

JOSÉ ALDO TEIXEIRA DA SILVA

**PRODUÇÃO DE QUITINASE E ANTAGONISMO DE *Trichoderma* spp.
CONTRA *Fusarium solani* E *Scytalidium lignicola* E ATIVIDADES
ENZIMÁTICAS ANTIOXIDANTES EM MANDIOCA**

GARANHUNS – PERNAMBUCO – BRASIL

OUTUBRO – 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS

PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO AGRÍCOLA

**PRODUÇÃO DE QUITINASE E ANTAGONISMO DE *Trichoderma* spp.
CONTRA *Fusarium solani* e *Scytalidium lignicola* E ATIVIDADES
ENZIMÁTICAS ANTIOXIDANTES EM MANDIOCA**

JOSÉ ALDO TEIXEIRA DA SILVA

SOB ORIENTAÇÃO DA PROFESSORA

ERIKA VALENTE MEDEIROS

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte das exigências da Pós-Graduação em Produção Agrícola, para obtenção do título de *Mestre*.

GARANHUNS

PERNAMBUCO – BRASIL

OUTUBRO – 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS

PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO AGRÍCOLA

**PRODUÇÃO DE QUITINASE E ANTAGONISMO DE *Trichoderma* spp.
CONTRA *Fusarium solani* e *Scytalidium lignicola* E ATIVIDADES
ENZIMÁTICAS ANTIOXIDANTES EM MANDIOCA**

JOSÉ ALDO TEIXEIRA DA SILVA

GARANHUNS – PE

OUTRUBRO – 2015

Ficha catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Setorial UFRPE/UAG

S586p Silva, José Aldo Teixeira da

Produção de quitinase e antagonismo de *trichoderma*
spp. contra *fusarium solani* e *scytalidium lignicola* e
atividades enzimáticas antioxidantes em mandioca / José
Aldo Teixeira da Silva. – Garanhuns, 2015.

f.

Orientadora: Erika Valente Medeiros

Dissertação (Mestrado em Produção Agrícola) -

CDD: 633.682

1. Trichoderma
2. Mandioca - Pesquisa
3. Mandioca - Inoculação
- I. Medeiros, Erika Valente
- II. Título

**PRODUÇÃO DE QUITINASE E ANTAGONISMO DE *Trichoderma* spp.
CONTRA *Fusarium solani* e *Scytalidium lignicola* E ATIVIDADES
ENZIMÁTICAS ANTIOXIDANTES EM MANDIOCA**

JOSÉ ALDO TEIXEIRA DA SILVA

**JOSABETE SALGUEIRO BEZERRA
DE CARVALHO
UFRPE/UAG**

**JÚLIA KUKLINSKY SOBRAL
UFRPE/UAG**

**LUCIANA MAIA MOSER
UFRPE/UAG**

**ERIKA VALENTE MEDEIROS
ORIENTADORA**

“Ninguém vence sozinho, nem no campo, nem na vida!”

Papa Francisco

Ofereço...

Aos meus irmãos Andeson, Alysson e Állida.

Aos meus pais, Aluizio Teixeira e Maria Jacira,

Dedico

AGRADECIMENTO

Agradeço à Deus, por tudo que sou e tenho conquistado.

Aos meus pais, Aluízio e Jacira, por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões e caminhos que tenho seguido.

Agradeço aos meus irmãos, por de uma forma ou de outra, sempre estiveram me ajudando quando sempre precisei.

Agradeço aos meus familiares, avós, tios e primos, que torceram por minhas escolhas, e deram seus apoios.

Agradeço a minha orientadora, Prof.^a Dra Erika Valente de Medeiros por todo o seu apoio e orientação para o desenvolvimento das atividades e escrita da dissertação.

Agradeço a minha co-orientadora, Prof.^a Dra Keila Aparecida Moreira, nas colaborações cruciais e orientação.

Agradeço a todos os meus colegas do Laboratório de Biotecnologia do CENLAG/UAG, Dyana, Jéssica, Camyla, Jamilly, Wendson, Edson, e Isabelle, pela ajuda e colaboração no desenvolvimento do trabalho e incentivo.

Agradeço a Ariely (“Pará”) por estar sempre por perto, aconselhando para as atividades em laboratório, e também, por toda sua amizade.

Agradeço aos meus amigos, Cássia Melo, Carlos Benildo e Joseildo Carvalho, que mesmo distante me incentivaram a nunca desistir e me ensinaram o valor da verdadeira amizade.

Agradeço aos meus amigos de convivência de sala de aula, Raquel, Djayran, e Sheylla, por todos os momentos de estudos e trabalhos.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, por fornecer todo apoio estrutural e educacional.

A FACEPE, por ter me concedido apoio financeiro para o desenvolvimento dessa pesquisa.

A Pós-Graduação em Produção Agrícola (PGPA) da Unidade Acadêmica de Garanhuns pelo apoio estrutural e educacional.

BIOGRAFIA

JOSÉ ALDO TEIXEIRA DA SILVA, natural de Correntes-PE, filho de Aluizio Teixeira de Araújo e Maria Jacira da Silva Araújo. Estudo no Colégio Normal Municipal das Correntes (1997-2001) e na Escola Augusto Lúcio da Silva (1994-1996, 2002-2004).

Ingressou no Curso de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Garanhuns em 2008, graduando-se em 2013.

Ingressou no Mestrado em Produção Agrícola em 2013, finalizando em 2015.

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO GERAL	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO I	22
RESUMO	23
ABSTRACT	25
1. INTRODUÇÃO	26
2. MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1 Obtenção dos isolados de <i>Trichoderma</i> e <i>F. solani</i> e teste de patogenicidade	27
2.2 Avaliação de potencial antagonismo de <i>Trichoderma</i> contra <i>Fusarium solani</i> , <i>in vitro</i>	28
2.3 Atividade de quitinase por isolados de <i>Trichoderma</i>	28
2.4 Biocontrole da podridão radicular da mandioca, causado por <i>Fusarium solani</i> , usando <i>Trichoderma</i>	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
3.1 Avaliação de potencial antagonismo de <i>Trichoderma</i> contra <i>Fusarium solani</i> , <i>in vitro</i>	32
3.2 Atividade de quitinase por isolados de <i>Trichoderma</i>	34
3.3 Biocontrole da podridão radicular da mandioca, causado por <i>Fusarium solani</i> , usando <i>Trichoderma</i>	35
3.4 Indução de respostas de defesas bioquímicas da planta	37
4. CONCLUSÃO	39
5. REFERÊNCIAS	39
CAPÍTULO II	48
RESUMO	49
ABSTRACT	51
1. INTRODUÇÃO	53
2. MATERIAL E MÉTODOS	54
2.1 Obtenção do <i>Scytalidium lignicola</i>	54

2.2 Avaliação de potencial antagonismo de <i>Trichoderma</i> contra <i>S. lignicola</i> (CFF408), <i>in vitro</i>	55
2.3 Biocontrole da podridão negra da mandioca, causado por <i>Scytalidium lignicola</i> (CFF408), usando <i>Trichoderma</i>	55
2.4 Atividade enzimática antioxidantes em mandioca	56
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
3.1 Avaliação de potencial antagonismo de <i>Trichoderma</i> contra <i>S. lignicola</i> (CFF408), <i>in vitro</i>	56
3.2 Biocontrole da podridao radicular da mandioca, causado por <i>Scytalidium lignicola</i> (CFF408), usando <i>Trichoderma</i>	57
3.3 Indução de respostas de defesas bioquímicas da planta	59
4. CONCLUSÃO	61
5. REFERÊNCIAS.....	61

RESUMO

A mandioca tem grande expressão econômica no Brasil e no mundo, pela sua importância alimentar. O Nordeste é a região que mais aumentou a produção dessa cultura no Brasil, porém, os produtores usam poucas tecnologias, acarretando em possíveis desenvolvimentos de doenças e queda na produção. A cultura sofre muitas perdas na produção pela ação de inúmeros fitopatógenos, sendo os do solo os mais severos, o *Fusarium solani* e *Scybalidium lignicola*, ganham ênfase por causarem doenças como a podridão radicular e negra da mandioca, respectivamente, afetando diretamente a parte comercial da planta, a tubera. Muitas pesquisas, apoiam o uso de práticas que viabilizem a produção e favoreçam o ambiente, assim, a utilização de biocontroladores vem ganhando destaque, principalmente fungos do gênero *Trichoderma* spp., por suas características como antagonistas de uma gama de fitopatógenos. Todavia, há poucas pesquisas que relatam os mecanismos fisiológicos que são ativados pelas plantas, quando expostos a essa interação, patógeno-planta-antagonista, como resposta vegetal a infecção de doenças. Desse modo, objetivou-se verificar o potencial antagonístico de dez *Trichoderma* spp. aos patógenos *F. solani* e *S. lignicola*, e avaliar a resposta fisiológica das plantas exposta a esse patossistema. Foi analisado, *in vitro*, a inibição do crescimento micelial do *F. solani* e *S. lignicola* em meio batata-dextrose-ágar, para selecionar o melhor *Trichoderma* com potencial antagonista direto a esses patógenos. Através do método da utilização de meio basal com quitina coloidal, sendo a única fonte de carbono, foi utilizada para avaliar o melhor *Trichoderma* para produção de quitinase. Em casa de vegetação, foi comparado os *Trichoderma* selecionados, contra o indutor de resistência, *in vivo*, avaliando a inibição das doenças infestadas nas plantas, após 92 dias de crescimento. Em seguida, avaliou-se a produção de enzimas das plantas dos tratamentos *in vivo*, do complexo oxidativo (ascorbato peroxidase, catalase, peroxidase e polifeniloxidase). Todas as estirpes apresentaram inibição do crescimento dos fitopatógenos. Porém, a melhor estirpe contra o *F. solani* foi o *T. hamatum* (6656), e para o *S. lignicola* foi o *T. harzianum* (3086), com valores de 88,91 e 80,78% de inibição de crescimento micelial, respectivamente, sendo designados como os melhores candidatos para tratamentos em casa de vegetação. Para a avaliação de produção de quitinase, todos os *Trichoderma* testados foram positivos, destaque dado

ao *T. aureoviride* (5158) por produzir $6,70 \text{ U mL}^{-1}$, sendo selecionado para candidato da inibição da severidade dos patógenos em casa de vegetação. Todas os *Trichoderma* selecionados para teste *in vivo* contra as severidades das doenças, apresentaram eficiência em comparação ao controle com a presença do patógeno. No entanto, o *T. aureoviride* (5158), foi a que apresentou valores contundentes para os dois patógenos. Dos resultados das enzimas das plantas, os tratamentos que detiveram a inoculação dos *Trichoderma* apresentaram resultados satisfatórios, colaborando com a resposta em casa de vegetação, contudo, novamente o tratamento com a estirpe (5158), foi a que apresentou melhores valores, com destaque a produção das enzimas ascorbato peroxidase e peroxidase. Portanto, conclui-se a eficiência do *Trichoderma aureoviride* (5158), para uso como biocontrolador da podridão radicular e da podridão negra da mandioca, pois induziu resistência a planta aos fitopatógenos, colaborando com a produção das enzimas antioxidativas.

