

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE ISOLADOS DE
Trichoderma spp. NO CONTROLE DO *Colletotrichum*
gloeosporioides, CAUSADOR DA ANTRACNOSE NO
MAMOEIRO**

Autora: Regiane Furtado de Miranda

Orientador: Cirano José Ulhoa

Coorientadora: Francilina Araújo Costa

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL
MARÇO - 2020

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Avaliação do Potencial de Isolados de *Trichoderma*
spp. no Controle do *Colletotrichum gloeosporioides*,
Causador da Antracnose no Mamoeiro**

Autora: Regiane Furtado de Miranda

Orientador: Cirano José Ulhoa

Coorientadora: Francilina Araujo Costa

“Dissertação apresentada, como parte das exigências
para obtenção do título de MESTRE EM
BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia da Universidade Católica Dom
Bosco – Área de concentração: Biotecnologia”

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL
MARÇO – 2020

M672a Miranda, Regiane Furtado de
Avaliação do potencial de isolados de *Trichoderma*
spp. no controle do *Colletotrichum gloeosporioides*,
causador da antracnose no mamoeiro/ Regiane Furtado
de Miranda, sob orientação do Professor Dr. Cirano
José Ulhoa e coorientadora da Professora Dra. Francilina
Araújo Costa
62 p.: il.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -Universidade
Católica Dom Bosco, Campo Grande-MS, 2020
Bibliografia: p. 1 a 48

1. Controle biológico. 2. Hidrólise enzimática. 3.
Pós-colheita. I.Ulhoa, Cirano José. II.Costa, Francilina
Araújo. III. Título.

CDD: 660.6

“Avaliação do Potencial de Isolados de *Trichoderma* ssp. no controle da Antracnose *Colletotrichum gloeosporioides* no mamoeiro”

Autora: Regiane Furtado de Miranda

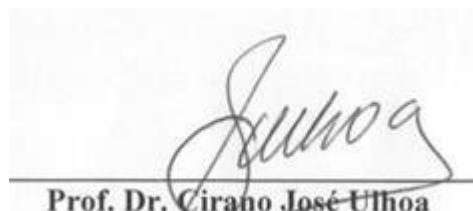
Orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

Coorientadora: Profa. Dra. Francilina Araújo Costa

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia.

APROVADO em 31 de março de 2020.



Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa- UCDB Prof.

Dr. Francilina Araújo Costa-UCDB

Prof. Dr. Ludovico Migliolo - UCDB

Prof. Dr. Felipe André Sganzerla Graichen- UEMS

Epígrafe

*“Não importa quais desculpas, eu preciso de coragem agora,
pois, mesmo que não sonhe, estou torcendo pelo meu sonho.”*

Gaho

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer a Deus, por ter me dado a vida e junto com ela a oportunidade de aproveitar de muitos momentos que fizeram ser quem sou hoje.

Aos meus pais Maria Idonei Custódio Furtado e Vanderlei de Lima Miranda, em especial a minha mãe que não mede esforços para que meus sonhos sejam realizados, e a todo o apoio que sempre me deu e nunca me permitir desistir. Ao meu pai pela paciência e sabedoria para me acalmar nos meus momentos de desespero.

As minhas irmãs, Ana Paula Miranda e Lucineia Miranda, que estiveram ao meu lado em todos os momentos da minha vida e sempre dispostas a me ajudarem, a me apoiarem, a surtarem comigo, a me deixarem feliz, não tenho palavras para descrever a nossa compreensão e o amor que temos envolvido, *in memoria*, Vanderlei Miranda que enquanto pode nunca deixou de me apoiar. E claro a minha sobrinha Nicole Fernando de Miranda Arruda que compartilhou os momentos difíceis e ajudou a torná-los mais leves, da nossa maneira.

Aos meus orientadores, que carinhosamente chamo de “pais” Dr Cirano Jose Ulhoa e Dr^a Francilina Araújo Costa, pela oportunidade de chegar até este momento, pela paciência e a disponibilidade de tempo para me ensinarem e tirarem minhas dúvidas.

A minhas amigas da Michele Leite e Victória Targa que passaram horas de laboratório, trocando dificuldades e outros “perrengues”, as inúmeras batatas fritas a qualquer hora dia, amizade que surgiu e se fortaleceu quando achei que não teria ninguém no mestrado para me fazer companhia no laboratório. A Stephany Santos que mesmo de longe não me abandou e sempre estivemos uma do lado da outra compartilhando as dificuldades da vida e da pós graduação.

A Ana Carolina da Costa Ortiz por disponibilizar o tempo para me ensinar e se tornar alguém que pretendo levar para vida toda, que além de ser sempre solicita aos meus pedidos, também está sempre disposta a aconselhar e compartilhar sobre a vida.

A equipe do Biossaúde sempre prontos a ajudar, em especial ao Willow Marques que apesar da sua “sinceridade” nos mais diversos momentos se tornou um amigo indispensável.

A UCDB pela bolsa oferecida que me permitiu desenvolver este projeto e a realizar este sonho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
Autora: Regiane Furtado de Miranda Orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa	4
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1 A cultura do mamoeiro e a doença antracnose na pós-colheita.....	4
3.2 <i>Trichoderma</i> spp. como agente de controle biológico	8
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Microrganismos utilizados e condições de cultivo	14
4.2 Teste de pareamento	15
4.3 Obtenção de micélio de <i>C. gloeosporioides</i>	16
4.4 Teste de avaliação do efeito de metabólitos voláteis	16
4.5 Teste de avaliação do efeito de metabolitos não voláteis	17
4.6 Produção de enzimas pelos isolados de <i>Trichoderma</i> app.	18
4.7 Ensaios enzimáticos.....	18
4.7.1 Dosagem de proteínas totais	18
4.7.2 β-1,3-glucanase	18
4.7.3 N-acetilglicosaminidase (NAGase) e Fosfatase ácida	19
4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1 Teste de antagonismo (Pareamento)	22

5.2	Teste de avaliação do efeito de metabólitos voláteis	25
5.3	Avaliação do efeito de metabolitos não voláteis	27
5.4	Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas.....	34
5.5	Avaliação por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	37
6.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	39
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação dos isolados de <i>Trichoderma</i>	14
Tabela 2. Escala de notas para o Teste de pareamento.....	15
Tabela 3. Potencial antagônico de <i>Trichoderma</i> frente ao crescimento de <i>C. gloeosporioides</i> segundo a nota na escala de Bell et al. (1982), ao 7º dia de cultivo em meio BDA	24
Tabela 4. Crescimento micelial de colônias (cm) de <i>C. gloeosporioides</i> submetidas a efeito de metabólitos voláteis produzidos in vitro por isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	27
Tabela 5. Teste de inibição de crescimento micelial submetido a ação de metabolitos não voláteis termoestáveis e metabolitos não voláteis de isolados de <i>Trichoderma</i> spp., com crescimento em meio com Micélio Macerado (MM) de <i>C. gloeosporioides</i> , após 7 dias de crescimento.....	32
Tabela 6. Teste de inibição de crescimento micelial submetido a ação de metabolitos não voláteis termoestáveis e metabolitos não voláteis de isolados de <i>Trichoderma</i> spp., com crescimento em meio com Micélio Macerado (MM) de <i>C. gloeosporioides</i> , após 7 dias de crescimento.....	33
Tabela 7. Atividade enzimática produzida pelos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. com micélio macerado de <i>C. gloeosporioides</i>	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Antracnose apresenta sintomas expressivos e diagnóstico visível. (A) Lesões por <i>C. gloeosporioides</i> em frutos do mamão. (B) <i>C. gloeosporioides</i> crescido em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar).....	5
Figura 2. Ciclo da doença causadas por <i>Colletotrichum</i> spp. Adaptado de Agrios 2005.	6
Figura 3. Características culturais de isolados de diferentes espécies de <i>Trichoderma</i> , em meio de cultura BDA. (A) <i>T. spirale</i> . (B) <i>T. asperellum</i> . (C) <i>T. koningii</i> . (D) <i>Trichoderma</i> spp. Cedido por Lima 2002.	9
Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura da ação micoparasítica de <i>T. harzianum</i> sobre <i>R. solani</i> . A, B, correspondem a interação entre os isolados de <i>T. harzianum</i> ALL-23, ALL-40, ALL-41, respectivamente. Cedida por Lima 2002.	10
Figura 5. Antagonismo de isolados de <i>Trichoderma</i> contra <i>C. gloeosporioides</i> por meio do teste de culturas pareadas ao 7º dia de cultivo, o fungo na parte inferior da placa é o <i>Trichoderma</i> e o fungo presente na parte superior da placa é o <i>C. gloeosporioides</i> . Isolado (A) AB 102, (B) AB 102, (C) TC 101, (D) CS 101, (E) AB 103, (F) AM 104, (G) T 00, (H) ALL 42, (I) PP 101, (J) B 201, (K) T 29	23
Figura 6. Efeito de metabolitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp., no crescimento do <i>C. gloeosporioides</i> . (A) Isolado de <i>C. gloeosporioides</i> , (B) B201, (C) CS101, (D) T00, (E) placa controle (F), PP101, (G) AM104, (H) AB103.....	26
Figura 7. Inibição de crescimento micelial submetido a ação de MNVT pelos isolados de <i>Trichoderma</i> spp., crescimento em meio BDMCG. Isolado (1) B201, (2) CS101, (3) T00, (4) PP101, (5) AM104, (6) AB103, (7) AB102, (8) ALL42, (9) TC101, (10) T29, (C) placa controle.	29
Figura 8. Inibição de crescimento micelial submetido a ação de MNV pelos isolados de <i>Trichoderma</i> spp., crescimento em meio BDMCG. Isolado B201 (1), CS101 (2), T00 (3), PP101 (4), AM104 (5), AB103 (6), AB102 (7), ALL42 (8), TC101 (9), T29 (10), placa controle (C).	30

Figura 9. Inibição de crescimento micelial submetido a ação de MNVT pelos isolados de <i>Trichoderma</i> spp., crescimento em meio caldo BD. Isolado (1) B201, (2) CS101, (3) T00, (4) PP101, (5) AM104, (6) AB103, (7) AB102, (8) ALL42, (9) TC101, (10) T29, (C) placa controle.....	30
Figura 10. Inibição de crescimento micelial submetido a ação de MNV pelos isolados de <i>Trichoderma</i> spp., crescimento em meio BD. Isolado (1) B201, (2) CS101, (3) T00, (4) PP101, (5) AM104, (6) AB103, (7) AB102, (8) ALL42, (9) TC101, (10) T 29, (C) placa controle.....	31
Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura de interações do fitopatógeno <i>C. gloeosporioides</i> imerso em suspensão enzimática dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. (A) Controle, (B) AM 104, (C) CS 101, (D) ALL 42, (E) T 00, (F) AB 103. Escala das imagens na barra no canto esquerdo de cada imagem, 5 µm.	38

RESUMO

A antracnose é uma das principais doenças de pós-colheita em cultura do mamão no Brasil, doença causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* com relatados de perdas de até 40% na produção nacional. A prevenção da antracnose é realizada pelo tratamento preventivo com fungicidas e na conservação em pós colheita o tratamento térmico ou por biofilmes. Esse trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de isolados de *Trichoderma* spp., no controle biológico de *C. gloeosporioides*. Fungos do gênero *Trichoderma* são conhecidos pelo seu potencial como agentes de controle biológico dos mais diversos fitopatógenos. Os mecanismos de ação destes fungos envolvem a competição por nutrientes e espaço, micoparasitismo, produção de metabolitos voláteis e não voláteis e pela produção de enzimas hidrolíticas. No teste de pareamento os isolados CS101, AMA104, TC10 e AB103 apresentaram uma alta inibição do crescimento micelial do fitopatógeno. O isolado AB103 apresentou o maior halo de inibição no teste de metabolitos voláteis quando comparado com os demais isolados. Nos testes de metabolitos não voláteis foram utilizadas amostras de sobrenadante de cultura filtradas ou autoclavadas, denominadas de metabólitos não voláteis (MNV) e metabólitos não voláteis termoestáveis (MNVT), respectivamente. Todos os isolados produziram metabólitos MNV e MNVT quando crescidos em meio caldo BD. Entretanto, o isolado T29 apresentou a maior inibição de crescimento micelial do fitopatógeno em ambas condições analisadas (MNV e MNVT). Em meio caldo BD contendo micélio macerado de *C. gloeosporioides* (BDMCG) como fonte de N e C, o isolado T29 apresentou a maior inibição de crescimento micelial do fitopatógeno em ambas condições (MNV e MNVT). A atividade das enzimas hidrolíticas relacionadas com o micoparasitismo foram determinadas no sobrenadante de cultura dos isolados crescidos no meio BDMCG. O isolado CS101 foi o melhor produtor da quitinase e N-acetilglicosaminidase. A melhor produção de β-1,3-glucanase foi observado nos

isolados AM104, B201 e ALL42. Os isolados ALL42 e T00 foram os maiores produtores de fosfatase ácida e protease, respectivamente. A relação entre a teste de pareamento, produção de enzimas e metabólitos secundários são discutidos neste trabalho. Os resultados obtidos neste trabalho permitem uma melhor compreensão dos mecanismos de ação de isolados de *Trichoderma* frente ao *C. gloeosporioides*.

Palavras chave: Controle Biológico, Enzimas hidrolíticas, Metabolitos secundários, Micoparasitismo, Pós-colheita.

ABSTRACT

Anthracnose is one of the main post-harvest diseases in papaya culture in Brazil, which is caused by the fungus *Colletotrichum gloeosporioides* responsible for reported losses of up to 40% in national production. The precaution against anthracnose is carried out through preventive treatment with fungicides and in post-harvest conservation, heat treatment or biofilms. This work aims evaluated the potential of isolated from *Trichoderma* spp., in the biological control of *C. gloeosporioides*. Fungi of the genus *Trichoderma* are known for their potential as biological control agents for the most diverse phytopathogens. The mechanisms of action of these fungi involve competition for nutrients and space, mycoparasitism, production of volatile and non-volatile metabolites and the production of hydrolytic enzymes. In the pairing test the isolates CS101, AMA104, TC10 and AB103 showed a high inhibition of the mycelial growth of the phytopathogen. The isolate AB 103 presented the greatest halo of inhibition in the test of volatile metabolites when compared with the other isolates. In the tests of non-volatile metabolites, samples of filtered or autoclaved culture supernatants were used, called non-volatile metabolites (MNV) and non-volatile thermostable metabolites (MNVT), respectively. All isolates produced MNV and MNVT metabolites when grown in BD broth. However, isolate T29 showed the greatest inhibition of mycelial growth of the phytopathogen in both conditions analyzed (MNV and MNVT). In BD broth containing macerated mycelium of *C. gloeosporioides* (BDMCG) as a source of N and C, isolate T29 presented the greatest inhibition of mycelial growth of the phytopathogen in both conditions (MNV and MNVT). The activity of hydrolytic enzymes related to mycoparasitism was determined in the culture supernatant of the isolates grown in the BDMCG. The CS101 isolate was the best producer of chitinase and N-acetylglucosaminidase. The best production of β -1,3-glucanase was observed

in isolates AM104, B201 and ALL42. The ALL42 and T00 isolates were the major producers of acid phosphatase and protease, respectively. The relationship between the pairing test, enzyme production and secondary metabolites are discussed in this work. The results obtained in this work allow a better understanding of the mechanisms of action of *Trichoderma* isolates against *C. gloeosporioides*.

