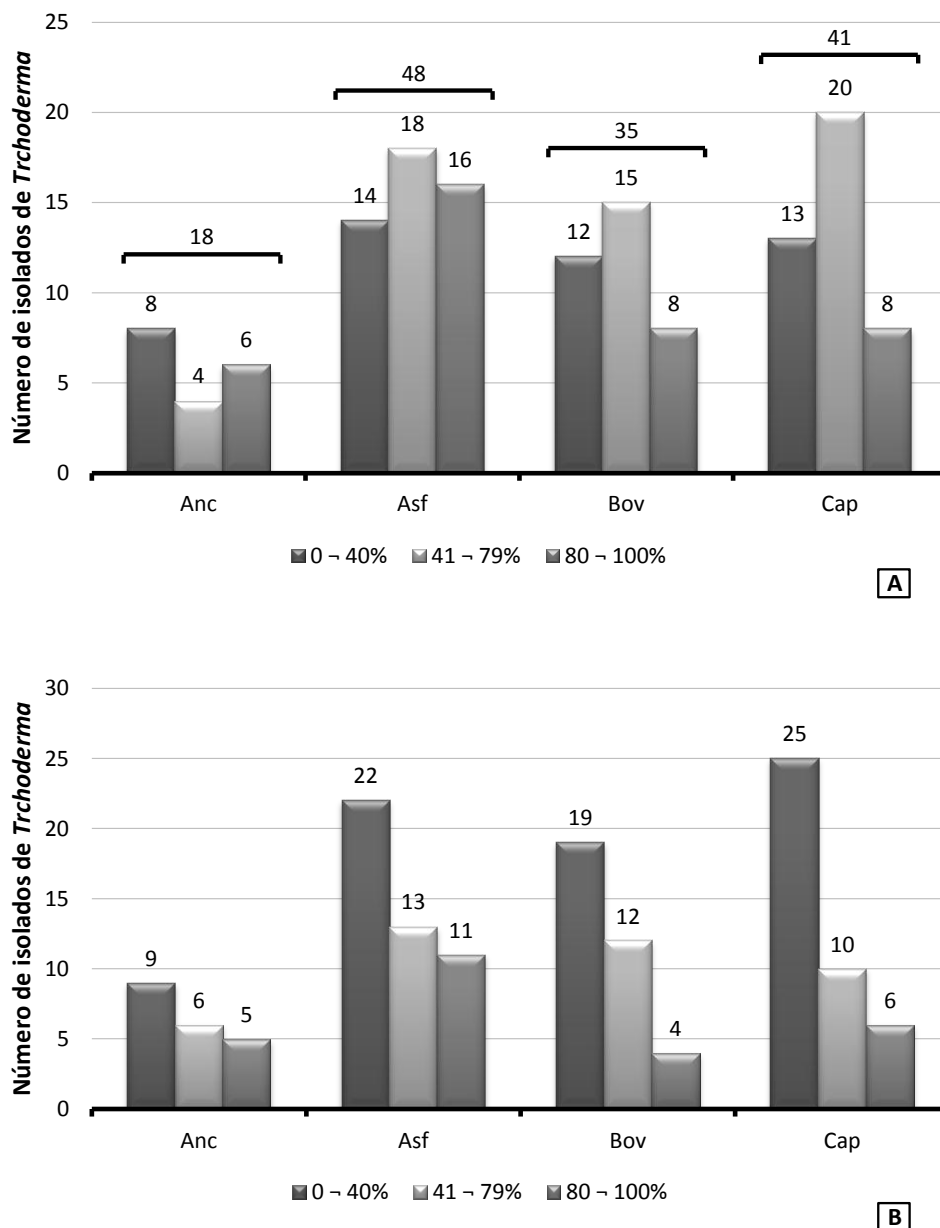


Figura 1. Número de *Trichoderma* spp. em diferentes intervalos de controle testados contra *Fgt* sob condições controladas, e frequência por hospedeiro. **(A)** Testes *in vitro*; **(B)** Bioensaios em discos de talo; **(Anc)** *Ananas comosus* var. *bracteatus*; **(Asf)** *Astronium fraxinifolium*; **(Bov)** *Bowdichia virgilioides*; e **(Cap)** *Caesalpinia pyramidalis*.

Tabela 2. Índice de doença em abacaxizeiro 'Pérola' após tratamento com agentes de biocontrole em casa de vegetação.

Isolado	Origem ^I	% Controle <i>in vitro</i> ^{II}	% Controle em discos de talo ^{III}	Ensaio em casa de vegetação	
				NM ^{IV}	ID ^V
CNI ^{VI}				0,30	0,07 a*
TC36	<i>Bowdichia virgilioides</i>	17,4	100,0 (100)	0,70	0,16 a
TC77	<i>Astronium fraxinifolium</i>	100,0	100,0 (100)	0,80	0,18 a
TC26	<i>Ananas comosus var. bracteatus</i>	100,0	100,0 (100)	0,90	0,20 a
TC37	<i>Ananas comosus var. bracteatus</i>	0,0	62,8	1,20	0,27 b
TC15	<i>Bowdichia virgilioides</i>	100,0	94,0	2,30	0,52 bc
TC07	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>	86,6	78,3	2,30	0,52 bc
TC59	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>	100,0	89,3	2,20	0,53 bc
TC42	<i>Bowdichia virgilioides</i>	87,5	100,0	2,40	0,55 bcd
TC30	<i>Astronium fraxinifolium</i>	100,0	100,0	2,50	0,57 bcd
TC06	<i>Astronium fraxinifolium</i>	83,5	54,6	2,50	0,57 bcd
TC101	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>	73,6	100,0	2,60	0,59 bcd
TC102	<i>Astronium fraxinifolium</i>	100,0	43,6	2,70	0,61 bcd
TC19	<i>Bowdichia virgilioides</i>	100,0	100,0	2,70	0,61 bcd
TC66	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>	58,3	0,0	2,70	0,61 bcd
TC54	<i>Astronium fraxinifolium</i>	100,0	100,0	2,80	0,64 bcd
TC03	<i>Astronium fraxinifolium</i>	66,1	55,0	2,80	0,64 bcd
TC09	<i>Ananas comosus var. bracteatus</i>	100,0	100,0	2,80	0,64 bcd
TC80	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>	75,6	62,7	2,80	0,64 bcd

Tabela 2. Continuação.

Isolado	Origem ^I	% Controle <i>in vitro</i> ^{II}	% Controle em discos de talo ^{III}	Ensaio em casa de vegetação	
				NM ^{IV}	ID ^V
TC87	<i>Astronium fraxinifolium</i>	47,1	16,2	2,90	0,66 bcd
TC40	<i>Astronium fraxinifolium</i>	67,3	50,8	2,90	0,66 bcd
TC50	<i>Bowdichia virgilioides</i>	100,0	75,8	2,90	0,66 bcd
TC29	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>	88,7	53,4	2,90	0,66 bcd
TC129	<i>Bowdichia virgilioides</i>	55,1	18,5	3,00	0,68 bcd
TC122	<i>Bowdichia virgilioides</i>	19,5	0,0	3,00	0,68 bcd
TC32	<i>Astronium fraxinifolium</i>	27,5	63,6	3,00	0,68 bcd
TC63	<i>Astronium fraxinifolium</i>	88,5	100,0	3,00	0,68 bcd
TC140	<i>Astronium fraxinifolium</i>	34,5	15,9	3,00	0,68 bcd
TC05	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>	95,3	0,0	3,00	0,68 bcd
TC79	<i>Astronium fraxinifolium</i>	0,0	0,0	3,10	0,70 bcd
TC88	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>	92,6	100,0	3,10	0,70 bcd
TC23	<i>Astronium fraxinifolium</i>	87,5	74,5	3,10	0,70 bcd
TC28	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>	83,4	76,7	3,10	0,70 bcd
TC31	<i>Astronium fraxinifolium</i>	28,4	22,8	3,10	0,70 bcd
TC52	<i>Ananas comosus var. bracteatus</i>	82,1	65,8	3,10	0,70 bcd
TC134	<i>Ananas comosus var. bracteatus</i>	34,2	24,8	3,10	0,70 bcd
TC71	<i>Astronium fraxinifolium</i>	58,3	82,6	3,10	0,70 cd
TC85	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>	16,1	0,0	3,10	0,70 cd

Tabela 2. Continuação.

Isolado	Origem ^I	% Controle <i>in vitro</i> ^{II}	% Controle em discos de talo ^{III}	Ensaio em casa de vegetação	
				NM ^{IV}	ID ^V
TC62	<i>Astronium fraxinifolium</i>	87,6	17,4	3,20	0,73 cd
TC76	<i>Bowdichia virgilioides</i>	13,7	62,0	3,20	0,73 cd
TC01	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>	18,5	0,0	3,10	0,73 cd
TC92	<i>Astronium fraxinifolium</i>	82,3	100,0	3,20	0,73 cd
TC57	<i>Astronium fraxinifolium</i>	76,6	0,0	3,20	0,73 d
TC22	<i>Astronium fraxinifolium</i>	38,4	12,5	3,20	0,73 d
CI ^{VII}	-	-	0,0	4,40	1,00 e

^I Espécie vegetal hospedeira de cada isolado.

^{II} Porcentagens de redução da colonização de *Fusarium guttiforme in vitro*.

^{III} Porcentagens de redução da colonização de *Fusarium guttiforme* em discos de talo de abacaxi 'Pérola' em condições controladas.

^{IV} Nota média de cada isolado atribuída de acordo com a escala de notas usada no estudo.

^V Proporções de valores do índice de doença normalizado de McKinney em relação ao controle inoculado.

^{VI} Controle não inoculado com o patógeno e sem aplicação de *Trichoderma* spp.

^{VII} Controle inoculado apenas com *Fusarium guttiforme*.

* Valores na coluna seguidos da mesma letra, não diferem entre si pelo teste de comparação múltipla não-paramétrica ($P \leq 0.05$).

() números entre parênteses correspondem aos valores obtidos nos testes de confirmação de resultados.

O método de inoculação de *F. guttiforme* em mudas de abacaxi 'Pérola' foi eficiente sob as condições estudadas, uma vez que sintomas externos foram observados em todos os tratamentos. Não houve relação absoluta entre os resultados obtidos *in vitro* com os verificados em casa de vegetação.

Os isolados TC19, TC54 e TC50 que nos testes *in vitro* promoveram acima de 90% de redução de *F. guttiforme*, nos experimentos em casa de vegetação, não mostraram eficiência no controle da doença. O contrário foi observado no isolado TC37, o qual *in vitro*, não apresentou atividade contra o patógeno, entretanto, em casa de vegetação mostrou eficiência contra *F. guttiforme*. Em adição, o isolado TC36 que apresentou baixa eficiência *in vitro*, mostrou índice de doença menor que 20% em casa de vegetação (Tabela 2).

Os isolados TC36, TC77 e TC26, que apresentaram 100% de redução de *F. guttiforme* em discos de talo de abacaxizeiro, mostraram índice de doença menor que 20% em casa de vegetação. Em contraste, os isolados TC101, TC09 e TC88 apresentaram baixa eficiência em casa de vegetação, porém, haviam reduzido em 100% a colonização de *F. guttiforme* em discos de talo de abacaxi (Tabela 2).

4. DISCUSSÃO

Fungos associados a plantas adaptadas às condições semiáridas constituem um importante grupo de microrganismos com potencial de uso no controle de fitopatógenos de espécies comerciais cultivadas nessas condições (GAMALERO et al., 2003; CHEN et al., 2003). Teoricamente, microrganismos que co-evoluíram com seus hospedeiros nesses ambientes teriam maior adaptabilidade quando submetidos às mesmas condições edafoclimáticas. Por isso, espécies vegetais da Caatinga teriam elevado potencial em abrigar microrganismos, incluindo fungos endofíticos do gênero *Trichoderma* com essa característica. Com base nisso, neste estudo foram obtidos 142 isolados de *Trichoderma* spp. com a finalidade de verificar seu potencial no controle da fusariose do abacaxizeiro.

Em geral, a etapa de seleção de microrganismos para aplicação no controle de doenças de plantas constitui-se como uma fase crítica no início dos estudos de

biocontrole. Tal fato é explicado pela falta de correspondência entre a eficiência obtida *in vitro* com a verificada em casa de vegetação ou em campo (ZHANG et al., 2009). Por isso, ao contrário da maioria dos trabalhos, onde a seleção inicial é realizada *in vitro*, neste estudo foi adotada a metodologia de seleção de agentes de biocontrole em discos de talo de abacaxi 'Pérola', conforme descrito por TROCOLI (2010). Além disso, o grande número de fungos a serem testados foi outro aspecto determinante para a adoção desta metodologia inicial de seleção. Todavia, mesmo não apresentando relação absoluta com os resultados obtidos em casa de vegetação, a atividade antimicrobiana foi evidenciada.

A maioria dos fungos testados neste estudo não apresentou atividade significativa contra *Fusarium guttiforme* (*Fgt*). Considerando que do elevado número de fungos associados a espécies vegetais, a maioria não é efetiva no controle biológico de doenças de plantas, esse era um resultado esperado (CHEN et al., 1996). Esse comportamento já foi relatado em diversos estudos envolvendo a busca e seleção de agentes de biocontrole para doenças de plantas (ZHANG et al., 2008). Por exemplo, Loguercio et al. (2009) estudando 63 isolados de *Trichoderma stromaticum*, observaram que apenas 14 isolados mostraram eficiência moderada contra *Moniliophthora perniciosa*. Destes, apenas sete isolados reduziram significativamente a incidência da doença, mostrando índices menores que 20%.

No estudo *in vitro* foram identificados 16 fungos que reduziram totalmente o crescimento de *Fgt*. Esse resultado pode ser explicado pela produção de substâncias antimicrobianas, as quais inibem ou retardam diretamente a colonização do patógeno. Tal comportamento é bem documentado em estudos com diversas espécies de *Trichoderma* spp. especialmente aquelas usadas como agentes de biocontrole (COLLEEN & SINGH, 2009). Para o antagonismo direto podem colaborar compostos antimicrobianos como o antibiótico *Trichosetin*, produzido por *T. harzianum* (MARFORI et al., 2002).

O presente trabalho não buscou identificar os mecanismos de ação envolvidos, e nem classificar os isolados em nível de espécies. Todavia, estudos direcionados à identificação dos compostos envolvidos, bem como ao esclarecimento do seu papel na redução da colonização de *F. guttiforme* deverão ser conduzidos em trabalhos

futuros.

Os testes em discos de talo revelaram 23 isolados capazes de reduzirem 100% a colonização do patógeno. Destes, três isolados foram os mais eficientes quando testados em casa de vegetação, os quais apresentaram índice de doença menor que 0,20 (Tabela 2). Em comparação ao estudo *in vitro*, essa metodologia apresentou maior eficiência na seleção de isolados com potencial de controle da doença. Esse fenômeno pode ser explicado pelo fato de que tanto nas plantas quanto nas mudas, a infecção de *F. guttiforme* localiza-se no talo, progredindo para a base aclorofilada das folhas. Por isso, a metodologia adotada constituiu-se como uma eficiente estratégia de seleção de isolados de *Trichoderma* spp.

No experimento realizado com mudas de abacaxi 'Pérola' em casa de vegetação, houve alta intensidade da doença confirmando a eficiência dos procedimentos de inoculação adotados. O fato de o controle não inoculado, mesmo em menor intensidade ter expressado sintomas da doença, pode ser explicado pelo fato de as mudas, consideradas principal veículo de disseminação da fusariose (MATOS & SANCHES, 2009), serem provenientes de áreas com histórico da doença. De fato, em futuros estudos a origem das mudas deverá ser criteriosamente verificada, visando evitar que as mesmas atuem como inóculo natural de *Fgt*.

Ao comparar a eficiência de redução da colonização de *F. guttiforme* em discos de talo de abacaxi com os níveis de controle observados em casa de vegetação, conclui-se que não houve correspondência absoluta entre o comportamento dos isolados em ambas as condições. Todavia, este método de seleção mostrou eficiência superior quando comparado com o procedimento *in vitro*. A falta de correspondência em ambos os procedimentos é frequentemente observada em estudos dessa natureza (HULTBERG et al., 2000; RAN, et al., 2005).

Diversos fatores são atribuídos a esse fato, tais como variabilidade das propriedades físicas e químicas nos nichos ocupados pelos agentes de biocontrole, características do hospedeiro, bem como as condições ambientais e experimentais que podem afetar processos inerentes aos agentes. Dentro dos processos afetados, destacam-se o crescimento, colonização e expressão de mecanismos de ação dos agentes de biocontrole (RYAN et al., 2004).

Dessa forma, mecanismos expressos pelos isolados TC19, TC54 e TC50 nos testes em laboratório podem ter sido afetados ou insuficientes para promover o controle de *F. guttiforme* em casa de vegetação. Em contraste, outros mecanismos que não se expressaram ou não foram observados nos estudos *in vitro*, podem ter contribuído para que o isolado TC37 reduzisse a intensidade da fusariose em casa de vegetação. Em adição, mecanismos expressos pelos isolados TC101, TC09 e TC88 em discos de talo podem ter sido menos importantes no controle do patógeno em casa de vegetação. Além disso, o fato de a maioria dos casos de biocontrole de doenças de plantas serem resultado da atuação de mais de um mecanismo de ação, pode explicar a variação nos níveis de eficiência observados *in vitro*, em discos de talo e em casa de vegetação.

Considerando esses resultados pode-se concluir que, apesar de utilizar tecidos do hospedeiro como substrato, este não foi totalmente eficiente nos testes iniciais de seleção. Esse fato corrobora que o processo de seleção de microrganismos continua sendo um dos grandes gargalos na busca por agentes de biocontrole. Por isso, pesquisas destinadas a geração de estratégias alternativas com essa finalidade devem ser desenvolvidas. Por exemplo, o uso de ferramentas biotecnológicas, como *Real-time PCR* pode constituir uma promissora ferramenta na detecção e quantificação de agentes de biocontrole aplicáveis não só no controle da fusariose do abacaxizeiro, como também em outras doenças de importância econômica (SAVAZZINI et al., 2008). Mesmo assim, no presente estudo houveram isolados, a exemplo de TC77 e TC26, que foram eficientes inibindo o patógeno tanto em discos de talo quanto em casa de vegetação. Isto demonstra que apesar da falta de relação, a seleção em discos de talo foi eficiente para identificar agentes de biocontrole.