ABSTRACT

Cassava has economic importance in Brazil and abroad, for their food importance. The Northeast is the region that most increased this crop in Brazil, but farmers use few technologies, resulting in diseases and decline in production. The crop is attacked for numerous pathogens as *Fusarium solani* and *Scybalidium lignicola*, that causes diseases such as cassava root rot and cassava black root, affecting the commercial part of plant, the tubera. Several research, support the use of practices that enable the production and support the environment, so the use of biocontrol has been used, particularly with the use of *Trichoderma* spp. However, little research reporting the physiological mechanisms that are activated by plants when exposed to this interaction, pathogen-plant-antagonist such as plant response to infection diseases. Thus, the objective this work was to verify the potential antagonism of *Trichoderma* spp. against *F. solani* and *S. lignicola*, and evaluating the physiological response of plants exposed to the pathosystem. We analyzed *in vitro* inhibition of mycelial growth of *F. solani* and *S. lignicola* to select the best *Trichoderma* antagonist with potential direct these pathogens. By the method of use of basal medium with colloidal chitin as the only carbon source, it was used to evaluate the best *Trichoderma* production of chitinase. In greenhouse, the selected *Trichoderma* was compared against the use of plant resistance inducer *in vivo* inhibition assessing the severity of disease infested plants after 92 days of growth. Then we evaluated the enzyme of antioxidative complex (peroxidase ascorbate, catalase, peroxidase and polyphenyl oxidase). All strains were inhibited the growth of pathogens. However, the best strain against *F. solani* was *T. hamatum* (6656), and has been for *S. lignicola* was *T. harzianum* (3086), with values of 88.91 and 80.78% growth mycelial respectively, being designated as the best candidates for treatments in the greenhouse. For chitinase production evaluation, all *Trichoderma* tested were positive, highlighting the *T. aureoviride* (5158) to produce 6.70 U mL⁻¹, being selected candidate for inhibiting the severity of pathogens in greenhouse. All *Trichoderma* selected for *in vivo* testing against the severities of diseases, presented efficiency compared to the control with the presence of the pathogen. However, the *T. aureoviride* (5158), showed the blunt values for both pathogens. The results of the enzymes of the plants, treatments that stopped inoculation of *Trichoderma* showed

satisfactory results, collaborating with the answer in a greenhouse, however, again treating with the strain (5158), showed the best values, especially the production of the enzymes peroxidase and ascorbate peroxidase. Therefore, concludes the efficiency of *Trichoderma aureoviride* (5158), for use as biocontrol of root rot and black rot of cassava as induced resistance to plant pathogens, contributing to the production of enzymes antioxidatives.

INTRODUÇÃO GERAL

A mandioca (*Manihot sculenta*, Crantz) pertence à família Euphorbiaceae, é a espécie mais cultivada do gênero *Manihot* (NASSAR et al., 2008), tendo relevância econômica no Brasil e no mundo, com destaque por ser uma das mais importantes fontes alimentares de carboidratos (ADEOTI, 2010).

O Brasil em 2015 terá um aumento na colheita de mandioca de 5,1% em ano anterior, sendo o Nordeste a região com maior aumento (11,5%) (IBGE, 2015). Pernambuco, no ano de 2014, apresentou um aumento na produção de 10,6% em relação à safra de 2013 (CONAB, 2015).

O agreste é a região mais expressiva da produção de mandioca no estado pernambucano (CUENCA e MANDARINO, 2006), porém, pelo pouco nível tecnológico, com multiplicação de manivas envelhecidas fisiologicamente, favorecem a disseminação de diversas doenças (OLIVEIRA e FIORINE, 2006), havendo quedas na produção.

Muitas doenças afetam a cultura da mandioca, tendo destaque a podridão radicular (BANDYOPADHYAY et al., 2006) e a podridão negra (SERRA et al., 2009), as quais responde por 70% e 100% de perdas da produção, respectivamente (FUKUDA, 1991). Vários são os patógenos causadores dessas doenças, mas estudos relatados por Notaro et al. (2013), constatou a prevalência do *Fusarium solani* como agente causal da podridão radicular em áreas com o cultivo no agreste de Pernambuco, e a ocorrência do *Scytalidium lignicola*, que é agente causal da podridão negra da mandioca (SILVA et al., 2013).

Tanto o *F. solani* como o *S. lignicola* são fungos que habitam diversos habitats (HASANZADE et al., 2008; CAI et al., 2011), no entanto, tem o solo como principal habitat das estruturas de resistência, o que dificultam seu controle. Além disso não existe controle químico registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para a cultura da mandioca, tornando necessário o manejo através de práticas culturais, genéticos e biológicos.

Para os produtores, o uso de práticas culturais e biológicas como manejo para diversas doenças, vem se tornando comum, por sua viabilidade e manutenção do

próprio solo. A utilização de *Trichoderma* spp. como biocontroladores de diversas doenças em várias culturas é destaque pela sua eficiência em diversas pesquisas (ABO-ELNAGA, 2014; ASRAN-AMAL et al., 2010; SUBASH et al., 2014). Antagonista de vários patógenos do solo (LEELAVATHI et al., 2014; PRASAD et al., 2013), pode contribuir como biocontrole de fitopatógenos da mandioca por resistência sistêmica induzida (BUENSANTEAI et al., 2012).

Os *Trichoderma* podem agir de diversas maneiras contra os patógenos como antagonistas, seja por competição de nicho, enzimas, nutrientes, produção de metabólitos e não-metabólitos (GVEROSKA e ZIBEROSKI, 2011; PANDEY et al., 2014), dentre outros. Apesar da eficácia deste antagonista, poucas são as pesquisas que contribuem para a resposta fisiológica de plantas contra os patógenos na interação com *Trichoderma*.

As plantas respondem por diversos mecanismos quando infectadas por patógenos, e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é uma indicação da resposta fisiológica, resistência sistêmica induzida (RSI), em que há produção de enzimas como, ascorbato peroxidase (ROSA et al., 2010), peroxidase (SEDLÁŘOVÁ et al., 2007), catalase (GAYATRIDEVI et al., 2012), e polifenoloxidase (CONCEIÇÃO et al., 2014), que contribuem para eliminação das EROs (peróxido, radical superóxido, oxigênio singlete, radical hidroxila), substâncias que são produzidas pelas plantas para minimizar os estresses abióticos e bióticos. Esses mecanismos de defesas podem ser explorados para o controle de doenças através da aplicação de biocontroladores para induzir uma resposta de defesa nas plantas contra o ataque de fitopatógenos (SINGH et al., 2011).

Logo, o presente trabalho teve como objetivos, avaliar e selecionar o melhor antagonista entre dez estirpes de *Trichoderma* no controle *in vitro* contra o *Fusarium solani* e o *Scybalidium lignicola*; avaliar e selecionar o melhor *Trichoderma* produtor de quitinase; avaliar o potencial antagonista dos isolados anteriormente selecionados e comparar com indutor de resistência, para o manejo da podridão radicular e podridão negra da mandioca; e determinar as respostas enzimáticas em plantas de mandioca.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO-ELNAGA, H. I. G. Photosynthetic efficiency promotion of sugar beet by formulation of *Trichoderma* and control of some sugar beet disease seedling. **Agrotechnology**, v. 3(1), p. 127-132, 2014.
- ADEOTI, O. Water use impact of ethanol at a gasoline substitution ratio of 5% from cassava in Nigeria. **Biomass & Bioenergy**, v. 34, p. 985-992, 2010.
- ASRAN-AMAL, A.; MOUSTAFA-MAHMOUD, S. M.; SABET, K. K. EL BANNA, O. H. *In vitro* antagonism of cotton seedlings fungi and characterization of chitinase isozyme activities in *Trichoderma harzianum*. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 17, p. 153-157, 2010.
- BANDYOPADHYAY, R.; MWANGI, M.; AIGBE, S. O.; LESLIE, J. F. *Fusarium* species from the cassava root rot complex in West Africa. **Phytopathology**, v. 96(6), p. 673-676, 2006.
- BUENSANTEAI, N.; ATHINUWAT, D. The antagonistic activity of *Trichoderma virens* strain TvSUT10 against cassava stem rot in Thailand. **African Journal of Biotechnology**, v. 11(84), p. 14996-15001, 2012.
- CAI, L.; UDAYANGA, D.; MANAMGODA, D. S.; MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; MCKENZIE, E. H. C.; GUO, L. D.; LIU, X. Z.; BAHKALI, A.; HYDE, K. D. The need to carry out re-inventory of plant pathogenic fungi. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, p. 205-213, 2011.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Perspectivas para a agropecuária** / Companhia Nacional de Abastecimento – v.2 – Brasília: Conab, 2014-v.1. Disponível em: <
http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_09_10_18_03_00_perspectivas_2014-15.pdf >.
- CONCEIÇÃO, C. S.; FELIX, K. C. S.; MARIANO, R. L. R.; MEDEIROS, E. V.; SOUZA, E. B. Combined effect of yeast and silicon on the control of bacterial fruit blotch in melon. **Scientia Horticulturae**, v. 174, p. 164-170, 2014.

- CUENCA, M.A.G.; MANDARINO, D.C. **Aspectos agroeconômicos da cultura da mandioca: características e evolução da cultura no Estado de Pernambuco entre 1990 e 2004**. Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. 24 p. Disponível em: <http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2006/doc-99.pdf>.
- FUKUDA, C. **Podridão das raízes da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Mandioca em Foco, 08), 1991.
- GAYATRIDEVI, S.; JAYALAKSHMI, S. K.; SREERAMULU, K. Salicylic acid is a modulator of catalase isozymes in chickpea plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceri*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 52, p. 154-161, 2012.
- GVEROSKA, B.; ZIBEROSKI, J. *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent against *Alternaria alternata* on tobacco. **Applied Technologies & Innovations**, v. 7(2), p. 67-76, 2011.
- HASANZADE, F.; RASTEGAR, M. F.; JAFARPOU, B.; KERMANI, M. Identification of *Fusarium solani* f. sp. pisi the cause of root rot in chickpea and assessment of its genetic diversity using AFLP in northeast Iran. **Research Journal of Biological Sciences**. v. 3, p. 737-741, 2008.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola 2015**. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistemático_da_Producao_Agricola_%5Bmensal%5D/Comentarios/lspa_201503comentarios.pdf>.
- LEELAVATHI, M. S.; VANI, L.; REENA, P. Antimicrobial activity of *Trichoderma harzianum* against bacteria and fungi. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3(1), p. 96-103, 2014.
- NASSAR N. M. A.; HASHIMOTO D. Y. C.; FERNANDES S. D. C. Wild *Manihot* species: botanical aspects, geographic distribution and economic value. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 16-28, 2008.

- NOTARO, K. A.; MEDEIROS, E. V.; SILVA, C. A. D.; BARROS, J. A. Prospecção de fitopatógenos associados à podridão radicular da mandioca em Pernambuco, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 5, p. 1832-1839, 2013.
- OLIVEIRA, M. A.; FIORINE, R. A. Análise de crescimento em mudas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) provenientes de estacas em diferentes recipientes para cultivo. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 2, p. 12-26, 2006.
- PANDEY, C.; SHAHI, N. V.; PAWAR, H. Synergistic effect of chitosan and *Trichoderma viride* against *C. paradoxa*, the causal agent of pineapple disease in sugarcane. **The Journal of Rural and Agricultural Research**, v. 14(2), p. 70-74, 2014.
- PRASAD, B. N.; KUMAR, M. R. Scanning electron microscopic studies on mycoparasitic activity of *Trichoderma* spp. against *Rhizoctonia solani*, incitant of sheath blight of rice. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 4(3), p. 88-96, 2013.
- ROSA, S. B.; CAVERZAN, A.; TEIXEIRA, F. K.; LAZZAROTTO, F.; SILVEIRA, J. A. G.; FERREIRA-SILVA, S. L.; ABREU-NETO, J.; MARGIS, R.; MARGIS-PINHEIRO, M. Cytosolic APx knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice. **Phytochemistry**, v. 71, p. 548-558, 2010.
- SEDLÁŘOVÁ, M.; LUHOVÁ, L.; PETŘIVALSKÝ, M.; LEBEDA, A. Localisation and metabolism of reactive oxygen species during *Bremia lactucae* pathogenesis in *Lactuca sativa* and wild *Lactuca* spp. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, p. 607-616, 2007.
- SERRA, I. M. R. S.; SILVA, G. S.; NASCIMENTO, F. S.; LIMA, L. F. L. *Scytalidium lignicola* em mandioca: ocorrência no Estado do Maranhão e reação de cultivares ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, v. 35(4), p. 327-328, 2009.
- SINGH, B. N.; SINGH, A.; SINGH, S. P.; SINGH, H. B. *Trichoderma harzianum* - mediated reprogramming of oxidative stress response in root apoplast of sunflower enhances defense against *Rhizoctonia solani*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 131, p. 121-134, 2011.