Keywords: Biological Control, Hydrolytic enzymes, Secondary metabolites, Mycoparasitism, Postharvest.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do mamoeiro (*Carica papaya L.*) é muito comum em quase toda a América Tropical, sendo uma das frutíferas mais cultivadas nas regiões subtropicais e tropicais do mundo (SERRANO; CAETTANO, 2010). O Brasil é o segundo maior produtor de mamão em nível mundial, com área de produção de cerca de 27.250 ha e uma produção de 1.060.392 toneladas no ano de 2018 (IBGE 2019).

O mamoeiro é do tipo aclimatário, onde a maturação dos frutos continua após a sua colheita, apresentando assim uma predisposição a um grande número de doenças que se manifestam na pós-colheita, embora as infecções ocorram na pré-colheita (JACOMINO et al., 2002; FONTES et al., 2008). A principal doença pós-colheita do mamão é a antracnose, causada pelo agente *Colletotrichum gloeosporioides* que causam perdas e prejuízos de importância econômica na comercialização dos frutos (ANDRADE; VIEIRA, 2016).

O fungo *C. gloeosporioides* produz lesões deprimidas, com coloração acastanhada com a bordas marrom-claro nos frutos. A contaminação pelo fungo pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento dos frutos, porém a doença só se manifesta quando o fruto amadurece (ANDRADE; VIEIRA, 2016; AYÓN-REYNA et al., 2017). Os frutos contaminados acabam se tornado impróprios para o consumo e consequentemente para sua comercialização (CIA; BENATO, 2005).

As perdas causadas pela antracnose no mamão podem chegar de 25 a 40% na pós-colheita, chegando a ocasionar prejuízos da ordem de US\$ 28 milhões nos principais países exportadores (RIBEIRO et al. 2016). Atualmente, o combate desse patógeno é realizado através de aplicações de fungicidas, um processo eficiente, mas oneroso para os produtores agrícolas, tóxico ao homem e extremamente poluente. Contudo, o aumento de resistência dos fitopatógenos, assim como a comprovação dos efeitos nocivos desses produtos ao meio ambiente e à saúde demandaram novas alternativas de controle (ALI et al., 2015; PERUMAL e al., 2016). Uma das alternativas à aplicação de fungicidas é o controle biológico, através da utilização de

microrganismos ou de suas moléculas biologicamente ativas que atuem contra o fitopatógeno evitando seu estabelecimento na planta hospedeira.

Fungos do gênero *Trichoderma* são saprófitas que compõem microflora do solo, sendo amplamente utilizados em todo mundo como agentes de controle biológico de fungos fitopatogênicos de solo, folhas e frutos. Os mecanismos de controle biológico destes fungos incluem competição por nutrientes e espaço, produção de metabolitos secundários (voláteis e não voláteis) e micoparasitismo através da produção de enzimas hidrolíticas degradadoras de parede celular de fitopatógenos. Além disto, estes fungos trazem outros benefícios para as plantas tais como promoção de crescimento, indução de mecanismos de defesa e solubilização de fosfato (SILVA et al., 2019; BONONI et al., 2020).

Os resultados da utilização de *Trichoderma* spp. como agente de controle biológico em condições de campo têm mostrado satisfatórios, e em consequência disto vários produtos comerciais a base deste fungo já são comercializados no Brasil e no mundo. Atualmente o mercado brasileiro de biológicos representa 2% das vendas de defensivos, porém a estimativa para o ano de 2020 é que ocorra o aumento de 15%, movimentando cerca de US\$ 800 milhões em toda a América Latina (EMBRAPA, 2019). Trata-se de um mercado significativo onde grande parte dos microrganismos comercializados são do gênero *Trichoderma*. Sendo assim, o isolamento, identificação e avaliação do potencial de novos isolados de *Trichoderma* como agente de controle biológico, poderá contribuir para o desenvolvimento de novos produtos à base destes fungos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de novos isolados de *Trichoderma* spp. do cerrado no controle de *C. gloeosporioides* através de estudos dos mecanismos de ação como potencial antagônico, produção de metabolitos voláteis e não voláteis e produção de enzimas hidrolíticas envolvidas no micoparasitismo.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial antagônico dos isolados de *Trichoderma* frente ao fitopatógeno *C. gloeosporioides*;
- Avaliar o potencial antagônico dos isolados de *Trichoderma* contra o fungo *C. gloeosporioides* por meio da produção de metabolitos voláteis e não voláteis;
- Avaliar a atividade enzimática das enzimas: N-acetil-glicosaminidase (NAGase), quitinase, β -1,3-glucanase, fosfatase ácida e protease, produzidas pelos isolados de *Trichoderma* na presença de micélio macerado de *C. gloeosporioides*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A cultura do mamoeiro e a doença antracnose na pós-colheita

A cultura do mamoeiro (*Carica papaya* L.) é muito comum em quase toda a América Tropical, devido a sua adaptabilidade ao clima, sendo uma das frutíferas mais cultivadas nas regiões subtropicais e tropicais do mundo, e é uma espécie e grande importância econômica e social nestas regiões (SERRANO; CAETTANO, 2010). O Brasil obteve uma área de produção de cerca de 27.250 ha e uma produção de 1060.392 toneladas no ano de 2018, sendo o segundo maior produtor de mamão em nível mundial (Embrapa 2019).

O fruto do mamão tem uma maior demanda no mercado interno, sendo comercializado e consumido in natura, sendo utilizado em geleias, doces, sucos entre outros, também é utilizado na produção de produtos industriais e farmacêuticas (RIGOTI, 2017). O mamoeiro é do tipo aclimatário, onde a maturação dos frutos continua após a sua colheita, apresentando assim uma predisposição a um grande número de doenças que se manifestam na pós-colheita, embora as infecções ocorram na pré-colheita (JACOMINO et al., 2002; FONTES et al., 2008).

Os problemas com as doenças na cultura do mamoeiro ocorrem em todos os locais em que são produzidos. Quando exposto a um ambiente favorável, hospedeiro suscetível, as doenças fúngicas acometem a cultura (CROPLIFE 2019). Os problemas fitossanitários são responsáveis por cerca de 25 a 40% dos danos na pós-colheita do mamão, chegando a ocasionar prejuízos de US\$ 28 milhões nos principais países exportadores, a antracnose é responsável por cerca de 90% destas perdas. As perdas pós-colheita do mamão podem ter as mais diversas causas, sendo as podridões pedunculares um dos problemas mais sérios causados pelos fitopatógenos (VALENZUELA et al., 2015; RIBEIRO et al. 2016).

Uma das principais doenças do mamão é a antracnose que é causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* causando perdas e prejuízos na comercialização dos

frutos do mamão. O manejo da doença começa no campo, já que a infecção ocorre normalmente na floração e permanece até o amadurecimento a colheita dos frutos, que aparentemente estão sadios, pois a penetração do patógeno se dá via epiderme, ferimentos, aberturas naturais e/ou ainda por conta de danos mecânicos ocasionados durante a colheita, beneficiamento, transporte ou no armazenamento (SIQUEIRA JUNIOR et al. 2011; FISCHER et al., 2017).

O *C. gloeosporioides* produz lesões deprimidas, com coloração acastanhada com a bordas marrom-claro nos frutos de mamão (Figura 1). A infecção ocasionada pelo fitopatógeno pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento dos frutos, porém a doença só se manifesta quando o fruto amadurece (ANDRADE; VIEIRA, 2016; AYÓN-REYNA et al., 2017).

À medida que os frutos amadurecem, vão surgindo pequenos pontos pretos e manchas vermelho-arroxeadas na casca dos frutos, que vão crescendo e formando manchas deprimidas que podem medir cerca de 5 cm de diâmetro, evoluindo para manchas necróticas. É formado um halo de tecido aquoso em torno das manchas e no centro ocorre uma coloração diferente, produzindo no centro das lesões massas de esporos de cor laranjada ou rosada, frequentemente arranjadas em anéis concêntricos. Na área infectada o tecido interno é firme, possuindo uma coloração branca-acinzentada, se tornando marrom posteriormente. Quando ocorre em grandes quantidades, as manchas se agregamumas às outras e espalham-se por toda a superfície do fruto, podendo penetrar na polpa do fruto, causando a podridão-mole, tornando o fruto inviável para consumo (EMBRAPA, 2009; MOURA et al., 2013; CORDEIRO et al., 2016).

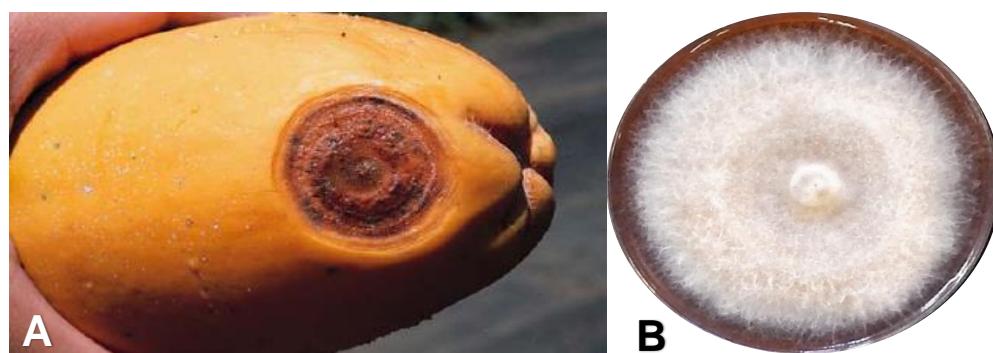


Figura 1. Antracnose apresenta sintomas expressivos e diagnóstico visível. (A) Lesões por *C. gloeosporioides* em frutos do mamão. (B) *C. gloeosporioides* crescido em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar).

O ciclo da antracnose é iniciado no processo de disseminação, que ocorre com a liberação de conídios que estão na presença de um filme de água, pois os conídios são envoltos por uma camada de massa mucilaginosa, que quando se aglutinam inibem a sua germinação. Os esporos produzidos na superfície do hospedeiro têm sua disseminação por chuvas acompanhadas de ventos, sendo desta forma o principal fator de disseminação entre as culturas e para dar início no ciclo do fitopatógeno. Após a disseminação, é dado o início do ciclo da doença de forma ativa na germinação dos esporos e na penetração das hifas. A penetração das hifas ocorre por meio de injúrias mecânicas, fermentos causados por insetos nos frutos, por fatores climáticos ou pelo manejo, sendo de extrema importância para que a doença se desenvolva uma vez que o fruto foi danificado (Figura 2) (AGRIOS, 2005; GASPAROTTO et al., 2014).

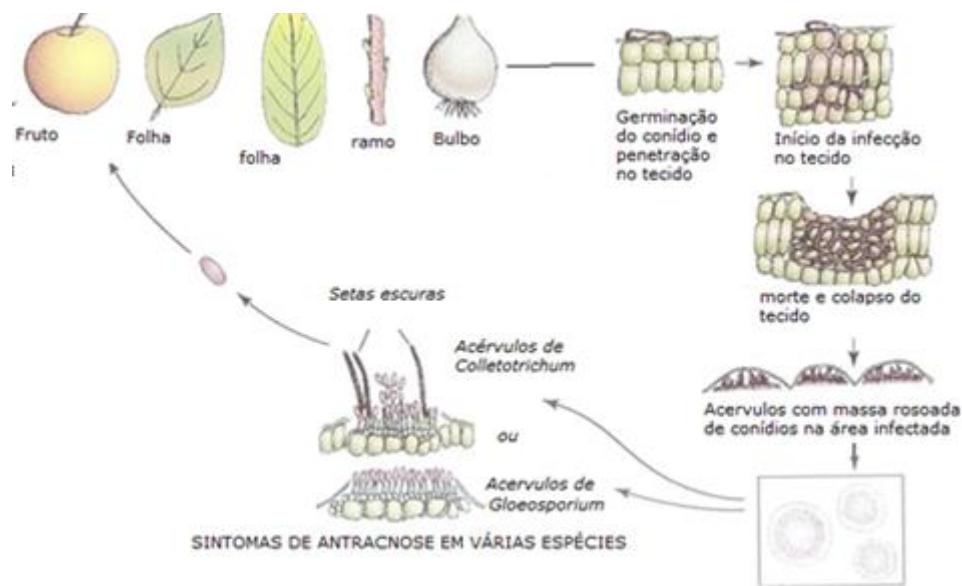


Figura 2. Ciclo da doença causadas por *Colletotrichum* spp. Adaptado de Agrios 2005.

O controle da antracnose no mamão em pré-colheita é realizado de forma massiva e frequente por meio da aplicação de fungicidas, por serem eficazes, de baixo custo e de fácil aplicabilidade. Porém, o uso indiscriminado e intensivo leva a consequências negativas, como principalmente a resistência dos fitopatógenos aos fungicidas, como também impactos ao meio ambiente e consequentemente toxicidade a saúde humana (VALENZUELA et al., 2015). Deste modo a ANVISA proibiu em 2016 a utilização do princípio ativo Prochloraz em pesticidas, por meio de resultados de

uma reavaliação toxicológica de acordo com os novos requisitos e diretrizes de avaliação toxicológica (ANVISA, 2016).

Por esta razão, estão sendo adotadas formas alternativas de controle da antracnose, levando em consideração métodos que impeçam a contaminação dos frutos por substâncias tóxicas e que mantenham a qualidade do produto final (GUPTA et al., 2015).

Para controlar a antracnose na pós-colheita no mamão é realizada geralmente o tratamento térmico com a imersão dos frutos, com 50% de maturação, em água por 20 minutos a uma temperatura e 48-49 °C, seguida de uma segunda imersão por mais 20 minutos a 14 °C. É recomendado realizar uma aplicação de cera e fungicidas posteriormente para garantir uma maior sobrevivência dos frutos. Para aumentar a eficácia no controle da antracnose na pós-colheita é recomendado ainda a utilização de atmosfera controlada e refrigeração (CARNELOSSI et al., 2009; CIA et al., 2010).

Para garantir a conservação na pós-colheita dos mais diversos frutos, uma alternativa que vem sendo estudada é a utilização de biofilmes com quitosana (um polissacarídeo natural comestível que é extraído do exoesqueleto de crustáceos). Este composto pode prolongar a vida pós-colheita dos frutos, pois diminui a perda de água e reduz a taxa de respiração por formar um revestimento semipermeável. Em demonstrações *in vitro* com a utilização de quitosana, a mesma mostrou possuir atividade antibacteriana e antifúngica, por ter um potencial de inibição do crescimento micelial de alguns fungos, como por exemplo *Rhizopus stolonifer* (CIA et al., 2010; HERNÁNDEZ et al., 2011).