Dos três grupos identificados nas análises de agrupamento os isolados do grupo 1 proporcionaram os melhores níveis de redução da doença em casa de vegetação. Nesse grupo, os isolados TC36, TC77 e TC26 são procedentes de três espécies vegetais distintas, *Bowdichia virgilioides*, *Astronium fraxinifolium* e *Ananas comosus* var. *bracteatus*, respectivamente. Em teoria, hospedeiros resistentes, adaptados às condições naturais de cultivo e que ainda não foram domesticados teriam maior probabilidade de abrigar microrganismos com potencial

de biocontrole de doenças de plantas (NOWAK, 1998). Por isso, a eficiência desses isolados na redução da doença em casa de vegetação pode ser explicada pelo fato dos mesmos terem sido isolados de plantas adaptadas às condições de cultivos comerciais presentes no semiárido.

A maioria dos fungos que promoveram índice de doença menor que 30% em casa de vegetação, são provenientes da espécie *Ananas comosus* var. *bracteatus* (Tabela 2). Isto pode ser explicado pelo fato de a variedade comercial 'Pérola' usada nos estudos ser da mesma espécie, *Ananas comosus* var. *comosus*, o que propiciou a colonização eficiente dos tecidos do hospedeiro pelos agentes de biocontrole. Em adição, o reconhecimento bioquímico entre os agentes e plantas de abacaxi 'Pérola' pode ter proporcionado maior desempenho na interação, resultando em níveis eficientes de controle do patógeno. Considerando que as variedades comerciais pertencem a essa mesma espécie, estes isolados teriam grandes chances de se estabelecer e promover o biocontrole em outras variedades comerciais suscetíveis a exemplo de 'Smooth Cayenne'.

Em muitos casos, compostos antimicrobianos se apresentam como um dos fatores determinantes para o controle de doenças de plantas, especialmente aqueles produzidos por fungos do gênero *Trichoderma* (WALTERS, 2009; ROJAN et al., 2010). A resistência sistêmica induzida também tem sido largamente apontada em diversos estudos como um dos principais mecanismos de ação envolvidos no controle de doenças de plantas (KLOEPPER et al., 2004; BAKKER et al., 2007; FONTENELLE et al., 2011).

Estudos preliminares indicam a presença de *Trichoderma harzianum* e *T. atroviride* associados à *Bowdichia virgilioides*, *Astronium fraxinifolium*, *Ananas comosus* var. *bracteatus* e *Caesalpinia pyramidalis* (TROCOLI et al., dados não publicados). Sendo assim, pode-se especular que *T. harzianum* seja uma das espécies que promoveram controle neste estudo. Por isso, há possibilidade do envolvimento de um ou mais mecanismos de ação citados acima, visto que são inerentes a maioria das espécies de *Trichoderma*. Diversos trabalhos reforçam essa teoria, uma vez que fungos do referido gênero têm sido apontados como eficientes agentes de controle biológico de doenças de plantas em várias culturas, atuando a partir de diferentes mecanismos de ação (ROJAN et al., 2010).

Independente das espécies e dos mecanismos de ação envolvidos, o presente estudo evidenciou o potencial do uso de fungos como agentes de biocontrole da fusariose do abacaxizeiro. Os resultados apontam para uma promissora alternativa com possibilidade de redução do uso de fungicidas nos plantios comerciais. Portanto, os isolados selecionados poderão ser foco de estudos futuros visando sua aplicação dentro do manejo integrado da doença em condições de campo.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho estudou-se o potencial de uso de *Trichoderma* spp. associados a espécies vegetais da Caatinga no controle da fusariose do abacaxizeiro. Foi selecionado um grupo de fungos endofíticos que mostraram níveis significativos de controle da fusariose em casa de vegetação. Nesse grupo foram encontrados isolados provenientes de *Bowdichia virgilioides*, *Astronium fraxinifolium* e *Ananas comosus* var. *bracteatus*.

O fato de os isolados mais eficientes terem sido isolados com maior frequência de *A. comosus* var. *bracteatus*, abre a possibilidade de estudos futuros usando outras variedades suscetíveis com ampla presença no mercado, a exemplo de 'MD2'. Em razão de as espécies comerciais serem do gênero *Ananas*, aumenta as chances de encontrar fungos oriundos de *A. comosus* var. *bracteatus* que se estabeleçam e reduzam a incidência da fusariose em outros genótipos de abacaxizeiro.

Considerando que pelo menos três isolados de *Trichoderma* mostraram ação contra *Fusarium guttiforme* promovendo índice de doença inferior a 0,20, os níveis de controle alcançados em casa de vegetação na variedade Pérola, podem ser considerados satisfatórios. Tal comportamento abre a oportunidade de aplicação conjunta destes isolados visando a ação de diferentes mecanismos de ação que a sua vez atuem em diferentes etapas do processo de infecção do patógeno.

Pesquisas futuras são indispensáveis para identificar os fungos selecionados em nível de espécie, determinar os mecanismos de ação e compostos antimicrobianos envolvidos na redução da colonização do patógeno e verificar a adaptabilidade dos agentes em condições de campo. Em adição, estudos de

formulação, formas e períodos de aplicação dos agentes de biocontrole, bem como sua compatibilidade com produtos utilizados na produção comercial de abacaxi serão necessários.

Neste estudo, o patógeno foi inoculado em concentrações significativamente mais altas quando comparado ao que acontece naturalmente em campo. Além disso, os agentes de biocontrole e o patógeno foram aplicados quase simultaneamente, o que desfavoreceu a colonização dos tecidos vegetais pelos agentes. Desta forma, em estudos futuros deve-se proceder à aplicação dos agentes antecipadamente, de maneira a permitir sua adaptação no sistema radicular das plantas e depois proceder à inoculação das mudas com o patógeno. Parâmetros como altura e matéria seca deverão ser estudados em trabalhos futuros visando verificar a promoção de crescimento das plantas de abacaxi em função da aplicação dos agentes de biocontrole. A produção de frutos em campo e principalmente a intensidade da doença nos mesmos também deverão ser cuidadosamente pesquisados. Antes da recomendação destes agentes para uso comercial, será necessário avaliar o impacto ambiental da introdução em larga escala desses microrganismos no ambiente.

Independentemente dos estudos que deverão ser realizados no futuro, o presente estudo mostrou o potencial de uso de *Trichoderma* spp. endofíticos de plantas da Caatinga como agentes de biocontrole da fusariose do abacaxizeiro. Este relato de controle biológico da doença por meio *Trichoderma* spp. em casa de vegetação, constitui uma promissora alternativa para a redução do uso de fungicidas. Espera-se que a aplicação desses agentes possa reduzir a incidência da doença nas principais regiões produtoras do Brasil.

6. REFERÊNCIAS

ADDINSOFT. **Programa XLSTAT versão 2012.5.01**, 2012.

AHMADZADEH, M.; SHARIFI-TEHRANI, A. Evaluation of fluorescent pseudomonads for plant growth promotion, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* on common bean, and biocontrol potential. **Biological Control**, v.48, p.101–107, 2009.

BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J.; VAN LOON, L. C. Induced systemic

resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. **Phytopathology**, v.97, p.239-243, 2007.

BAILEY, B. A.; BAE, H.; STREM, M. D.; CROZIER, J.; THOMAS, S. E.; SAMUELS, G. J. VINYARD, B. T.; HOLMES, K. A. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. **Biological Control**, v.46, p.24–35, 2008.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMON, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **Int. Microbiol. Madrid**.v.7, p. 249-260, 2004.

BETTIOL, W. Componentes do Controle Biológico de Doenças de Plantas. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p.1-5, 1991a.

BOYETCHKO, S.; HYNES, R. Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. **Soil Bio Biochem**, v.38, p.845–9, 2006.

CHEN, Y.; MEI, R.; LU, S.; LIU, L.; KLOEPPER, J. W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: UTKHEDE, R. S.; GUPTA, V. K. (Eds.). **Management of soil borne diseases**. New Delhi: Kalyani Publishers, p.165-84, 1996.

CHEN, W. Q.; MORGAN, D. P.; FELTS, D.; MICHAILIDES, T. J. Antagonism of *Paenibacillus lentimorbus* to *Botryosphaeria dothidea* and biological control of panicle and shoot blight of pistachio. **Plant Disease**, v.87, p.359–365, 2003.

COLLEEN, C.; SINGH, T. *In vitro* evaluation of combination of *Trichoderma harzianum* and chitosan for control of sapstain. **Biological Control**, v.50, p.262-266, 2009.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of plant pathogens**. St. Paul, Minnesota: APS Press, American Phytopathological Society, 1983. 539p.

CUNHA, G. A. P. da; REINHARDT, D. H. R. C. **Orientações básicas para o cultivo do abacaxizeiro**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 4p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Comunicado Técnico, 110), 2004.

FONTENELLE, A.D.B.; GUZZO, S.D.; LUCON, C.M.M.; HARAKAVA, R. Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. **Crop Protection**, v.30, p.1492-1500, 2011.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acessado em: 22 de julho de 2012.

- GAMALERO, E.; LINGUA, G.; BERTA, G.; LEMANCEAU, P. Methods for studying root colonization by introduced beneficial bacteria. **Agronomie** v.23, p.407–418, 2003.
- HULTBERG, M.; ALSANIUS, B.; SUNDIN, P. *In Vivo* and *in Vitro* Interactions between *Pseudomonas fluorescens* and *Pythium ultimum* in the Suppression of Damping-off in Tomato Seedlings. **Biological Control**, v.19, p.1–8, 2000.
- KLOEPPER, J. W.; RYU, C. M.; ZHANG, S.; Induced resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology**, v.94, p.1259–1266, 2004.
- LOGUERCIO, L. L.; CARVALHO, A. C. DE; NIELLA, G. R.; SOUZA, J. T. DE; POMELLA, A. W. V. Selection of *Trichoderma stromaticum* isolates for efficient biological control of witches' broom disease in cacao. **Biological Control**, v.51, p.130–139, 2009.
- MATOS, A. P. de; REINHARDT, D. H. Pineapple in Brazil: Characteristics, Research and Perspectives. **Acta Horticulturae**, v.822, p.25-36, 2009.
- MATOS, A. P. de; SANCHES, N. F.; TEIXEIRA, F. A.; ELIAS JÚNIOR, J. Integrated Management of Fusariosis in Pineapple Fields under Integrated Production System. **Acta Horticulturae**, v.822, p.199-204, 2009.
- MATOS, A. P. de; CABRAL, J. R. S. Evaluation of Pineapple Genotypes for Resistance to *Fusarium subglutinans*. **Acta Horticulturae**, v.702, p.73-77, 2006.
- NOWAK, J. Benefits of *in vitro* 'biotization' of plant tissue cultures with microbial inoculants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v.34, p.122-130, 1998.
- NORDLUND, D. A. Biological control, integrated pest management and conceptual models. **Biocontrol News and Information**, v.17, p.35N-44N, 1996.
- RYAN, A. D.; KINKEL, L. L.; SCHOTTEL, J. L. Effect of pathogen isolate, potato cultivar, and antagonist strain on potato scab severity and biological control. **Biocontrol Science and Technology**, v.14, p.301–311, 2004.
- HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v.87, p.4-10, 2003.
- ROJAN, P. J.; TYAGI, R. D.; PREVOST, D.; SATINDER, K. B.; POULEUR, S.; SURAMPALLI, R.Y. Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. **Crop Protection**, v.29, p. 1452-1459, 2010.
- SAVAZZINI, F.; LONGA, C. M. O.; PERTOT, I.; GESSLER, 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.

SHARMA, R. R.; DINESH, S.; RAJBIR, S. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biological Control** v.50, p.205–221, 2009.

SOUZA, J. T. DE; BAILEY, B. A.; POMELLA, A. W. V.; ERBE, E. F.; MURPHY, C. A.; BAE, H.; HEBBAR, P. K. Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches' broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance. **Biological Control**, v.46, p.36–45, 2008.

TROCOLI, R. O. **Potencial de uso de bactérias associadas ao sistema radicular de abacaxizeiro (*Ananas spp.*) no controle da fusariose.** 2010, 83p., Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia). Cruz das Almas-BA, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2010.

WALTERS, D. R. Are plants in the field already induced? Implications for practical disease control. **Crop Protection**, v.28, p.459-465, 2009.

WALTERS, D. R.; DANIELL, T. Microbial induction of resistance to pathogens. In: WALTERS, D., NEWTON, A., LYON, G. (Eds.). **Induced Resistance for Plant Disease Control: A Sustainable Approach to Crop Protection.** Blackwell Publishing, Oxford, p.65–88, 2007.

YU, G. Y.; SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L.; BERTAGNOLLI, B. L.; Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.34, p.955–963, 2002.

ZHANG, H.; YANG, X. M.; RAN, W.; XU, Y. C.; SHEN, Q. R. Screening of bacterial antagonistic against soil-borne cotton *Verticillium* wilt and their biological effects on the soil cotton system. **Acta Pedol. Sinica**, v.45, n.6, p.1095–1100, 2008.

ZHANG, S.; WHITE, T. L.; MARTINEZ, M. C.; MCINROY, J. A.; KLOEPPER, J. W.; KLASSEN, W. Evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria for control of *Phytophthora* blight on squash under greenhouse conditions. **Biological Control**, In prelo, doi:10.1016/j.biocontrol.2009.10.015, 2009.

CAPÍTULO 2

***Trichoderma* spp. vs *Fusarium guttiforme*: influência sobre a produção de frutos de abacaxizeiro ‘Pérola’**

¹ Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico: Biological Control.

***Trichoderma* spp. vs *Fusarium guttiforme*: influência sobre a produção de frutos de abacaxizeiro ‘Pérola’**

Autor: Rafael Oliva Trocoli

Orientador: Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza

RESUMO: Por provocar perdas de até 80% da produção de frutos de abacaxi, a fusariose do abacaxizeiro, doença causada por *Fusarium guttiforme*, constitui o principal fator limitante ao desenvolvimento da cultura no Brasil. Atualmente, o controle efetivo da doença fundamenta-se na aplicação de fungicidas. Apesar de sua eficiência, o uso frequente de produtos químicos implica no surgimento de uma série de problemas ambientais. Todavia, pesquisas alternativas ao uso de agroquímicos com foco no biocontrole da fusariose do abacaxizeiro são escassas ou nulas, sobretudo envolvendo níveis de produção de frutos de abacaxi. Dentre as alternativas, fungos do gênero *Trichoderma* têm sido intensivamente estudados com essa finalidade em diversas culturas de importância econômica. Dessa forma, visando verificar o potencial de biocontrole da fusariose do abacaxizeiro, 29 isolados endofíticos de *Trichoderma* pré-selecionados em casa de vegetação, foram estudados em condições de campo. O isolado TC77 mostrou maior eficiência de controle da doença expresso em peso médio de fruto igual a 953,30 g, seguido pelos isolados TC26 e TC36 com médias iguais a 951,05 g e 927,23 g, respectivamente. A aplicação conjunta de TC36 + TC77 e TC36 + Bion® também proporcionaram significativos níveis de controle da doença, quando comparados com o controle não tratado com *Trichoderma*, que apresentou uma média de 561 g. Esses isolados são promissores agentes de biocontrole da fusariose do abacaxizeiro. Por isso, estudos futuros mais aprofundados, visando sua introdução no programa de produção integrada de abacaxi no Brasil devem ser realizados.

Palavras-chaves: Controle Biológico, abacaxi, *Trichoderma* spp.

***Trichoderma* spp. vs *Fusarium guttiforme*: influence on fruit production by pineapple cv. 'Pérola'**

Author: Rafael Oliva Trocoli

Advisor: Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza

ABSTRACT: Pineapple fusariosis caused by *Fusarium guttiforme* is the main limiting factor to the development of this crop in Brazil. The disease can cause losses of up to 80% in fruit production. Currently, the most effective control method is based on the application of fungicides. Despite its efficiency, the frequent use of chemicals results in the appearance of a series of environmental problems. Research alternatives to the use of agrochemicals focused on biocontrol of fusarium wilt of pineapple are scarce. Thus, to identify potential biocontrol agents against pineapple fusariosis, 29 endophytic isolates of *Trichoderma* preselected in greenhouse assays were studied under field conditions. Isolate TC77 showed the greatest efficiency for disease control as expressed in average fruit weight, which was 953.30 g, followed by TC26 and TC36 with averages of 951.05 g and 927.23 g, respectively. The combined application of TC77 + TC36 and TC36 + Bion[®] also provided significant levels of disease control when compared to the non-inoculated control that showed an average fruit weight of 561 g. These isolates are promising biocontrol agents for fusarium wilt of pineapple. Therefore, future studies should focus on their application in programs for integrated pineapple production in Brazil.

Keywords: Biological control, pineapple, *Trichoderma* spp.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a doença conhecida por fusariose do abacaxizeiro, causada pelo fungo *Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell (sin. *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* Nelson, Tousson & Marasas comb. nov.) é considerada o principal fator limitante da cultura (MATOS & REINHARDT, 2009). As perdas em produção de frutos de abacaxi ocasionadas pela doença podem atingir até 80%, a depender da cultivar, da região produtora, bem como da época de plantio (MATOS & SANCHES, 2009).

O controle da fusariose fundamenta-se na integração de várias práticas culturais, tais como: utilização de mudas saudáveis, monitoramento e erradicação de plantas infectadas, indução floral em época que possibilite o desenvolvimento das inflorescências sob condições desfavoráveis à incidência da doença (princípio de escape) e aplicação de fungicidas visando proteger as inflorescências em desenvolvimento.

Todavia, o uso excessivo de produtos químicos tem promovido uma série de problemas de ordem ambiental (WALTERS, 2009). Diante disso, os consumidores têm exigido cada vez mais a produção de alimentos sem resíduos químicos. Dessa forma, torna-se imprescindível encontrar alternativas de controle eficientes que garantam a sustentabilidade da cultura e sejam menos agressivas ao meio ambiente.

O uso de agentes de biocontrole para o combate de fitopatógenos constitui uma promissora estratégia para reduzir os impactos ambientais causados pelo uso frequente de agroquímicos. Além disso, possibilita a produção de alimentos não agressivos à saúde humana (BOYETCHKO e HYNES, 2006). Dentre os agentes, destacam-se fungos do gênero *Trichoderma* pelo seu potencial de biocontrole contra diversos fitopatógenos associados a culturas de importância econômica tais como tomate, banana e mamão. A ação desses microrganismos tem sido relatada contra patógenos foliares e de solo, tanto em laboratório quanto em condições de campo (VERMA et al., 2007).

A eficiência desses microrganismos no controle de fitopatógenos tem sido comprovada em diferentes patossistemas. Srivastava et al. (2010) relatam a

eficiência de *Trichoderma harzianum* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, reduzindo a incidência da doença em até 74% e 67% em casa de vegetação e em campo, respectivamente. Os autores também relatam a possibilidade de uso combinado de *T. harzianum* com outras espécies de *Trichoderma*, e até mesmo com bactérias do gênero *Pseudomonas*.