SILVA, C. A. D.; MEDEIROS, E. V.; BEZERRA, C. B.; SILVA, W. M.; BARROS, J. A.; SANTOS, U. J. Interferência da incorporação de matéria orgânica no solo no controle da podridão negra da mandioca, causada por *Scytalidium lignicola*. **Bioscience Journal**, v. 29, p. 1823-1831, 2013.

SUBASH, N.; MEENAKSHISUNDARAM, M.; SASIKUMAR, C.; UNNAMALAI, N. Mass cultivation of *Trichoderma harzianum* using agricultural waste as a substrate for the management of damping off disease and growth promotion in chilli plants (*Capsicum annuum* L.). **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6(5), p. 188-192, 2014.

CAPÍTULO I

PRODUÇÃO DE QUITINASE POR ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. E ANTAGONISMO AO *Fusarium solani*, CAUSADOR DA PODRIDÃO RADICULAR DA MANDIOCA

RESUMO

A mandioca tem destaque no mundo, por ser uma grande fonte alimentar. Apesar do Brasil ser um dos grandes produtores dessa cultura, a produção sofre por ataque de várias doenças, como a podridão radicular, causada por *F. solani*. O uso de biocontroladores como *Trichoderma*, vem sendo usado para o manejo dos patógenos de uma grande quantidade de culturas. Mecanismos de eficiência desses organismos, está apoiado na produção de enzimas, como a quitinase, e quando interagem com as plantas podem induzir a resistência. No presente estudo objetivou-se selecionar os melhores, antagonista *in vitro* e produtor de quitinase; avaliar o potencial antagonístico dos *Trichoderma*, em comparação com o indutor de resistência e avaliar a resposta fisiológica da mandioca na produção de enzimas do complexo oxidativo. *In vitro*, foi analisado a inibição do crescimento micelial do *F. solani* em meio batata-dextrose-água, para selecionar o melhor *Trichoderma* com potencial antagonista direto. Um método baseado na utilização de meio basal com quitina coloidal, como única fonte de carbono, foi utilizada para avaliar o melhor *Trichoderma*, para produção de quitinase. Em casa de vegetação, foi comparado *in vivo* os *Trichoderma* selecionados, contra o indutor de resistência, para o potencial inibitório da severidade da doença infestada nas plantas, após 92 dias de crescimento. Posteriormente, foi avaliada a atividade enzimática pelas plantas dos tratamentos *in vivo*, do complexo antioxidativo (ascorbato peroxidase, catalase, peroxidase e polifeniloxidase). Todas as estirpes apresentaram inibição do crescimento do *F. solani*, no entanto, os *T. aureoviride* (3486), *T. harzianum* (6508) e *T. hamatum* (6656) foram os mais eficazes, sendo o último selecionado. Enquanto na produção de quitinase, o *T. aureoviride* (5158) foi o melhor candidato para inibição da severidade. Todos os tratamentos foram eficientes para a diminuição da severidade da doença na parte radicular da planta, sendo os mais eficientes os *Trichoderma*. Os dados enzimáticos demonstraram uma boa eficiência dos tratamentos que foram utilizados os *Trichoderma*, para todas as enzimas testadas (APX, CAT, POX e PFO), com destaque para a alta produção das enzimas peroxidase e ascorbato peroxidase. Assim, pode-se concluir a eficiência do *Trichoderma aureoviride* (5158), para possível uso como biocontrolador da podridão radicular da mandioca, e sua afinidade com a

cultura, por possibilitar melhor atividade enzimática e podendo induzir resistência a planta contra o *F. solani*.

ABSTRACT

Cassava has great prominence in the world, as a major food source. Although Brazil is a major producer of this crop, the production suffers from attacks of various diseases, as the root rot caused by *F. solani*. The use of biocontrol as *Trichoderma*, has been used for the management of pathogens a large amount of cultures. Mechanisms efficiency of these organisms, is supported on the production of enzymes, such as chitinase, and when they interact with plants can induce resistance. The present study aimed to select the best *in vitro* antagonist and chitinase producer; evaluate the antagonistic potential of *Trichoderma*, in comparison with the resistance inducer and evaluate the physiological response of cassava in the production of enzymes of the antioxidant complex. *In vitro*, it was analyzed the inhibition of mycelial growth of *F. solani* in potato-dextrose-agar, to select the best *Trichoderma* with antagonist direct potential. A method based on the use of basal medium with colloidal chitin, as the sole carbon source, was used to evaluate the best *Trichoderma*, for chitinase production. In the greenhouse, the selected *Trichoderma* was compared *in vivo*, against the resistance inducer for the inhibitory potential of the severity of the disease in infested plants, after 92 days of growth. Subsequently, we evaluated the production of enzymes in plants *in vivo* treatments, antioxidative complex (ascorbate peroxidase, catalase, peroxidase and polyphenyl oxidase). All strains were inhibited growth of *F. solani*, however, *T. hamatum* (6656), *T. harzianum* (6508) and *T. aureoviride* (3486), were the most effective, the latter being selected. While in the production of chitinase, *T. atroviride* (5158) was the best candidate for inhibition of severity. All treatments were effective for decreasing the severity of disease in the root part of the plant, being more efficient *Trichoderma*. Enzyme data showed a good efficiency of the *Trichoderma* treatments that were used for all tested enzymes (APX, CAT, POX and PPO), highlighting the high production of peroxidase and ascorbate peroxidase. The obtained results in the present study lead to conclude about the efficiency of *Trichoderma atroviride* (5158), for possible use as biocontrol of the cassava root rot and their affinity with the culture, by allowing better enzyme activity and can induce resistência the plant against *F. solani*.

1. INTRODUÇÃO

A mandioca tem grande destaque no mundo, por ser uma das mais importantes fontes alimentares, sendo a terceira maior cultura rica em carboidratos nos países tropicais, perdendo para o arroz e o milho (FAO, 2015). Apesar de o Brasil ser um dos maiores produtores da cultura, a mesma sofre grandes perdas com as várias doenças atreladas a esse cultivo.

A podridão radicular é uma das doenças mais impactantes para a cultura da mandioca (SERRA et al., 2009), podendo ser causada por um complexo de espécies fúngicas, dentre elas *Phytophthora drechsleri*, *Rhizoctonia solani*, *Diplodia manihotis* e *Fusarium solani* (MENDES e URBEN, 2015). Esta última, tem alta representatividade por causar muitos danos econômicos (BANDYOPADHYAY et al., 2006), podendo chegar a 70% de perdas na produção.

O *Fusarium solani* é um fungo que apresenta característica de difícil controle, por ter potencial de sobrevivência através de estruturas de resistências, em vários habitats por longo período (HASANZADE et al., 2008). Para este patógeno em relação a cultura da mandioca no Brasil, não há registro sobre nenhum produto químico no Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Assim, técnicas de manejos e prevenções (UBALUA e OTI, 2008) são as viabilizações utilizadas para o plantio da cultura. Todavia, há uma necessidade por maior conhecimento de técnicas de eficiência para o controle da doença da podridão radicular da mandioca.

Estudos recentes vêm sendo abordados para o manejo do *F. solani*, seja através do desenvolvimento de cultivares resistentes (OLIVEIRA et al., 2013), supressividade do solo (BARROS et al., 2014), compostos comerciais (SABET et al., 2013), indutores de resistência (EL-MOHAMEDY et al., 2014), uso de enzimas (HUSSAIN et al., 2013), extratos (BHARDWAJ, 2012; YELMAME et al., 2010), matéria orgânica (ALMEIDA et al., 2012), e o biocontrole bacteriano e/ou fúngico (CALVO et al., 2010; EBD-EL-KHAIR et al., 2010; OYELANA et al., 2011).

Nesse contexto, a sustentabilidade para o agricultor e o meio ambiente é o enfoque de destaque. Assim, pelo o cultivo da mandioca ser uma prática de cunho

rústico, o uso de indutores de resistências e biocontroladores fungicos, são meios atrativos para os produtores. Neste sentido, o uso de *Trichoderma spp.* para o combate de patógenos sistêmicos ou os do solo (BUENSANTEAI e ATHINUWA, 2012; HARMAN et al., 2012; UBALUA e OTI, 2007), vem ganhando importância pois agem de modo preventivo contra as doenças (HRIDYA et al., 2012), através do controle direto (HHMAU et al., 2015) por micoparasitismo com a produção de enzimas (quitinase, α -1,3-glucanase) que degradam a parede celular dos patógenos (MARCELLO et al., 2010), e permanência no solo (NOTARO, et al., 2013) cultivado com mandioca.

Diversos estudos vêm sendo realizados utilizando o *Trichoderma* visando o controle biológico de doenças de plantas, entretanto, ainda existe uma lacuna no que diz respeito a ação desses antagonistas e a resposta fisiológica de mandioca quando submetidas à tal patossistema. Uma resposta direta das plantas a interação com patógenos é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (APEL e HIRT, 2004), ocorrendo o seu combate para a desintoxicação da planta, através da sua regulação por enzimas antioxidativas, minimizando o estresse biótico (THIPYAPONG et al., 2004).

Assim, o presente trabalho teve como objetivos, (1) avaliar e selecionar o melhor antagonista entre dez estirpes de *Trichoderma* no controle *in vitro* ao *Fusarium solani*; (2) avaliar e selecionar o melhor *Trichoderma* produtor de quitinase; (3) avaliar o potencial antagonista dos isolados anteriormente selecionados e comparar com o indutor de resistência para o manejo da podridão radicular da mandioca e (4) avaliar as atividades enzimáticas em plantas de mandioca.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos isolados de *Trichoderma* e *F. solani* e teste de patogenicidade

Foram utilizados os *Trichoderma*: *T. aureoviride* (3486; 3734; 5158; 6668), *T. hamatum* (6656), *T. harzianum* (3086; 3197; 6508), *T. longibrachiatum* (6068) e *T. virens* (5007), obtidos da coleção de cultura Micoteca URM UFPE (<https://www.ufpe.br/micoteca/>) e reativados através de 3 repicagens sucessivas.

O *F. solani* CFF109 foi isolado de raízes de mandioca com sintomas de podridão radicular, na cidade de Jupi-PE, Brasil (8° 42' 23" S, 36° 25' 3" O) (NOTARO et al., 2013). Tal isolado foi reativado através de 3 repicagens sucessivas quando então foi submetido ao teste de patogenicidade conforme Serra et al. (2009), que mostrou alto grau de virulência.

2.2 Avaliação do potencial antagônico de *Trichoderma* ao *Fusarium solani*, *in vitro*

A capacidade de antagonismo dos isolados de *Trichoderma* foi realizado utilizando o método de Li et al. (2003). As placas de Petri (15 cm de diâmetro) contendo cerca de 15 mL de meio batata-dextrose-ágar (BDA) foram inoculadas com micélios de *F. solani* com 8 dias de crescimento, em um dos lados da placa, em aproximadamente 1 cm da borda; e os isolados de *Trichoderma* foram inoculados em posição oposta na mesma medida, em seguida, incubados em B.O.D. a 25 °C.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 11 tratamentos (10 isolados de *Trichoderma* + tratamento controle), com quatro repetições. O tratamento controle consistiu de placas inoculadas apenas com *F. solani*.

As observações foram registradas após 24h de inoculação dos micro-organismos até a cobertura completa da área demarcada para o patógeno no tratamento controle. A percentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada com a seguinte fórmula (EDGINGTON et al., 1971):

$$\% \text{ inibição do crescimento} = [(C - T) / C] \times 100$$

Onde, C = o crescimento radial de *F. solani* no controle, T = o crescimento radial de *F. solani* em tratamento com *Trichoderma*.