As desvantagens na utilização dos métodos tradicionais no controle de doenças fúngicas e a preocupação da população com a saúde e o meio ambiente, meios alternativos de controle tem sido uma grande preocupação de pesquisadores e indústria. Uma das alternativas é a utilização de microrganismos antagonistas tais como fungos e bactérias (AGUADO; RASCÓN; LUNA, 2012). Dentre os fungos, o gênero *Trichoderma* tem sido um dos mais estudados devido a sua capacidade de produzir enzimas hidrolíticas e metabólitos secundários que atuam como agentes de controle biológico (BATISTA et al., 2011).

3.2 *Trichoderma* spp. como agente de controle biológico

A definição de controle biológico se dá com Cook e Baker (1983), como controle de um determinado microrganismo através de ação direta de outro microrganismo antagônico, que pode atuar como parasita, por meio de antibiose, competição, hipovirulência e ou predação. O controle biológico é um método baseado no controle de pragas agrícolas, insetos transmissores de doenças, fungos, vírus e bactérias. São utilizados organismos vivos como inimigos naturais no controle biológico para diminuir o impacto ou diminuir a densidade populacional de um organismo patogênico, tornando-o menos agressivo e prejudicial ao meio em que se encontram (FRIGHETTO, 2000; BENÍTEZ et al., 2004; EMBRAPA, 2006; LORITO et al., 2010).

No Brasil existem diversos produtos biológicos disponíveis no mercado, como extratos vegetais e microrganismos antagonistas tais como fungos do gênero *Trichoderma* (SANTOS et al., 2015). O gênero *Trichoderma* sp. são mundialmente utilizado no controle biológico nas principais doenças de diversas culturas, assim como para os mais diversos tipos de fitopatógenos e nematóides (CARVALHO et al., 2011; SINGH ; SCWARTZ, 2011; AMIRA et al., 2018; FRACETO et al., 2018; KIRIGA et al., 2018). Isso se deve ao fato destes fungos serem capazes de induzir uma combinação de mecanismos de ação antagônicas, como micoparasitismo, competição por nutrientes, produção de metabolitos secundários antifúngicos, produção de enzimas hidrolíticas degradadoras de parede celular de fitopatógenos (GOMES et al., 2015). Além disto, é descrito que estes fungos trazem outros benefícios para as plantas tais como promoção de crescimento, indução de mecanismos de defesa e solubilização de fosfato (SILVA et al., 2019; BONONI et al., 2020).

O gênero *Trichoderma* é um fungo de vida livre ou presentes na rizosfera das plantas, assim como também são encontrados no solo. Normalmente são reconhecidos por suas características macroscópicas como rede micelial aérea hialina, septada, esparsa e bastante ramificada, crescimento rápido em cultura e pela produção de pústulas conidiógenas diferenciais (verdes ou brancas) (Figura 3). Para a diferenciação das espécies são utilizados o tamanho e a estrutura dos conidióforos, que podem ser elipsóides, elíptico-cilíndricos, ovoides e subglobosos, produzidos em série e acumulados no ápice das fiálide formando estrutura subglobosas ou globosas com um diâmetro menor que 15 µm. As colônias podem ser ligeiramente rugosas ou

lisas, com coloração variando de verde-escuro a amarelo e hialinos (CORABI-ADELL, 2004; CARRERAS-VILLASEÑOR et al., 2012). Nos últimos anos marcadores moleculares específicos têm sido usados para diferenciar entre as espécies de *Trichoderma* (LOPES et al., 2012).

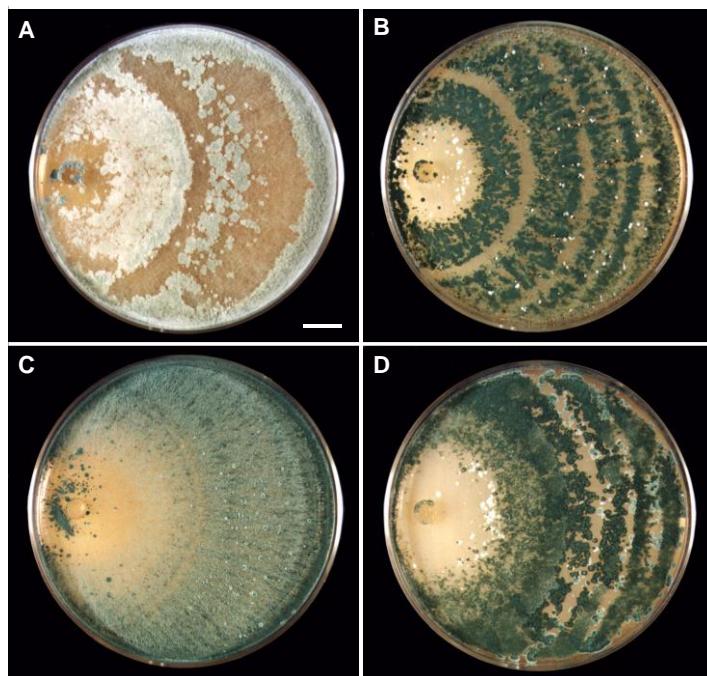


Figura 3. Características culturais de isolados de diferentes espécies de *Trichoderma*, em meio de cultura BDA. (A) *T. spirale*. (B) *T. asperellum*. (C) *T. koningii*. (D) *Trichoderma* spp. Cedido por Lima 2002.

O fungo *Trichoderma* atua no controle do crescimento de diversos fitopatógenos por diferentes mecanismos de ação, sendo um deles conhecido como micoparasitismo que é o mais estudado e mais importante entre os mecanismos de ação no controle biológico. O micoparasitismo acontece por meio do enovelamento das hifas no hospedeiro (Figura 4), permanecendo preso por ganchos emitidos pelas hifas, e a penetração na parede celular se dá por meio de secreção de enzimas líticas que acabam desestabilizando a parede celular dos fungos fitopatógenos (KUBICEK, 2001; CHENG et al., 2012).

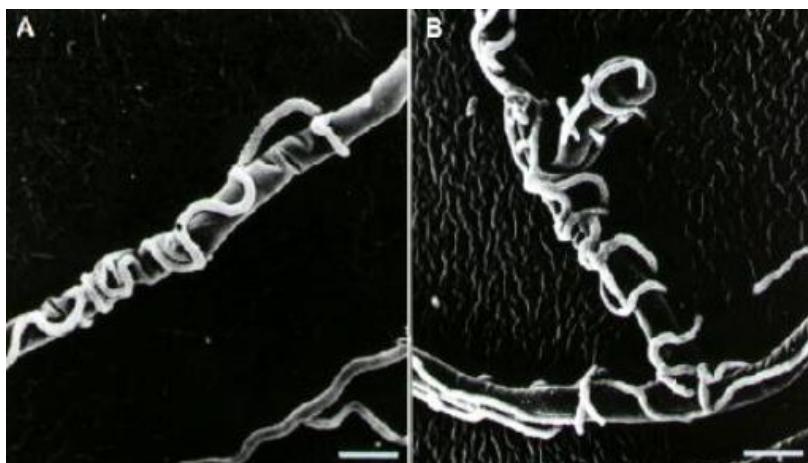


Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura da ação micoparasítica de *T. harzianum* sobre *R. solani*. A, B, correspondem a interação entre os isolados de *T. harzianum* ALL-23, ALL-40, ALL-41, respectivamente. Cedida por Lima 2002.

Acredita-se que as espécies de *Trichoderma* possuem uma grande capacidade de micoparasitismo por apresentarem uma variedade de metabolitos secundários (MUKHERJEE et al., 2012). O termo “metabolitos secundários” relaciona diversos compostos químicos envolvidos nas vias de sinalização, desenvolvimento e na interação com outros organismos, em geral, o fungo do gênero *Trichoderma* produzem metabolitos secundários que estão frequentemente ligados a algumas atividades que acontecem no metabolismo fúngico (CHIANG et al., 2009). A produção de metabolitos secundários exerce um papel importante na colonização e na conquista do ambiente, pois, a produção destes metabolitos está relacionada com a alta capacidade das espécies de *Trichoderma* em parasitar os mais diferentes patógenos (O'BRIEN; WRIGHT, 2011; MUKHERJEE et al, 2012).

Os metabolitos secundários quando produzidos podem estar presente em duas rotas de síntese dos fungos, onde uma é a alteração de qualquer metabolito primário, como de aminoácidos e Acetil Coenzima, pelas vias de policetídeo sintase, do mevalonato, entre outras (VINALE et al., 2014); e a outra rota se dá pelos complexos enzimáticos que recebem o nome de sintetasas não ribossomais, também conhecidos como *peptaibols*, que são peptídeos antibióticos (MUKHERJEE et al., 2012), que é um exemplo de grupo de metabolitos secundários que são produzidos pelo gênero *Trichoderma* spp. Dentre os metabolitos produzidos por fungos do gênero *Trichoderma* spp., podemos citar moléculas tais como quinonas, pironas, terpenóides, esteroides, gliotoxinas e gliovirinas (RAMADA et al., 2019, cap. 5).

Na agricultura o *Trichoderma* é conhecido pela eficiência no controle das mais diversas doenças em plantas, assim como também um ótimo agente de controle biológico. Tal controle se dá pelas redes de ações envolvendo o *Trichoderma* spp. e o fitopatógeno atacado (MEYER et al., 2019). No contato inicial do *Trichoderma* com o fitopatógeno é necessário a secreção de metabolitos secundários voláteis, pois assim ocorreria o estímulo para que ocorra o micoparasitismo (ZEILINGER; OMANN, 2007).

A parede celular dos fungos tem sua composição química bastante complexa, sendo constituída por polissacarídeos, ligados ou não a lipídeos ou a proteínas, íons inorgânicos e polifosfatos, que formam a matriz de cimentação. Proteínas, glucanas e quitina são compostos encontrados mais frequentemente, porém as quantidades dos mesmos vão variar de acordo com as espécies dos fungos (ADAMS, 2004). Segundo Bartnicki-Garcia (1968), a parede celular dos fungos fitopatógenos são na sua maioria complexa, por terem um esqueleto estrutural de quitina em camadas ordenadas e β -1,3-glicanas entre tais camadas, que formam uma matriz compacta. Também tem a presença de lipídeos e proteínas, sendo que em algumas vezes podem ser constituídas por pigmento, melanina e outros.

Algumas enzimas hidrolíticas estão envolvidas nas atividades de biocontrole por degradarem a parede celular dos fungos fitopatogênicos. No processo de micoparasitismo é fundamental a produção das enzimas, fosfatases, proteases, quitinases, β -1,3-glucanases e N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAGase) (KUBICEK, 2001; CHEN et al., 2015).

O polissacarídeo β -1,3-glicano é o segundo polímero fibrilar mais encontrado na parede celular dos fungos (GRUBER; SEIDL-SEIBOTH, 2012). A cadeia β -1,3-glucana é hidrolisada pela enzima β -1,3-glucanase (EC. 3.2.1.39), um polímero que é constituído de resíduos de D-glicose que são ligados em uma configuração β -1,3. Existem dois tipos de mecanismo para hidrolisar o substrato por estas enzimas, as exo- β -1,3-glucanases que sequencialmente hidrolisam as ligações β -1,3 glicosídicas a partir das extremidades não redutoras, onde o produto final é a glicose. Porém, as endo- β -1,3- glucanases clivam as ligações de β -1,3 na cadeia polissacarídica, liberando pequenas cadeias de glicose e oligossacarídeos como produto final. Estas enzimas são muito importantes no mecanismo de ação micoparasitismo, devido à sua alta expressão quando na presença de quitina na parede celular dos fitopatogênicos (AIT-LAHSEN et al., 2001; VINALE et al., 2008; GRUBER ; SEIDL-SEIBOTH, 2012).

As quitinases (EC. 3.2.1.14) estão entre as enzimas que degradam a parede celular. Estão envolvidas no processo de antagonismo e apresentam uma importância no controle biológico, tornando-se interessante para estudos (VITERBO et al., 2002; MARCELLO et al., 2010; MONTEIRO et al., 2010). Estas enzimas tem uma função fisiológica nos fungos no processo de crescimento celular, remodelamento de parede celular e também no micoparasitismo (GRUBER; SEIDL-SEIBOTH, 2012). Inbar e Chet (1995), mostraram que após o contato físico do fungo antagonista com lectinas da parede celular do alvo ocorre a secreção de um complexo enzimático rico em quitinases e outras hidrolases. Com o ataque inicial das enzimas sobre a parede celular do fitopatógeno, ocorre a liberação de oligômero de quitina que induzem uma rápida liberação de volumes maiores de quitinases, intensificando o seu ataque (HARMAN, et al. 2004).

N-acetyl- β -D-glicosaminidases (NAGases) (EC.3 .2.1.30) são enzimas conhecidas como quitobiosidases ou hexosaminidases e fazem parte sistema quitinolítico responsável pela hidrólise de quitina e liberação de monômero de N-acetilglicosamina (GlcNAc) (CHEN et al., 2015). Da mesma forma que as quitinase estas enzimas estão relacionadas com a síntese e remodelação de parede celular e micoparasitismo (SLÁMOVÁ et al., 2010; GRUBER; SEIDLSEIBOTH, 2012; ROGG et al., 2012; LANGNER; GÖHRE, 2016). As NAGases fazem o papel de mediadoras no processo de síntese/hidrólise de quitina no decorrer do crescimento dos fungos (ROGG et al., 2012). Outro papel importante destas enzimas é a participação no biocotrole de fitopatógenos, com a liberação de moléculas indutores de genes envolvidos do mecanismo micoparasitismo (HARTL; ZACH; SEIDL-SEIBOTH, 2012; DUBEY et al., 2012).

As proteases (EC. 3.4) são divididas em exopeptidases, que atuam na extremidade da cadeia polipeptídica, e em endopeptidases, atuam clivando ligações no interior da cadeia polipeptídica (MONTEIRO, 2010). Estas enzimas atuam na degradação de proteínas estruturais de parede celular e membrana, desestabilizando a integridade celular dos fitopatógenos, facilitando a penetração e colonização do fungo *Trichoderma*. Estas enzimas podem ser produzidas antes ou durante o contato do *Trichoderma* com o fitopatógeno. Outro papel importante destas enzimas produzidas por *Trichoderma* é a inativação de enzimas produzidas pelos fitopatógenos no decorrer do processo de infecção nas plantas (SUÁREZ et al., 2007; GRUBER; SEIDL-SEIBOTH, 2012).

As enzimas fosfatases (EC 3.1.3.2) são amplamente distribuídas na natureza, e podem ser encontradas nos organismos eucariotos e procariotos (GUIMARÃES et al., 2004). Estas enzimas são responsáveis pela hidrolise de ésteres e anidridos de ácido fosfórico, participando de diversos processos biológicos como sinalização celular, assimilação de fósforo e metabolismo intermediário. Na hidrólise dos ésteres fosfatados produzem o fósforo solúvel, e ainda em baixos níveis de fósforo livre são responsáveis pela mineralização do fosfato orgânico (AOYAMA et al., 2003). Dickman e Tarden (1999) relatam que dependendo do pH estas enzimas podem ser de dois grupos, dependendo do pH: ótimo igual ou superior a 8,0 são as fosfatases alcalinas, pH ótimo igual ou inferior a 6,0 são as fosfatases ácidas. Estas enzimas já foram descritas em fungos do gênero *Trichoderma* e seu papel pode estar relacionado com a competição por fosforo com outros microrganismos no solo (LEITÃO et al., 2010). Entretanto, o seu papel no mecanismo de micoparasitismo ainda é desconhecido.