O sucesso do uso de *Trichoderma* spp. deve-se ao fato destes atuarem por meio de diversos mecanismos de ação. De forma direta, promovem antibiose, parasitismo, predação, competição por nutrientes e sítios de alimentação. Indiretamente, podem induzir resistência em plantas por meio de estímulos bioquímicos. Na maioria dos casos de controle biológico de fitopatógenos, dois ou mais desses mecanismos podem ocorrer simultaneamente (HOWELL, 2003; WALTERS, 2009). Além disso, *Trichoderma* spp. apresentam capacidade para se associar eficientemente às raízes de plantas (BAILEY et al., 2008).

A maioria dos estudos em campo envolvendo biocontrole de doenças de plantas usa parâmetros avaliativos com base apenas na severidade de doença (ROJO et al., 2007; SRIVASTAVA et al., 2010). De fato, verificar o potencial de biocontrole de fitopatógenos, expresso em níveis de produção de frutos, constitui uma estratégia mais eficiente na identificação de possíveis agentes de biocontrole. Todavia, pesquisas nesse sentido com foco no controle de *F. guttiforme* em plantios de abacaxi são escassas.

Diante disso, o presente trabalho objetivou estudar o potencial de *Trichoderma* spp. endofíticos, no controle da fusariose do abacaxizeiro, visando: a) verificar em condições de campo, o efeito dos isolados selecionados em casa de vegetação, no controle da fusariose do abacaxizeiro; e b) estudar em campo, o potencial de uso combinado de espécies de *Trichoderma* no combate à *F. guttiforme*, bem como a aplicação conjunta dos fungos com o produto comercial Bion®.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Manutenção e Preservação dos Isolados

Todos os microrganismos utilizados nos ensaios em condições de campo foram cultivados e armazenados na coleção de culturas do Laboratório de Biologia Geral e Microbiologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano – IF Baiano, *Campus* Senhor do Bonfim-BA. O isolado de *Fusarium guttiforme* Fgt72CA-CNPMF, usado nos estudos em campo foi cedido pelo Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA, onde os testes de patogenicidade foram realizados. O fungo foi cultivado em meio BDA (batata – dextrose – ágar) e constantemente reativado em abacaxizeiro adulto, visando manter a virulência de *F. guttiforme*.

Com a finalidade de evitar a perda de patogenicidade, o patógeno foi periodicamente inoculado e re-isolado utilizando plantas da variedade ‘Pérola’ suscetível à fusariose. Os isolados de *Trichoderma* foram preservados em tubos tipo “ependorff” contendo meio BDA e armazenados em água destilada esterilizada ou óleo mineral.

2.2 Bioensaio em condições de campo

Os experimentos realizados em campo foram implantados na zona rural do município de Jaguarari, Bahia. Nestes, foram testados os isolados com melhor desempenho no controle de *Fusarium guttiforme* selecionados em casa de vegetação. Foram realizados dois experimentos no campo, os quais foram denominados por Experimento 1 e 2. Ambos foram conduzidos no período de abril de 2011 a novembro de 2012 com intervalo de 30 dias entre experimentos.

2.2.1 Seleção e cultivo de mudas de abacaxizeiro

Mudas, tipo filhote, da variedade ‘Pérola’ foram obtidas de plantios comerciais localizados na zona rural do município de Jaguarari, Bahia. As mudas que

atenderam aos critérios de seleção quanto à qualidade fitossanitária e altura (aproximadamente 30 cm) foram plantadas em sacos plásticos com capacidade para 3,5 kg de solo. O solo usado nos estudos foi composto por 2 partes de latossolo, 1 parte de terra preta e 1 parte de areia lavada. Visando o desenvolvimento fisiológico ideal para a implantação do estudo no campo, após o plantio, procedeu-se a adubação das mudas conforme descrito por Cunha e Reinhardt, (2004). Em seguida, todas as mudas foram acondicionadas em telado durante 60 dias, sendo a umidade do solo mantida por meio de irrigação periódica.

2.2.2 Aplicação de *Trichoderma* spp. endofíticos e inoculação de mudas de abacaxizeiro

Para a obtenção da suspensão conidial de *Trichoderma* spp., vinte e nove isolados foram crescidos em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. As culturas foram incubadas em BOD à 25 °C durante sete dias. Decorrido esse período, 2/3 do volume das placas foram cobertos com água destilada esterilizada, procedendo-se a homogeneização da suspensão com o auxílio de um pincel, obtendo-se a liberação dos conídios. A suspensão foi filtrada e a concentração ajustada para 10^8 conídios.mL⁻¹. A combinação dos isolados TC36 e TC77 foi preparada pela mistura de volumes iguais da suspensão conidial de cada isolado na concentração de 10^8 conídios.mL⁻¹, de modo a se ter concentrações finais iguais a 10^8 conídios.mL⁻¹ (LATHA et al., 2011). O produto Bion foi aplicado na concentração de 200 mg.L⁻¹ em conjunto com o isolado TC36 de *Trichoderma* a 10^8 conídios.mL⁻¹.

Os isolados foram aplicados via imersão das mudas em suspensão do inóculo durante 20 minutos. Com a finalidade de evitar a lavagem da suspensão de inóculo no momento da inoculação, as mudas permaneceram sobre o solo durante 10 minutos. Decorrido esse período foi verificado visualmente que o sistema radicular das mudas apresentava-se seco. A seguir, as mudas foram inoculadas com uma suspensão de *F. guttiforme* a 10^5 conídios.mL⁻¹ por cinco

minutos. Para garantir a eficiência da inoculação, foram feitos ferimentos equidistantes na base das mudas com 2 cm de profundidade e 1 mm de diâmetro conforme descrito por Matos e Cabral (2006).

Imediatamente após a inoculação, as mudas foram replantadas e mantidas sob condições de campo durante todo o período de condução dos experimentos. Após o plantio, o solo próximo ao talo das mudas (raio de 10 cm), foi infestado com a suspensão conidial de *Trichoderma* spp. seguindo a ordem de aplicação dos tratamentos. Durante os três primeiros dias após o plantio, não foram realizadas as irrigações periódicas. A área foi arada e gradeada conforme Cunha & Reinhardt (2004). Em ambos os experimentos foi dispensado o manejo de adubações tanto no plantio quanto na condução dos experimentos. Foi utilizado espaçamento de 0,90 m entre linhas e 0,35 m entre plantas (CUNHA & REINHARDT, 2004). A umidade do solo foi mantida por meio de irrigação periódica, bem como as plantas companheiras que por ventura se desenvolveram entre as linhas de cultivo foram retiradas manualmente.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dez plantas por tratamento, sendo cada planta considerada uma repetição. A testemunha foi representada por plantas inoculadas somente com *F. guttiforme* (controle inoculado). Visando verificar a qualidade fitossanitária das mudas usadas no estudo, foi utilizado um controle composto por mudas tratadas com água destilada esterilizada, sem aplicação de *Trichoderma* spp. e sem inoculação de *F. guttiforme* (Controle não inoculado).

Visando uniformizar a produção de frutos, 60 dias após o plantio procedeu-se a indução floral das plantas de abacaxi 'Pérola'. Para tanto, foi usado o produto comercial etefon a 24%. Para cada 10 litros de água adicionaram-se 10 mL de etefon, acrescentando-se 200 g de ureia e 3 g de cal. Após o preparo, a solução foi aplicada via pulverização do centro da roseta foliar das plantas. Cada planta recebeu a aplicação de 50 mL da solução. As pulverizações foram realizadas durante o período da tarde, quando a temperatura encontra-se mais baixa.

Decorridos 160 dias após o plantio, procedeu-se a remoção das plantas e avaliação da severidade da fusariose. A severidade da doença foi determinada com base em uma escala de notas variando de zero a cinco, conforme a seguir: (0)

planta sem sintomas; (1) início de podridão na base da planta; (2) podridão leve; (3) podridão média; (4) podridão severa e (5) base da muda totalmente apodrecida, ocorrendo morte da planta. Para facilitar a avaliação, cortes longitudinais foram realizados na base das mudas que permitiram a visualização e quantificação dos sintomas internos (MATOS e CABRAL, 2006).

Os frutos foram coletados, identificados e levados ao laboratório de Biologia Geral e Microbiologia do IF Baiano, onde foram pesados em balança digital com precisão de 0,001g.

2.3 Análises estatísticas

Para a variável peso de fruto, os dados foram submetidos a análise de variância e as médias dos tratamentos ao teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. A análise de variância e o teste de Scott-Knott foram realizados no programa SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 2010). A partir dos dados de severidade obtidos em campo foi calculado o índice de doença de McKinney utilizando a fórmula $ID = [(grau\ da\ escala \times\ frequência) / (N^\circ\ de\ plantas \times\ grau\ máximo)] \times 100$. Em seguida, os valores de ID foram convertidos em proporções com base nos valores do controle inoculado com *F. guttiforme* e sem aplicação de *Trichoderma* spp. Os dados originais de severidade, avaliados com escala de notas de 6 classes, foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk. O resultado revelou que os dados não seguem uma distribuição normal. Dessa forma, os dados foram submetidos à análise não-paramétrica (Kruskal Wallis, 1%), e as médias das observações analisadas por um teste de comparação múltipla não-paramétrica (Conover-Iman 5%). Com base na comparação múltipla não-paramétrica, os tratamentos foram “ranqueados” em três grupos distintos. As análises de Kruskal-Wallis e a comparação múltipla não-paramétrica foram realizadas no programa XLSTAT versão 2012.5.01.

3. RESULTADOS

O método de inoculação de *F. guttiforme* foi eficiente nos experimentos realizados, visto que sintomas internos e externos foram observados em todos os tratamentos, incluindo o controle não inoculado. Os resultados apresentaram relação moderada com aqueles obtidos em casa de vegetação (capítulo 1). Entretanto, não houve relação absoluta entre os resultados obtidos em laboratório (capítulo 1) com os de campo. Apesar da variação nos índices de doença e peso de fruto nos dois experimentos, houve repetibilidade do padrão dos resultados.

A partir da análise de comparação múltipla não-paramétrica ($P < 0.05$), houve diferença significativa entre o controle não inoculado e o controle inoculado nos dois experimentos. Dos trinta e um tratamentos testados em campo, um grupo de três isolados endofíticos reduziu significativamente o índice de doença (ID). Tais tratamentos não diferiram significativamente do controle não inoculado pelo teste de Conover-Iman a 5% (Tabela 1). Dentre eles, o isolado TC77 apresentou maior eficiência com ID igual a 0,19, indicando significativo nível de controle em comparação com o controle inoculado apenas com *F. guttiforme* (Figura 1). Em seguida, os isolados TC36 e TC26 com ID igual a 0,23 e 0,28, respectivamente, também apresentaram redução da colonização de *F. guttiforme* nos tecidos internos de plantas de abacaxi 'Pérola' (Tabela 1). Em adição, outros 27 tratamentos testados não diferiram estatisticamente em si, porém, proporcionaram moderados índices de doença (Tabela 1), diferindo do controle inoculado.

Os isolados TC116 e TC 141 que não apresentaram eficiência em casa de vegetação (Tabela 2, capítulo 1), também não foram satisfatórios quando submetidos aos ensaios em campo. O primeiro apresentou ID de 0,62, enquanto o isolado TC141 não diferiu do controle inoculado com ID igual a 0,94 (Figura 1). Os isolados TC77 e TC36 que testados individualmente demonstraram resultados expressivos, quando testados em conjunto mostraram eficiência reduzida (ID 0,45), passando a integrar o segundo grupo de isolados que proporcionaram moderados índices de doença. O mesmo foi observado em relação à aplicação combinada de

Bion[®] com o isolado TC36. Isoladamente TC36 integrou o grupo 1, entretanto, combinado com o produto comercial Bion[®], proporcionou índice de doença igual a 0,36 (Tabela 1).

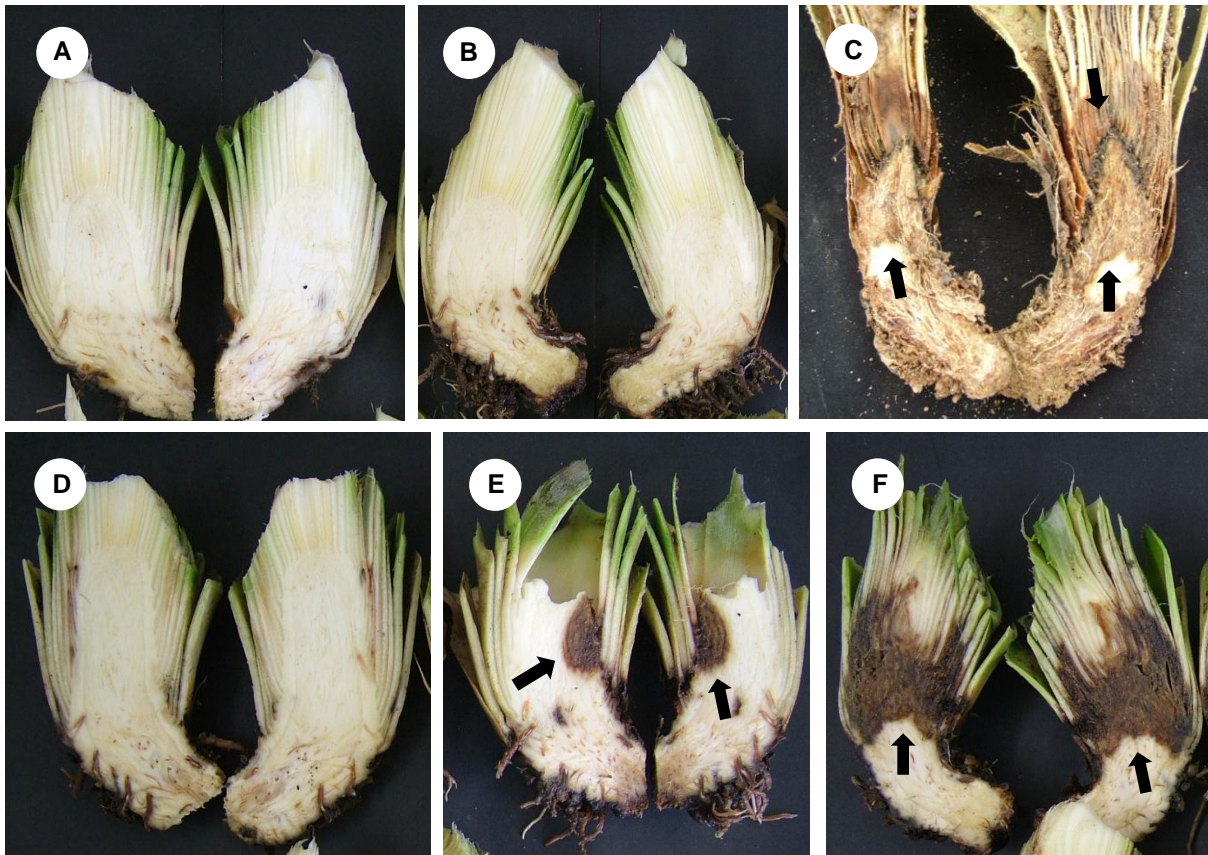


Figura 1. Reação de plantas de abacaxi 'Pérola' à inoculação com *Fusarium guttiforme* em campo, após tratamento com *Trichoderma* spp. **(A)** Controle não inoculado - CNI; **(B)** tratamento com o isolado TC77; **(C)** Controle inoculado com *F. guttiforme* - CI; **(D)** tratamento com o isolado TC36; **(E)** combinação TC36 + Bion[®]; e **(F)** tratamento com o isolado TC141. Setas negras indicam tecido vegetal infectado pelo patógeno.

Tabela 1. Índice de doença e peso de fruto de abacaxizeiro 'Pérola' após aplicação de *Trichoderma* spp. em campo.

Isolado	Experimento 1			Experimento 2		
	NM ^I	ID ^{II}	PF ^{III}	NM	ID	PF
CNI ^{IV}	0,4	0,09 a*	978,38 a**	0,30	0,07 a	870,16 a
TC36	1,1	0,23 a	927,23 a	1,40	0,32 a	779,67 a
TC77	0,9	0,19 a	953,29 a	0,70	0,16 a	834,01 a
TC26	1,3	0,28 a	951,05 a	1,40	0,32 a	764,42 b
TC39	2,4	0,51 b	723,96 b	2,50	0,57 bc	657,10 b
TC59	2,2	0,47 b	763,72 b	2,10	0,48 b	663,18 b
TC07	2,3	0,49 b	789,84 b	2,50	0,57 bc	600,93 b
TC15	2,4	0,51 bc	823,65 b	2,40	0,55 bc	579,32 b
TC36 + Bion	1,7	0,36 b	896,96 a	1,00	0,23 a	828,21 a
TC36 + TC77	2,1	0,45 b	782,96 b	2,80	0,64 bcde	706,80 b
TC42	2,6	0,55 bcd	786,35 b	2,80	0,64 bcde	624,48 b
TC06	2,5	0,53 bcd	913,26 a	1,90	0,43 b	817,63 a
TC30	2,5	0,53 bcd	799,47 b	2,20	0,50 b	609,52 b
TC101	2,7	0,57 bcde	783,69 b	2,50	0,57 bc	635,99 b
TC19	2,4	0,51 bcde	799,61 b	2,60	0,59 bcde	581,13 b
TC66	3,0	0,63 bcde	804,88 b	3,10	0,70 bcde	619,18 b
TC102	2,9	0,62 bcde	782,74 b	2,80	0,64 bcde	578,45 b
TC03	3,1	0,66 bcde	837,79 a	1,00	0,23 a	846,84 a
TC09	2,8	0,60 bcde	767,46 b	2,70	0,61 bcde	593,71 b

Tabela 1. Continuação.

Isolado	Experimento 1			Experimento 2		
	NM ^I	ID ^{II}	PF ^{III}	NM	ID	PF
TC54	3,3	0,70 bcde	802,13 b	3,10	0,70 bcde	574,49 b
TC80	3,2	0,68 bcde	816,85 b	3,20	0,73 bcde	576,77 b
TC29	3,3	0,70 bcde	894,58 a	3,00	0,68 bcde	NA
TC40	3,4	0,72 bcde	812,10 b	3,10	0,70 bcde	605,23 b
TC50	3,1	0,66 bcde	863,04 a	2,90	0,66 bcde	NA
TC87	2,9	0,62 bcde	870,13 a	2,50	0,57 bc	NA
TC05	3,5	0,74 bcde	894,62 a	1,10	0,25 a	825,11 a
TC32	3,6	0,77 bcde	896,72 a	3,40	0,77 bcde	714,52 b
TC63	3,6	0,77 bcde	874,56 a	3,60	0,82 bcde	678,40 b
TC122	3,7	0,79 bcde	870,50 a	3,50	0,80 bcde	NA
TC129	3,7	0,79 bcde	872,18 a	3,30	0,75 bcde	596,2 b
TC116	2,9	0,62 bcde	729,85 b	2,70	0,61 bcde	573,6 b
TC141	4,4	0,94 f	720,81 b	3,90	0,89 f	NA
CI ^V	4,7	1,00 f	560,86 c	4,40	1,00 f	532,76 c

^I Nota média de cada isolado atribuída de acordo com a escala de notas usada no estudo.