2.3 Atividade de quitinase por isolados de *Trichoderma*

Os isolados de *Trichoderma* foram cultivados em frascos de erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura líquido (1,4g (NH₄)₂SO₄; 2g KH₂PO₄; 6,9g NaH₂PO₄; 0,3g MgSO₄.7H₂O; 1g quitina coloidal; 10g peptona) (ANJANI KUMARI e PANDA 1992). A quitina coloidal foi preparada por hidrólise ácida utilizando ácido fosfórico em 85% tal como descrito por Elad e Kapat (1999). A leitura da atividade de quitinase foi realizada através do espectrofotômetro, tal como descrito

por Monreal e Reese (1969). A mistura de reação foi composta de 1 mL de quitina coloidal 1% (w/v), 0,5 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,4 e 0,5 mL do extrato de enzima em bruto incubadas a 37 °C durante 96h. Os açúcares redutores foram detectados mediante a aplicação do método do ácido dinitrossalicílico a 570 nm (MILLER 1959). A curva de calibração foi realizada com N-acetilglicosamina, a concentrações de 0 a 5 mg mL⁻¹. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para a formação de 1 µmol de N-acetilglicosamina por minuto da reação, sob as condições padrão de ensaio.

2.4 Biocontrole da podridão radicular da mandioca, causado por *Fusarium solani*, usando *Trichoderma*

2.4.1 Preparação dos inoculos do patógeno e dos *Trichoderma*

Os inóculos do *F. solani* e dos *Trichoderma* selecionados foram cultivadas para crescimento em frascos de erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio líquido batata-dextrose, com adição de cloranfenicol. Estes foram incubados em B.O.D. por 8 dias a temperatura de 28 °C.

2.4.2 Coleta e preparação do solo

O solo utilizado neste experimento foi proveniente de mata nativa do município de São João-PE. Os atributos químicos foram avaliados e apresentaram os seguintes resultados: pH (H₂O 1:2,5) = 4,5; P (16,6 mg Kg⁻¹); Mg (0,8 cmol_c dm⁻³); Ca (0,8 cmol_c dm⁻³); Al (0,15 cmol_c Kg⁻¹) e H + Al (1,8 cmol_c dm⁻³) através de análise realizada de acordo com (EMBRAPA, 2009). Tal solo apresentou 880 g Kg⁻¹ de areia, 40 g Kg⁻¹ de argila e 80 g Kg⁻¹ de silte, sendo considerado solo arenoso. A sua coleta foi realizada em ziguezague, sendo realizadas 10 amostragens e misturadas para homogeneização, e acondicionados em sacos de nylon. Para a realização do experimento, o solo foi peneirado em malha de 2 mm e feita a esterilização do solo através do uso de autoclave, a uma temperatura de 121 °C, a 1 atm de pressão, por duas horas. Deixou-se o solo secar e em repouso durante duas semanas, após a autoclavagem, para estabilização dos teores de metais pesados. O solo foi distribuído por vasos plásticos com 4 L de capacidade. Estes receberam uma

planta e a irrigação manual realizada diariamente, o solo mantido na capacidade de campo.

2.4.3 Coleta e preparo das manivas

A coleta das manivas para plantio, foi realizada em propriedade com plantio sem histórico da doença da podridão radicular da mandioca, no município de São João-PE. A cultivar disponibilizada foi a “Pai Antônio”, sendo susceptível ao *F. solani*. As manivas foram previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio a 3% e colocadas para secar em ambiente protegido. Essas mediam 15-20 cm de comprimento e apresentavam 8-12 gemas.

2.4.4 Inoculação do patógeno

A infestação do patógeno foi feita seguindo a metodologia de Abo-elyousr et al. (2014) com adaptações, em que aos 90 dias do crescimento da planta, foi feita a dispersão em meio líquido do *F. solani* na concentração 1×10^6 propágulos mL^{-1} . Assim, 15 dias após procedimento, foi realizada avaliação da patogenicidade.

2.4.5 Aplicação dos *Trichoderma*

A inoculação dos *Trichoderma* (melhor controlador *in vitro* e o melhor produtor de quitinase) foi feita seguindo a metodologia de Abo-elyousr et al. (2014), em que aos 88 dias da planta, foi feita a dispersão em meio líquido de 100 mL dos *Trichoderma* na concentração 1×10^6 propágulos mL^{-1} . E aos 92 dias, repetiu-se o mesmo procedimento.

2.4.6 Aplicação do indutor de resistência

A aplicação do indutor de resistência (acibenzolar-S-metil) (Bion[®]), foi feita através da sua dispersão no solo em 2 aplicações (GRAHAM e MYERS, 2011), na concentração de $0,02 \text{ g L}^{-1}$, sendo a primeira aos 88 dias de vida da planta, e a seguinte, aos 92 dias.

2.4.7 Avaliação dos sintomas

A severidade da doença foi medida através de escala percentual e o índice de doença foi calculado de acordo com McKinney (1923), utilizando a atribuição de notas para os sintomas apresentados. 0 = plantas sem sintomas; 1 = plantas com

menos de 10% até 25% com lesões; 2 = plantas com 25% até 50%; 3 = plantas com 50% até 75%; 4 = 75% até 100% (plantas totalmente com sintomas).

2.4.8 Código dos Tratamentos de Campo

CSP – Controle sem patógeno, plantas sem a inoculação do *F. solani*;

CCP – Controle com a inoculação do *F. solani*;

IRP – Indutor de resistência e a inoculação do *F. solani*;

EIV – Eficiente *in vitro* - *Trichoderma* melhor antagonista *in vitro* e a inoculação do *F. solani*;

EPQ – Eficiente produtor de quitinase - *Trichoderma* melhor produtor de quitinase e a inoculação do *F. solani*;

2.4.9 Indução de respostas de defesas bioquímicas da planta

Coletou-se cinco folhas das plantas de mandioca de cada tratamento e armazenadas em freezer (-18 °C) para determinações analíticas. Para obtenção dos extratos vegetais, e posterior determinação das atividades enzimáticas, 0,1 g das amostras de folhas foram maceradas em N₂ líquido e em seguida adicionado 4 mL do tampão fosfato de potássio (50 mM pH 7,0) com [0,05g] de polivinilpirrolidona (PVP). O extrato foi colocado em microtubos, centrifugados por 10 min a 10.000 g a 4 °C. Em seguida o sobrenadante foi transferido para microtubos, e armazenados em freezer a -20°C, para serem usadas posteriormente. Para determinar a atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi utilizada a metodologia descrita por Havir e Mchale (1987). A atividade da ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) foi determinada pela metodologia de Nakano e Asada (1981) modificada por Koshiba (1993). A determinação da atividade da peroxidase (POX, EC 1.11.1) foi avaliada de acordo com Urbanek et al. (1991) usando guaiacol e H₂O₂ como substrato, e a polifenoloxidase (PFO, EC 1.10.3.1) foi determinada pela oxidação do pirogalol (KAR e MISHRA, 1976). Todas as atividades enzimáticas foram medidas em mmol min⁻¹g⁻¹ MF.

2.5 Delineamento experimental e análise estatística

Todos os testes foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, submetidos à análise de variância ANOVA. As médias separadas pelo teste de

Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, pelo Programa Sisvar versão 5.4 Build 80 (FERREIRA, 2007).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação de potencial antagonista de *Trichoderma* contra *Fusarium solani*, *in vitro*

Todos as estirpes de *Trichoderma* apresentaram inibição contra o crescimento do *F. solani* (Tabela 1). Os mais eficientes foram *T. hamatum* (6656) *T. harzianum* (6508) e *T. aureoviride* (3486), com inibição do crescimento em média de 88%. Alwathnani et al. (2012), Melo e Faull (2000), Rahman et al. (2015) encontraram resultados similares na avaliação do controle *in vitro* com as mesmas espécies de *Trichoderma*. Porém, nenhum desses autores deparou-se com o maior percentual encontrado nesta pesquisa. Um fator relevante, visto que Hermosa et al. (2012) em análises bioquímicas e moleculares mostraram a relação entre o antagonista e o patógeno para um bom resultado no momento da inibição.

Tabela 1. Efeito antagonista de isolados de *Trichoderma* contra o crescimento micelial de *Fusarium solani*, *in vitro*

Espécie de <i>Trichoderma</i>	Número de Identificação	% de inibição do crescimento do <i>Fusarium solani</i>
<i>Trichoderma aureoviride</i>	3486	87,83 ± 0,13 ^{ab}
<i>Trichoderma aureoviride</i>	3734	81,30 ± 0,14 ^c
<i>Trichoderma aureoviride</i>	5158	80,43 ± 0,16 ^c
<i>Trichoderma aureoviride</i>	6668	71,30 ± 0,12 ^d
<i>Trichoderma hamatum</i>	6656	88,91 ± 0,08 ^a
<i>Trichoderma harzianum</i>	3086	84,35 ± 0,07 ^b
<i>Trichoderma harzianum</i>	3197	75,87 ± 0,05 ^c
<i>Trichoderma harzianum</i>	6508	88,48 ± 0,23 ^a
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	6068	82,17 ± 0,10 ^c
<i>Trichoderma virens</i>	5007	84,57 ± 0,12 ^b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Esta avaliação é de suma importância, pois possibilita selecionar potencial agente antagonico com efeito direto, interferindo no crescimento micelial dos patógenos (KHALILI et al., 2012), e em particular potencial agentes antagonicos a patógenos do solo (ROSA et al., 2009). Portanto, o presente trabalho mostra uma eficiente capacidade de competição dos isolados de *Trichoderma*, e sua relação micoparasítica *in vitro* contra *F. solani*, salvo que Al-Saeedi et al. (2014) sugerem esse potencial por vários mecanismos de ação, com relevância a competição por nutrientes e/ou nicho, parasitismo, produção de enzimas, ou mesmo antagonismo mecânico.

Verifica-se que o *T. hamatum* (6656), apresentou alto poder micoparasítico, já que é possível observar o maior percentual de inibição de crescimento *in vitro* do *F. solani* (Tabela 1; Figura 1). Assim, este foi selecionado como melhor candidato ao controle *in vivo* da podridão radicular da mandioca neste estudo. Em vista que, Bae et al. (2009) e Ryder et al. (2012), relataram que esta espécie de *Trichoderma* apresentou potencial para indução de resistência e promoção de crescimento de cultivares de cacau e alface, respectivamente, em ambientes adversos, e por estas características serem similares às encontradas em solos cultivados com mandioca, evidencia um possível agente antagonico eficiente para utilização contra fungos patogênicos em solos pobres e com histórico de infestação de doenças.

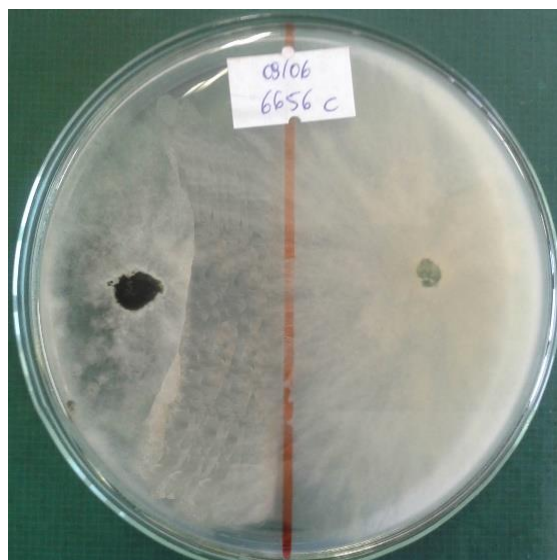


Figura 1. Atividade micoparasita de *Trichoderma hamatum* (6656) diante do *Fusarium solani*.