Este trabalho realizou um levantamento do perfil antagônico de isolados de *Trichoderma* spp. da região do cerrado frente ao fungo *C. gloeosporioides*, um fitopatógeno de grande relevância no cenário agrícola brasileiro, principalmente na cultura de mamão. Algumas características da capacidade de produção de metabólitos secundários (voláteis e não voláteis) e da capacidade micoparasítica dos isolados serão avaliados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos utilizados e condições de cultivo

Foram utilizados 7 isolados nativos de *Trichoderma* de diferentes regiões do estado de Mato Grosso do Sul, nos municípios de Amambai, Aral Moreira, Bandeirantes, Cassilândia, Ponta Porã e Tacuru, onde todos são do bioma do cerrado, e solos anteriormente cultivados com a cultura da soja, e três isolados fornecidos pelo laboratório de Enzimologia (UFG/ICB) (Tabela 1), e um isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* da coleção do laboratório de Microbiologia da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA), em estufa BOD com temperatura de 25 °C em um fotoperíodo de 12 horas.

Tabela 1. Identificação dos isolados de *Trichoderma*.

Cidades	Siglas
Amambai	AB 102
Amambai	AB 103
Aral Moreira	AM 104
Bandeirantes	B 201
Cassilândia	CS 101
Ponta Porã	PP 101
Tacuru	TC 101
Lab. Enzimologia (UFG)	ALL 42
Lab. Enzimologia (UFG)	T 00
Lab. Enzimologia (UFG)	T 29

4.2 Teste de pareamento

O antagonismo dos isolados de *Trichoderma* nativos de regiões do estado de Mato Grosso do Sul contra *C. gloeosporioides* foi avaliado pelo método de culturas pareadas, conforme descrito por Mello et al. (2007). Discos de ágar (10 mm de diâmetro) contendo micélio do *C. gloeosporioides* e dos dez isolados de *Trichoderma* foram retirados de colônias com três dias de cultivo e depositados, em extremidades opostas a 1 cm da borda das placas de Petri contendo meio BDA solidificado. A inoculação foi realizada em intervalos de tempo diferentes, baseando na velocidade de crescimento micelial dos isolados de *Trichoderma* quanto do *C. gloeosporioides*, sendo este último colocado dois dias antes. As placas foram armazenadas a temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Após sete dias de cultivo, foi avaliado o crescimento micelial dos fungos, conforme escala proposta por Bell et al. (1982), modificada (Tabela 2).

Tabela 2. Escala de notas para o Teste de pareamento

Nota	Características
1	<i>Trichoderma</i> ocupando 100% de toda superfície do meio.
2	<i>Trichoderma</i> ocupando 75% da superfície do meio.
3	<i>Trichoderma</i> ocupando 50% da superfície do meio.
4	<i>Trichoderma</i> ocupando 25% da superfície do meio.
5	Ausência de crescimento de <i>Trichoderma</i> , patógeno ocupando toda a superfície do meio.

Os experimentos foram realizados com cinco repetições. Considerou-se o isolado de *Trichoderma* como antagônico ou eficiente quando sua nota era menor ou igual a 3, conforme Louzada et al. (2009). Para este teste foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott (1974), a 5% de probabilidade, empregando-se o programa estatístico Sisvar®.

4.3 Obtenção de micélio de *C. gloeosporioides*

Para obtenção de micélio macerado 10 discos (10 mm) de meio BDA contendo *C. gloeosporioides* foram inoculados em frascos de Erlenmeyer de 1L contendo 300mL de meio MYG (0,5% de extrato de malte; 0,25% de extrato de levedura, 1% de glicose e 2 % de ágar). Os frascos foram incubados em agitação constante de 180 rpm em agitador giratório por 7 dias e 28 °C. O micélio foi coleado por filtração (papel Whatman nº. 4), liofilizado e macerado com nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino. O micélio acerado foi lavado exaustivamente com água destilada para a remoção de resíduos celulares. A dosagem de proteínas (Bradford, 1976) dos resíduos foram feitas como controle. Após as lavagens o micélio de *C. gloeosporioides* foi liofilizado e posteriormente utilizada como fonte de carbono e nitrogênio para crescimento dos isolados de *Trichoderma* spp.

4.4 Teste de avaliação do efeito de metabólitos voláteis

O método baseado em Bharat et al. (1980), consistiu em posicionar fundos de placas de Petri umas sobre as outras, após ter vertido meio BDA solidificado em cada uma delas. Na extremidade inferior da placa, colocou-se os dez isolados de *Trichoderma*, individualmente, e na superior, *C. gloeosporioides*, ambos na forma de disco de ágar (10 mm) contendo micélio. Lateralmente, os fundos foram vedados com filme PVC em seguida, as placas foram incubadas em temperatura de 25°C com fotoperíodo de 12 horas, utilizando o crescimento do controle como referência.

Placas com crescimento apenas de *C. gloeosporioides* foram utilizadas como controle, e após o preenchimento total da placa de Petri pelo micélio do *C. gloeosporioides*, o que aconteceu em aproximadamente 10 a 15 dias, foi realizada a avaliação do efeito de metabólitos voláteis inibindo o crescimento do patógeno nas placas contendo o patógeno e o isolado de *Trichoderma*. Para isso, foi realizada a medição da colônia do patógeno utilizando um paquímetro. Foram utilizadas placas de 9 mm de diâmetro. Quanto menor o diâmetro da colônia do patógeno maior a inibição realizada pelo *Trichoderma*. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento mais um controle. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott (1974), a 5% de probabilidade, empregando-se o programa estatístico Sisvar®.

4.5 Teste de avaliação do efeito de metabolitos não voláteis.

Para a produção de metabólitos não voláteis (MNV) foi utilizado a metodologia descrita por Frighetto e Melo (1995), com modificações na produção dos metabólitos. Para a produção dos MNV foi utilizado o meio caldo BD (Batata, dextrose) sem ou contendo 0,5% de micélio macerado de *C. gloeosporioides* (BDMCG). Frascos de Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio BD ou BDMCG foram inoculados com 3 discos de meio BDA contendo esporos e micélio dos isolados de *Trichoderma*. Após a incubação por 120 horas com agitação (150 rpm) a 28°C, o sobrenadante foi coletado por filtração em papel de filtro (Whatman no 4) e utilizado como fonte de metabólitos não voláteis. Para avaliar se os metabolitos produzidos são sensíveis a temperatura duas metodologias foram usadas. Na primeira, alíquotas de 10 ml de sobrenadante foram adicionados 60 ml de meio BDA e após a autoclavação (20 minutos, a 120°C e 1 atm) vertidos em placas de Petri. Na segunda, 10 ml do sobrenadante foi submetido à filtração (membrana millipore - 0,45 µm), e adicionados a 60 ml de meio BDA previamente autoclavado (20 minutos, a 120°C e 1 atm) e posteriormente vertidos em placas de Petri.

Após a solidificação dos meios, um disco de 5 mm de diâmetro, obtido de colônias ativas de *C. gloeosporioides* foi transferido para o centro de cada placa de Petri contendo o meio específico (BD ou BDMCG). Como testemunhas discos de *C. gloeosporioides* foram transferidos para o meio BDA, sem metabólitos. As placas de Petri foram incubadas em estufa BOD a 27 °C e fotoperíodo de 12 horas. A avaliação foi realizada após sete dias de incubação por meio de medições dos diâmetros da colônia *C. gloeosporioides*, em dois sentidos perpendiculares. Os testes foram realizados em delineamento casualizado com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, e o Teste T (LSD), empregando-se o programa estatístico Sisvar®.

4.6 Produção de enzimas pelos isolados de *Trichoderma* app.

Para produção de enzimas foi utilizado o meio TLE {Bactopeptona 1,0 g/l, Ureia 0,3 g/l, KH₂PO₄ 1,4 g/l, (NH₄)₂SO₄ 1,4 g/l, MgSO₄ 0,3 g/l, CaCl₂ 0,2 g/l, glicose 0,5 g/l, e 0,5% de micélio macerado de *C. gloeosporioides*}. Três discos de micélio dos isolados de *Trichoderma* spp., foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio TLE. Os frascos foram incubados em um agitador rotatório a 180 rpm em temperatura de 28 °C por 72 horas. O meio de cultura foi coletado por filtração a vácuo, e sobrenadante obtido foi armazenado a -20 °C e usado como fonte de enzimas.

4.7 Ensaios enzimáticos

4.7.1 Dosagem de proteínas totais

A concentração de proteínas dos sobrenadantes foram determinadas por meio do método descrito por Bradford (1976) utilizando o micro ensaio. Alíquotas de 10 µL de amostras foram adicionadas a 100 µL do reagente e Bradford em placas de ELISA, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos. A leitura foi realizada na Leitora de Elisa (Bitel Instruments) a 595 nm. Os ensaios foram realizados com três repetições e uma curva padrão foram utilizadas para determinar a concentração de proteínas das amostras.

4.7.2 β-1,3-glucanase

A atividade de β-1,3-glucanase, foi determinada usando como substrato 0,25% de laminarina (*Sigma Chemical Company*) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 (Ramada et al., 2010). A mistura de reação continha 50 µL do sobrenadante de cultura e 100 µL de solução de laminarina (0,25%) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Após incubação em banho-maria a 40 °C por 60 minutos foi adicionado 500 µL de ácido 3,5-Dinitrossalicílico (DNS). As amostras foram fervidas por 10 minutos e realizada a leitura na Leitora de Elisa (Bitek Instruments) a 550 nm. Os ensaios foram realizados com três repetições e uma curva padrão de glicose foi utilizada para determinar a concentração de açúcar redutor.

Uma unidade de enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de açúcar redutor por minuto.

4.7.3 N-acetilglicosaminidase (NAGase) e Fosfatase ácida

As atividades das enzimas NAGase e fosfatase ácida foram determinadas usando os substratos *p*-nitrofenil-β-N-acetilglicosamina (*p*-NPNA) (5 mM) e *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) (5 mM), respectivamente (ULHOA; PEBERDY, 1993; LEITÃO et al. 2010). As misturas de ensaio continham 50 µL de sobrenadante de cultura, 100 µL de solução de *p*NP-derivado e 350 µL de tampão. Em ambos os ensaios foi utilizado tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Após incubação da mistura a 40 °C por 60 min., a reação foi interrompida com a adição de 500 µL de NaOH (0,5 M). A quantidade de *p*-nitrofenol (*p*-NP) formado foi determinada espectrofotometricamente a 405 nm utilizando a Leitora de Elisa (Bitek Instruments).

Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzimas necessária para produzir 1 µmol de *p*-NP por minuto. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.7.4 Protease

A atividade de protease ácida foi determinada usando como substrato de azocaseína (0,1 %) dissolvida em tampão TRIS-HCl 0,1 M, pH 9,0. A mistura de ensaio continha 50 µL do sobrenadante de cultura, 50 µL de solução de azocaseína. Após incubação da mistura a 37 °C por 90 minutos, foi adicionado 100 µL de 10% ácido tricloroacético (TCA). Após a incubação a 4 °C por 10 minutos as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos. Alíquotas de 100 µL do sobrenadante foram misturadas com 200 µL de NaOH (1,8 M). A leitura foi determinada espectrofotometricamente a 420 nm utilizando a Leitora de Elisa (Bitek Instruments).

Uma unidade de enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para aumentar uma unidade de absorbância por minuto. Os ensaios foram realizados em três repetições.

4.7.5 Quitinase

A atividade de quitinase foi determinada usando como substrato quitina (0,1%) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5.0. A mistura de reação continha 250 µL do sobrenadante de cultura e 250 µL de solução de quitina. Após a incubação da mistura por 22 horas a 37 °C em shaker (180 rpm) foram adicionados 500 µL de DNS. Após ferver a mistura por 5min e esfriamento em banho de água, a leitura das amostras foram feitas a 550 nm utilizando a Leitora de Elisa (Bitek Instruments).

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 µmol de açúcar redutor por minuto. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

4.7.6 Analise estatística

Os dados de atividade enzimática foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott (1974), a 5% de probabilidade, empregando-se o programa estatístico Sisvar®.

4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para avaliar o efeito dos sobrenadantes de cultura dos 10 isolados de *Trichoderma* spp., no micélio *C. gloeosporioides* foi utilizado a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Discos de 5 mm foram incubados por 24 horas com 1 mL de amostras de sobrenadante. Após a incubação as amostras foram fixadas com glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2%, em tampão cacodilato de sódio (0,05 M, pH 7,2), em seguida foram incubadas overnight em geladeira. Após a fixação o material foi retirado do fixador e foi realizado a lavagem (quatro vezes) em tampão cacodilato (0,05M, pH 7,2), por 15 min. cada. Em seguida todas as amostras foram desidratadas com etanol 30% (v/v), 50% (v/v), 70% (v/v), 80% (v/v), 90% (v/v), deixando agir por 15 minutos, finalizando a desidratação com etanol 100%, por 10 minutos, duas vezes.

Após a fixação as amostras foram transferidas para a câmara de secagem ao ponto crítico do CO₂ (Autosamdry – 815), seguido de recobrimento por deposição de filmes de ouro (Deton Vacuum, Desk V, equipado com o acessório de carbono). Completando-se assim o preparo do material para observação ao MEV, com o

aparelho Jeol JSM – 6610, equipado com EDS, Thermo scientific NSS Spectral Imaging. As amostras foram analisadas no Laboratório Multusuário de Microscopia de Alta Resolução da Universidade Federal de Goiás (LabMic/UFG).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste de antagonismo (Pareamento)

Fungos do gênero *Trichoderma* são saprófitas que compõem a microflora do solo, sendo amplamente utilizados em todo mundo como agentes de controle biológico (SILVA et al., 2019). O primeiro trabalho que descreveu um isolado de *Trichoderma* como agente de biocontrole foi publicado por Weindling (1932). A partir desse trabalho, várias espécies do gênero foram isoladas e identificadas através de características morfológicas e moleculares. A maioria dos isolados são de amostras de solos já cultivados ou de áreas não utilizadas na agricultura. Vários trabalhos mostram que espécies de *Trichoderma* são parasitas de uma ampla gama de fitopatógenos de importância na agricultura.

Considerando a importância destes fungos na biotecnologia grupos de pesquisa da Universidade Federal de Goiás e da Universidade Católica Dom Bosco iniciaram um projeto de isolamento e caracterização de fungos do gênero *Trichoderma* de amostras de solo do Estado do Mato Grosso do Sul. Atualmente a coleção tem 95 isolados para avaliação do potencial como agentes de controle biológico. Neste trabalho foi usado o fungo *C. gloeosporioides* causador da antracnose em mamão (ANDRADE et al., 2016).