^{II} Proporções de valores do índice de doença de McKinney em relação ao controle inoculado.

^{III} Peso médio de frutos de abacaxi 'Pérola' em gramas.

^{IV} Controle não inoculado com o patógeno e sem aplicação de *Trichoderma* spp.

^V Controle inoculado apenas com *Fusarium guttiforme*.

* Valores na coluna seguidos da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de comparação múltipla não-paramétrica ($P \leq 0.05$).

** Valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

NA: não avaliado.

Em relação a variável peso de fruto (PF) e com base no teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade houve diferença significativa entre o controle não inoculado e o controle inoculado (Tabela 1; Figura 2). Foram gerados dois grupos que diferiram estatisticamente entre si, os quais diferiram do controle inoculado. Dos trinta e um tratamentos testados, 14 isolados apresentaram médias satisfatórias de peso de frutos. O isolado TC77 proporcionou maior eficiência expressa em PF com média igual a 953,29 gramas, seguido pelos tratamentos TC26, TC36, TC06, TC36 + Bion e TC32 com 951,05 gramas - 927,23 g - 913,26 g - 896,96 g e 896,72 g, respectivamente. Tal comportamento indica significativo nível de controle em comparação com o controle inoculado apenas com *F. guttiforme*. Outros 17 tratamentos proporcionaram médias moderadas de peso de fruto, como por exemplo, o isolado TC66 com média igual a 804,88 g (Tabela 1).

Em geral, não houve relação absoluta entre as variáveis, índice de doença e peso de fruto. Os isolados TC32, TC29, TC03, e TC87 que não foram eficientes em relação ao índice de doença, proporcionaram satisfatórias médias de peso de fruto, sendo enquadrados no grupo 1. Porém, comportamento contrário não foi observado (Tabela 1). Entretanto, considerando os isolados TC77, TC36 e TC26 houve relação moderada entre os valores de índice de doença e peso de fruto. Os três isolados que proporcionaram os menores índices de doença também mostraram os maiores valores de peso de fruto. O isolado TC77 que proporcionou o menor índice de doença continuou sendo o tratamento mais eficiente em relação ao peso de fruto. Comportamento similar foi observado em relação aos isolados TC26 e TC36. Em adição, os isolados TC39, TC59 e TC07 que mostraram moderados índices de doença, mantiveram mesma posição no “ranking” em relação às médias de peso de frutos (Tabela 1).

Os isolados TC77 e TC36 que individualmente apresentaram satisfatórias médias de peso de frutos em campo, quando aplicados em conjunto mostraram inferiores níveis de controle da doença expressos pela mesma variável. Comportamento similar foi observado na combinação TC36 + Bion que foi inferior quando comparado à aplicação individual de TC36. Todavia, essa última combinação não diferiu significativamente dos melhores tratamentos obtidos no estudo. Em adição, ambas as combinações apresentaram significativo nível de controle em relação ao controle inoculado apenas com *F. guttiforme* (Figura 2).

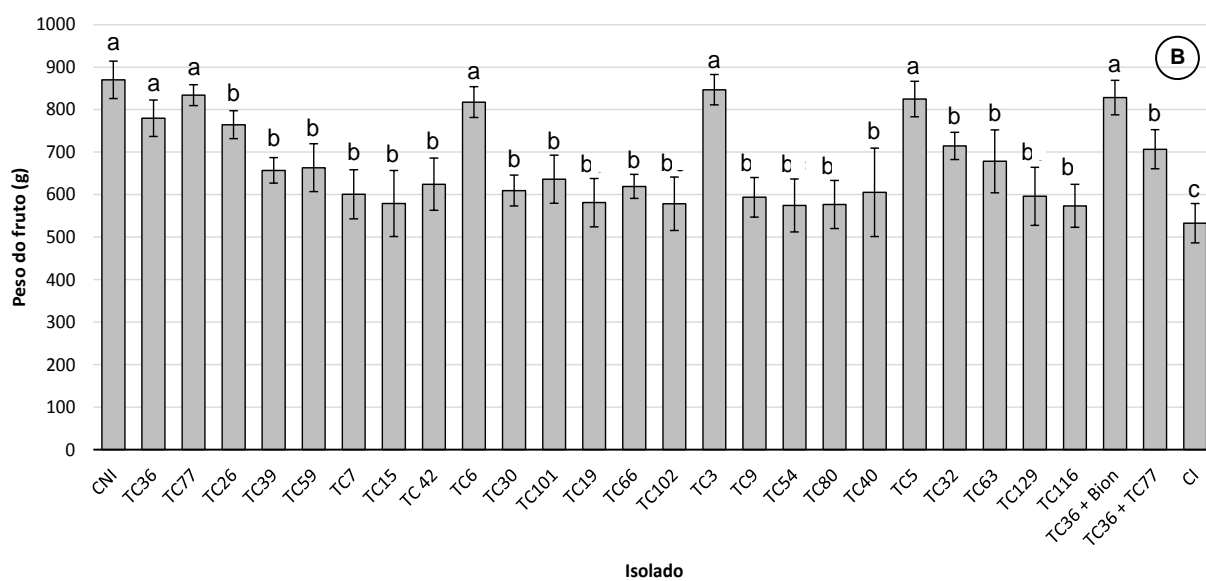
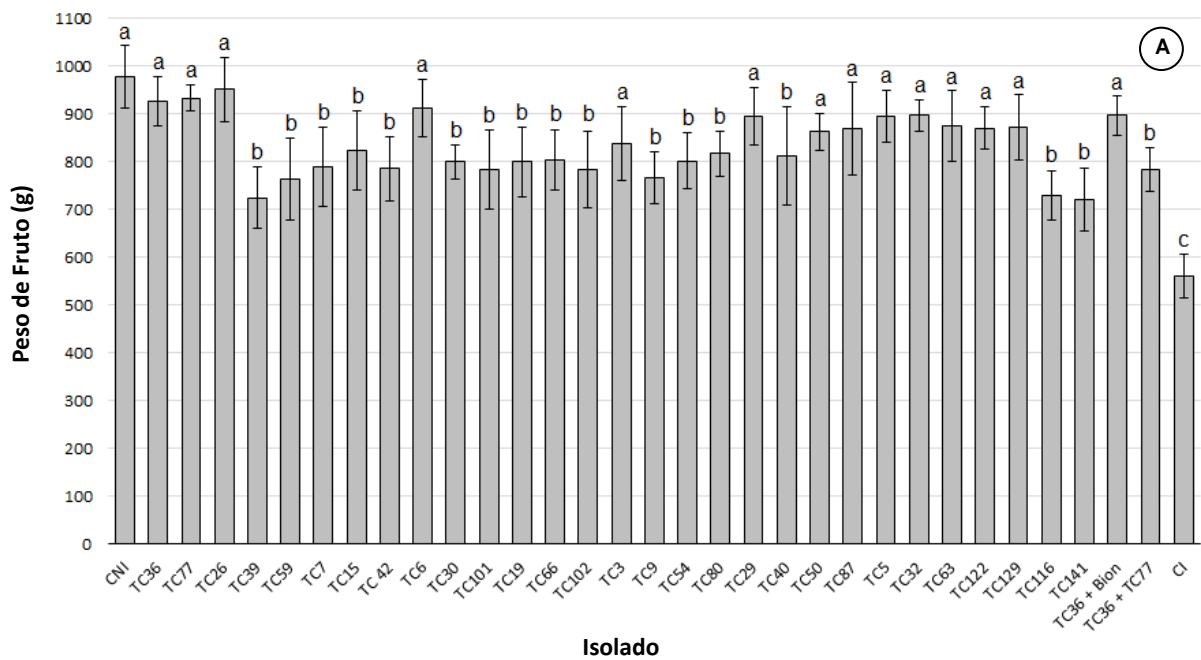


Figura 2. Peso de frutos de abacaxi 'Pérola' após inoculação com *Fusarium guttiforme* em resposta ao tratamento com *Trichoderma* spp. **(A)** experimento 1; **(B)** experimento 2; **(CNI)** Controle não inoculado; **(CI)** Controle inoculado com *F. guttiforme*. Em cada tratamento, colunas com mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os valores representam médias de dez repetições (n=10) e as barras verticais representam o desvio padrão. Coeficiente de variação igual a 17,66.

4. DISCUSSÃO

Fungos endofíticos do gênero *Trichoderma* são destaque em estudos de controle biológico de doenças de plantas. Dentre as características relacionadas ao potencial de biocontrole, os diferentes mecanismos de ação e a adaptabilidade em campo atuam de modo determinante (VAN LOON et al. 1998; HOWELL, 2003; VALLAD e GOODMAN 2004). Nesse contexto, o uso de isolados adaptados às condições naturais de plantio constitui uma importante estratégia para o controle de doenças de plantas em condições de campo.

Tal metodologia ainda pode permitir a verificação do comportamento da produção de frutos em função da aplicação de isolados de *Trichoderma* spp., possibilidade excluída em estudos iniciais de biocontrole *in vitro* e/ou em casa de vegetação. Todavia, pesquisas nesse sentido envolvendo o biocontrole de *Fusarium guttiforme* na cultura do abacaxi são escassas. Com base nisso, neste estudo 29 isolados de *Trichoderma* spp. provenientes de espécies vegetais da Caatinga, selecionados em casa de vegetação, foram testados em condições de campo com a finalidade de verificar seu potencial no controle de *F. guttiforme*.

Uma etapa crítica em estudos de controle biológico de doenças de plantas são os ensaios conduzidos em condições de campo. Ao contrário da maioria dos trabalhos, onde os testes em campo tomam como base apenas a severidade da doença (ROJO et al., 2007; WALTERS, 2009; SRIVASTAVA et al., 2010), neste trabalho optou-se por cruzar esses dados com a produção de frutos de abacaxi. Esse critério foi estabelecido por considerar que a variável peso de fruto (PF), pode apontar com maior acurácia o real potencial de biocontrole dos isolados em estudo.

Houve alta intensidade de fusariose nos experimentos realizados em condições de campo, o que indica a eficiência dos procedimentos de inoculação adotados. Mesmo em menor intensidade, o controle não inoculado também expressou sintomas internos e externos da doença. O fato das mudas serem consideradas o principal veículo de disseminação de *F. guttiforme* (MATOS & SANCHES, 2009), pode explicar tal comportamento. Diante disso, a seleção das mudas, bem como sua procedência é de fundamental importância nessa modalidade de estudo, para que as mesmas não atuem como fonte de inóculo. Por outro lado, em estudos de biocontrole em condições comerciais de

cultivo, essas mudas, são consideradas ideais por simularem fielmente o que acontece em plantios comerciais.

Segundo a análise de comparação múltipla não-paramétrica ($P \leq 0.05$), houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 1). Do total de 29 endofíticos testados, apenas três mostraram satisfatórios índices de doença (ID). Dentre eles, destaca-se o isolado TC77 com ID igual a 0,19, seguido pelos isolados TC36 e TC26 com ID igual a 0,23 e 0,28, respectivamente. O fato de a minoria dos isolados reduzirem a severidade da doença era um comportamento esperado, visto que é relatado em diversos trabalhos (SHARMA, et al., 2009). Por exemplo, em estudo similar, Fontenelle et al., (2011), estudando 28 isolados de *Trichoderma* spp. observaram que apenas o isolado "IB 30/07" mostrou eficiência contra *Alternaria solani* quando testados em campo.

O presente estudo não buscou identificar os mecanismos de ação desempenhados pelos agentes de biocontrole. Entretanto, diante dos resultados obtidos, bem como considerando outros trabalhos similares, pode-se apontar a atuação determinante destes, na reação das plantas de abacaxi à inoculação de *F. guttiforme*. Tchameni et al., (2011) afirmam a capacidade de *T. asperellum*, por meio de estímulos bioquímicos, induzir genes envolvidos no sistema de defesa de plantas de cacau, condicionando-as a responderem mais rapidamente ao ataque de *Phytophthora megakarya*. Entretanto, não descartam a possibilidade de ação conjunta de um ou mais mecanismos de ação. Em trabalho similar, Wijesinghe et al., (2011), apesar de não buscarem a identificação dos mecanismos de ação, também afirmam a possibilidade do envolvimento de mais de um mecanismo no controle de *Thielaviopsis paradoxa* em abacaxizeiro. Os autores ainda estimam a possibilidade da indução de resistência das plantas de abacaxi em função do tratamento com *T. asperellum*, bem como a produção de substâncias antagônicas ao patógeno.

Considerando a origem dos agentes de controle biológico testados neste trabalho e estudos preliminares que indicam alta concentração de *T. asperellum* e *T. virens* associados às espécies vegetais da Caatinga (TROCOLI et al., dados não publicados), há probabilidade de que essas espécies estejam presentes nos isolados que promoveram controle neste estudo. Por isso, não se descarta o envolvimento de um ou mais dos mecanismos de ação descritos anteriormente.

Além dessas espécies, os mesmos estudos preliminares ainda indicam o envolvimento de outras espécies de *Trichoderma* testadas em campo tais como, *Trichoderma atroviride*, *T. longibrachiatum*, *T. koningiopsis* e *T. harzianum*. Este fato reforça ainda mais a teoria defendida acima pelo que a eficiência dessas espécies, em diversos trabalhos, também é associada aos mecanismos já citados (ROJO et al., 2007; ROSA e HERRERA, 2009).

A variável peso de fruto (PF) apresentou diferença significativa ($P > 0,01$) em função dos tratamentos (Figura 2). A partir do teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade os tratamentos foram divididos em dois grupos, os quais diferiram estatisticamente do controle inoculado. Ao comparar o desempenho dos isolados testados em função da promoção do ID e PF de abacaxi, observa-se que não houve relação absoluta entre os valores observados em ambas as variáveis.

Todavia, os isolados que apresentaram menores valores de ID, também propiciaram os maiores valores de PF (Tabela 1). Em adição, outros isolados, a exemplo de TC06, TC32, TC29, TC03, e TC87, além do tratamento TC36 + Bion que promoveram moderados ID, quando observada a variável PF não diferiram do controle não inoculado (Tabela 1). Esse comportamento indica que mesmo não refletindo em ID reduzido, a eficiência de aplicação de determinados isolados no controle de *F. guttiforme*, pode interferir positivamente no peso de fruto final. Dessa forma, pode-se afirmar que a variável PF é mais apropriada para identificar microrganismos com potencial de uso no controle de *F. guttiforme* em condições de campo. Adicionalmente, em condições de infecção natural, *F. guttiforme* infecta plantas de abacaxizeiro através dos frutos em desenvolvimento (MATOS & SANCHES, 2009), o que reforça ainda mais a tese da relevância de verificação do potencial de uso de agentes de biocontrole refletido em PF de abacaxi.

Diversos autores têm sugerido a combinação de agentes de biocontrole para a redução de doenças associadas a culturas de importância econômica (JETIYANON & KLOEPPER, 2002; HARMAN et al., 2004; HARISH et al., 2009). Nessa estratégia, tanto isolados do gênero *Trichoderma* (SANTOS et al., 2012), quanto isolados de espécies diferentes, incluindo espécies de bactérias (LATHA et al., 2011) podem ser combinados, desde que apresentem compatibilidade entre si (JANISIEWICZ, 1996). Além disso, outros autores ainda

afirmam a eficiência de *Trichoderma* aplicado em conjunto com produtos comerciais já usados no manejo das culturas (CHITTENDEN e SINGH, 2009; MCLEAN et al., 2012).

Em campo, a aplicação combinada dos isolados TC36 e TC77 mostrou eficiência moderada de controle da doença refletida em PF. Vale destacar que, estes isolados foram mais eficientes contra *F. guttiforme* quando aplicados individualmente (Figura 2). A eficiência reduzida da aplicação combinada pode ser explicada pela incompatibilidade entre os isolados, onde a produção de compostos secundários que inibem processos como, velocidade de crescimento e capacidade de colonização radicular poderiam ter sido alterados (DUFFY et al., 1996; LATHA et al., 2009). Mesmo assim, não apenas estes, mas outros isolados em estudo apresentam potencial de uso combinado tanto com outras espécies de *Trichoderma* quanto com bactérias de eficiência comprovada sobre *F. guttiforme* (TROCOLI, 2010). Todavia, estudos mais refinados e com diversas combinações entre os isolados mais eficientes devem ser implementados futuramente.

Santos et al., (2012) relataram a compatibilidade entre *Trichoderma koningiopsis* **Th003** e *Trichoderma asperellum* **Th034**, sendo sua ação em conjunto responsável pela redução em 70% da incidência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em plantios de tomate. A mistura dos isolados também proporcionou máxima redução (100%) da incidência de *Rhizoctonia solani* em cultivos de mamão. A aplicação em conjunto de isolados que atuem por meio de diferentes mecanismos de ação pode maximizar o potencial de controle. Esse comportamento fundamenta-se na teoria de que microrganismos, os quais co-evoluíram com seu hospedeiro, têm elevado potencial em promover indução de resistência em plantas (VAN LOON et al., 1998; SILVA et al., 2008). Em adição, *Trichoderma* spp. associadas a espécies vegetais não só podem atuar diretamente sobre o patógeno, mas também induzindo resistência (SANTOS et al., 2012).

Em contraste, a combinação TC36 + Bion apesar de mostrar ID reduzido em comparação com a aplicação isolada de TC36, promoveu satisfatório desempenho em PF no campo (Tabela 1). A eficiência da aplicação combinada de agentes de biocontrole com produtos comerciais é relatada em diversos trabalhos (VESENTINI et al., 2007; SINGH et al., 2008). Chittenden e Singh,

(2009) relatam a eficiência da aplicação combinada de *Trichoderma harzianum* e Chitosan na redução da colonização de *Leptographium procerum in vitro*. Mesmo a média de PF sendo inferior a outros tratamentos como TC77 e TC26, a mistura (TC36 + Bion) promoveu média de PF que não diferiu significativamente destes e do controle não inoculado (Figura 2).

Independente das espécies e dos mecanismos de ação envolvidos, o presente estudo evidenciou o potencial do uso de *Trichoderma* spp. no controle da fusariose do abacaxizeiro. O potencial de biocontrole dos isolados expressos em médias de PF no campo faz com que os torne uma promissora alternativa para a redução do uso de fungicidas. Além disso, a combinação desses agentes com práticas já estabelecidas e recomendadas para o manejo integrado da doença constitui uma estratégia viável para maximizar os níveis de controle da fusariose do abacaxizeiro no Brasil.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho estudou-se o uso de fungos endofíticos do gênero *Trichoderma* para o controle da fusariose do abacaxizeiro. Pela primeira vez foi pesquisado o potencial de biocontrole destes, tomando como base os níveis de produção de frutos de abacaxi em condições de campo. Foram identificados três isolados de *Trichoderma* que promoveram satisfatórias médias de peso de fruto (PF). Além desses, outros tratamentos, incluindo a combinação de um isolado com um produto comercial, também mostraram eficiência no controle de *F. guttiforme* expressos em PF. Dentre os melhores tratamentos, foram encontrados isolados provenientes de *Bowdichia virgilioides*, *Astronium fraxinifolium* e *Ananas comosus* var. *bracteatus*.