3.2 Atividade de quitinase por isolados de *Trichoderma*

Todas as estirpes de *Trichoderma* apresentaram produção de quitinase (Tabela 2), com destaque ao *T. aureoviride* (5158) na qual apresentou maior valor de atividade de quitinase, diferindo estatisticamente dos demais isolados, apresentando o valor de $6,70 \text{ U mL}^{-1}$. Resultado semelhantes foram encontrados por Agrawal e Kotasthane (2012) na qual relataram que estirpes de *T. aureoviride* apresentaram maiores atividades quitinolíticas suplementadas com quitina coloidal, do que as estirpes das espécies: *T. harzianum*, *T. viride*, *T. virens* e *T. citrinoviride*. Os mesmos autores indicaram que, maior resultado da produção de quitinase por essa espécie, *T. aureoviride*, se dá pela afinidade quanto ao pH da quitina coloidal, e assim, sendo um ótimo produtor da enzima contra a quitina da parede celular de patógenos.

Tabela 2. Atividade de quitinase por isolados de *Trichoderma*

Espécie de <i>Trichoderma</i>	Número de Identificação	Atividade de quitinase (U mL^{-1})
<i>Trichoderma aureoviride</i>	3486	$2,77 \pm 0,19^d$
<i>Trichoderma aureoviride</i>	3734	$1,95 \pm 0,14^e$
<i>Trichoderma aureoviride</i>	5158	$6,70 \pm 0,43^a$
<i>Trichoderma aureoviride</i>	6668	$3,46 \pm 0,23^d$
<i>Trichoderma hamatum</i>	6656	$4,01 \pm 0,27^{cd}$
<i>Trichoderma harzianum</i>	3086	$2,70 \pm 0,19^{de}$
<i>Trichoderma harzianum</i>	3197	$4,40 \pm 0,29^c$
<i>Trichoderma harzianum</i>	6508	$4,53 \pm 0,30^c$
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	6068	$5,55 \pm 0,36^b$
<i>Trichoderma virens</i>	5007	$2,05 \pm 0,15^{de}$

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

A análise da capacidade de produção de quitinase pelas estirpes de *Trichoderma* (LÓPEZ-MONDÉJAR et al., 2011; SILVA et al., 2004; SILVA et al., 2011) é um importante parâmetro analisado, uma vez que essa enzima degrada a quitina, um polissacarídeo constituinte da parede celular de uma gama de fungos, dentre eles os patogênicos (DE LA CRUZ et al., 1995), ocorrência apoiada pela análise genômica, feita por Gruber et al. (2011), Kubicek et al. (2011), que identificaram sequências genômicas em várias estirpes de *Trichoderma* que correspondem a quitinase.

Alamri et al. (2012) avaliando a produção de quitinase por uma estirpe *T. harzianum*, utilizando quitina de diferentes paredes celulares de patógenos, encontraram valores menores que o presente trabalho, um indicativo de que as estirpes aqui testadas, tem alto potencial contra patógenos fúngicos. O *T. aureoviride* (5158) apresentou o melhor valor na produção de quitinase, além disso, em estudos de Calvaet et al. (1993), demonstraram a eficiência desta espécie em causar benefícios a plantas de calêndola, por estimular o seu crescimento e aumentar a biomassa das plantas. Por isso, esta espécie foi selecionada como melhor candidato ao controle *in vivo* da podridão radicular da mandioca neste estudo.

3.3 Biocontrole da podridão radicular da mandioca, causado por *Fusarium solani*, usando *Trichoderma*

Os resultados da severidade, avaliado tanto na parte aérea quanto na raiz mostram alto poder de virulência do *F. solani* (CFF109) (Figura 2 – A), com severidade de 85 e 35%, respectivamente, no tratamento controle com patógeno. A aplicação do *Trichoderma* mais eficiente no antagonismo *in vitro* e o mais eficiente na produção de quitinase, mostraram reduções de 64 e 60% na severidade da doença na parte aérea, de 82 e 84% na severidade na raiz, respectivamente, quando comparados ao tratamento controle com patógeno.

Estes valores indicam que tanto o *T. hamatum* (6656) e o *T. aureoviride* (5158), foram eficientes no controle do *F. solani* na parte aérea da planta.

Todos os tratamentos testados foram eficientes em relação à diminuição da severidade da doença na parte radicular da planta, em relação ao CCP (Figura 2 – B).

Os valores expressos no presente trabalho, mostram similaridade ao estudo de Bokhari e Perveen (2012), em que demonstra redução da incidência da doença, causado por fungos do gênero *Trichoderma* no controle *in vivo* contra o mesmo patógeno em plantas de tomates.

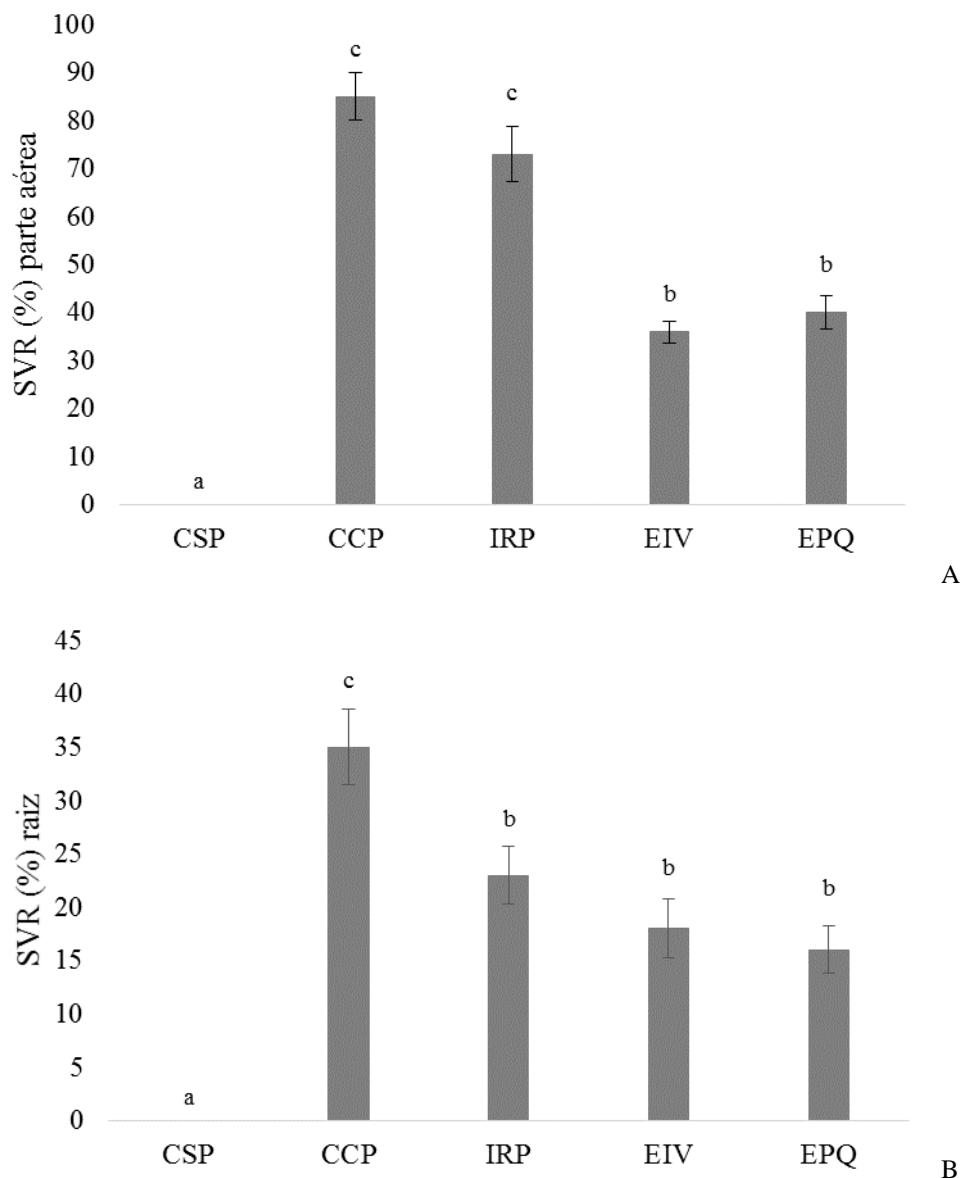


Figura 2. A – Severidade (%) da parte aérea; B – Severidade (%) da parte radicular de mandioca cv. “Pai Antônio” infectadas com *Fusarium solani*. CSP = Controle Sem o Patógeno; CCP = Controle Com o Patógeno; IRP = Indutor de Resistência em Plantas (ASM); EIV = *Trichoderma hamatum* (6656) - Eficiente *in vitro*; EPQ = *Trichoderma aureoviride* (5158) - Eficiente em Produção de Quitinase.

Medias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0.05$).

O IRP diminuiu na porcentagem da severidade na parte radicular, não diferenciando estatisticamente em relação ao controle com *F. solani* na parte aérea (Figura 2 – A e B). Apesar de vários autores (JI et al., 2011; KONÉ et al., 2009) relatarem que o indutor de resistência em plantas age na resistência sistêmica adquirida (*systemic acquired resistance* - SAR) em plantas contra agentes patogênicos, no presente trabalho este não foi tão eficaz. Provavelmente devido ao tempo de ação do indutor de resistência em plantas, que dependendo da cultura, necessita de quatro semanas para apresentar resultados na indução da resistência à planta (BARILLI et al., 2010; SILLERO et al., 2012).

3.4 Indução de respostas de defesas bioquímicas da planta

As análises das atividades de enzimas antioxidantes, que combatem as espécies reativas de oxigênio, nos tratamentos analisados, mostraram perfis de atividade semelhante para as enzimas CAT e PFO para todos os tratamentos, mas perfis diferentes para as enzimas POX e APX em relação ao tratamento IRP. As atividades de todas as enzimas analisadas (APX, POX, CAT e PFO), aumentaram suas atividades na presença dos dois antagonistas nos tratamentos EIV e EPQ.

As plantas analisadas responderam ativamente a todos os testes submetidos do grupo de enzimas que combatem as EROs. Dando-se ênfase as plantas dos tratamentos EPQ e EIV para todos os testes enzimáticos: peroxidase (POX), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e polifenoloxidase (PFO); apresentando diferença significativa quanto os tratamentos controles CSP, CCP e o tratamento IRP (Figura 3).

Importância é dada as enzimas que combatem o grupo das EROs, pois é uma resposta da planta que sofre estresse seja abiótico ou biótico, para um reequilíbrio bioquímico (MILLER et al., 2010). Portanto, um mecanismo para homeostase redox das plantas, em condições de estresse, é a desintoxicação das EROs para a sobrevivência celular (GILL e TUTEJA, 2010).

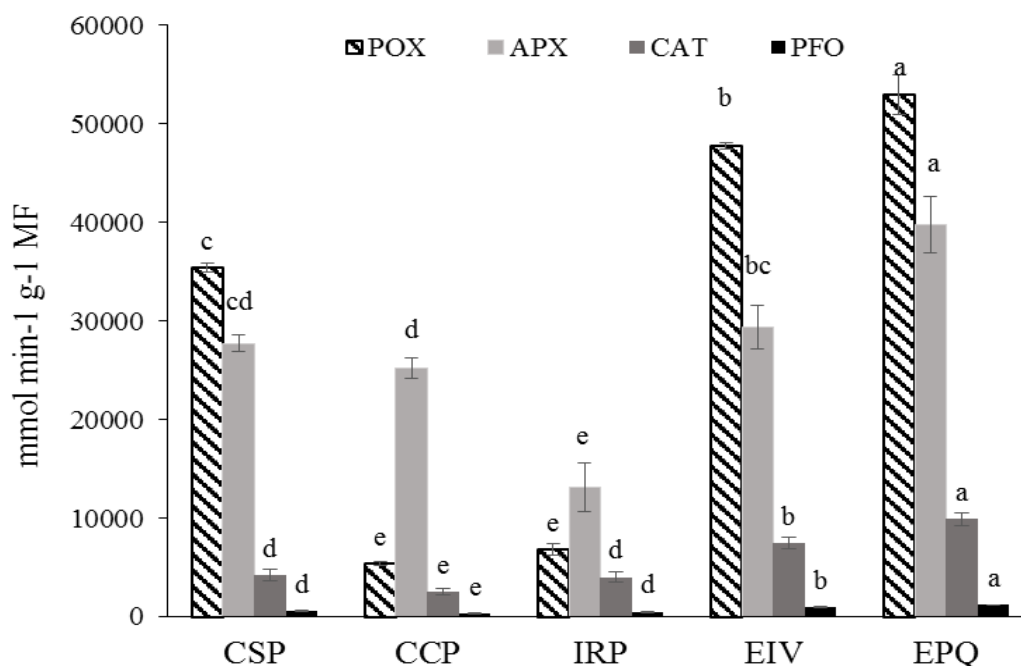


Figura 3. Atividades enzimáticas em plantas de mandioca tratadas com isolados de *Trichoderma* (eficientes no antagonismo *in vitro* e na produção de quitinase) e inoculadas com *Fusarium solani*. Peroxidase (POX), Catalase (CAT), polifenoloxidase (PFO) e Ascorbato peroxidase (APX). CSP = Controle Sem o Patógeno; CCP = Controle Com o Patógeno; IRP = Indutor de Resistência em Plantas (ASM); EIV = *Trichoderma hamatum* (6656) - Eficiente *in vitro*; EPQ = *Trichoderma aureoviride* (5158) - Eficiente em Produção de Quitinase. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0.05$).