O primeiro passo para avaliar o potencial antagônico destes fungos é fazer o teste de pareamento de cultura. A partir dos resultados obtidos dos testes de pareamento é possível observar que todos os isolados apresentaram potencial antagônico sobre o fungo *C. gloeosporioides* (Figura 5, Tabela 3). O teste indicou um rápido crescimento dos isolados de *Trichoderma* em relação ao *C. gloeosporioides*, se mostrando altamente competitivo em meio de cultura BDA. Observa-se que todos os isolados apresentaram uma nota inferior a 3, que segundo a escala de Bell et al. (1982) indica que houve uma inibição no crescimento do *C. gloeosporioides* (Tabela 3). A partir dos resultados obtidos pode ser observado ainda que houve diferenças significativas quando se compara a ação micoparasitica entre os isolados de

Trichoderma spp. Os isolados CS101, AM104, TC101 e AB103 apresentaram maior eficiência com inibição do crescimento micelial em torno de 85%. Foi observado também que estes isolados foram capazes de crescer em cima das colônias de *C. gloeosporioides* (Figura 5). Resultados semelhantes foram descritos por Mendes (2017) em um trabalho de pareamento de cultura entre uma cepa de *T. harzianum* e *C. gloeosporioides*. Os isolados ALL 42 e PP 101 foram os que apresentaram menor capacidade de antagonismo em relação aos demais isolados, embora tenham obtido uma nota inferior a 3 (Figura 5 e Tabela 3).

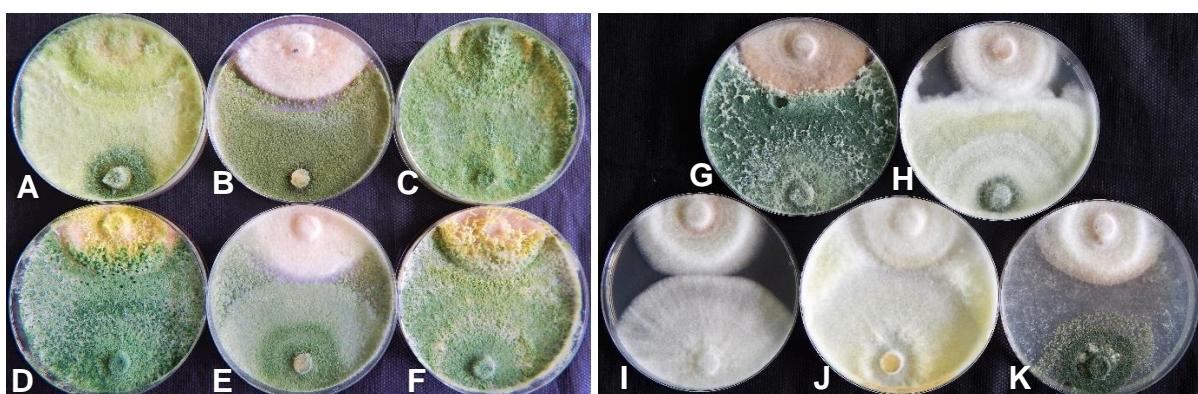


Figura 5. Antagonismo de isolados de *Trichoderma* contra *C. gloeosporioides* por meio do teste de culturas pareadas ao 7º dia de cultivo, o fungo na parte inferior da placa é o *Trichoderma* e o fungo presente na parte superior da placa é o *C. gloeosporioides*. Isolado (A) AB 102, (B) AB 102, (C) TC 101, (D) CS 101, (E) AB 103, (F) AM 104, (G) T 00, (H) ALL 42, (I) PP 101, (J) B 201, (K) T 29

Tabela 3. Potencial antagônico de *Trichoderma* frente ao crescimento de *C. gloeosporioides* segundo a nota na escala de Bell et al. (1982), ao 7º dia de cultivo em meio BDA.

Isolados	<i>C. gloeosporioides</i>
CS101	1.24 a
AM104	1.24 a
TC 101	1.24 a
AB103	1.29 a
B201	1.72 b
AB102	1.97 c
T00	2.13 c
T29	2.27 c
ALL42	2.67 d
PP101	2.86 d
CV (%)	12.51

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, segundo o teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$), CV = Coeficiente de variação. BDA (batata dextrose ágar).

Esta técnica foi usada por outros autores para avaliar o potencial antagônico de isolados de *Trichoderma* spp. frente *C. gloeosporioides*. Valenzuela et al. (2015), avaliou o potencial antagônico de alguns isolados de *Trichoderma* contra *C. gloeosporioides* em testes *in vitro*. Todos isolados utilizados apresentaram um crescimento radial em placas de *C. gloeosporioides* com inibição de 50 a 60%. Em outro trabalho Ramírez-Olier et al. (2019) relataram que o fungo *Trichoderma* foi eficiente contra o *C. gloeosporioides*. Os dados destes trabalhos e os nossos mostraram que isolados de *Trichoderma* spp., tem potencial para serem usados no controle biológico de *C. gloeosporioides*.

Esta técnica tem sido usada para avaliar o potencial antagônico de isolados de *Trichoderma* spp. frente a diversos fitopatógenos tais como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium* spp., (MONTEIRO et al., 2010; QUALHATO, 2013). Bezerra et al. (2019), avaliou a inibição do crescimento micelial do *F. guttiforme* com cinco isolados diferentes de *Trichoderma* spp., onde todos os isolados

apresentaram potencial antagônico, com uma inibição de 80 a 83%. Em trabalho realizado por Chrismann et al. (2019), reportaram a eficiência antagônica do fungo *Trichoderma* spp. frente ao fitopatógeno *C. lindemuthianum* em teste de pareamento, onde houve uma inibição do crescimento micelial do fitopatógeno em 83%.

O teste de pareamento de cultura é uma técnica importante nos estudos de micoparasitismo entre *Trichoderma* e diversos fitopatógenos pois fornecem dados da competição por nutrientes e espaço entre estes organismos. Trata-se de uma ferramenta importante para posterior escolha de um agente de controle biológico eficiente (DRUZHININA et al., 2018; MEYER et al., 2019).

5.2 Teste de avaliação do efeito de metabólitos voláteis

Em geral, fungos que são utilizados como agentes de biocontrole sintetizam metabolitos capazes de inibir o crescimento de fitopatógenos. Estes metabolitos podem ser de origem volátil (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010). Os metabólitos voláteis podem facilmente difundir no ambiente após a produção, enquanto os não voláteis normalmente são produzidos e ficam retidos no meio de cultura.

A etapa seguinte da avaliação do potencial dos 10 isolados de *Trichoderma* como agente de controle biológico foi analisar a capacidade destes isolados de produzir metabólitos voláteis em placas de Petri (Figura 6 e Tabela 4). Podemos observar que todos os isolados produziram metabólitos voláteis com inibição micelial do crescimento de *C. gloeosporioides* entre 49 e 82% (Tabela 4). Entretanto, o isolado AB103 foi o mais eficiente na produção de metabólitos voláteis, pois foram capazes de inibir em 82 % o crescimento de *C. gloeosporioides*. Os dados mostraram que 7 isolados de *Trichoderma* foram também eficientes, pois foram capazes de inibir em torno de 68-74% o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* (Tabela 4). O isolado PP101 foi o que apresentou o menor percentual de inibição (49%). Entretanto, está de acordo com os dados obtidos por Mendes (2017) que mostraram que *T. harzianum* e *T. logibrachiatum* foram capazes de inibir o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, em 44 e 40%, respectivamente.

A técnica de produção de metabólitos voláteis mostrou ser eficiente para avaliar o potencial antagônico de diferentes espécies de *Trichoderma* contra os fitopatógenos *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina* (QUALHATO et al., 2013; MENDES, 2017).

O isolado AB103 foi também um dos mais eficientes no teste de pareamento de cultura (Tabela 3), sugerindo que a produção de metabólitos voláteis pode ser uma característica importante para a colonização do fitopatógeno. Outro dado que corrobora com esta observação é que o isolado PP101 foi o menos eficiente na produção de metabólitos voláteis e no teste de pareamento de cultura (Tabela 3 e 4). Entretanto, os metabólitos secundários produzidos pelos isolados de *Trichoderma*, principalmente AB103 e PP101, precisam ser identificados e suas estruturas determinadas.

A correlação positiva entre o potencial antagônico e a produção de metabolitos voláteis foram relatadas em trabalhos da interação *Trichoderma* spp., versus *Sclerotinia sclerotiorum*, mostrando que isolados que apresentam uma boa eficiência no antagonismo também apresentam uma boa produção de metabolitos voláteis (LOPES et al., 2012).

O primeiro trabalho científico mostrando a produção de metabólitos secundários por *Trichoderma* foram descritos por Weidling (1932), que identificou e caracterizou os antibióticos gliotoxin e viridin. Mais recentemente Schuster e Schmoll, (2010) relataram a existência de mais de 100 metabólitos secundários com ação inibitória de fitopatógenos. Dentre os metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma* spp., podemos citar moléculas tais como etileno e cianeto de hidrogênio (CAMPELL, 1989), acetaldeído, acetona, etanol e dióxido de carbono (TAMIMI; HUTCHINSON, 1975).



Figura 6. Efeito de metabolitos voláteis de isolados de *Trichoderma* spp., no crescimento do *C. gloeosporioides*. (A) Isolado de *C. gloeosporioides*, (B) B201, (C) CS101, (D) T00, (E) placa controle (F), PP101, (G) AM104, (H) AB103.

Tabela 4. Crescimento micelial de colônias (cm) de *C. gloeosporioides* submetidas a efeito de metabólitos voláteis produzidos *in vitro* por isolados de *Trichoderma* spp.

Isolados	<i>C. gloeosporioides</i> (cm)	Inibição (%)
AB103	1.48 a	82
B201	2.23 b	74
CS101	2.37 b	72
T 00	2.47 b	71
ALL 42	2.49 b	71
AM104	2.72 b	68
AB102	2.72 b	68
TC101	2.75 b	68
T 29	3.26 c	62
PP101	4.37 d	49
CV (%)	20.05	

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, segundo o teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$), CV = Coeficiente de variação.

5.3 Avaliação do efeito de metabolitos não voláteis

Fungos do gênero *Trichoderma* possuem diferentes mecanismos de ação durante a interação com o fitopatógeno. Dentre estes mecanismos podemos citar a antibiose que consiste na produção de moléculas voláteis e não voláteis que inibem o crescimento de fitopatógenos. As moléculas não voláteis são aquelas que permanecem no meio de cultura após o crescimento dos isolados de *Trichoderma* em condições de cultivo bem definidas. Os metabólitos não voláteis podem ter diferentes estruturas e várias moléculas já foram isoladas, caracterizadas e seu mecanismo de ação determinado (RAMADA et al., 2019, cap. 5).

Neste trabalho usamos dois meios de cultura para avaliar a produção de metabólitos não voláteis: 1) BD que consiste em meio contendo caldo de batata e glicose; 2) e BDMCG que consiste em meio BD contendo micélio macerado e liofilizado de *C. gloeosporioides*. Após o crescimento dos isolados nos meios BD e BDMCG amostras de sobrenadante foram coletadas e submetidas a dois tratamentos: 1) filtração em filtro millipore (Metabolitos não volátil - MNV); 2) autoclavada (NVT). O

objetivo foi observar o efeito da temperatura na estabilidade dos metabólitos não voláteis produzidos pelos isolados.

Todos os isolados de *Trichoderma* produziram metabolitos não voláteis no meio de cultura BD e BDMCG (Tabela 5). Entretanto, a inibição na maioria das vezes foi maior quando usamos amostras do meio BDMCG quando comparado com amostras do meio BD (Tabela 6).

Quando comparamos as amostras MNV e MNVT produzidas em meio BDMCG observamos que, em geral, a produção de MNV não se diferenciaram do MNVT na inibição de *C. gloeosporioides* (Tabela 5). Quando os resultados são comparados entre os isolados de *Trichoderma* spp., mais eficientes (PP 101 56%; T 29 53%; AB 102 48%; TC 101 47%; e B 201 47%), podemos observar que não houve diferenças significativas nos valores de inibição de *C. gloeosporioides*, na condição de MNV (Tabela 5 e 6). Foi também observado que esta ordem de inibição se mantém na situação MNVT, mas com valores de inibição menores para cada isolado (PP 101 54%; T 29 40%; AB 102 44%; TC 101 4%; e B 201 38%) quando comparado com a condição MNV.

Os níveis de percentual de inibição das amostras do meio BDMCG foram maiores do que aqueles observados no meio BD (Tabela 6). Por exemplo, amostras do isolado PP 101 apresentou uma inibição de crescimento de *C. gloeosporioides* de 56 e 47% em meio BDMCG e BD, respectivamente. O isolado T 29 foi o único em que a amostra teve um aumento na inibição quando crescido em meio BD (60%) (Tabela 6). Quando comparamos as amostras MNV e MNVT produzidas em meio BD observamos também que as amostras MNV em geral não diferenciaram o crescimento de *C. gloeosporioides* do que as MNVT, somente os isolados PP 101, TC 101, T 29 e CS 101 (Tabela 5) que apresentaram diferenças significativas.

A avaliação da produção de metabólitos não voláteis tem sido usada para avaliar o potencial antagônico de vários isolados de *Trichoderma* e tem sido descrita na literatura. Martins et al. (2007), verificou a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. em diminuir o crescimento de *C. gloeosporioides*, apresentando resultados semelhantes a obtidos neste trabalho. Isaias et al. (2014) mostraram que *T. koningiopsis*, *T. asperellum*, *T. harzianum* não apresentaram diferenças na inibição do fitopatógeno *S. rolfsii* quando os metabólitos foram filtrados (MNV) ou autoclavados (MNVT). Estes dados mostraram que os metabólitos são resistentes ao calor e que a atividade de inibição não foi alterada. Guimarães et al. (2016), também estudou os

efeitos de metabólitos MNV e MNVT em isolados de *T. harzianum*, e todos apresentaram inibição do crescimento micelial de *Cladosporium herbarum*, e não constataram diferenças entre os tratamentos. Marques et al. (2018), demonstrou em seu trabalho a eficiência da produção de metabolitos não voláteis produzidos pelas espécies de *T. brevicompactum*, *T. harzianum* e *T. spirale*, contra os fitopatógenos *S. sclerotiorum* e *F. oxysporum*. Em seu trabalho Utami et al. (2019) mostrou que a ação antifúngica apresentada pelo fungo *Trichoderma* spp., contra *Colletotrichum* spp e *F. oxysporum* foi devido a produção de metabolitos secundários.

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que os isolados PP 101, T 29 e AB 102 tem um bom potencial para produção de metabólitos não voláteis, pois as amostras de seus sobrenadantes obtidos em meio BDMCG quanto BD foram capazes de inibir o crescimento de *C. gloeosporioides*. Futuros trabalhos de pesquisa devem ser realizados para a caracterização dos metabólitos produzidos pelos isolados de *Trichoderma* quando crescido em BD e BDMCG. Como trata-se de isolados de *Trichoderma* nunca estudados a expectativas é que novas moléculas com potencial em biocontrole possam ser identificadas e seus mecanismos de ação determinados. A busca por moléculas novas com potencial no controle biológico é de interesse para a agricultura devido ao fato da facilidade de armazenamento e transporte.