Os níveis de controle alcançados em frutos de abacaxi 'Pérola' relatados neste estudo podem ser considerados satisfatórios. O fato de pelo menos três isolados de *Trichoderma* terem se destacado contra *F. guttiforme*, abre a oportunidade do uso futuro de inoculação dupla visando à ação conjunta de diferentes mecanismos de ação que por sua vez possam atuar em diferentes etapas do processo de infecção do patógeno. Todavia, outras variedades como 'Smooth Cayenne' e 'MD2' também deverão ser estudadas, visto que alguns isolados são provenientes de espécies vegetais do mesmo gênero (*Ananas*), o

que poderá facilitar a interação. Pesquisas futuras são indispensáveis para identificar os fungos selecionados em nível de espécie, bem como verificar as formas e períodos de aplicação dos agentes de acordo com o manejo da cultura. Além disso, estudos de estabilidade dos agentes em condições de campo e sua compatibilidade com produtos utilizados na produção comercial de abacaxi serão necessários. Por exemplo, é essencial verificar a possibilidade de uso combinado desses agentes com o produto “etefon”, responsável pela indução floral das plantas de abacaxizeiro. Tal estratégia certamente poderá reduzir a incidência da doença, pelo que em condições naturais a infecção de *F. guttiforme* ocorre exclusivamente após a indução floral. Além disso, deve-se dedicar atenção ao uso combinado dos isolados apontados neste estudo, com adubos nitrogenados aplicados periodicamente via pulverização foliar. Dessa forma, os custos relacionados às aplicações dos agentes de biocontrole não configurará um gasto adicional dentro do manejo da cultura.

Considerando que frutos de abacaxi são comercializados por unidade, e não por peso, os tratamentos em estudo certamente poderão propiciar ganhos econômicos aos produtores, bem como compor o sistema de produção integrada de frutos de abacaxi. Entretanto, antes da recomendação destes agentes para uso comercial, será necessário avaliar o impacto ambiental da introdução em larga escala desses microrganismos no ambiente.

Neste estudo os isolados de *Trichoderma* e o patógeno foram aplicados quase simultaneamente, sendo *F. guttiforme* inoculado em concentrações significativamente mais altas em comparação ao que acontece ao natural. Esse fato pode ter desfavorecido a colonização dos tecidos vegetais pelos agentes. Diante disso, pelo menos duas estratégias deverão ser exploradas em estudos futuros: a) aplicar o agente de biocontrole antecipadamente, de modo a facilitar a colonização do sistema radicular das plantas; e b) aplicar os isolados de *Trichoderma* spp. e plantar as mudas em condições de infecção natural, sem proceder a inoculação de *F. guttiforme*. Em geral, os agentes de biocontrole podem ser efetivos contra um amplo espectro de fitopatógenos. Com base nisso, estudos futuros devem ser conduzidos visando verificar a atividade dos isolados identificados neste estudo sobre outros patógenos do abacaxizeiro, tais como *Penicillium funiculosum* (*Fusarium moniliforme*), *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*, *Phytophthora cinnamomi* e *Erwinia ananas*.

O presente estudo mostrou o potencial de uso de *Trichoderma* spp. endofíticos de plantas da Caatinga no controle da fusariose do abacaxizeiro. Este é o primeiro relato de controle biológico da doença por meio *Trichoderma* expresso em níveis de produção de frutos de abacaxi em campo. O desempenho mostrado pelos isolados testados constitui uma promissora alternativa para a redução do uso de fungicidas. Espera-se que a combinação desses agentes com práticas recomendadas para o manejo integrado da doença, reduza a aplicação de fungicidas controlando eficientemente a fusariose do abacaxizeiro no Brasil.

6. REFERÊNCIAS

ADDINSOFT. **Programa XLSTAT versão 2012.5.01**, 2012.

BOYETCHKO, S.; HYNES, R. Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. **Soil Bio Biochem**, v.38, p.845–9, 2006.

CHITTENDEN, C.; SINGH, T. In vitro evaluation of combination of *Trichoderma harzianum* and chitosan for the control of sapstain fungi. **Biological control**, v.50, p.262-266, 2009.

CUNHA, G. A. P. da; REINHARDT, D. H. R. C. **Orientações básicas para o cultivo do abacaxizeiro**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 4p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Comunicado Técnico, 110), 2004.

DUFFY, B. K.; SIMON, A.; WELLER, D. M. Combination of *Trichoderma koningii* with fluorescent pseudomonads for control of take-all on wheat. **Phytopathology**, v.86, p.188–194,1996.

FERREIRA, D. F. **Sisvar versão 5.3** (Build 74). DEX/UFLA, 2010. FONTENELLE, A.D.B.; GUZZO, S.D.; LUCON, C.M.M.; HARAKAVA, R. Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. **Crop Protection**, v.30, p.1492-1500, 2011.

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

HARISH, S.; KAVINO, M.; KUMAR, N.; BALASUBRAMANIAN, P.; SAMIYAPPAN, R. Induction of defense-related proteins by mixtures of plant growth promoting endophytic bacteria against Banana bunchy top virus. **Biological Control**, v.51, p.16–25, 2009.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological

control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v.87, p.4-10, 2003.

JANISIEWICZ, W. J. Ecological diversity, niche overlay and coexistence of antagonists used in developing mixtures for biocontrol of postharvest diseases of apples. **Phytopathology**, v.86, p.473–479, 1996.

JETIYANON, K.; KLOEPPER, J. W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. **Biological Control**, v.24, p. 285–291, 2002.

LATHA, P.; ANAND, T.; RAGUPATHI, N.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. **Biological Control**, v.50, p.85–93, 2009.

LATHA, P.; ANANDA, T.; PRAKASAMA, V.; JONATHANB, E. I.; PARAMATHMAC, M.; SAMIYAPPAN, R. Combining *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Trichoderma* strains with organic amendments and micronutrient to enhance suppression of collar and root rot disease in physic nut. **Applied Soil Ecology**, v.49, p.215–223, 2011.

MCLEAN, K. L.; HUNT, J. S.; STEWART, A.; WITE, D.; PORTER, I. J.; VILLALTA, O. Compatibility of a *Trichoderma atroviride* biocontrol agent with management practices of *Allium* crops. **Crop Protection**, v.33, p.94-100, 2012.

MATOS, A. P. de; CABRAL, J. R. S. Evaluation of Pineapple Genotypes for Resistance to *Fusarium subglutinans*. **Acta Horticulturae**, v.702, p.73-77, 2006.

MATOS, A. P. de; SANCHES, N. F.; TEIXEIRA, F. A.; ELIAS JÚNIOR, J. Integrated Management of Fusariosis in Pineapple Fields under Integrated Production System. **Acta Horticulturae**, v.822, p.199-204, 2009.

ROJO, F. G.; REYNOSO, M. M.; FEREZ, M.; CHULZE, S. N.; TORRES, A. M. Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. **Crop Protection**, v.26, p.549–555, 2007.

ROSA, D. R.; HERRERA, L. C.J. Evaluation of *Trichoderma* spp. as biocontrol agents against avocado white root rot. **Biological Control**, v.51, p.66–71, 2009.

SANTOS, A.; GARCÍA, M.; COTES, A. M.; VILLAMIZAR, L. Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034. **Revista Iberoamericana de Micología**. v.29, n.3, p.150–156, 2012.

SHARMA, R. R.; DINESH, S.; RAJBIR, S. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biological Control** v.50, p.205–221, 2009.

SILVA, H. S. A.; TERRASAN, C. R. F.; TOZZI, J. P. L.; MELO, I. S.; BETTIOL,

W. Bactérias endófitas do cafeeiro e a indução de enzimas relacionadas com o controle da ferrugem (*Hemileia vastratrix*). **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.1, p.49-54, 2008.

SINGH, T.; VESENTINI, D.; SINGH, A. P.; DANIEL, G. Effect of chitosan on physiological, morphological and ultrastructural characteristics of wood degrading fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.62, p.116–124, 2008.

SRIVASTAVA, R.; KHALID, A.; SINGH, U.S.; SHARMA, A.K. Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt. **Biological Control**, v.53, p.24–31, 2010.

TCHAMENI, S. N.; NGONKEU, M. E. L.; BEGOUDE, B. A. D.; WAKAM, N. L.; FOKOM, R.; OWONA, A. D.; MBARGA, J. B.; TCHANA, T.; TONDJE, P. R.; ETOA, F. X.; KUATÉ, J. Effect of *Trichoderma asperellum* and arbuscular mycorrhizal fungi on cacao growth and resistance against black pod disease. **Crop Protection**, v.30, p.1321-1327, 2011.

TROCOLI, R. O. **Potencial de uso de bactérias associadas ao sistema radicular de abacaxizeiro (*Ananas spp.*) no controle da fusariose**. 2010, 83p., Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia). Cruz das Almas-BA, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2010.

VALLAD, G. E.; GOODMAN, R. M. Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. **Crop Science Society of America**, v.44, n.6, p.1920–1934, 2004.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.453–483, 1998.

VERMA, M.; BRAR, K.; TYAGI, R.; SURAMPALLI, T.; VALERO, J. Antagonistic fungi *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. **Biochem Eng J.** v.37, p.1–20, 2007.

VESENTINI, D.; STEWARD, D.; SINGH, A. P.; BALL, R.; DANIEL, G.; FRANICH, R. Chitosan mediated changes in cell wall composition, morphology and ultrastructure in two wood-inhabiting fungi. **Mycological Research**, v.111, p.875–890, 2007.

WALTERS, D. R. Are plants in the field already induced? Implications for practical disease control. **Crop Protection**, v.28, p.459-465, 2009.

WIJESINGHE, C.J.; WILSON, W. R. S.; SAMARASEKARA, J. K. R. R.; WIJESUNDERA, R. L. C. Development of a formulation of *Trichoderma asperellum* to control black rot disease on pineapple caused by (*Thielaviopsis paradoxa*). **Crop Protection**, v.30, p.300-306, 2011.

CAPÍTULO 3

Caracterização molecular de agentes de biocontrole (*Trichoderma* spp.) de *Fusarium guttiforme*

¹ Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico: Biological Control.

Caracterização molecular de agentes de biocontrole (*Trichoderma* spp.) de *Fusarium guttiforme*

Autor: Rafael Oliva Trocoli

Orientador: Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza

RESUMO: Neste trabalho foi estudada a variabilidade genética de *Trichoderma* spp., selecionados como potenciais agentes de biocontrole da fusariose do abacaxizeiro. Todos os isolados em estudo foram obtidos de diferentes espécies vegetais da Caatinga. A partir das análises BOX-PCR, 113 isolados de *Trichoderma* spp. originaram 14 grupos genéticos (Grg), os quais foram submetidos a testes de biocontrole de *Fusarium guttiforme* (*Fgt*) *in vitro*. Destes, o Grg 3 (TC09) apresentou o melhor desempenho na redução da colonização de *Fgt*, seguido pelo Grg 9 (TC10) e Grg 5 (TC14). Para as análises filogenéticas foram obtidas sequências de fragmentos da região ITS rDNA e do gene *tef* de cada isolado. As análises revelaram a presença de pelo menos oito espécies de *Trichoderma*: 1) *T. harzianum*; 2) *T. atroviride*; 3) *T. koningiopsis*; 4) *T. virens*; 5) *T. longibrachiatum*; 6) *T. dorotheae*; 7) *T. cremeum*; e 8) *T. stromaticum*. Os isolados TC77, TC09 e TC10 foram identificados como *T. atroviride*, TC26 e TC36 como *T. koningiopsis* e TC14 como *T. longibrachiatum*. Os resultados indicam significativa heterogeneidade entre os isolados e possivelmente a existência de novas espécies de *Trichoderma*, independente do potencial de biocontrole demonstrado. Esses isolados são promissores agentes de biocontrole da fusariose do abacaxizeiro, o que justifica a realização de novos estudos visando sua precisa identificação e a possível descrição de novas espécies.

Palavras-chaves: *translation and elongation factor*, análise filogenética, controle biológico.

Molecular characterization of *Trichoderma* spp., biocontrol agents of *Fusarium guttiforme*

Author: Rafael Oliva Trocoli

Advisor: Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza

ABSTRACT: In this study the genetic variability of *Trichoderma* spp., selected as potential biocontrol agents of fusarium wilt of pineapple is examined. All isolates in this study were obtained from the interior of different species of the Caatinga. BOX-PCR analysis of 113 isolates of *Trichoderma* spp. resulted in 14 genetic groups (Grg). These were tested against *Fusarium guttiforme* (*Fgt*) *in vitro*. Grg 3 (TC09) showed the best performance in reducing the colonization of *Fgt*, followed by Grg 9 (TC10) and Grg 5 (TC14). For phylogenetic analyzes sequences of fragments of the ITS region of the rDNA and *translation and elongation factor 1 alpha* of the RNA (*tef*) were analyzed. The analysis revealed the presence of at least eight species of *Trichoderma*: 1) *T. harzianum*; 2) *T. atroviride*; 3) *T. koningiopsis*; 4) *T. virens*; 5) *T. longibrachiatum*; 6) *T. dorotheae*; 7) *T. cremeum*; e 8) *T. stromaticum*. TC09 and TC10 were identified as *T. atroviride* and TC14 as *T. longibrachiatum*. Preliminary results indicate significant heterogeneity among the isolates, with possibly new undescribed species of *Trichoderma*. These isolates are promising biocontrol agents of fusarium wilt of pineapple, which justifies new studies aiming its precise identification and description the new species.

Keywords: *translation elongation factor*, phylogenetic analysis, biological control.

1. INTRODUÇÃO

O uso de microrganismos para o controle de doenças de plantas tem sido intensivamente estudado nos últimos anos. Dentre os agentes de biocontrole, fungos do gênero *Trichoderma* têm se destacado no combate a diversos fitopatógenos associados a culturas de importância econômica (COLLEEN & SINGH, 2009; SHARMA et al., 2009). A eficiência contra fitopatógenos deve-se ao fato desses microrganismos atuarem por meio de diversos mecanismos de ação, tais como antibiose, parasitismo, predação e competição. Além disso, a capacidade para promover crescimento e induzir resistência em plantas também são características desse gênero (HOWELL, 2003; WALTERS, 2009).

A despeito do seu potencial, estudos com foco na identificação de novas espécies de *Trichoderma* associados a plantas da Caatinga ou provenientes de regiões tropicais são raros. Por isso, torna-se imprescindível o uso de ferramentas biotecnológicas visando à identificação de novos agentes de biocontrole de doenças de plantas, especialmente do gênero *Trichoderma*.

Inicialmente, Rifai (1969) propôs a divisão do gênero *Trichoderma* em nove agregados de espécies com base em características morfológicas. Entretanto, esta classificação tem sido considerada preliminar, visto que alguns agregados comportam espécies indistinguíveis morfológicamente, além da provável presença de complexos de espécies (HERMOSA et al., 2004). Dentre as alternativas para suprir essa lacuna, o uso de ferramentas moleculares tem sido relatado em diversos trabalhos, incluindo o estudo de *T. harzianum*, *T. virens*, *T. longibrachiatum* e *T. viride*. As pesquisas apontam alto nível de heterogeneidade entre estas e outras espécies do gênero *Trichoderma* (YABUKI et al., 2013), sobretudo em relação a *T. harzianum* (HERMOSA et al. 2000, SAMUELS et al. 2002, CHAVERRI et al. 2003;).

Tal comportamento apresentado pelo gênero ainda necessita de explicações mais consistentes, incluindo o estudo de isolados originários de regiões tropicais. Associar a caracterização molecular desses fungos a sua eficiência no combate a fitopatógenos constitui uma excelente ferramenta que pode acelerar programas de biocontrole de doenças de plantas. Isto, considerando que a fase de seleção inicial dos melhores isolados representa longos e onerosos períodos experimentais. Por

isso, a diversidade genética dos isolados possivelmente pode corresponder a diferentes potenciais de biocontrole, contribuindo para a identificação de promissores agentes de controle biológico, o que justifica estudos dessa natureza.

Novos haplótipos de *Trichoderma* têm sido reconhecidos com base na análise filogenética de suas sequências. Tais trabalhos são sustentados pelo estudo de fragmentos de genes específicos, tais como ITS1 e 2 “Internal transcribed spacer”, além de TEF1 “translation elongation factor” (SAMUELS et al. 2002). Todavia, alguns “clados” dentro do gênero *Trichoderma*, a exemplo de *harzianum*, são extremamente complexos do ponto de vista filogenético (JAKLITSCH, 2009). Chaverri e Samuels (2002) estabeleceram uma relação teleomorfo/anamorfo entre *Hypocrea lixii* e *Trichoderma harzianum*, porém, Chaverri et al., (2003) mostraram a incompatibilidade genética entre os isolados **CBS 226.95** de *T. harzianum* e **G.J.S. 97-96** de *H. lixii*. Em adição, Druzhinina et al. (2009) também rejeitaram a relação genética teleomorfo/anamorfo de *H. lixii* e *T. harzianum* a partir de estudos realizados com diversos isolados com origens distintas.

O fato dos isolados em estudo serem originários de regiões tropicais os tornam excelentes fontes na busca por novas informações filogenéticas do gênero *Trichoderma*. Essa hipótese é reforçada ainda mais, em função da ausência deste tipo de isolado nos estudos supracitados. Adicionalmente, dentre as várias exigências para o registro de um produto biológico, é necessário identificar em nível de espécie o microrganismo selecionado. No passado, era comum que agentes de biocontrole fossem identificados morfologicamente como *T. harzianum* (RIFAI, 1969) em função da dificuldade de separar os membros desse gênero. Atualmente, para a recomendação de uso comercial de microrganismos no controle de doenças de plantas, é necessária a precisa identificação molecular dos agentes.

Neste sentido, o presente trabalho objetivou verificar a diversidade genética de *Trichoderma* spp. endofíticos de plantas da Caatinga, visando: a) identificar prováveis grupos genéticos entre os isolados em estudo por meio de análises BOX-PCR; b) verificar o potencial de biocontrole de *Fusarium guttiforme* apresentado por cada grupo genético; e c) identificar as espécies envolvidas no controle da fusariose do abacaxizeiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem e manutenção dos Isolados

Todos os isolados em estudo foram obtidos a partir de espécies vegetais da Caatinga. Após a purificação das colônias, os isolados foram liofilizados e mantidos em câmara fria a 10° C, sendo periodicamente reativados com a finalidade de manter a viabilidade dos microrganismos. Os isolados foram submetidos a testes de biocontrole da fusariose do abacaxizeiro (*Fusarium guttiforme*) em casa de vegetação e em condições de campo. Independente dos resultados obtidos, todos os isolados foram submetidos a estudos de biodiversidade.