Os tratamentos com o uso dos *Trichoderma*, foram os mais ativos para todas as enzimas como resposta da planta, indicativo que o uso dos antagonistas, ajudou a resposta de defesa caracterizando a inibição do crescimento do patógeno, que pode ocorrer através da formação de fitoalexinas, reforço da parede celular, síntese de metabolitos secundários e proteínas (SHORESH et al., 2008).

As mais altas atividades foram de POX, que pode correlacionar por essa enzima catalisar a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico em presença de peroxidase, originando lignina, reforçando a parede celular das plantas em resposta a ataque de patógenos (ARRIETA-BAEZ e STARK, 2006; FRY, 2004);

e a APX, por essa enzima junto com glutathiona redutase e dehidroascorbato redutase, pertencem a um mecanismo de detoxificação de peróxido, conhecido como via ascorbato-GSH (TOMÁNKOVÁ et al., 2006), ajudando na mecanismo de defesa da planta.

4. CONCLUSÃO

O *Trichoderma hamatum* (6656) foi o melhor antagonista entre todas as estirpes; já o *Trichoderma aureoviride* (5158) foi o mais eficiente produtor de quitinase.

Os *T. hamatum* (6656) e *T. aureoviride* (5158) foram eficazes e melhores que o indutor de resistência, podendo ser usados como controladores da podridão radicular da mandioca, causada por *Fusarium solani*.

O *T. aureoviride* (5158) teve uma melhor afinidade com a planta, visto que possibilitou a mesma, maiores atividades de peroxidase e ascorbato peroxidase, sendo indício de que esta estirpe promove a cultura da mandioca, a produção de inibidores contra a podridão radicular da mandioca, causando a resistência sistêmica induzida para essas plantas.

5. REFERÊNCIAS

- ABO-ELYOUSR, K. A. M.; ABDEL-HAFEZ, S. I. I.; ABDEL-RAHIM, I. R. Isolation of *Trichoderma* and evaluation of their antagonistic potential against *Alternaria porri*. **Journal of Phytopathology**, v. 162, p. 567-574, 2014.
- AGRAWAL, T.; KOTASTHANE, A. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. **SpringerPlus**, v. 1(73), p. 1-10, 2012.
- ALAMRI, S. A. A. D.; HASHEM, M.; MOSTAFA, Y. S. *In vitro* and *in vivo* biocontrol of soil-borne phytopathogenic fungi by certain biogents and their possible mode of action. **Biocontrol Science**, v. 17(4), p. 155-167, 2012.
- ALMEIDA, A. M.; SOUZA, R. M.; GOMES, V. M.; MIRANDA, G. B. Greenhouse and field assessment of different organic compounds against guava-parasitic *Meloidogyne enterolobii*. **Bragantia**. Campinas, v. 71, n. 1, p. 67-74, 2012.

- AL-SAEEDI, S. S.; AL-ANI, B. M. Study of antagonistic capability of *Trichoderma harzianum* isolates against some pathogenic soil borne fungi. **Agriculture and Biology Journal of North America**, v. 5(1), p. 15-23, 2014.
- ALWATHNANI, H. A.; PERVEEN, K.; TAHMAZ, R.; ALHAQBANI, S. Evaluation of biological control potential of locally isolated antagonist fungi against *Fusarium oxysporum* under *in vitro* and pot conditions. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6(2), p. 312-319, 2012.
- ANJANI KUMARI J.; PANDA, T. Studies on critical analysis of factors influencing improved production of protoplasts from *Trichoderma reesei* mycelium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 241–248, 1992.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**. v. 55, p. 373–399, 2004.
- ARRIETA-BAEZ, D., AND STARK, R. E. Modeling suberization with peroxidase-catalyzed polymerization of hydroxycinnamic acids: crosscoupling and dimerization reactions. **Phytochemistry**, v. 67, p. 743–753, 2006.
- BAE, H.; SICHER, R. C.; KIM, M. S.; KIRN, S. H.; STREM, M. D.; MELNICK, R. L.; BAILEY, B. A. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. **Journal of Experimental Botany**, v. 60(1), p. 3279-3295, 2009.
- BANDYOPADHYAY, R.; MWANGI, M.; AIGBE, S.O.; LESLIE, J.F. *Fusarium* species from the cassava root rot complex in West Africa. **Phytopathology**, v. 96, p. 673-676, 2006.
- BARILLI, E.; PRATS, E.; RUBIALES, D. Benzothiadiazole and BABA improve resistance to *Uromyces pisi* (Pers.) Wint. in *Pisum sativum* L. with an enhancement of enzymatic activities and total phenolic content. **European Journal of Plant Pathology**, v. 128, p. 483-493, 2010.
- BARROS, J. A.; MEDEIROS, E. V.; NOTARO, K. A.; MORAES, W. S.; SILVA, J. M.; NASCIMENTO, T. C. E. S.; MOREIRA, K. A. Different cover promote

- sandy soil suppressiveness to root rot disease of cassava caused by *Fusarium solani*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8(10), p. 967-973, 5 March, 2014.
- BHARDWAJ, S. K. Evaluation of plant extracts as antifungal agents against *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 8(6), p. 385-388, 2012.
- BOKHARI, N. A.; PERVEEN, K. Antagonistic action of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Fusarium solani* causing root rot of tomato. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6(44), p. 7193-7197, 2012.
- BUENSANTEAI, N.; ATHINUWAT, D. The antagonistic activity of *Trichoderma virens* strain TvSUT10 against cassava stem rot in Thailand. **African Journal of Biotechnology**, v. 11(84), p. 14996-15001, 2012.
- CALVET, C.; PERA, J.; BAREA, J. M. Growth response of marigold (*Tagetes erecta* L.) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlite mixture. **Plant and Soil**, v. 148, p. 1-6, 1993.
- CALVO, P.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; ZÚÑIGA, D. Characterization of *Bacillus* isolates of potato rhizosphere from andean soils of Peru and their potential PGPR characteristics. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 899-906, 2010.
- CASTELLANI, A. Viability of mold culture of fungi in distilled water. **Jornal of tropical Medicine and Hygiene**, Detroit, v. 42, p. 225-226, 1939.
- DE LA CRUZ, J.; PINTOR-TORO, J. A.; BENÍTEZ, T.; LLOBELL, A.; ROMERO, L. C. A novel endo- β -1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 6937-6945, 1995.
- EBD-EL-KHAIR, H.; KHALIFA, R.; KARIMA, H. E. Effect of *Trichoderma* species on damping off diseases incidence, some plant enzymes activity and nutritional status of bean plants. **Journal of American Science**, v. 6(9), p. 486-497, 2010.

- EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, v. 61, p. 42-44, 1971.
- ELAD, Y.; KAPAT, A. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, p. 177–189, 1999.
- EL-MOHAMEDY, R. S. R.; JABNOUN-KHIAREDDINE, H.; DAAMI-REMADI, M. Control of root rot diseases of tomato plants caused by *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* using different chemical plant resistance inducers. **Tunisian Journal of Plant Protection**, v. 9 (1), p. 45-55, 2014.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, **Why cassava?** FAOSTAT Database Gateway – FAO, 2015. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/agp/agpc/gcids/index_en.html>.
- FRY, S. C. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. **New Phytologist**, v. 161, p. 641-675, 2004.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909–930, 2010.
- GRAHAM, J. H.; MYERS, M. E. Soil application of SAR Inducers Imidacloprid, Thiamethoxam, and Acibenzolar-S-Methyl for citrus canker control in young grapefruit trees. **Plant Disease**, v. 95, p. 725-728, 2011.
- GRUBER, S.; KUBICED, C. P.; SEIDL-SEIBOTH, V. Differential regulation of orthologous chitinase genes in mycoparasitic *Trichoderma* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 7217-7226, 2011.
- HARMAN, G. E.; HERRERA-ESTRELLA, A. H.; HORWITZ, B. A.; LORITO, M. Special issue: *Trichoderma* - from basic biology to biotechnology. **Microbiology**, v. 158, p. 1-2, 2012.
- HASANZADE, F.; RASTEGAR, M. F.; JAFARPOU, B.; KERMANI, M. Identification of *Fusarium solani* f. sp. pisi the cause of root rot in chickpea and

- assessment of its genetic diversity using AFLP in northeast Iran. **Research Journal of Biological Sciences**, v. 3, p. 737-741, 2008.
- HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and development characterization of multiple forms of catalase in *Tobacco leaves*. **Plant Physiology**, v. 84, p. 450–455, 1987.
- HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v. 158, p. 17–25, 2012.
- HHMAU, H.; WIJESUNDERA, R. L. C.; CHANDRASEKHARAN, N. V.; WIJESUNDERA, W. S. S.; KATHRIARACHCHI, H. S. Isolation and characterization of *Trichoderma erinaceum* for antagonistic activity against plant pathogenic fungi. **Current Research in Environmental & Applied Mycology**, v. 5 (2): 120-127, 2015.
- HRIDYA, A.C.; BYJU, G.; MISRA, R. S. Effect of biocontrol agents and biofertilizers on root rot, yield, harvest index and nutrient uptake of cassava (*Manihot esculanta* Crantz), **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 59, p. 1-13, 2012.
- HUSSAIN, F.; SHAUKAT, S. S.; ABID, M.; USMAN, F.; AKBAR, M. Control of *Meloidogyne javanica* and *Fusarium solani* in chilli (*Capsicum annuum* L.) with the application of chitin. **Pakistan Journal of Nematology**, v. 31 (2), 165-170, 2013.
- Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA). **Cultura da mandioca**. Disponível em: <<http://www.ipa.br/resp14.php>>.
- JI, P.; YIN, J.; KONÉ, D. Application of acibenzolar-S-methyl and standardd fungicides for control of Phytophthora blight on squash. **Crop Protection**, v. 30, p. 1691-1605, 2011.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p. 315–319, 1976.

- KHALILI, E. SADRAVI, M.; NAEIMI, S.; KHOSRAVI, V. Biological control of rice brown spot with native isolates of three *Trichoderma* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43(1), p. 297-305, 2012.
- KONÉ, D.; CSINOS, A.S.; JACKSON, K.L.; JI, P. Evaluation of systemic acquired resistance inducers for control of *Phytophthora capsicion* squash. **Crop Protection**, v. 28, p. 533-538, 2009.
- KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant and Cell Physiology**, v. 34, p. 713–721, 1993.
- KUBICEK et al., 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. **Genome Biology**, v. 12, p. 1-15, 2011.
- LI, G.; HUANG, H.; ACHARYA, S. Antagonism and biocontrol potential of *Ulocladium atrum* on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, v. 28, p. 11–18, 2003.
- LÓPEZ-MONDÉJAR, R.; ROS, M.; PASCUAL, J. A. Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent. **Biology Control**, v. 56, p. 59-66, 2011.
- MARCELLO C. M.; STEINDORFF A. S.; SILVA S. P.; SILVA R. N.; BATAUS L. A. M.; ULHOA, C. J. Expression analysis of the exo- β -1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. **Microbiological Research**. v. 165, p. 75-81, 2010.
- McKINNEY, R. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research, Pakistan**, v. 6, p.195-218, 1923.
- MELO, I. S.; FAULL, J. L. Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. **Scientia Agricola**, v. 57(1), p. 55-59, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162000000100010&lng=pt&nrm=iso>.