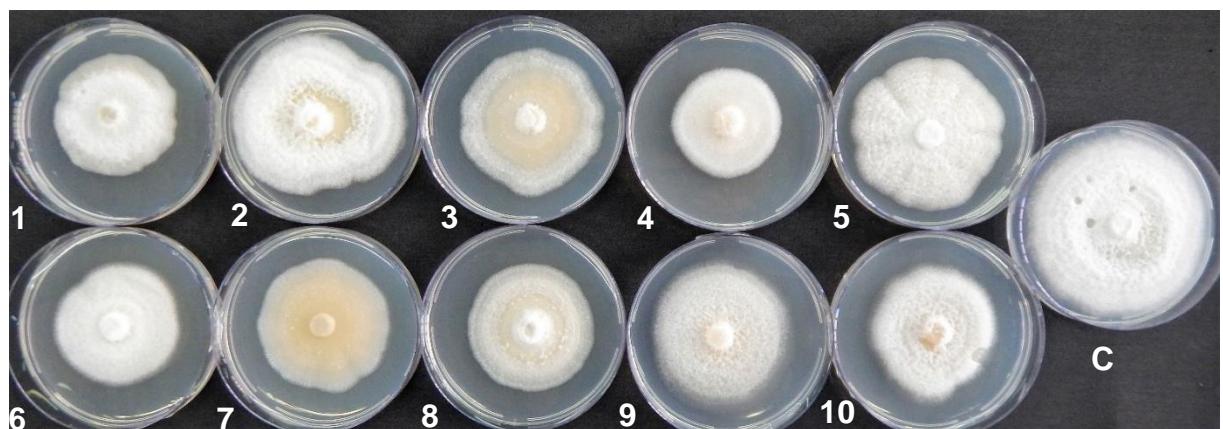


Figura 7. Inibição de crescimento micelial submetido a ação de MNVT pelos isolados de *Trichoderma* spp., crescimento em meio BDMCG. Isolado (1) B201, (2) CS101, (3) T00, (4) PP101, (5) AM104, (6) AB103, (7) AB102, (8) ALL42, (9) TC101, (10) T29, (C) placa controle.

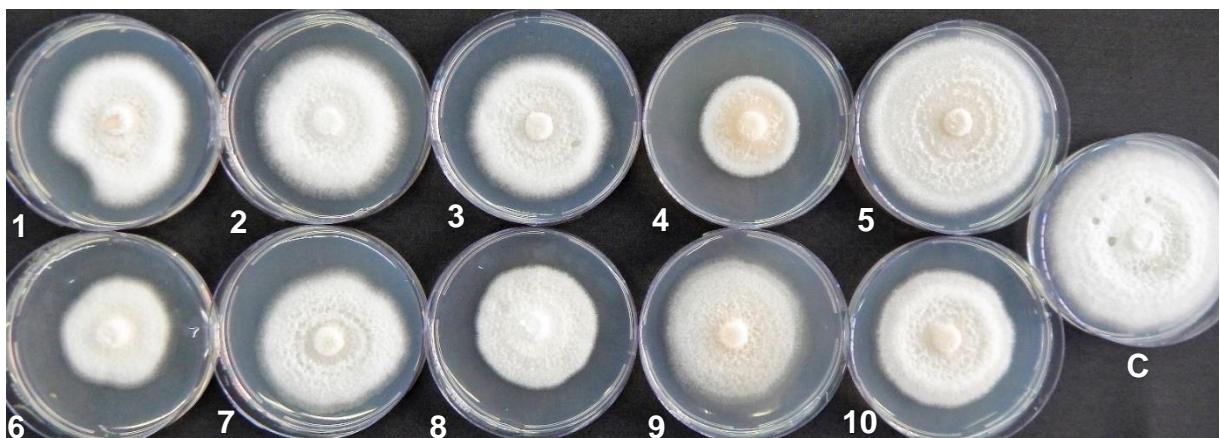


Figura 8. Inibição de crescimento micelial submetido a ação de MNV pelos isolados de *Trichoderma* spp., crescimento em meio BDMCG. Isolado B201 (1), CS101 (2), T00 (3), PP101 (4), AM104 (5), AB103 (6), AB102 (7), ALL42 (8), TC101 (9), T29 (10), placa controle (C).

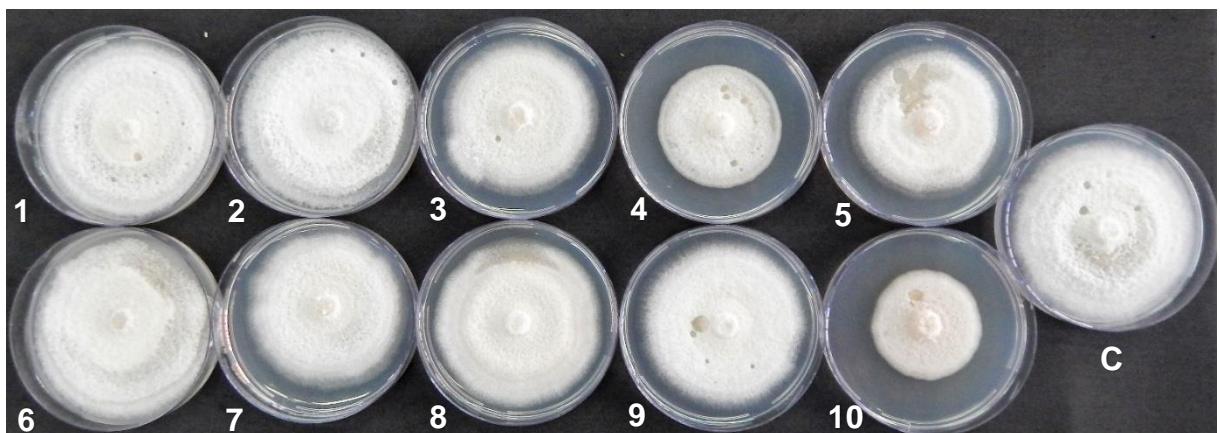


Figura 9. Inibição de crescimento micelial submetido a ação de MNVT pelos isolados de *Trichoderma* spp., crescimento em meio caldo BD. Isolado (1) B201, (2) CS101, (3) T00, (4) PP101, (5) AM104, (6) AB103, (7) AB102, (8) ALL42, (9) TC101, (10) T29, (C) placa controle.

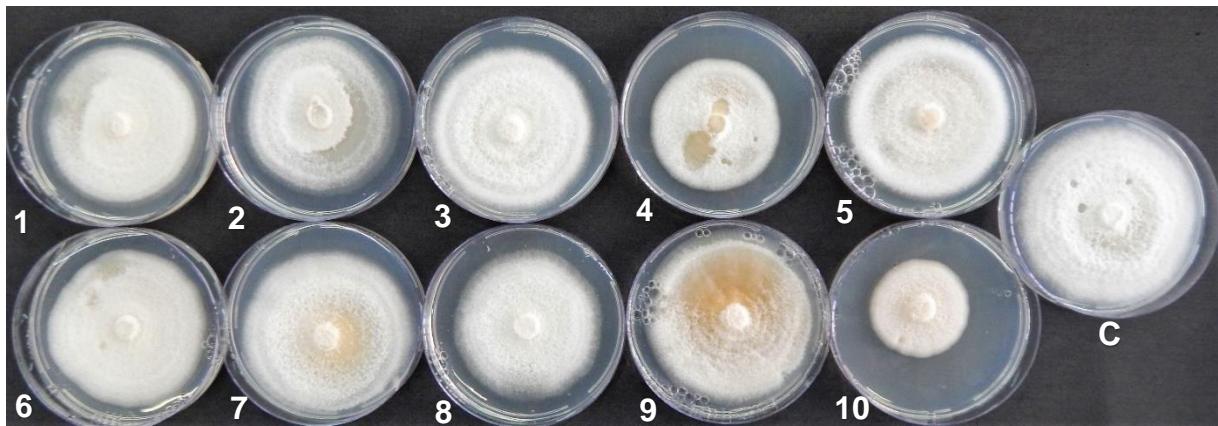


Figura 10. Inibição de crescimento micelial submetido a ação de MNV pelos isolados de *Trichoderma* spp., crescimento em meio BD. Isolado (1) B201, (2) CS101, (3) T00, (4) PP101, (5) AM104, (6) AB103, (7) AB102, (8) ALL42, (9) TC101, (10) T 29, (C) placa controle.

Tabela 5. Teste de inibição de crescimento micelial submetido à ação de metabolitos não voláteis termoestáveis e metabolitos não voláteis de isolados de *Trichoderma* spp., com crescimento em meio com Micélio Macerado (MM) de *C. gloeosporioides*, após 7 dias de crescimento.

Isolados	BDMCG				BD			
	Não Voláteis(cm)	Inibição (%)	Não Voláteis	Inibição (%)	Não Voláteis(cm)	Inibição (%)	Não Voláteis	Inibição (%)
			Termoestáveis(cm)				Termoestáveis(cm)	
PP 101	3.77 a	56	3.87 a	54	4.53 b	47	5.00 b*	41
AB 102	4.43 a	48	4.77 b	44	5.50 c	35	5.63 b	34
TC 101	3.97 a	47	4.78 b	44	6.67 d	29	7.38 e*	13
T 29	4.47 a	53	5.10 b*	40	3.43 a	60	3.87 a*	53
B 201	4.50 a	47	5.27 b*	38	6.67 d	21	6.53 d	23
AB103	4.83 b	43	5.15 b	39	6.50 d*	23	5.47 b	36
CS 101	5.03 c	41	6.13 d*	28	5.50 c	35	7.27 e*	14
T 00	5.58 d	34	5.27 b	38	6.57 d	22	6.17 c	27
ALL 42	5.73 d	32	5.80 c	32	6.37 d	25	6.02 c	29
AM 104	5.90 e	30	5.42 b	36	5.97 c	30	6.23 c	27
CV (%)	7.21		4.61		4.26		5.59	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, segundo teste de Tukey a 5%.

*Médias quando comparadas em linha, são estatisticamente diferentes, segundo o teste de t (LSD), CV = Coeficiente de variação.

Tabela 6. Teste de inibição de crescimento micelial submetido à ação de metabolitos não voláteis termoestáveis e metabolitos não voláteis de isolados de *Trichoderma* spp., com crescimento em meio com Micélio Macerado (MM) de *C. gloeosporioides*, após 7 dias de crescimento.

Isolados	Não Voláteis				Não Voláteis Termoestáveis			
	BD (cm)	Inibição (%)	BDMCG (cm)	Inibição (%)	BD (cm)	Inibição (%)	BDMCG (cm)	Inibição (%)
T 29	3.43 a	60	4.47 a*	53	3.87 a	54	5.10 b*	40
PP 101	4.53 b*	47	3.77 a	56	5.00 b*	41	3.87 a	54
AB 102	5.50 c*	35	4.43 a	48	5.63 b*	34	4.77 b	44
CS 101	5.50 c*	35	5.03 c	41	7.27 e*	14	6.13 d	28
AM 104	5.97 c	30	5.90 e	30	6.23 c*	27	5.42 b	36
ALL 42	6.37 d*	25	5.73 d	32	6.02 c	29	5.80 c	32
AB 103	6.50 d*	23	4.83 b	43	5.47 b*	36	5.15 b	39
T 00	6.57 d	22	5.58 d	34	6.17 c	27	6.13 d	28
TC 101	6.67 d*	29	3.97 a	47	7.38 e*	13	4.78 b	44
B 201	6.67 d*	21	4.50 a	47	6.53 d*	23	5.27 b	38
CV (%)	4.26		7.21		5.59		4.61	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, segundo teste de Tukey a 5%.

*Médias quando comparadas em linha, são estatisticamente diferentes, segundo o teste de t (LSD), CV = Coeficiente de variação.

5.4 Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas

A interação inicial entre espécies do gênero *Trichoderma* e fitopatógenos é caracterizada por crescimento quimiotrófico da hifa do antagonista em direção a do hospedeiro (ELAD et al., 1983). Quando o antagonista atinge o hospedeiro, suas hifas frequentemente enrolam-se nas hifas dos hospedeiros e em seguida formam estruturas denominadas de apressórios (Figura 4). Através destas estruturas e produção de enzimas hidrolíticas o antagonista penetra na hifa do hospedeiro e em seguida passa a usá-lo como fonte de carbono e nitrogênio (BENHAMOU; CHET, 1993). Portanto, a principal barreira para a colonização da hifa do hospedeiro pelo microparasita é a parede celular. A parede celular da maioria dos fungos é composta principalmente por carboidratos (β -1,3, 1,6-glicanos e quitina) e glicoproteínas. Os polissacarídeos constituem 80-85% da parede celular enquanto as glicoproteínas constituem o restante 15-20% (LATGÉ, 2007).

A produção de enzimas hidrolíticas que degradam a parede celular de fungos é uma das etapas mais importantes no mecanismo de micoparasitismo (SILVA et al., 2019). A eficiência de um agente de controle biológico está relacionada com a produção de enzimas hidrolíticas que degradam parede celular (VASSEUR et al., 1995; LORITO et al., 1996; URBINA-SALAZAR et al., 2018). Sendo assim, o levantamento do perfil enzimático é fundamental na decisão da escolha do isolado a ser utilizado em uma possível aplicação no campo. A capacidade dos novos isolados em produzir estas enzimas foram realizadas após o crescimento em meio TLE contendo micélio macerado e liofilizado do fungo *C. gloeosporioides*. As atividades das enzimas quitinases, N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAGase), β -1,3-glucanases, proteases e fosfatases ácida foram determinadas.

Todos os isolados foram capazes de produzir as enzimas quitinase e NAGase, com destaque para os isolados CS101, TOO e AMB104 (Tabela 7). Estas duas enzimas pertencem ao sistema quitinolítico que é um complexo enzimático responsável pela degradação completa da quitina presente na parede celular de fungos (ULHOA; PEBERDY, 1991). As quitinases degradam a quitina em dissacarídeos de N-acetylglucosamina que são hidrolisados pelas NAGase em monômeros. Estes monômeros são absorvidos e metabolizados pelos fungos para fornecer energia e moléculas para síntese de parede celular. Uma alta atividade destas enzimas tem sido usada como um indicador para a seleção de agentes de

biocontrole, principalmente do gênero *Trichoderma* (SILVA et al., 2019). Almeida et al. (2007) observaram uma relação direta entre a atividade destas enzimas e a capacidade de micoparasitismo de isolados de *T. harzianum* contra o fitopatógeno *R. solani*.

Todos os isolados mostraram alta atividade da enzima β -1,3-glucanases com destaque para os isolados ALL42 (369,15 U/mL), AM104(365,39 U/mL) e B201(346,79 U/mL) (Tabela 7). As β -1,3-glucanases fazem parte de um complexo enzimático formado pelas exo- β -1,3-glucanases e endo- β -1,3- glucanases e o produto da hidrolise das glucanas da parede celular é glicose. Muitos trabalhos da literatura já demonstram a importância deste grupo de enzimas durante o micoparasitismo entre isolados *Trichoderma* spp., e diferentes fitopatógenos (GRUBER; SEIDL-SEIBOTH, 2012; TROIAN et al., 2014). Monteiro (2010) observou uma alta atividade de β -1,3-glucanases de *T. harzianum* quando este fungo foi crescido na presença da parede celular tratada de *R. solani* e de *F. solani*.