2.2 Extração de DNA

O DNA total dos isolados foi extraído empregando-se o método proposto por Doyle e Doyle (1990) adaptado. Cerca de 100 mg de micélio liofilizado macerado em nitrogênio líquido foi transferido para microtubos de 1,5 mL contendo 650 µL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA pH 8,0; 1,4 M NaCl; 2% CTAB; 1% PVP; 0,2% b- Mercaptoetanol; 50 mg.mL⁻¹ proteinase K) e incubados a 55°C por 1 hora em banho-maria, agitando-se a cada 15 min. Em seguida, as amostras foram mantidas a temperatura ambiente, e um volume 650 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) foi adicionado. A mistura foi agitada manualmente por 2 min e em seguida centrifugada a 12.000 rpm por 5 min. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, acrescentando-se volume igual de isopropanol gelado, cerca de 600 µL. A solução foi incubada a -80 °C por 15 min, sendo posteriormente centrifugada a 12.000 rpm por 5 min, descartando-se a fase líquida. O DNA aderido ao fundo do tubo foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70% e centrifugando a 12.000 rpm por 3 min. Por fim, o pellet foi ressuspenso em 50 µL de TE (10mM Tris HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA), contendo 10 mg/mL RNase. Quando necessário, a concentração de DNA das amostras foi diluído para 5 ng/µL e usado para as reações posteriores.

2.3 Box - PCR

As amostras de DNA de cada isolado foram amplificadas utilizando o primer BOXA1R (5'- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG - 3') (VERSALOVIC et al., 1994). A reação total de 25 µL foi a seguinte: 5 µL de tampão 5X, 6 µL de MgCl₂, 7,1 µL de dNTPs, 0,4 µL de Taq DNA polimerase, 5 µL de primer, 1,5 µL de DNA e H₂O ultra pura para volume final de 25 µL. As amplificações foram realizadas em termociclador (PeqSTAR gradiente) programado para um ciclo inicial de desnaturação de 95°C por 5 min, seguido por dez ciclos de um min a 94°C, 30 s a 40°C, 72°C por um min, 30 ciclos de um min a 90°C, 30 s a 48°C, um min a 72°C e uma extensão final de 10 min a 72°C.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio 1 µg/mL, com a velocidade de corrida de 50 V em tampão TAE (Tris-Acetato 90 mM e EDTA 1 mM), durante 7 h. O marcador de 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen) foi utilizado. Ao término da corrida, os géis foram fotografados em um fotodocumentador (Loccus biotechnology).

A análise do perfil das bandas visualizadas no gel gerou uma matriz de dados binários em função da presença ou ausência de bandas, onde a existência da banda é representada por 1 e ausência representada por 0. A análise de agrupamento foi feita com o programa FREE TREE (HAMPL et al., 2001), sendo usado o método UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

2.4 Potencial de biocontrole dos grupos BOX sobre *Fusarium guttiforme* em discos de tecidos de abacaxizeiro 'Pérola'

Os 14 grupos genéticos identificados no estudo BOX-PCR foram submetidos aos testes de biocontrole em condições controladas. Cada grupo foi representado por um isolado de *Trichoderma* spp. selecionado aleatoriamente. Além desses, foram testados um isolado de *Trichoderma longibrachiatum* e um isolado de *Trichoderma brevicompactum*. Discos obtidos da região basal de mudas de abacaxi 'Pérola', cortados na altura de 3 cm a partir da inserção na planta mãe, foram tratados com 200 µL da suspensão de *Trichoderma* spp. (10⁸ conídios.mL⁻¹). Após uma hora (1h), período suficiente para a suspensão ter sido totalmente absorvida pelo tecido, os discos foram inoculados com 200 µL da suspensão

conidial de *Fusarium guttiforme*, na concentração de 10^5 conídios.mL⁻¹. O controle positivo consistiu na inoculação de *F. guttiforme* em discos de talo tratados apenas com água destilada esterilizada. Como controle negativo foram utilizados discos de talo não tratados e não inoculados visando verificar a eficiência do processo de desinfestação. Após a aplicação dos diferentes tratamentos e inoculação do patógeno os discos foram acondicionados em câmara úmida a 25°C durante 8 dias. A câmara úmida consistiu de potes plásticos descartáveis contendo uma fina camada de papel filtro esterilizado e umedecido com água destilada esterilizada.

Decorrido este período, avaliou-se visualmente a porcentagem de colonização de *F. guttiforme* com base em uma escala de notas pré-estabelecida. O experimento obedeceu ao delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Visando confirmar os resultados obtidos foi conduzido um segundo experimento em paralelo. Seguindo a mesma metodologia descrita, o segundo experimento foi montado cinco dias após a implantação do primeiro.

2.5 Amplificação e sequenciamento

O DNA genômico dos isolados de *Trichoderma* foram submetidos à amplificação de duas regiões, um fragmento da região ITS do rDNA (*internal transcribed spacer*), e outro fragmento do gene TEF1- α (*translation and elongation factor 1 alfa da RNA polimerase*). Os primers utilizados foram respectivamente ITS1 (5'TTC CGT AGG TGAACC TGC GG 3'), ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TATGC 3') (WHITE et al., 1990;), e EF1-728F (5'- CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG – 3') descrito por Carbone e Kohn, (1999) combinado com EF2T (5'- GGA RGT ACC AGT SAT CAT GTT – 3') (O' DONNELL e CIGELNIK, 1998).

As reações de PCR foram preparadas em um volume total de 25 μ L composta por 5 μ L de tampão 5x , 2,0 μ L de dNTPs, 2,0 μ L de MgCl₂, 0,75 μ L de cada primer, 0,4 μ L de Taq DNA polimerase, 2,0 μ L de DNA e 12,1 μ L de água miliQ autoclavada. As amplificações foram feitas em um termociclador (peqSTAR universal gradiente) utilizando o programa touchdown. Após amplificação as amostras foram submetidas à reação de sequenciamento.

O sequenciamento das amostras ocorreu de acordo com o método de Sanger et al., (1977) e os primers utilizados para a amplificação dos fragmentos do gene

ITS, bem como do gene TEF1- α foram os citados anteriormente. Foram preparadas as reações em um volume final de 10 μ L, composto por: 4,1 μ L de água ultrapura; 2,0 μ l do tampão de sequenciamento 5X (Applied biosystems); 0,4 μ L de primer (10 pM/ μ L); 2,5 μ L de DNA da amostra; e 1,0 μ L de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems). As amplificações ocorreram em um termociclador (peqSTAR universal gradiente), seguindo o seguinte programa: desnaturação inicial a 96 °C por 1 min, seguida de 35 ciclos de três etapas: desnaturação (96 °C, 10 s), anelamento (50 °C, 5 s) e extensão (65 °C, 4 min). As etapas seguintes foram: a precipitação com a adição de 40 μ l de isopropanol 65%, centrifugando a 4.000 rpm por 40 min. Em seguida o DNA foi lavado com 200 μ l de etanol 60% centrifugando a 4.000 rpm por 8 min, Em seguida, sobrenadante foi descartado e o DNA foi ressuspendido em 10 μ L de formamida. A solução de DNA – formamida foi aquecida a 93 °C por 3 min, em termociclador, e resfriado rapidamente em freezer -20°C para manter a desnaturação.

Posteriormente, as amostras foram submetidas à eletroforese em sequenciador tipo ABI prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystem). A condição de injeção das amostras foi de 2 Kv por 30 seg. A condição de eletroforese foi de 12 Kv por 120 min.

2.6 Caracterização molecular e análises filogenéticas

A edição e montagem das sequências foi realizada com o programa Sequencher 5.1 (Gene Code Corporation). Para realizar a identificação molecular dos isolados, o programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) foi usado para comparar as sequências de cada isolado com aquelas encontradas em bancos de dados públicos. Sequências dos bancos de dados públicos foram incluídas nas análises para fins de comparação. O alinhamento das sequências foi realizado *on line* utilizando o *Guidance*, e as árvores filogenéticas foram geradas com o programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011). O método Neighbor-Joining (NJ) com análises de bootstrap com 1.000 e o modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros foram usados na construção das árvores.

3. RESULTADOS

3.1 Box - PCR

A amplificação do DNA de 113 isolados de *Trichoderma* spp. com a técnica BOX-PCR gerou um total de 9 bandas polimórficas, sendo algumas mostradas na figura 1. Foi observada alta diversidade entre os isolados, a qual também foi expressa em diferentes níveis de controle de *Fusarium guttiforme* nos testes em condições controladas (item 3.2). A análise conjunta gerou a formação de 14 grupos genéticos.

De modo geral não houve relação direta entre os grupos genéticos formados e a origem dos isolados. Os grupos genéticos 1, 2, 3, 8, 9 e 10 apresentaram isolados provenientes das quatro espécies vegetais usadas nos estudos (*Ananas comosus* var. *bracteatus*; *Astronium fraxinifolium*; *Bowdichia virgilioides*; e *Caesalpinia pyramidalis*). Os grupos 5, 6 e 13 foram representados por isolados oriundos de três espécies vegetais, enquanto os isolados dos grupos genéticos 11 e 14 foram obtidos de duas espécies vegetais. Os demais grupos genéticos 4, 7 e 12 foram constituídos por isolados oriundos de uma única espécie vegetal: grupo 4 – *C. pyramidalis*; grupo 7 – *B. virgilioides*; e grupo 12 – *A. fraxinifolium*. Entretanto, esses últimos foram representados apenas por um isolado de *Trichoderma*, conforme análise de agrupamento BOX-PCR.

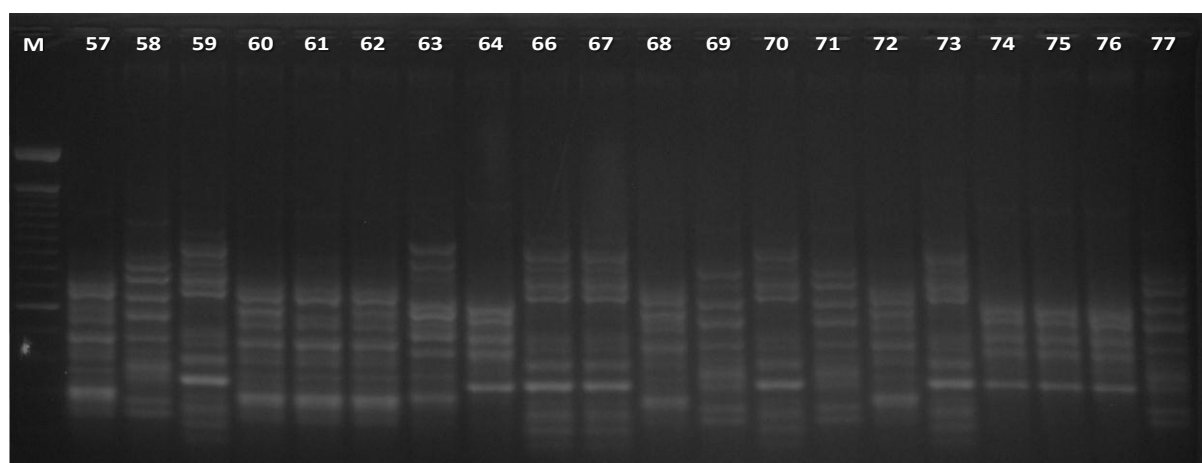


Figura 1. Perfil eletroforético em gel de agarose obtido por meio de BOX – PCR. São mostradas bandas polimórficas de 20 isolados de *Trichoderma* spp. M: marcador molecular ladder 100pb. 57 a 77: DNA dos isolados. 60, 61 e 62: padrão de base 1. 66, 67, 70 e 73: padrão de base 2. 64, 74, 75 e 76: padrão de base 3.

3.2 Potencial de biocontrole dos grupos BOX sobre *Fusarium guttiforme* em discos de tecidos de abacaxizeiro 'Pérola'

Não foi observado crescimento micelial de *Fusarium guttiforme* (*Fgt*) em nenhuma das repetições do Controle Negativo (CN), e todas as repetições do tratamento Controle Positivo (CP) demonstraram crescimento micelial do patógeno (Figura 2). Os testes em discos de talo apontaram quatro isolados capazes de reduzir significativamente a colonização de *Fgt* em discos de talo de abacaxi 'Pérola'. Esse grupo não diferiu do CN. O isolado ALF53 mostrou maior eficiência na redução da colonização de *Fgt*, seguido pelos isolados TC09, TC10 e TC14. Neste grupo, verificou-se maior frequência de isolados provenientes de *Ananas comosus* var. *bracteatus* (TC09 e TC10), e um isolado proveniente de *Caesalpinia pyramidalis* (TC14). A origem do isolado ALF53 é desconhecida. Respectivamente, esses isolados representaram os grupos genéticos 3, 9 e 5 (Tabela 1; Figura 2). Por outro lado, os isolados TC24, TC27, TC11, TC25, TC03 e TC21 não proporcionaram significativa redução da colonização de *Fgt* pelo que não diferiram do tratamento CP. Os grupos genéticos 13, 12, 10, 14, 2 e 7 foram representados por esses isolados, respectivamente. Nesse grupo não houve frequência predominante em relação ao hospedeiro (Tabela 1). O segundo experimento conduzido sob as mesmas condições apresentou resultados similares.

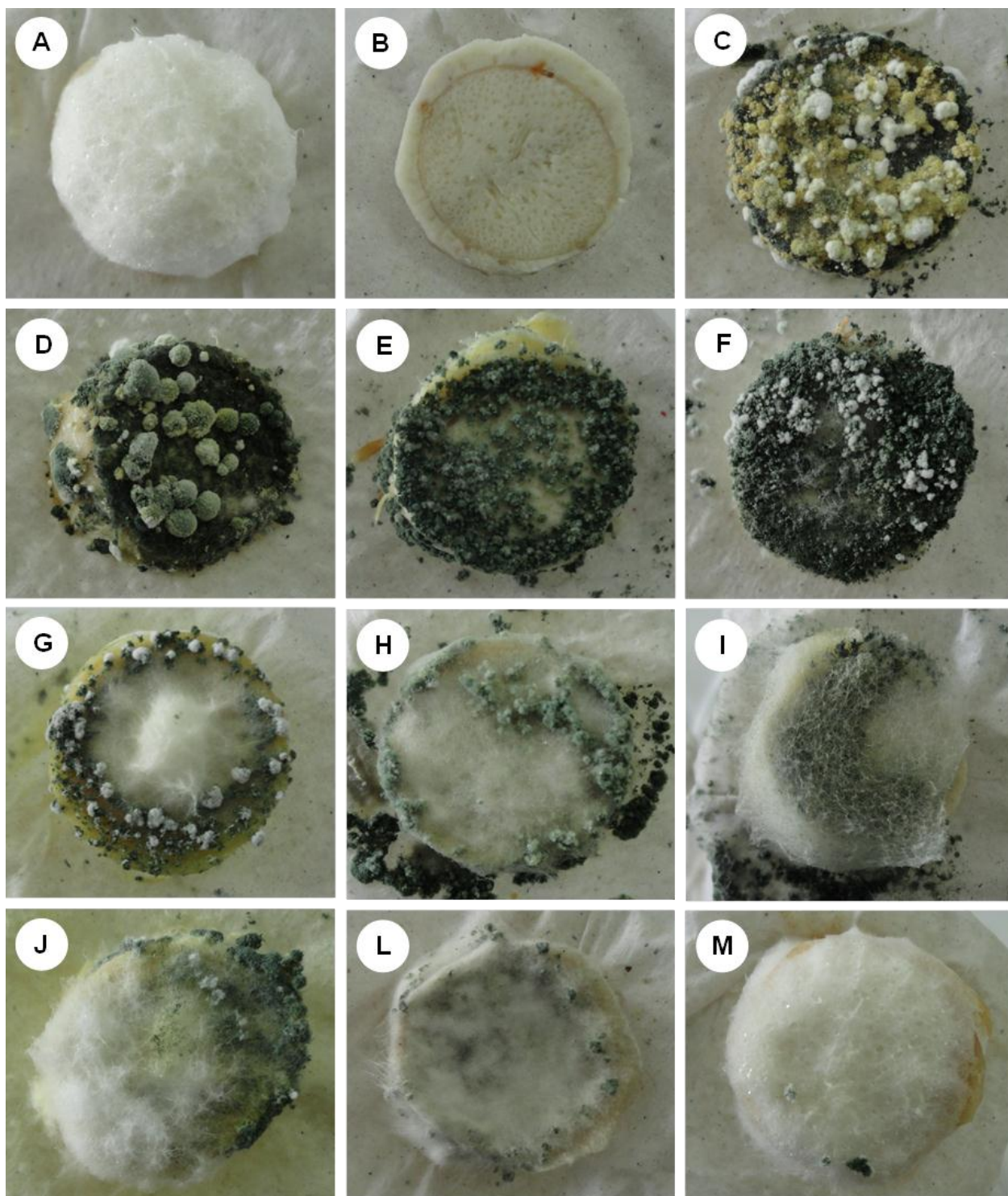


Figura 2. Crescimento de *Fusarium guttiforme* em discos de talo de abacaxi 'Pérola' após tratamento com *Trichoderma* spp. **(A)** Controle Positivo - inoculado apenas com *F. guttiforme*; **(B)** Controle Negativo - não inoculado com o patógeno e sem aplicação de *Trichoderma* spp; **(C)** TC 10; **(D)** TC 09; **(E)** ALF 53, *T. longibrachiatum* ; **(F)** TC 14; **(G)** TC 60; **(H)** TC 73; **(I)** TC 29; **(J)** TC 88; **(L)** *T. brevicompactum* e **(M)** TC 11.

Tabela 1. Redução da colonização de *Fusarium guttiforme* em discos de talo de abacaxi 'Pérola', após aplicação de isolados de *Trichoderma* spp. em condições controladas.