- MENDES, M. A. S.; URBEN, A. F.; Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. Disponível em: <<http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fichahp.asp?id=994>>.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426–428, 1959.
- MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant Cell Environ**, v. 33, p. 453–467, 2010.
- MONREAL, J.; REESE, E. T. The chitinase of *Serratia marcescens*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 15, p. 689–696, 1969.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, p. 867–880, 1981.
- NOTARO, K. A.; MEDEIROS, E. V.; SILVA, C. A. D.; BARROS, J. A. Prospecção de fitopatógenos associados à podridão radicular da mandioca em Pernambuco, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 5, p. 1832-1839, 2013.
- OLIVEIRA, S. A. S.; HOHENFELD, C. S.; SANTOS, V. S. HADDAD, F.; OLIVEIRA, E. J. Resistance to *Fusarium* dry root rot disease in cassava accessions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.10, p.1414-1417, 2013.
- OYELANA, O. A.; DURUGBO, E. U.; OLUKANNI, O. D.; AYODELE, E. A. Antimicrobial activity of *Ficus* leaf extracts on some fungal and bacterial pathogens of *Dioscorea rotundata* from Southwest Nigeria. **Journal of Biological Sciences**, v. 11(5), p. 359-366, 2011.
- RAHMAN, S. M. M.; MUNIRUZZAMAN, S. M.; NUSRAT, S.; KHAIR, ABUL. *In vitro* evaluation of botanical extract, bioagents and fungicides against purple blotch diseases of bunch onion in Bangladesh. **Advances in Zoology and Botany**, v. 3(4), p. 179-183, 2015.

- ROSA, D. R.; HERRERA, C. J. L. Evaluation of *Trichoderma* spp. as biocontrol agents against avocado white root rot. **Biological Control**, v. 51, p. 66-71, 2009.
- RYDER, L. S.; HARRIS, B. D.; SOANES, D. M.; KERSHAW, M. J. TALBOT, N. J.; THORNTON, C. R. Saprotrophic competitiveness and biocontrol fitness of a genetically modified strain of the plant-growth-promoting fungus *Trichoderma hamatum* GD12. **Microbiology**, v. 158, p. 84-97, 2012.
- SABET, K. K.; SABER, M. M.; EL-NAGGAR, M. A.; EL-MOUGY, N. S.; EL-DEEB, H. M.; EL-SHAHAWY, I. E. Using commercial compost as control measures against Cucumber root-rot disease. **Journal of Mycology**, v. 13, 2013.
- SERRA, I. M. R. S., SILVA, G. S.; NASCIMENTO, F.S.; LIMA, L. K. F. *Scytalidium lignicola* em mandioca: ocorrência no Estado do Maranhão e reação de cultivares ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 4, p. 327-328, 2009.
- SHORESH, M.; HARMAN, G. E. The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: A proteomic approach. **Plant Physiology**, v. 147, p. 2147–2163, 2008.
- SILLERO, J.C.; ROJAS-MOLINA, M. M.; AVILA, C. M.; RUBIALES, D. Induction of systemic acquired resistance against rust, ascochyta blight and broomrape in faba bean by exogenous application of salicylic acid and benzothiadiazole. **Crop Protection**, v. 34, p. 65–69, 2012.
- SILVA, B. D.; ULHOA, C. J.; BATISTA, K. A.; YAMASHITA, F.; FERNANDES, K. F. Potencial fungal inhibition by immobilized hydrolytic enzymes from *Trichoderma asperellum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 8148-8154, 2011.
- SILVA, R. N.; SILVA, S. P.; BRANDÃO, R. L.; ULHOA, C. J. Regulation of N-acetyl- β -D-glucosaminidase produced by *Trichoderma Harzianum*: evidence that cAMP controls its expression. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 667-671, 2004.
- THIPYAPONG, P.; HUNT, M. D.; STEFFENS, J. C. Antisense downregulation of

polyphenoloxidase results in enhanced disease susceptibility. **Planta**, v. 220, p. 105-117, 2004.

TOMÁNKOVÁ, K.; LUHOVÁ, L.; PETRIVALSKÝ, M.; PEC, P. LEBEDA, A. Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 68, p. 22–32, 2006.

UBALUA, A. O.; OTI, E. Antagonistic properties of *Trichoderma viride* on post harvest cassava root rot pathogens. **African Journal of Biotechnology**, v. 6(21), p. 2447-2450, 2007.

UBALUA, A. O.; OTI, E. Evaluation of antimicrobial properties of some medicinal plants for fresh cassava roots preservation. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 7(5), p. 679-681, 2008.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, K. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 13, p. 43–50, 1991.

YELMAME, M. G.; MEHTA, B. P.; DESHMUKH, A. J.; PATIL, V. A. Evaluation of some organic extracts in *in vitro* to control *Fusarium solani* causing Chilli wilt. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 1(2), p. 1-4, 2010.

CAPÍTULO II

POTENCIAL ANTAGÔNICO DE *Trichoderma* SPP. AO *Scytalidium lignicola* (CFF408) E ATIVIDADES ENZIMÁTICAS ANTIOXIDANTES EM MANDIOCA

RESUMO

Trichoderma são fungos com grande potencial antagônico pelos seus vários mecanismos de atuação. Como liberação de enzimas, a quitinase, que atacam a parede celular dos patógenos. Esses fungos são utilizados em várias culturas como antagonistas de vários fitopatógenos, porém, poucos estudos indicam o uso do *Trichoderma* como biocontrole do *S. lignicola* causador da podridão negra da mandioca. Apesar das muitas possibilidades antagônicas dos *Trichoderma*, existe lacunas sobre o conhecimento da interação *Trichoderma*-planta-patógeno, visto que os antagonistas podem colaborar para a possível indução de resistência as plantas, porque quando expostas a esse patossistemas, as plantas respondem com a produção de enzimas antioxidativas. Portanto, o presente trabalho teve como objetivos, selecionar os melhores, antagonista *in vitro* e produtor de quitinase; avaliar o potencial antagônico dos *Trichoderma* selecionados, em comparação com o indutor de resistência, em aplicação na planta, tendo como resposta fisiológica a avaliação da produção de enzimas do complexo oxidativo. *In vitro*, foi analisado a inibição do crescimento micelial do *S. lignicola* em meio batata-dextrose-ágar, para selecionar o melhor *Trichoderma* com potencial antagônico direto. Um método baseado na utilização de meio basal com quitina coloidal, como única fonte de carbono, foi utilizada para avaliar o melhor *Trichoderma*, para produção de quitinase. Em casa de vegetação, foi comparado *in vivo* os *Tricoderma* anteriormente selecionados, contra o uso de indutor de resistência, para o potencial inibitório da severidade da doença infestada nas plantas, após 92 dias de crescimento. Posteriormente, foi avaliada a produção de enzimas pelas plantas dos tratamentos *in vivo*, do complexo antioxidativo (ascorbato peroxidase, catalase, peroxidase e polifeniloxidase). Todas as estirpes apresentaram inibição do crescimento do *S. lignicola*, no entanto, o mais eficiente foi o *T. harzianum* (3086) com valor de 80,78% de inibição de crescimento micelial, assim sendo o melhor candidato para inibição da doença. O *T. aureoviride* (5158) foi o melhor candidato para inibição da doença, por ser o melhor produtor de quitinase. No resultado para o teste da severidade *in vivo*, todos os tratamentos foram eficientes para à diminuição da severidade da doença, sendo os tratamentos com os *Trichoderma* que mais se destacaram. Dos dados enzimáticos, o tratamento *T. aureoviride* (5158) eficiente na produção de quitinase foi o que apresentou maior

eficiência dentre os tratamentos para todas as enzimas testadas (APX, CAT, POX e PFO), com destaque para a alta produção das enzimas peroxidase e ascorbato peroxidase. Os isolados *Trichoderma harzianum* (3086) e *Trichoderma aureoviride* (5158) foram eficientes na diminuição da severidade da podridão negra da mandioca, causada por *S. lignicola*.

ABSTRACT

Trichoderma fungi are strongly antagonistic by its various mechanisms of action. As release of enzymes, such as chitinase, which attack the cell wall of the pathogen. These fungi are used in various cultures as antagonists of various pathogens, however, few studies account for the use of *Trichoderma* as biocontrol of *S. lignicola* that causes the of cassava black rot. Despite the many opposing possibilities of *Trichoderma*, there are gaps on the knowledge of interaction *Trichoderma*-plant-pathogenic, whereas antagonists may contribute to possible plants induction of resistance, because when exposed to this pathosystems, plants respond with the production of antioxidative enzymes. Therefore, this study aimed to select the best antagonist *in vitro* and chitinase producer; evaluate the antagonistic potential of the selected *Trichoderma*, compared with the resistance inducer in applying to the plant, with the physiological response evaluation of the production of oxidative enzymes complex. *In vitro*, it was analyzed the inhibition of mycelial growth of *S. lignicola* on potato-dextrose-agar, to select the best *Trichoderma* with direct antagonistic potential. Method based on the use of basal medium with colloidal chitin as the sole carbon source, was used to evaluate the best *Trichoderma*, for chitinase production. In the greenhouse, it was compared *in vivo* the *Trichoderma* selected earlier, against the use of inductor resistance to the inhibitory potential of the severity of the disease in infested plants, after 92 days of growth. Subsequently, was evaluated the production of enzymes in plants *in vivo* treatments of the antioxidative complex (ascorbate peroxidase, catalase, peroxidase and poliphenol oxidase). All strains show inhibition of *S. lignicola* growth, however, was more efficient *T. harzianum* (3086) value of 80.78% of mycelial growth inhibition, therefore the best candidate for inhibition of disease. The *T. aureoviride* (5158) was the best candidate for inhibiting the disease, to be the best of the chitinase producer. The result for the severity *in vivo* test, all treatments were effective in the reduction of disease severity, and the treatments with *Trichoderma* that more stood out. Of enzyme data, the treatment *T. atroviride* (5158) efficient in the production of chitinase showed the highest efficiency among the treatments for all tested enzymes (APX, CAT, POX and PPO), highlighting the high production of peroxidase and ascorbate peroxidase. The *Trichoderma harzianum* (3086) and *Trichoderma*

aureoviride (5158) were effective in reducing the severity of cassava black rot, caused by *S. lignicola*.

1. INTRODUÇÃO

Trichoderma é um grupo de fungos filamentosos de rápido crescimento, com produção intensiva de esporos em condições adversas do solo (SINGH et al., 2010) e simbiontes endofíticos das plantas (CARRERAS-VILLASEÑOR et al., 2012). Estes exercem controle biológico contra fungos fitopatogênicos de forma indireta, através de mecanismos defensivos e antibiose (SALAS-MARINA et al., 2011), competição por nicho e nutrientes (HERMOSA et al., 2012), alterando condições ambientais (STEYAERT et al., 2010) e estimulando o crescimento das plantas (BOGUMIL et al., 2013) ou diretamente, por micoparasitismo (LÓPEZ-MONDÉJAR et al., 2011).

Pelo mecanismo de micoparasitismo os *Trichoderma* spp. são capazes de clivar as hifas dos patógenos através da secreção de enzimas, tais como amilase (ANITA et al., 2012), glucanases e quitinases (MARCELLO et al., 2010; SHORESH et al., 2010).