Outras enzimas avaliadas neste trabalho e menos estudadas no mecanismo de micoparasitismo são as fosfatases e protease. As fosfatases são responsáveis pela hidrolise de ésteres e anidridos de ácido fosfórico e participam de vários processos biológicos em fungos (DICKMAN; YARDEN, 1999). Todos isolados avaliados mostraram atividade de fosfatase ácida com destaque para os isolados ALL42 (510,04 U/mL), AM104 (270,21 U/mL), AB103 (236,17 U/mL), TC101 (212,03 U/mL) e PP101 (196,20 U/mL). Estas enzimas já foram descritas em fungos do gênero *Trichoderma* e estão relacionadas a disponibilidade de fósforo para o próprio metabolismo e crescimento celular (LEITÃO et al., 2010).

Seis isolados avaliados mostraram atividade de protease com destaque para os isolados T00 (1,71 U/mL), AB102 (1,19 U/mL) e AM104 (0,54 U/mL) (Tabela 7). As proteases são um grupo de enzimas que juntamente com as quitinases e β -1,3-glucanases participam na degradação de proteínas estruturais de parede celular e da membrana, desestabilizando a integridade celular dos fitopatógenos (SUÁREZ et al., 2007; GRUBER; SEIDL-SEIBOTH, 2012).

Tabela 7. Atividade enzimática produzida pelos isolados de *Trichoderma* spp. com micélio macerado de *C. gloeosporioides*.

Isolados	Proteína Total ($\mu\text{g/mL}$)	Atividade Enzimática (U/mL.min.)				
		NAGase	Quitinase	β -1,3-glucanase	Fosfatase ácida	Protease
CS 101	115,83	41,12 \pm 0,07 a	10,56 \pm 0,02 a	296,13 \pm 0,02 b	155,63 \pm 0,01 f	0,17 \pm 0,01 d
T 00	119,17	24,12 \pm 0,08 b	6,25 \pm 0,07 b	318,88 \pm 0,01 b	143,96 \pm 0,01 f	1,71 \pm 0,13 a
AM 104	61,67	18,01 \pm 0,05 c	3,70 \pm 0,03 c	365,39 \pm 0,04 a	270,21 \pm 0,01 b	0,54 \pm 0,04 c
T 29	205,00	13,57 \pm 0,03 d	2,98 \pm 0,02 d	287,62 \pm 0,04 c	83,31 \pm 0,01 g	0
PP 101	127,50	12,01 \pm 0,05 d	2,79 \pm 0,02 d	266,45 \pm 0,03 c	196,20 \pm 0,01 e	0,08 \pm 0,01 e
B 201	195,83	11,87 \pm 0,08 d	2,62 \pm 0,01 d	346,79 \pm 0,06 a	153,65 \pm 0,01 f	0,06 \pm 0,01 e
TC 101	136,67	8,30 \pm 0,03 e	2,15 \pm 0,03 e	316,51 \pm 0,01 b	212,03 \pm 0,01 d	0
ALL 42	210,00	7,82 \pm 0,07 e	5,88 \pm 0,01 b	369,15 \pm 0,02 a	510,04 \pm 0,01 a	0,12 \pm 0,01 d
AB 103	67,50	6,23 \pm 0,01 e	3,78 \pm 0,06 c	263,48 \pm 0,01 c	236,17 \pm 0,01 c	0
AB 102	13,33	4,48 \pm 0,01 e	1,41 \pm 0,05 f	279,90 \pm 0,04 c	78,46 \pm 0,01 g	1,19 \pm 0,11 b

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, segundo o teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

5.5 Avaliação por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para avaliar o efeito do complexo enzimático dos isolados sobre a morfologia das hifas de *C. gloeosporioides* foi utilizado a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os isolados AM104, CS101, ALL42 e T00 foram escolhidos devido ao fato de apresentarem boas atividades das cinco enzimas analisadas (Tabela 11). O isolado AB103 não foi um bom produtor do complexo quitinolítico e não apresentou nenhuma atividade de protease no sobrenadante (Tabela 11).

O *C. gloeosporioides* tem crescimento rápido em meio de cultura BDA, formando colônias concêntricas, de coloração verde-oliva à marrom, podendo ocorrer a formação ou não de setores (Figura 11). Na figura 11 podemos observar a estrutura das hifas de *C. gloeosporioides* após tratamento com o sobrenadante de cultura dos isolados de *Trichoderma* spp. No tratamento controle (Figura 11A) não foi visualizado a presença de esporos e as hifas formam estruturas filamentosas concêntricas isoladas ou formando feixes ordenados. Todos os outros tratamentos promoveram um colapso na organização das hifas de *C. gloeosporioides* (Figura 11). Os feixes de hifas ficaram desorganizados e em alguns casos ocorreu uma fragmentação delas. Em todos os tratamentos observamos um enrugamento das hifas, principalmente no tratamento CS101 (Figura 11C). Este isolado foi um dos que mostraram melhores resultados no teste de confronto e na produção das enzimas quitinase, NAGase, β -1,3-glucanase e protease. Este enrugamento pode ser devido a lise das hifas pela ação das enzimas e o extravasamento de material intracelular para o meio. Entretanto, para que esta hipótese possa ser confirmada é necessário que outros experimentos sejam realizados no futuro.

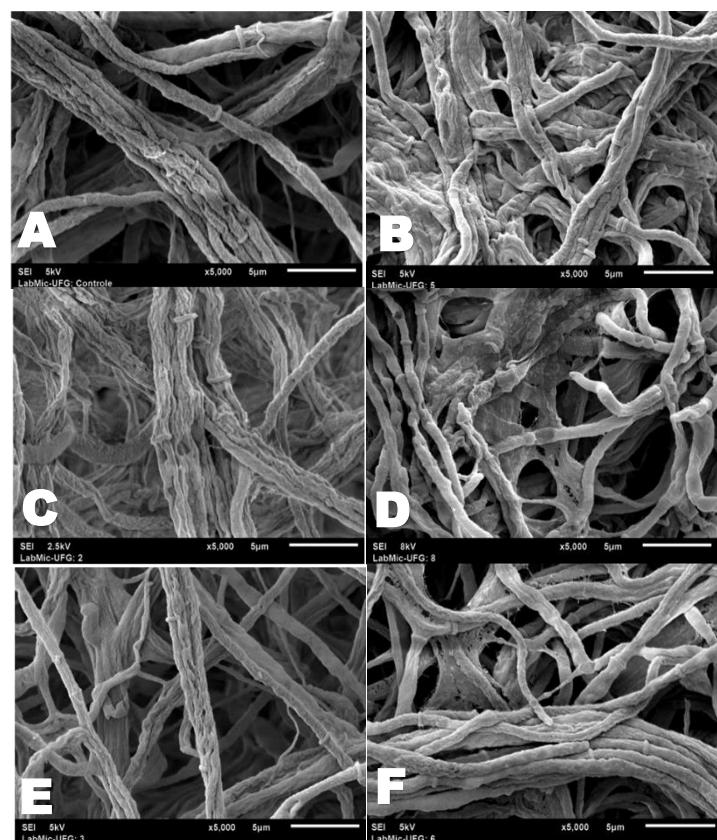


Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura de interações do fitopatógeno *C. gloeosporioides* imerso em suspensão enzimática dos isolados de *Trichoderma* spp. (A) Controle, (B) AM 104, (C) CS 101, (D) ALL 42, (E) T 00, (F) AB 103. Escala das imagens na barra no canto esquerdo de cada imagem, 5 μm.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo avaliou diferentes isolados de *Trichoderma* spp. em testes *in vitro* para avaliar os seus mecanismos de ação como micoparasita do *C. gloeosporioides*, causador da antracnose no mamão, onde todos os isolados se mostraram eficientes. Os isolados CS101, AM104, TC101 e AB103 apresentaram maior eficiência com inibição do crescimento micelial do fitopatógeno no teste de antagonismo.

Nos metabolitos voláteis de *Trichoderma* spp., os isolados que apresentaram ação antifúngica capaz de inibir o *C. gloeosporioides* foi o AB 103. No teste de metabolitos não voláteis os isolados PP 101, T 29 e AB 102 apresentaram os melhores resultados na produção de MNV, tanto nas amostras dos sobrenadantes de meio BDMCG quanto no meio BD, na inibição do crescimento do fitopatógeno.

Todos os isolados apresentaram atividade enzimática envolvidas no processo de micoparasitismo, e o isolado CS101 foi o melhor produtor da quitinase e N-acetilglicosaminidase. A melhor produção de β-1,3-glucanase foi observado nos isolados AM104, B201 e ALL42. Os isolados ALL42 e T00 apresentaram serem os maiores produtores de fosfatase ácida e protease, respectivamente.

Os resultados mostram que o *Trichoderma* é um eficiente agente de controle biológico do *C. gloeosporioides*, em testes *in vitro*. E mais estudos devem ser realizados para que estes potenciais isolados sejam testados a campo, como uma alternativa aos defensivos agrícolas na pós colheita de frutos de mamão. No ponto de vista biotecnológico estudos com agentes de controle biológico é cada vez mais importante, devido a preocupação da população com resíduos químicos, onde estudos de meios alternativos de controle de doenças devem ser impulsionados para que a agricultura tenha acesso a mais produtos biológicos e eficientes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*, Reading, v. 150, n. 7, p. 2029-2035, 2004.
- Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC n.60, de 3 de fevereiro de 2016. Dispõe sobre a utilização do sistema em procloraz de produtos agrotóxicos, em decorrência de sua reav. toxicológica. *Diário Oficial da União*, Brasília, 4 fev., 2016. Disponível em: Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=48&data=04/02/2016>>. Acesso em: 18 junho de 2019.
- AGRIOS, G. N., Plant pathology. 5a Ed. Academic Press, San Diego. 2005, 922 p.
- AGUADO, G. A., RASCÓN, R., Y LUNA, A. Impacto económico y ambiental del empleo de fertilizantes químicos. Ciudad de México, México: Inifap/Sagarpa. (2012).
- AIT-LAHSEN H, et al. An antifungal exoalpha-1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol*. 1 Dec 2001;67(12):5833–9.
- ALI A, WEE PHENG T, MUSTAFA MA. Application of lemongrass oil in vapour phase for the effective control of anthracnose of ‘Sekaki’ papaya. *J Appl Microbiol*. 2015; 118:1456–1464. doi: 10.1111/jam.12782.
- ALMEIDA, F.B., CERQUEIRA, F.M., SILVA, R.N., ULHOA, C.J. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*. v.29:p.1189-1193. 2007.
- AMIRA, M. B. et al. MIP diversity from *Trichoderma*: Structural considerations and transcriptional modulation during mycoparasitic association with *Fusarium solani* olive trees. *PLoS ONE* 13 (3), 2018.
- ANDRADE, W. P.; VIEIRA, G. H. C. Efeito dos óleos essenciais sobre a antracnose in vitro e em frutos de mamoeiro. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 18, n. a00101s1, p. 367-372, 2016.
- AOYAMA H.; SILVA, T. M. A.; Miranda, A.; Ferreira, C. V. Proteínas tirosinas fosfatase: propriedades e funções biológicas. *Química Nova*, v. 26, p. 896-900, 2003.
- BARTNICKI-GARCLIA S. Cell Wall Chemistry, Morphogenesis and Taxonomy of Fungi. *Annual Review of Microbiology*.v.22: p.87-108. 1968.

BATISTA, K.A., et al. Potential fungal inhibition by immobilized hydrolytic enzymes from *Trichoderma asperellum*. Journal of agricultural and food chemistry. v.59. p.8148-8154. 2011.

BELL, D.K., WELLS. H.D., MARKHAM, C.R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology, v.72, n.4, p.379-382, 1982.

BENHAMOU, N, CHET, I. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process, Phytopathology 83 (1993) 1062– 1071.

BENÍTEZ, T., et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology, v. 7, n. 4, p. 249-260, set. 2004.

BEZERRA, G. DE A. et al. Identificação e seleção de espécies de *Trichoderma* spp. endofíticos de bromélias de restingas como agentes de biocontrole da fusariose em frutos de abacaxi. Summa phytopathol., Botucatu, v. 45, n. 2, p. 172-178, Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052019000200172&lng=en&nrm=iso>. Acessado em 20 de janeiro de 2020. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/189165>.

BHARAT, R.; SINGH, V.N.; SINGH, D.B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. Plant and Soil, v.57, p.131-135, 1980.

BONONI, L., et al. (2020). Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. Scientific Reports, 10(1). doi:10.1038/s41598-020-59793-8

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry.V.72: P.248-254. 1976.

CAMPBELL, R. 1989. Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge University Press. Cambridge pg. 218

CARNELOSSI, P.R. et al. Óleos essenciais no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v.11, n.4, p.399-406, 2009.

CARRERAS-VILLASEÑOR, N., SÁNCHEZ-ARREGUÍN, J.A., HERRERA-ESTRELLA, A.H. *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. Microbiology.v.158; p.3–16. 2012.

CARVALHO, D. D. et al. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. phaseoli in vitro e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. Tropical Plant Pathology, v. 36, n. 1, p.28-34, 2011.

CHEN, F. et al. Characterization and homologous overexpression of an N-acetylglucosaminidase Nag1 from *Trichoderma reesei*. Biochemical and Biophysical Research Communications. v. 459, n. 2, p. 184–188, 2015.

CHENG, C.H., YANG, C.A., PENG, K.C. Antagonism of *Trichoderma harzianum* ETS 323 on *Botrytis cinerea* Mycelium in Culture Conditions. *Phytopathology*. v.102, n. 11, p.1054-1063. 2012.

CHIANG, Y. M.; et al. Unlocking fungal cryptic natural products. *Natural Product Communications*, v. 4, n. 11, p. 1505, 2009.

CHRISMANN, P. E. T. P., PRIA, M. D., HENNIPMAN, H. S., GODOY, A. R., In vitro control of *Colletotrichum lindemuthianum* by *Trichoderma* spp. and in vivo with Alternative Products. *International Journal of Advanced Engineering Research and Science (IJAERS)*. Vol-6, Issue-10, Oct- 2019. DOI: <https://dx.doi.org/10.22161/ijaers.610.12>

CIA, P.; BENATO, E.A. Doenças do mamão. *Informe Agropecuário Brasileiro*, v.26, n.167, p.25-29, 2005.

CIA, P.; BENATO, EA; PASCHOLATI, SF; GARCIA, EO. Quitosana no controle pós-colheita da podridão mole em caqui 'Rama Forte'. *Bragantia*, Campinas, v.69, n.3, p.745-752, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/brag/v69n3/28.pdf>>. Acesso em: 27 julho 2019.

8. COOK, R. J.; BAKER, K. F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St Paul: APS, 1983. 539 p.

CORABI-ADELL, C. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (HYPOCREALES – FUNGI) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brasil. 2004.

CORDEIRO, Z. J. M., MATOS, A. P., KIMATI, H. Doenças do mamoeiro. In: Amorim, L. et al., 2016. Manual de Fitopatologia. Ouro Fino: CERES. p. 497-506.

CROP LIFE LATIN AMERICA. A Antracnose, uma doença limitante para a produção de mamão. Disponível em: <https://www.croplifela.org/pt/pragas/lista-dopragas/antracnose>. Acesso: 22 jan. 2019.