Is. ^I	Grg ^{II}	Origem ^{III}	Espécie (BLAST)	Cr. Fgt ^{IV}
CN ^{VI}	-	-	-	0,00 a [#]
ALF 53	-	-	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	1,66 ab
TC 09	03 (15)*	Anc	<i>Trichoderma atroviride</i>	1,67 ab
TC 10	09 (11)	Anc	<i>Trichoderma atroviride</i>	1,79 abc
TC14	05 (07)	Cap	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	1,87 abc
TC 29	11 (02)	Cap	<i>Trichoderma harzianum</i>	2,56 def
TC 73	08 (17)	Bov	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	2,64 def
TC 88	01 (22)	Cap	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	2,69 def
TC13	04 (01)	Cap	<i>Trichoderma virens</i>	2,79 def
-	-	-	<i>Trichoderma brevicompactum</i>	2,84 def
TC 60	06 (07)	Cap	<i>Trichoderma harzianum</i>	2,89 def
TC 24	13 (03)	Cap	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	2,95 fg
TC 27	12 (01)	Asf	<i>Trichoderma stromaticum</i>	2,97 fg
TC 11	10 (13)	Cap	<i>Trichoderma harzianum</i>	2,98 fg
TC 25	14 (05)	Asf	<i>Trichoderma sinuosa</i>	2,98 fg
TC 03	02 (08)	Asf	<i>Trichoderma harzianum</i>	2,99 g
TC 21	07 (01)	Bov	-	2,99 g
CP ^{VII}	-	-	-	3,00 g

^I Código de trabalho dos isolados; ^{II} Grupos genéticos gerados por meio de análises BOX-PCR; ^{III} Espécie hospedeira dos isolados de *Trichoderma* spp. em estudo; ^{IV} Colonização de *F. guttiforme* em discos de talo de abacaxi 'Pérola'; ^{VI} Controle não inoculado com o patógeno e sem aplicação de *Trichoderma* spp; ^{VII} Controle inoculado apenas com *F. guttiforme*.

[#] Valores na coluna seguidos da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de comparação múltipla não-paramétrica ($P \leq 0.05$). Os valores representam as médias de colonização de *F. guttiforme* transformadas para $\sqrt{\text{arc. sen.}}$. ()* indica o número total de isolados por grupo genético.

3.3 Amplificação e sequenciamento

Um total de 23 isolados representando todos os grupos BOX foram selecionados e tiveram fragmentos da região ITS (*internal transcribed spacer*), e do gene TEF1- α (*translation and elongation factor 1- alfa* do RNA) sequenciados. Para cada fragmento dos genes foi gerada uma árvore filogenética (Figuras 3 e 4). Em ambas, observou-se a formação grupos do gênero *Trichoderma* de acordo com as sequências dos bancos de dados públicos. Em geral, esses agrupamentos apresentaram-se corroborados pela análise de bootstrap e englobaram todos os grupos BOX, exceto o grupo genético 7. Nesse caso, o representante desse grupo genético, o isolado TC21, não apresentou material genômico de qualidade necessário à condução dos estudos. Por outro lado, não houve correspondência absoluta entre os grupos BOX e os formados pela análise filogenética. As árvores apresentaram basicamente os mesmos grupos de *Trichoderma*. Todavia, a análise realizada a partir das sequências do gene *tef* propiciou melhores condições para inferir sobre a identificação dos isolados em estudo, incluindo seis espécies novas, representada pelos isolados TC06, TC23, TC26, TC27, TC33 e TC93 (Figura 4; Tabela 3). De acordo com essa mesma análise e com as sequências de bancos de dados públicos foi possível identificar as espécies de *Trichoderma* com potencial de biocontrole de *Fusarium guttiforme*: 1) TC09 e TC10, *T. atroviride*; e 2) TC14, *T. longibrachiatum* (Tabela 3). Contudo, algumas diferenças foram apresentadas quando as duas árvores foram comparadas: 1) Com base em sequências *its*, os isolados TC10 e TC 12 foram agrupados em clados distintos, entretanto, foram alocados no mesmo clado com base em sequências *tef*; 2) O isolado TC22 foi classificado como *T. petersenii* de acordo com *its* e como *T. atroviride* segundo sequências *tef* (Tabela 2 e 3).

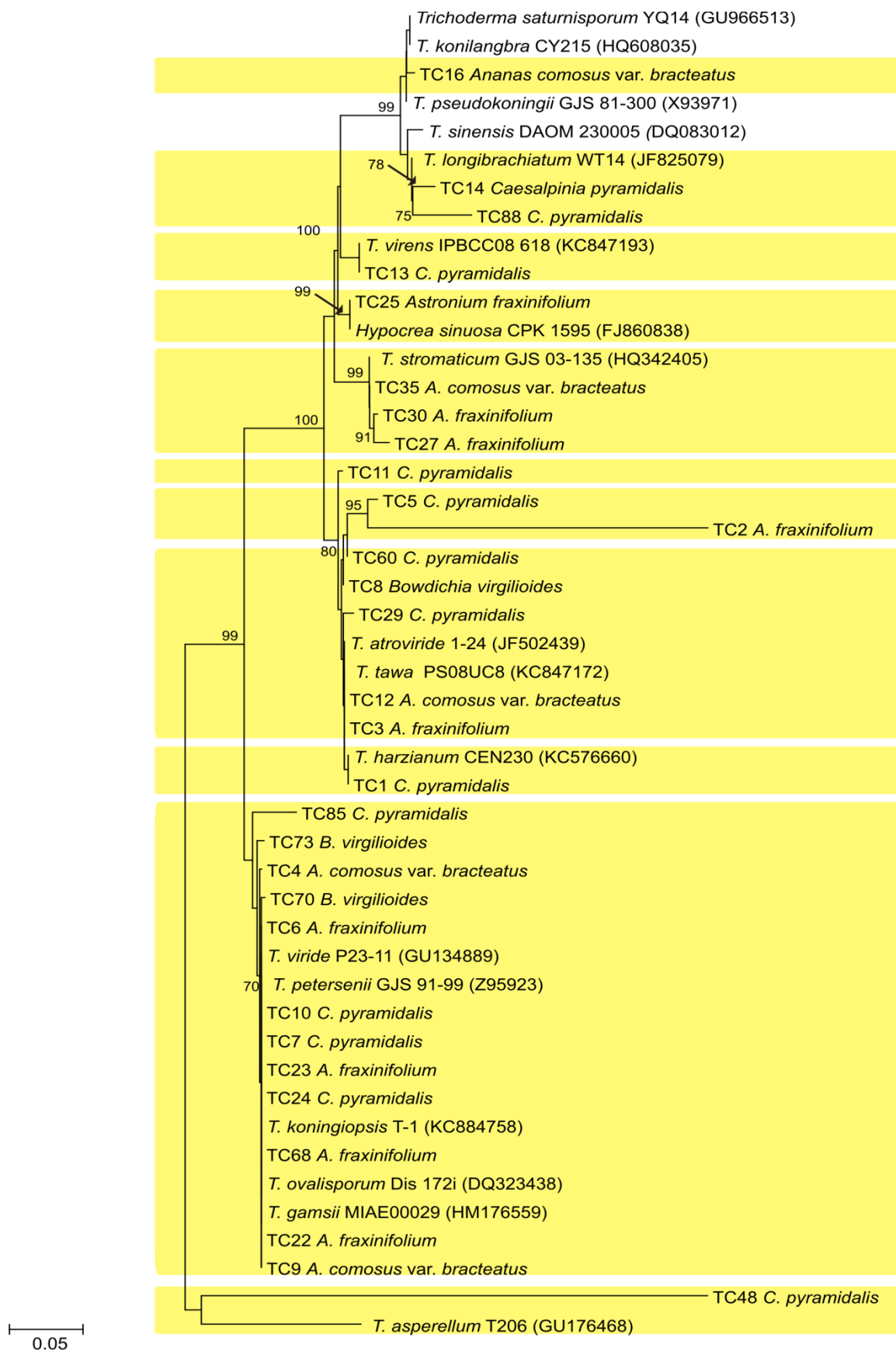


Figura 3. Árvore filogenética gerada a partir de 556 nucleotídeos alinhados de sequências de um fragmento da região ITS do rDNA. O agrupamento foi gerado com o método Neighbor-joining e modelo Kimura 2 parâmetros. Os valores de bootstrap (1000 repetições) acima de 70% são mostrados nos ramos correspondentes.

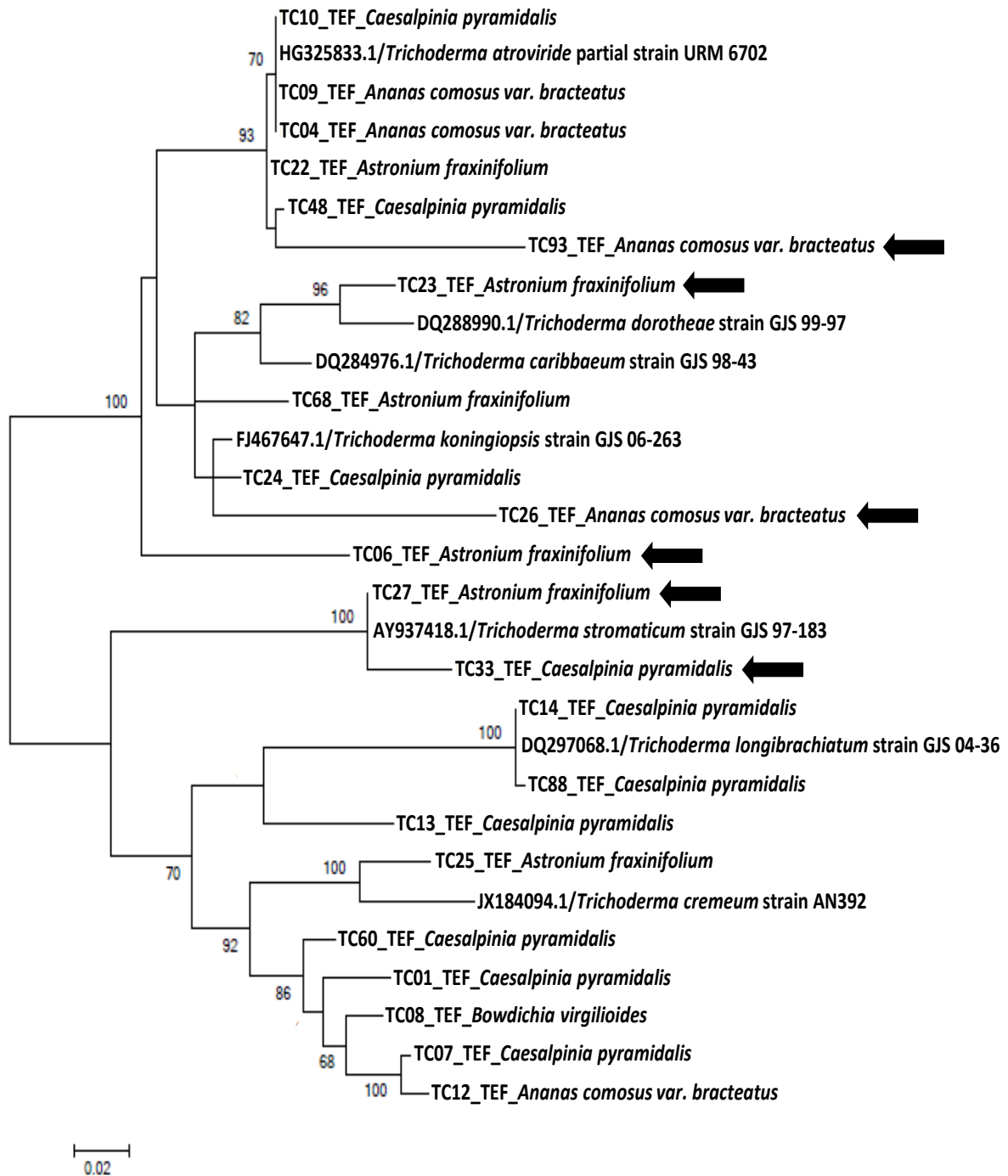


Figura 4. Árvore filogenética gerada a partir de 609 nucleotídeos alinhados de seqüências de um fragmento do gene TEF 1- α (*translation and elongation factor 1- alfa* do RNA). O agrupamento foi gerado com o método Máxima verossimilhança e modelo Kimura 2 parâmetros. Os valores de bootstrap (1000 repetições) acima de 70% são mostrados nos ramos correspondentes. Setas indicam as seis novas espécies identificadas no estudo.

Tabela 2. Identificação dos isolados de *Trichoderma* spp. por meio do sequenciamento da região ITS e análises de comparação realizada com o programa BLAST.

Is. ^I	Fr. Seq. (pb) ^{II}	Espécie (BLAST-NCBI)	Id. ^{III}	Ref. (GenBank) ^{IV}	Espécie hospedeira ^V
TC 01	571	<i>Trichoderma harzianum</i>	99%	JN228897.1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC 02	561	<i>Trichoderma harzianum</i>	79%	KC576646.1	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC 03	567	<i>Trichoderma tawa</i>	99%	KC847172.1	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC 04	566	<i>Trichoderma</i> sp.	99%	FJ607332.1	<i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i>
TC 05	601	<i>Trichoderma harzianum</i>	95%	JN618339.1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC 06	556	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	99%	KC884758.1	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC 07	556	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	99%	KC884758.1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC 08	574	<i>Trichoderma harzianum</i>	99%	FJ442251.1	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC 09	570	<i>Trichoderma atroviride</i>	99%	JF694930.1	<i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i>
TC 10	571	<i>Trichoderma atroviride</i>	99%	JF694930.1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC 11	587	<i>Trichoderma harzianum</i>	98%	FJ461572.1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC 12	570	<i>Trichoderma</i> sp.	99%	KF367569.1	<i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i>
TC 13	585	<i>Trichoderma virens</i>	99%	KC847193.1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC 14	597	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	98%	JF825079.1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC 16	607	<i>Hypocrea schweinitzii</i>	99%	FJ605263.1	<i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i>
TC 22	590	<i>Trichoderma atroviride</i>	99%	JF694930.1	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC 23	580	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	99%	EU718083.1	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC 24	568	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	99%	EU718083.1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC 25	571	<i>Trichoderma sinuosa</i>	99%	FJ860838.1	<i>Astronium fraxinifolium</i>

Tabela 2. Continuação...

Is. ^I	Fr. Seq. (pb) ^{II}	Espécie (BLAST-NCBI)	Id. ^{III}	Ref. (GenBank) ^{IV}	Espécie hospedeira ^V
TC 27	484	<i>Trichoderma stromaticum</i>	98%	HQ342405.1	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC 29	605	<i>Trichoderma harzianum</i>	97%	EF191305.1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC 30	523	<i>Trichoderma stromaticum</i>	98%	HQ342405.1	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC 35	606	<i>Trichoderma stromaticum</i>	99%	DQ083013.1	<i>Ananas comosus var. bracteatus</i>
TC 48	609	<i>Trichoderma atroviride</i>	74%	HQ259979.1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC 60	552	<i>Trichoderma harzianum</i>	99%	FJ461566.1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC 68	577	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	98%	KF060155.1	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC 70	511	<i>Trichoderma petersenii</i>	99%	JX518935.1	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC 73	546	<i>Trichocerma gamsii</i>	98%	jq398842.1	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC 85	606	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	95%	KC576723.1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC 88	481	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	97%	AF414290.1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>

^I Código de trabalho dos isolados;

^{II} Tamanho do fragmento sequenciado do gene *its*;

^{III} Grau de identidade em relação à sequência de referência;

^{IV} Código de acesso à sequência de referência do GenBank;

^V Origem dos isolados em estudo.

Tabela 3. Identificação dos isolados de *Trichoderma* spp. por meio do sequenciamento do gene *tef* e análises de comparação realizada com o programa BLAST.

Is. ^I	Fr. Seq. (pb) ^{II}	Espécie (BLAST-NCBI)	Id. ^{III}	Ref. (GenBank) ^{IV}	Espécie hospedeira ^V
TC01	494	<i>Trichoderma harzianum</i>	99%	AF348106.1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC04	508	<i>Trichoderma atroviride</i>	99%	HG325833.1	<i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i>
TC06	549	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	88%	EU279995.1	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC07	514	<i>Trichoderma harzianum</i>	98%	AY605773.1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC08	524	<i>Trichoderma harzianum</i>	100%	EU279989.1	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC09	536	<i>Trichoderma atroviride</i>	99%	HG325833.1	<i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i>
TC10	526	<i>Trichoderma atroviride</i>	99%	HG325833.1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC12	532	<i>Trichoderma harzianum</i>	96%	AY605775.1	<i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i>
TC13	517	<i>Trichoderma virens</i>	99%	KC291138.1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC14	555	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	99%	DQ297068.1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC22	526	<i>Trichoderma atroviride</i>	100%	DQ307550.1	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC23	540	<i>Trichoderma dorotheae</i>	94%	DQ288990.1	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC24	554	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	96%	FJ463270.1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC25	525	<i>Trichoderma cremeum</i>	93%	JX184094.1	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC26	546	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	91%	EU279995.1	<i>Ananas comosus</i> var. <i>bracteatus</i>
TC27	488	<i>Trichoderma stromaticum</i>	99%	AY937418.1	<i>Astronium fraxinifolium</i>

Tabela 3. Continuação...

Is. ^I	Fr. Seq. (pb) ^{II}	Espécie (BLAST-NCBI)	Id. ^{III}	Ref. (GenBank) ^{IV}	Espécie hospedeira ^V
TC33	479	<i>Trichoderma stromaticum</i>	97%	AY937418.1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC48	547	<i>Trichoderma atroviride</i>	99%	DQ307548.1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC57	281	<i>Trichoderma harzianum</i>	97%	AY605779.1	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC59	350	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	97%	FJ463270.1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC60	526	<i>Trichoderma harzianum</i>	98%	AY605773.1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC68	472	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	98%	EU280012.1	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC88	530	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	99%	DQ297068.1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC93	463	<i>Trichoderma atroviride</i>	92%	DQ307547.1	<i>Ananas comosus var. bracteatus</i>

^I Código de trabalho dos isolados;

^{II} Tamanho do fragmento sequenciado do gene *its*;

^{III} Grau de identidade em relação à sequência de referência;

^{IV} Código de acesso à sequência de referência do GenBank;

^V Origem dos isolados em estudo.

4. DISCUSSÃO

Trichoderma spp. endofíticos de espécies vegetais da Caatinga, originários de regiões tropicais constituem um importante grupo de microrganismos com potencial de uso no controle de fitopatógenos. Em teoria, isolados provenientes de localidades com altas temperaturas, teriam maior probabilidade de se estabilizar e promover o biocontrole em condições semiáridas, bem como representar novas espécies do gênero (JAKLITSCH, 2009). Com base nisso, 14 grupos genéticos de *Trichoderma* foram testados contra *Fusarium guttiforme* (*Fgt*) no intuito de verificar diferentes potenciais de biocontrole e a biodiversidade entre os isolados em estudo.