DICKMAN, M. B., & YARDEN, O. (1999). Serine/Threonine Protein Kinases and Phosphatases in Filamentous Fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 26(2), 99–117. doi:10.1006/fgb.1999.1118

DRUZHININA, I. S.; et al. Massive lateral transfer of genes encoding plant cell wall-degrading enzymes to the mycoparasitic fungus *Trichoderma* from its plant-associated hosts. *PLoS Genetics*, v. 14, n. 4, e1007322, 2018.

ELAD, Y., CHET, I. (1983). Improved selective media for isolation of *Trichoderma* spp. Or *Fusarium* spp. *Phytoparasitica*, 11(1), 55–58. doi:10.1007/bf02980712.

EMBRAPA, A cultura do mamão / Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. – 3. ed.rev. ampl. – Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 119 p.: il. – (Coleção Plantar, 65). Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/128280/1/PLANTAR-Mamuo-ed03-2009.pdf>>. Acessado em: 15 de agosto de 2019.

EMBRAPA, Brasil é líder mundial em tecnologias de controle biológico. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/46366490/brasil-e-lider-mundial-em-tecnologias-de-controle-biologico>>, acessado em: 10 de fevereiro de 2020.

EMBRAPA. Controle biológico, 2006. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-controle-biologico/sobre-o-tema>> acessado em 02 de julho de 2019.

FISCHER, I.H.; et al. Ocorrência de antracnose em abacate, agressividade e sensibilidade de *Colletotrichum gloeosporioides* a fungicidas. Agropecuária Científica no Semiárido, Patos-PB,v. 13, n.2, p. 130-137, 2017.

FONTES, R.V.; SANTOS, M.P.; FALQUETO, A.R.; SILVA, D.M. Atividade da pectinametilesterase e sua relação com a perda de firmeza da polpa de mamão cv. Sunrise Solo e Tainung 1. Revista Brasileira de Fruticultura, v.30, n.1, p.054-058, 2008.

FRACETO, L. F et al. *Trichoderma harzianum*-based novel formulations: potential applications for management of Next-Gen agricultural challenges. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, p.1-8, 2018.

FRIGHETTO, R.T.S. Influência do manejo de agrotóxicos no meio ambiente. Fitopatologia brasileira.v.25: p.271-274. 2000.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R.; BERNI, R. F. A antracnose da pimenta de cheiro. EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL. Manaus, 2014. Comunicado Técnico no 104, p. 1-3.

GOMES, E.V., et al., 2015. The Cerato-Platanin protein Epl-1 from *Trichoderma harzianum* is involved in mycoparasitism, plant resistance induction and selfcell wall protection. Sci. Rep. 5, 17998. <https://doi.org/10.1038/srep17998>.

GRUBER, S.; SEIDL-SEIBOTH, V. Selfversus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. Microbiology, v. 158, n. 2, p. 26–34, 2012.

GUIMARÃES, L. H. S.; et al. T. Characterization and properties of acid phosphatases with phytase activity produced by *Aspergillus caespitosus*. Biotechnology and Applied Biochemistry, v. 40, p. 201-207, 2004.

GUIMARÃES, G.R.; et al. Ação de metabólitos voláteis e não voláteis de *Trichoderma harzianum* sobre o crescimento de *Cladosporium herbarum*. Pesquisa Agropecuaria Pernambucana. v. 21, n. 1, p. 7-11, 2016.

GUPTA, RK; CHOUDHARY, B.; NAGPURE, A. Controle biológico de citros toxigênicos e fungos podres de mamão por *Streptomyces violascens* MT7 e seus metabólitos extracelulares. Journal of Basic Microbiology, Berlim, v.55, p.1343-1356, 2015.

HARMAN, G.E. HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiol. 02: 43–56. 2004.

HARMAN, G.E., PETZOLDT, R., COMIS, A., CHEN, J. Interactions between *Trichoderma harzianum* stain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 94: p. 147-153, 2004.

HARTL, L.; ZACH, S.; SEIDL-SEIBOTH, V. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 93, n. 2, p. 533–43, 2012.

HERNÁNDEZ-LAURARDO, A. N., et al., Changes in the Functionality of Plasma Membrane of *Rhizopus stolonifer* by Addition of Chitosan. *Journal of Phytopathology*. First published:04 May 2011 <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01802.x>

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção Agrícola Municipal, 2018. Consultado em 05 de fevereiro de 2020. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1612>>

INBAR, J.; CHET, I. The role of recognition in the induction of specificchitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*, *Microbiology* 141(11), 2823–2829. 1995.

ISAIAS, C.O. et al. Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. *Summa Phytopathologica*, v.40, n.1, p.34-41, 2014.

JACOMINO, A.P.; KLUGE, R.A. BRACKMANN, A.; CASTRO, P.R.C. Amadurecimento do mamão com 1-metilciclopropeno. *Scientia Agrícola*, v.59, n.2, p.303-308. 2002.

KIRIGA, A. W. et al. Effect of *Trichoderma* spp. and *Purpureocillium lilacinum* on *Meloidogyne javanica* in commercial pineapple production in Kenya. *Biological Control*, v. 119, p.27-32, 2018.

KUBICEK C.P., MACH R.L., PETERBAUER C.K., LORITO M., *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *Journal Plant Pathology*.v.83: p.11–24. 2001.

LANGNER, T.; GÖHRE, V. Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions. *Current genetics*, v. 62, n. 2, p. 243–54, 2 2016.

LATGÉ, J. P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*, v.66, n.2, p.279-290, 2007.

LEITÃO, V.O., LIMA, R.C.M., VAINSTEIN, M.H., ULHOA, C.J. Purification and characterization of an acid phosphatase from *Trichoderma harzianum*, *Biotechnology Letters*, v. 32(8), p. 1083-1088, 2010.

LIMA, A.L. Caracterização morfológica, molecular e bioquímica de *Trichoderma* spp isolados de solo do cerrado brasileiro, Brasília – DF. UnB. IB / Departamento de Fitopatologia. Imprensa Universitária. 73p. (Tese de Doutorado). 2002.

LOPES, F.A.C. et al., Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biology* 116, 815-824, 2012.

LORITO M., FARKAS V. REBUFFAT S., BODO B., KUBICEK C P " Cell-wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. I. Bacteriol. 178, 6382-6385 (1996).

LORITO, M., WOO, S.L., HARMAN, G.E., MONTE, E. Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. Annual Reviews of Phytopathology.v.8 (48): p.395-417. 2010.

LOUZADA, G.A.S., et al. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. Biota Neotropica.v9(3):<http://www.biota-neotropica.org.br/v9n3/en/abstractinventory+bn0250903> 2009.

MARCELLO, C.M., et al. Expression analysis of the exo- β -1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. Microbiol. Res. 165 (1): 75-81. 2010.

MARQUES, E; MARTINS, I; MELLO, SCM. Antifungal potential of crude extracts of *Trichoderma* spp. Biota Neotrop. Vol.18 no.1, 2018.

MELLO, S.C.M., et al. Cepas de *Trichoderma* para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. Fitosenidad.v.11(1): p.3-9. 2007.

MENDES, H. T. A. Controle Alternativo *in vitro* e *in vivo* da Antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) em Mamão 'Sunrise Solo'. 2017. 84f.

MEYER, M. C., et al., *Trichoderma*: uso na agricultura. editores técnicos. – Brasília, DF: Embrapa, 2019. 538 p.

MONTEIRO, V.N., et al. 2010. New insights in *Trichoderma* 69 harzianum antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. Curr. Microbiol. 61(4): 298-305.

MOURA, F.T de et al. Frutos do umbuzeiro armazenados sob atmosfera modificada e ambiente em diferentes estádios de maturação. Revista Ciência Agronômica, v.44, n.4, 2013.

MUKHERJEE, M. et al. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions: advances in genetics of biological control. Indian Journal of Microbiology, v. 52, n. 4, p. 522-529, 2012. DOI: 10.1007/s12088-012-0308-5.

O'BRIEN, J.; WRIGHT, G. D. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. Current Opinion in Biotechnology, v. 22, n. 4, p. 552-558, 2011.

PERUMAL AB, SELLAMUTHU PS, NAMBIAR RB, SADIQU ER. Antifungal activity of five different essential oils in vapour phase for the control of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Lasiodiplodia theobromae* *in vitro* and on mango. Int J Food Sci Technol. 2016; 51:411–418. doi: 10.1111/ijfs.12991.

QUALHATO, T. F., et al. (2013). Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. Biotechnology Letters, 35(9), 1461–1468. doi:10.1007/s10529-013-1225-3.

RAMADA, M. H. S., LOPES, F. A.C., ULHOA, C. J. *Trichoderma* uso na agricultura. Cap. 5. *Trichoderma: metabolitos secundários*. pag. 201. Brasília, DF: Embrapa, 2019.

RAMÍREZ-OLIER, J. et al., Antagonismo in vitro de *Trichoderma asperellum* contra *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia lunata*, y *Fusarium oxysporum*. Vol. 18 Núm. 2 (2019): Revista UIS Ingenierías. DOI: <https://doi.org/10.18273/revuin.v18n2-2019015>.

RIBEIRO, J. G.; SERRA, I. M. R. de S.; ARAUJO, M. U. P. Uso de produtos naturais no controle de antracnose causado por *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. *Summa phytopathol.*, Botucatu, v. 42, n. 2, p. 160-164, June 2016. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052016000200160&lng=en&nrm=iso>. access on 21 Mar. 2020. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2023>.

RIGOTI, M. Cultura do mamoeiro. Disponível em: <http://www.portaldahorticultura.xpg.com.br/CulturadoMamoeiro.pdf>. Acesso em: 29 de junho de 2017.

ROGG, L. E. et al. Regulation of expression, activity and localization of fungal chitin synthases. *Medical Mycology*, v. 50, n. 1, p. 2–17, 2012.

9. SANTOS, A.L., MAREK, J.; MAIA, A.J.; FARIA, C.M.D.R. Controle biológico e promoção de crescimento das plantas. *Revista campos e negócios grãos*. 2015. Disponível em: <http://www.revistacampoenegocios.com.br/controle-biologico-epromocao-de-crescimento-das-plantas>. Acesso em: 22 de dezembro de 2019.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and Biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 87, n. 3, p. 787-799, 2010.

SERRANO L. A. L., CATTANEO L. F. O cultivo do mamoeiro no Brasil. *Rev. Bras. Frutic.* vol.32 no.3 Jaboticabal Sept. 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452010000300001>

SILVA, F. F.; et al. Emergência e análise ultraestrural de plântulas de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* sob efeito da aplicação de *Trichoderma harzianum*. *Summa Phytopathol*, Botucatu, v. 43, n. 1, p. 41-45. 2017.

SILVA, R. N., et al. (2019). *Trichoderma/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security*. *Fungal Biology*. DOI: 10.1016/j.funbio.2019.06.010

SINGH, S. P.; SCHWARTZ, H. F. Breeding Common Bean for Resistance to Diseases: A Review. *Crop Science*, v. 50, n. 6, p.2199-2223, 2011

SIQUEIRA JUNIOR, CL; MORAES, TC; MARTINS, JAB; FREIRE, MGM Controle de antracnose em mamão por extratos vegetais. *Biológicas & Saúde*, v.1, n.1, p.99-105, 2011. Disponível em: <http://www.seer.perspectivasonline.com.br/index.php/biologicas_e_saude/article/viewFile/517/429>. Acesso em: 27 julho de 2019. DOI:<https://doi.org/10.25242/8868112011517>

SLÁMOVÁ, K. et al. β -N-Acetylhexosaminidase: What's in a name? *Biotechnology Advances*, v. 28, n. 6, p. 682–693, 2010.

SOUZA, A. A. et al. *Trichoderma harzianum* Produces a New Thermally Stable Acid Phosphatase, with Potential for Biotechnological Application. *Plos One*, v. 11, p. e0150455, 2016.

SUÁREZ MB, VIZCAÍNO JA, LLOBELL A, MONTE E. Characterization of genes encoding novel peptidases in the biocontrol fungus *Trichodermaharzianum* CECT 2413 using the TrichoEST functional genomics approach. *Curr Genet.* 2007 May;51(5):331-42.

TAMIMI, K. M., HUTCHINSON, S. A. (1975). Differences between the biological effects of culture gases from several species of *Trichoderma*. *Transactions of the British Mycological Society*, 64(3), 455–463. doi:10.1016/s0007-1536(75)80144-6 MARTINS, I.; PEIXOTO, J.R.; MENÉZES, J.E.; MELLO, S.C.M. Avaliação *in vitro* do antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, p.1676 – 1340, 2007.

TROIAN, ROGÉRIO FRAGA; Steindorff, Andrei Stecca ; RAMADA, MARCELO HENRIQUE SOLLER ; ARRUDA, WALQUIRIA ; Ulhoa, Cirano José . Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: evaluation of antagonism and expression of cell wall-degrading enzymes genes. *Biotechnology Letters*, v. 2, p. 1-6, 2014.

ULHOA, C. J., PEBERDY, J. F. Effect of carbon sources on chitobiase production by *Trichoderma harzianum*. *Mycol Res* 97:45–48. 1993.

ULHOA, C. J.; PEBERDY, J. F. Regulation of Chitinase Synthesis in *Trichoderma Harzianum*. *Journal of General and Applied Microbiology*, v. 137, p. 2163-2169, 1991.

URBINA-SALAZAR, et al. (2018). *Chitinase Production by Trichoderma harzianum Grown on a Chitin-Rich Mushroom Byproduct Formulated Medium. Waste and Biomass Valorization*. doi:10.1007/s12649-018-0328-4

UTAMI, U., NISA, C., PUTRI, A. Y., & RAHMAWATI, E. (2019). The potency of secondary metabolites endophytic fungi *Trichoderma* sp as biocontrol of *Colletotrichum* sp and *Fusarium oxysporum* causing disease in chili. INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOLOGY AND APPLIED SCIENCE (ICOBAS). doi:10.1063/1.5115758

VALENZUELA, N.L., et al. Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma* spp. on maradol papaya fruit, *Biological Control* (2015), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.08.002>.

VASSEUR, V.; VAN MONTAGU, M.; GOLDMAN, G.GH. *Trichoderma harzianum* genes induced during growth on *Rhizoctonia solani* cell walls. *Microbiology* v.141, p. 767-774, 1995.

VINALE, F.; et al. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *The Open Mycology Journal*, v. 8, n. 1, p. 127-139, 2014.

VITERBO, A.; RAMOT, O.; CHERNIN, L.; CHET, I. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* ssp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. Antonie von Leeuwenhoek 81: 549–556. 2002.

WEINDLING, R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of others soil fungi. Phytopathology.v.22(8):p.837-845. 1932.

ZEILINGER, S.; OMANN, M. *Trichoderma* biocontrol: signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. Gene Regulation and Systems Biology, v. 1, p. 227-234, 2007.

ZEILINGER, S.; GRUBER, S.; BANSAL, R.; MUKHERJEE, P. K. Secondary metabolism in *Trichoderma*—Chemistry meets genomics. Fungal Biology Reviews, v. 30, n. 2, p. 74-90, 2016.