Por meio de ferramentas biotecnológicas foi identificado pela primeira vez espécies de *Trichoderma* com potencial de biocontrole de *Fgt*. Apesar das variações observadas nos níveis de redução da colonização do patógeno, houve repetibilidade nos dois experimentos conduzidos em condições controladas. O isolado ALF 53 de *Trichoderma longibrachiatum* apresentou maior redução de *Fgt* nos estudos de biocontrole. Dos 14 grupos genéticos testados contra o patógeno, três proporcionaram os melhores níveis de redução da colonização de *Fgt* em discos de talo de abacaxi 'Pérola' (Figura 2). Considerando a metodologia adotada durante os bioensaios, esse resultado pode ser explicado pela provável ocorrência de antagonismo direto e/ou competição por espaço e nutriente, fenômenos bem documentado em diversas espécies de *Trichoderma*, incluindo *T. atroviride* (LUTZ et al., 2003; BENÍTEZ et al., 2004; VINALE et al., 2008).

Trichoderma longibrachiatum, *T. atroviride* e *T. harzianum* espécies identificadas neste estudo com potencial de biocontrole de *Fgt*, têm sido largamente relatadas em diversos estudos dessa natureza, envolvendo o biocontrole de patógenos do gênero *Fusarium* (DUBEY et al., 2007; ROJAN et al., 2010), bem como de outros patógenos de importância econômica (BRUNNER et al., 2005; ROSA et al., 2009; MCLEAN et al., 2012; DUBEY et al., 2013). Uma das estratégias usadas por *Fusarium* spp. para inibir o crescimento de prováveis antagonistas é a liberação no solo de metabólitos como o ácido fusarico (DESJARDINS, 2006). De fato, esse fenômeno dificulta

o controle de patógenos desse gênero por meio de agentes de biocontrole. Todavia, isolados de *Trichoderma* spp. têm demonstrado habilidade para resistir a metabólitos produzidos por *Fusarium* spp. Por exemplo, Marzano et al., (2013) verificaram a capacidade de biocontrole de *T. harzianum* (Th908-5) contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Os autores relatam que Th908-5 proporcionou a redução da doença mesmo em bioensaios com adição de ácido fusarico. Além disso, Th908-5 promoveu significativo crescimento de plantas de tomate. Entretanto, o tipo selvagem de *T. harzianum* não demonstrou a mesma habilidade, o que pode explicar a diferença de potencial de biocontrole entre isolados da mesma espécie. Por isso, provavelmente no presente estudo, os isolados TC29 e TC11, ambos de *T. harzianum* apresentaram diferentes níveis de redução de *Fgt*. Em adição, TC29 e TC11 foram alocados em diferentes grupos genéticos, o que pode ter sido ocasionado por uma provável diferença de habilidade em tolerar concentrações de metabólitos produzidos por *Fgt*, a qual foi expressa nas análises BOX-PCR (Tabela 1).

O fato de os grupos genéticos apresentarem diferentes potenciais de biocontrole de *Fgt*, abre a oportunidade desta metodologia atuar como ferramenta de seleção de prováveis agentes de biocontrole dentro de programas de controle biológico da fusariose do abacaxizeiro, bem como de outras doenças de importância econômica. Essa estratégia poderá garantir resultados satisfatórios em menor espaço de tempo e com menor custo, visto que a etapa de seleção de isolados ainda constitui uma das principais limitações em programas de controle biológico.

Análises moleculares revelaram alta diversidade entre os isolados estudados, incluindo a possibilidade de identificação de novas espécies desse gênero, independente do potencial de biocontrole. Esse comportamento tem sido geralmente atribuído ao gênero *Trichoderma* (DRUZHININA et al., 2012; YABUKI et al., 2013). Apesar de representar os principais agentes de biocontrole de doenças de plantas (WALTERS, 2009), fungos desse gênero ainda apresentam lacunas do ponto de vista genético que necessitam ser preenchidas (CHAVERRI et al., 2003; SAMUELS et al., 2011). Tais respostas certamente auxiliarão estudos voltados para o desenvolvimento de produtos de biocontrole.

As análises das sequências do gene TEF dos 23 isolados representantes dos 14 grupos genéticos revelaram a presença de oito (8) espécies de *Trichoderma*: 1) *T. harzianum*; 2) *T. atroviride*; 3) *T. koningiopsis*; 4) *T. virens*; 5) *T. longibrachiatum*; 6) *T. dorotheae*; 7) *T. cremeum*; e 8) *T. stromaticum* (Tabela 3). Adicionalmente, ao comparar as sequências dos isolados com outras disponíveis em bancos de dados públicos verificou-se a presença de prováveis novas espécies, representadas pelos isolados TC06, TC23, TC26 e TC93, os quais apresentaram identidade inferior a 97% (Tabela 3). Por exemplo, TC06 apresentou 88% de identidade em relação à *T. koningiopsis* (EU279995). Fato também observado para o isolado TC12 (96%) de *T. harzianum* (Tabela 3).

Tal comportamento é reforçado a partir de resultados disponíveis na literatura científica. Jaklitsch (2009) relata a complexidade filogenética de alguns “clados” dentro do gênero *Trichoderma*, sobretudo de *harzianum*. O autor ainda enfatiza a necessidade de estudos mais aprofundados envolvendo isolados de várias partes do mundo. Além disso, afirma a possibilidade de identificação de novas espécies dentro de *T. harzianum*. Por isso, considerando que os isolados em estudo são originários de regiões tropicais abre oportunidade de realmente se tratar de novas espécies com potencial de biocontrole de doenças de plantas. Sobretudo, são raros estudos filogenéticos envolvendo isolados de *Trichoderma* provenientes de espécies vegetais da Caatinga originárias de regiões tropicais. A situação ainda é mais inconsistente se verificado a relação teleomorfo/anamorfo entre *Hypocrea lixii* e *T. harzianum*, visto que já foi demonstrada a existência de duas espécies distintas, entre os isolados **CBS 226.95** de *T. harzianum* e **G.J.S. 97-96** de *H. lixii* (CHAVERRI et al., 2003; DRUZHININA et al., 2009).

Os isolados TC27 e TC 33 identificados como *Trichoderma stromaticum* apresentam comportamento similar ao do “clado” *harzianum*. Isto também implica na possibilidade de novas espécies presentes nesse estudo terem sido inicialmente associadas a *T. stromaticum*. Evento reforçado pelo fato de *T. stromaticum* ter co-evoluido com *Moniliophthora perniciosa*, e até então, ter sido encontrado somente em associação com esse fungo (SAMUELS et al., 2011). Com base nisso, e considerando a origem de TC27 (*Asf*) e TC33 (*Cap*),

abre oportunidade para inferir que esses isolados representam novas espécies do gênero *Trichoderma*.

Todavia, todos os isolados identificados neste estudo como novas espécies de *Trichoderma* devem ser submetidos a pesquisas mais detalhadas. A análise de outros genes como, *rbp2*, *cal* e *chi18-5* poderá auxiliar com exatidão a identificação de novas espécies, bem como sua aplicação em programas de biocontrole. Em adição, a caracterização fisiológica, envolvendo o crescimento em diferentes meios e temperaturas, bem como a caracterização morfológica dos isolados poderão auxiliar a descrição de novas espécies de *Trichoderma*.

O presente estudo identificou espécies de *Trichoderma* eficientes contra *Fgt*, bem como evidenciou o envolvimento de prováveis novas espécies deste gênero associadas a espécies vegetais da Caatinga, tais como TC12, TC24 e TC25. Independente dos estudos futuros que deverão ser realizados, essas informações são fundamentais para a compreensão da vasta diversidade dentro do gênero *Trichoderma*, bem como para biocontrole de da fusariose do abacaxizeiro. A combinação dessas estratégias biotecnológicas em associação com estudos mais aprofundados de aplicação dos agentes de biocontrole, certamente poderá ampliar os níveis de controle da fusariose dentro da cadeia produtiva do abacaxizeiro.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho se estudou pela primeira vez *Trichoderma* spp. endofíticos de espécies vegetais da Caatinga, enfatizando sua diversidade genética e potencial de controle de *Fusarium guttiforme* (*Fgt*). Os resultados obtidos demonstraram alta diversidade ente os isolados, incluindo a identificação de novas espécies do gênero, representadas pelos isolados TC06, TC23, TC26, TC27, TC 33 e TC93. Em adição, foram identificados três grupos genéticos que apresentaram resultados satisfatórios frente à redução da colonização de *Fgt* em condições controladas. Nestes grupos, pelo menos duas espécies foram identificadas *T. longibrachiatum* e *T. atroviride*. O emprego de análises BOX-PCR em programas de controle biológico,

certamente poderá auxiliar a seleção de *Trichoderma* spp. eficientes contra a fusariose do abacaxizeiro.

Entretanto, pesquisas futuras são indispensáveis para, realizar a classificação fisiológica e morfológica dos isolados em estudo, determinar os mecanismos de ação e compostos antimicrobianos envolvidos na redução da colonização de *Fgt*, bem como identificar formulações viáveis e verificar a compatibilidade dos isolados com produtos utilizados na produção comercial de abacaxi. Adicionalmente, mais estudos relacionados à diversidade de *Trichoderma* spp. associados a espécies vegetais da Caatinga são necessários para elevar a compreensão sobre a dinâmica populacional desses micro-organismos, e conseqüentemente seu papel no controle de doenças de plantas.

Independente dos estudos futuros necessários, este é o primeiro relato de *Trichoderma* spp. originários de regiões tropicais com potencial de biocontrole de *Fgt*. Espera-se que essas informações contribuam para o controle alternativo da fusariose do abacaxizeiro, e futuramente resulte na redução do uso de fungicidas nos plantios comerciais. Além disso, possa contribuir para que todo empenho despendido na busca por agentes de biocontrole da doença seja continuado a fim de alcançar um produto que seja efetivamente útil para a abacaxicultura nacional.

6. REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M. LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v.07, p.249-260, 2004.

BEZERRA, J.L.; COSTA, J. C.; BASTOS, C. N.; FALEIRO, F. G. (2003) *Hypocrea stromatica* sp. nov. teleomorfo de *Trichoderma stromaticum*. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.408-412

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 and Environmental Microbiology**, v.71, p.3959-3965, 2005.

CHAVERRI, P.; SAMUELS, G. J. *Hypocrea lixii*, the teleomorph of *Trichoderma harzianum*. **Mycological Progress**, v.1, p.283-286, 2002.

CHAVERRI, P.; CASTLEBURY, L. A.; SAMUELS, G. J.; GEISER, D. M. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v.27, p.302–313, 2003.

COLLEEN, C.; SINGH, T. *In vitro* evaluation of combination of *Trichoderma harzianum* and chitosan for control of sapstain. **Biological Control**, v.50, p.262-266, 2009.

DESJARDINS, A.E., 2006. *Fusarium Mycotoxins. Chemistry, Genetics, and Biology*. APS Press, St. Paul, MN, USA.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

DUBEY, S. C.; SURESH, M.; SINGH, B. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. **Biological Control**, v.40, p.118-127, 2007.

DUBEY, M. K.; BROBERG, A.; SOORIYAARACHCHI, S.; UBHAYASEKERA, W.; JENSEN, D. A.; KARLSSON, M. The glyoxylate cycle is involved in pleiotropic phenotypes, antagonism and induction of plant defence responses in the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride*. **Fungal Genetics and Biology**, v.58-59, p.33-41, 2013.

DRUZHININA I. S.; KUBICEK, C.P.; KOMON-ZELAZOWSKA, M.; BELAYNEH, T.; BISSETT, J. *Trichoderma harzianum* is a recent agamospecies isolated from numerous sibling relicts and several genetically close biological species. **BMC Evolutionary Biology**: in press, 2009.

DRUZHININA, I. S.; KOMON´-ZELAZOWSKA, M.; ISMAIEL, A.; JAKLITSCH, W.; MULLAW, T.; SAMUELS, G. J.; KUBICEK, C. P. Molecular phylogeny and species delimitation in the section *Longibrachiatum* of *Trichoderma*. **Fungal Genetics and Biology**, v.49, p.358-368, 2012.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp**, v.41, p.95-98, 1999.

HAMPL, V.; PAVLICEK, A.; FLEGR, J. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.731-735, 2001.

HERMOSA, M. R.; GRONDONA, I.; ITURRIAGA, E. A.; DI´AZ-MI´NGUEZ, J. M.; CASTRO, C.; MONTE, E.; GARCÍA-ACHA, I. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.1890–1898, 2000.

HERMOSA, M. R.; KECK, E.; CHAMORRO, I.; RUBIO, B.; SANZ, L.; VIZCAÍNO, J. A.; GRONDONA, I.; MONTE, E. Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. **Mycol. Res.**, v.108, n.8, p.897–906, 2004.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v.87, p.4-10, 2003.

JAKLITSCH W. M. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. **Stud Mycol**, v.63, p.1–91, 2009.

KULLNIG-GRADINGER, C. M.; SZAKACS, G.; KUBICEK, C. P. Phylogenetic and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. **Mycological Research**, v.106, p.757–767, 2002.

LUTZ, M. P. et al., Mycotoxigenic *Fusarium* and deoxynivalenol production repress chitinase gene expression in the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* P1. Applied and Environmental Microbiology. Washington, v. 69, p. 3077-3084, 2003.

MARZANO, M.; GALLO, A.; ALTOMARE, C. Improvement of biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* vs. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through UV-induced tolerance to fusaric acid. **Biological Control**, v.67, p.397-408, 2013.

MCLEAN, K. L.; HUNT, J. S.; STEWART, A.; WITE, D.; PORTER, I. J.; VILLALTA, O. Compatibility of a *Trichoderma atroviride* biocontrol agent with management practices of *Allium* crops. **Crop Protection**, v.33, p.94-100, 2012.

NYLANDER, J. A. A. **MrModeltest. Version 2**. Uppsala, Sweden: Evolutionary Biology Centre, Uppsala Univ., 2004.

O' DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, H. I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, v.90, p.465–493, 1998.

PAGE, R. D. M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, v.12, p.357-358, 1996.

RIFAI, M. A. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological Papers**, v.116, p.1–56, 1969.

ROJAN, P. J.; TYAGI, R.D.; PRÉVOST, D.; BRAR, S.K.; POULEUR, S.; SURAMPALLI, R.Y. Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. **Crop Protection**, v.29, p.1452-1459, 2010.

ROSA, D. R. & HERRERA C.J.L. Evaluation of *Trichoderma* spp. as biocontrol agents against avocado white root rot. **Biological Control**, v.51, p.66–71, 2009.

SAMUELS, G. J.; DODD, S. L.; GAMS, W.; CASTLEBURY, L. A.; PETRINI, O. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, v.94, p.146–170, 2002.

SAMUELS, S. J.; ISMAIEL, A.; SOUZA, J. T. de; CHAVERRI, P. *Trichoderma stromaticum* and its overseas relatives. **Mycol. Progress**, DOI 10.1007/s11557-011-0743-4, 2011.

SHARMA, R. R.; DINESH, S.; RAJBIR, S. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biological Control** v.50, p.205–221, 2009.

SOUZA, J.T.; POMELLA, A.W.V.; BOWERS, J.H.; PIROVANI, C.P.; LOGUERCIO, L.L.; HEBBAR, P.K. Genetic and biological diversity of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches' broom pathogen. **Phytopathology**, v.96, p.61-67, 2006.

SOUZA, J. T.; BAILEY, B.A.; POMELLA, A.W.V.; ERBE, E.F.; MURPHY, C.A.; BAE, H.; HEBBAR, P.K. Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches' broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance. **Biological Control**, v.46, p.36-45, 2008.

VINALE, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., Lorito, M. *Trichoderma*–plant pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry* 40, 1–10, 2008.

WALTERS, D. R. Are plants in the field already induced? Implications for practical disease control. **Crop Protection**, v.28, p.459-465, 2009.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SHINSKY, J.J.; WHITE, T.J. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. New York: Academic, 1990. p.315-322.

YABUKI, T.; MIYAZAKI, K.; OKUDA, T. Japanese species of the Longibrachiatum Clade of *Trichoderma*. **Mycoscience**, article in press: <http://dx.doi.org/10.1016/j.myc.2013.08.006> (2013).

7. ANEXOS

ANEXO I. Resultado da análise BOX-PCR com 142 isolados de *Trichoderma* provenientes de espécies vegetais da Caatinga.

Isolado	Grupo Box	Origem
TC64	1	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC74	1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC75	1	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC76	1	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC80	1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC86	1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC88	1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC91	1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC93	1	<i>Ananas comosus var. bracteatus</i>
TC97	1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC135	1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC118	1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC109	1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC137	1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC37	1	<i>Ananas comosus var. bracteatus</i>
TC131	1	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC120	1	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC127	1	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC132	1	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC130	1	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC82	1	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC136	1	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC03	2	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC04	2	<i>Ananas comosus var. bracteatus</i>
TC08	2	<i>Bowdichia virgilioides</i>
R16	2	<i>Ananas comosus var. bracteatus</i>
TC46	2	<i>Ananas comosus var. bracteatus</i>
TC43	2	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC45	2	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC56	2	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC47	3	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC09	3	<i>Ananas comosus var. bracteatus</i>
TC48	3	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC53	3	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC54	3	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC55	3	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC63	3	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC78	3	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>

ANEXO I. Continuação...

Isolado	Grupo Box	Origem
TC81	3	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC84	3	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC94	3	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC95	3	<i>Ananas comosus var. bracteatus</i>
TC138	3	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC123	3	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC105	3	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC13	4	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC14	5	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC33	5	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC87	5	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC89	5	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC92	5	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC01	5	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC139	5	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC57	6	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC60	6	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC61	6	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC62	6	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC68	6	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC72	6	<i>Ananas comosus var. bracteatus</i>
TC79	6	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC21	7	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC32	8	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC59	8	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC66	8	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC67	8	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC70	8	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC73	8	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC85	8	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC90	8	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC128	8	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC115	8	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC134	8	<i>Ananas comosus var. bracteatus</i>
TC141	8	<i>Ananas comosus var. bracteatus</i>
TC129	8	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC100	8	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC103	8	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC140	8	<i>Astronium fraxinifolium</i>

ANEXO I. Continuação...

Isolado	Grupo Box	Origem
TC122	8	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC10	9	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC42	9	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC50	9	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC44	9	<i>Ananas comosus var. bracteatus</i>
TC58	9	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC69	9	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC71	9	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC77	9	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC83	9	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC96	9	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC126	9	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC11	10	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC26	10	<i>Ananas comosus var. bracteatus</i>
TC28	10	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC30	10	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC31	10	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC34	10	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC35	10	<i>Ananas comosus var. bracteatus</i>
TC39	10	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC36	10	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC40	10	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC41	10	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC49	10	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC142	10	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC29	11	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC38	11	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC27	12	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC20	13	<i>Bowdichia virgilioides</i>
TC24	13	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>
TC111	13	<i>Ananas comosus var. bracteatus</i>
TC104	14	<i>Ananas comosus var. bracteatus</i>
TC25	14	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC116	14	<i>Ananas comosus var. bracteatus</i>
TC119	14	<i>Astronium fraxinifolium</i>
TC125	14	<i>Astronium fraxinifolium</i>