Vários são os estudos que avaliam o potencial antagônico do gênero *Trichoderma* diante de fitopatógenos (DOLEY et al., 2014; EL-GALI, 2014; KUMAR et al., 2015), porém, existe uma lacuna de informações a respeito do comportamento da planta na utilização desses fungos como biocontroladores de patógenos do solo (KIPNGENO et al., 2015; SRIVASTAVA et al., 2014; TAPWAL et al., 2015), sobretudo na cultura da mandioca (SOBOWALE et al., 2010).

A eficiência na utilização de estirpes de *Trichoderma* contra diversos patógenos foi mostrada para uma gama de culturas, como, feijão (MOHAMED et al., 2010), tomate (PATIL et al., 2012), amendoim (ABDEL-KADER et al., 2013), melão (GALLETTI et al., 2015), melancia (EVERTS et al., 2014), mandioca (UBALUA e OTI, 2008), dentre outras. Sabe-se que a mandioca sofre grandes perdas por causa do ataque de várias doenças, com destaque a podridão negra da mandioca pela severidade contra a cultura (EMBRAPA, 2003), sendo um dos principais agentes causais o *Scytalidium lignicola*, fitopatógeno habitante do solo de difícil manejo (SILVA et al., 2013).

O manejo integrado de doenças incorporando métodos de controles cultural e biológico, com redução de insumos químicos vem sendo uma abordagem cada vez

mais presente e bastante promissora, uma vez que, para o controle de várias doenças da mandioca não há registro de defensivos agrícolas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e o uso de *Trichoderma* como biocontrolador dos patógenos vem despontando dentre as alternativas para essa cultura (BUENSANTEAI e ATHINUWAT, 2012; HARMAN et al., 2012).

Vários são os estudos utilizando o *Trichoderma* no biocontrole de inúmeras doenças de plantas, todavia, existe lacunas no conhecimento da ação enzimática desses antagonistas e a resposta fisiológica da mandioca, quando submetidas ao patossistema em estudo. Assim, no presente trabalho, objetivou-se, (1) avaliar e selecionar o melhor antagonista entre dez estirpes de *Trichoderma* no controle *in vitro* contra o *Scytalidium lignicola*; (2) avaliar o potencial antagonista dos isolados anteriormente selecionados e comparar com o indutor de resistência para o manejo da podridão negra da mandioca e (3) determinar as respostas enzimáticas em plantas de mandioca.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do *Scytalidium lignicola*

O fungo *S. lignicola* (CFF408) foi isolado pelos autores Notaro et al. (2013), a partir de raízes de plantas de mandioca, em propriedades no agreste pernambucano, que apresentavam problemas com a podridão negra da mandioca. As raízes foram acondicionadas, refrigeradas e encaminhadas para o CENLAG, para higienização, através de lavagem em água corrente, e desinfestadas com hipoclorito de sódio a 3% e colocadas para secar em ambiente protegido. Em seguida, o patógeno foi isolado a partir de fragmentos das raízes com lesões, em que foram plaqueados em meio de cultura BDA, acrescido de estreptomicina. Colocados para crescimento, obtendo-se culturas puras, sendo identificadas e quantificadas por microscopia óptica através da característica das colônias, morfologia da cultura, dos esporos, e pigmentação.

A patogenicidade deste isolado foi previamente testado conforme Serra et al. (2009), observado através de avaliação visual a severidade da doença, caracterizada por áreas de tecido coberto com sintomas.

2.2 Avaliação de potencial antagônico de *Trichoderma* spp. ao *S. lignicola* (CFF408), *in vitro*

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 11 tratamentos, sendo 10 isolados de *Trichoderma* + tratamento controle constituído apenas pelo patógeno *S. lignicola*, com quatro repetições. Os tratamentos foram: T1 = *T. aureoviride* (3486), T2 = *T. aureoviride* (3734), T3 = *T. aureoviride* (5158), T4 = *T. aureoviride* (6668), T5 = *T. hamatum* (6656), T6 = *T. harzianum* (3086), T7 = *T. harzianum* (3197), T8 = *Trichoderma harzianum* (6508), T9 = *T. longibrachiatum* (6068), T10 = *T. virens* (5007), T11 = controle, apenas o *S. lignicola*.

Foi selecionado o isolado de *Trichoderma* mais eficiente na inibição do crescimento micelial *in vitro* de *S. lignicola*. O mais eficiente na produção da enzima quitinase, já foi selecionado em ensaio anterior.

2.3 Biocontrole da podridão negra da mandioca, causado por *Scytalidium lignicola* (CFF408), usando *Trichoderma*

O experimento de manejo da podridão negra da mandioca, causado por *S. lignicola* utilizando *Trichoderma*, foi realizado conforme capítulo anterior, seguindo a mesma metodologia para preparo dos inóculos do patógeno e dos *Trichoderma* selecionados, mesmo preparo do solo, aplicação do indutor de resistência comercial, da inoculação do patógeno e antagonista.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 6 tratamentos e quatro repetições, sendo a unidade experimental constituída por uma planta por vaso. Os tratamentos foram: CSP – controle sem inoculação do *S. lignicola*; CCP – controle com a inoculação do *S. lignicola*; IRP – indutor comercial de resistência de plantas (Bion[®]); EIV – *Trichoderma* selecionado como melhor antagonista *in vitro*; EPQ – *Trichoderma* selecionado como o melhor produtor de quitinase.

Aos 92 dias após o plantio da maniva, foram avaliadas a severidade através da visualização dos sintomas da podridão negra, causada por *S. lignicola* que são calculadas de acordo com McKinney (1923), utilizando a atribuição de notas. 0 = plantas sem sintomas; 1 = plantas com menos de 10% até 25% com lesões; 2 =

plantas com 25% até 50%; 3 = plantas com 50% até 75%; 4 = 75% até 100% (plantas totalmente com sintomas).

2.4 Atividade enzimática antioxidantes em mandioca

As atividades enzimáticas determinadas foram as mesmas do capítulo anterior.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação do potencial antagonístico de *Trichoderma* spp. ao *S. lignicola* (CFF408), *in vitro*

Dos isolados de *Trichoderma* testados, o que apresentou menor porcentagem de inibição de crescimento do *S. lignicola* (CFF408), foi o *T. aureoviride* (6668) com valor de 61,41%, enquanto o maior foi o *T. harzianum* (3086) com 80,78% (Figura 4).

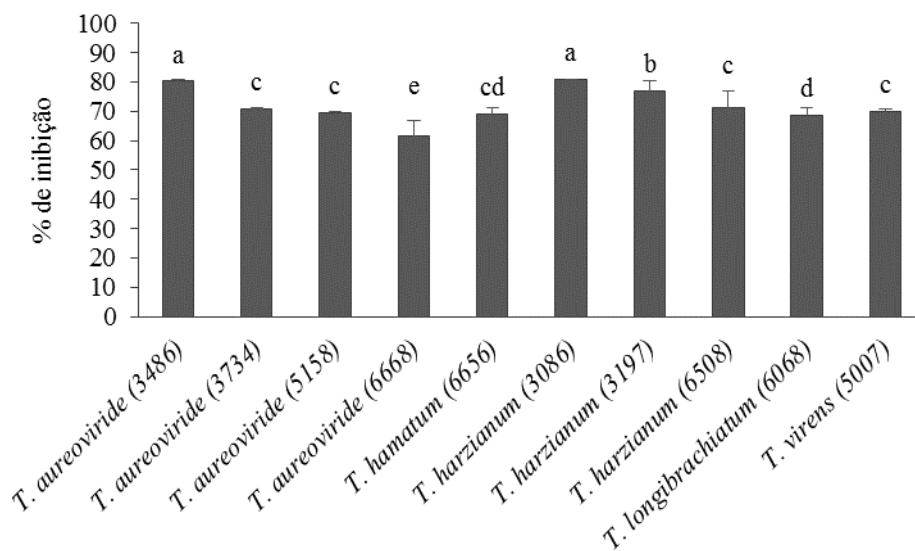


Figura 4. Efeito antagonista de isolados de *Trichoderma* contra o crescimento micelial de *Scytalidium lignicola* (CFF408), *in vitro*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Todos os *Trichoderma* apresentaram potencial inibitório contra o *S. lignicola*, similar aos resultados obtidos por Reddy et al. (2014), quando testaram os *Trichoderma viride*, *T. harzianum*, *T. reesei*, *T. atroviride*, *T. pseudokoningii*, *T.*

koningii e *T. virens* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*, *Alternaria solani*, *Aspergillus niger* e *Macrophomina phaseolina*, verificaram que todos os antagonistas se mostraram capazes de inibir o crescimento dos patógenos, sugerindo como mecanismo de inibição, o micoparasitismo e a produção de metabólitos voláteis e não-voláteis.

As estirpes *T. aureoviride* (3486) e *T. harzianum* (3086) não apresentaram diferença estatística, destacando-se pelos melhores resultados de porcentagem de inibição do crescimento do *S. lignicola* (CFF408) (Figura 4; 5). Assim, a estirpe *T. harzianum* (3086), por apresentar um valor maior e outros autores (GALLETTI et al., 2015) verificarem seu potencial para o desenvolvimento da cultura em avaliação, e antagonismo a patógenos presentes no solo (SUNDARAMOORTHY e BALABASKAR, 2013), foi selecionado como melhor candidato ao controle *in vivo* da podridão radicular da mandioca neste estudo.

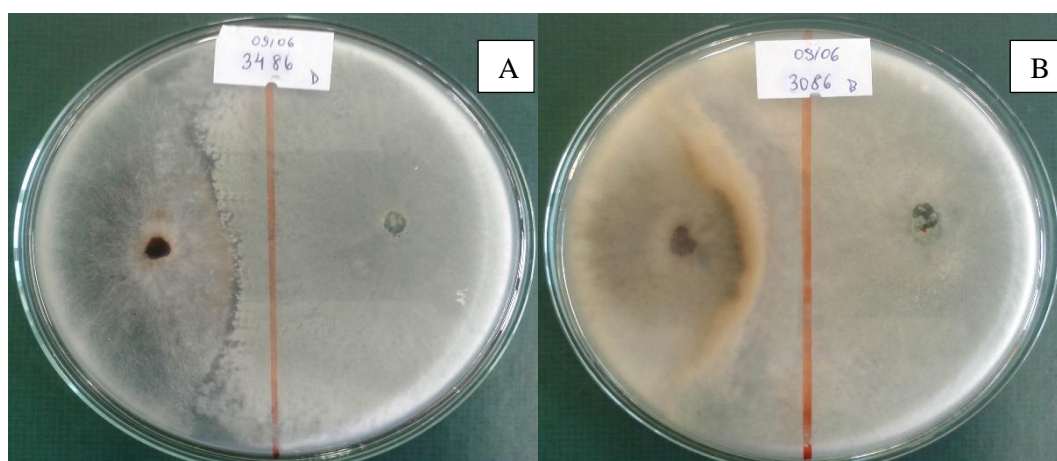


Figura 5 – Atividade micoparasita de *T. aureoviride* (3486) (A) e *T. harzianum* (3086) (B) diante do *S. lignicola* (CFF408).

3.2 Biocontrole da podridão radicular da mandioca, causado por *Scytalidium lignicola* (CFF408), usando *Trichoderma*

Todos os tratamentos foram eficientes no manejo da podridão negra da mandioca, causada por *S. lignicola* (Figura 6 A e B). O tratamento EIV foi o melhor estatisticamente no controle da podridão radicular da mandioca *in vivo*, seguido dos tratamentos EPQ e IRP, em que apresentaram valor estatístico diferente do controle com patógeno - CCP, na avaliação da porcentagem da severidade. Os dados

apresentados, evidenciam a eficácia dos tratamentos *T. harzianum* (3086), como controlador da severidade do *S. lignicola* (CFF408). Ênfase pode ser dada ao resultado encontrado com o uso do *Trichoderma*, pois sugere que o uso do organismo em plantas em ambiente bem nutrido, contribuí numa maior resistência a cultura contra patógenos (ABDEL-KADER et al., 2013; EL-MOHAMADY et al., 2014).

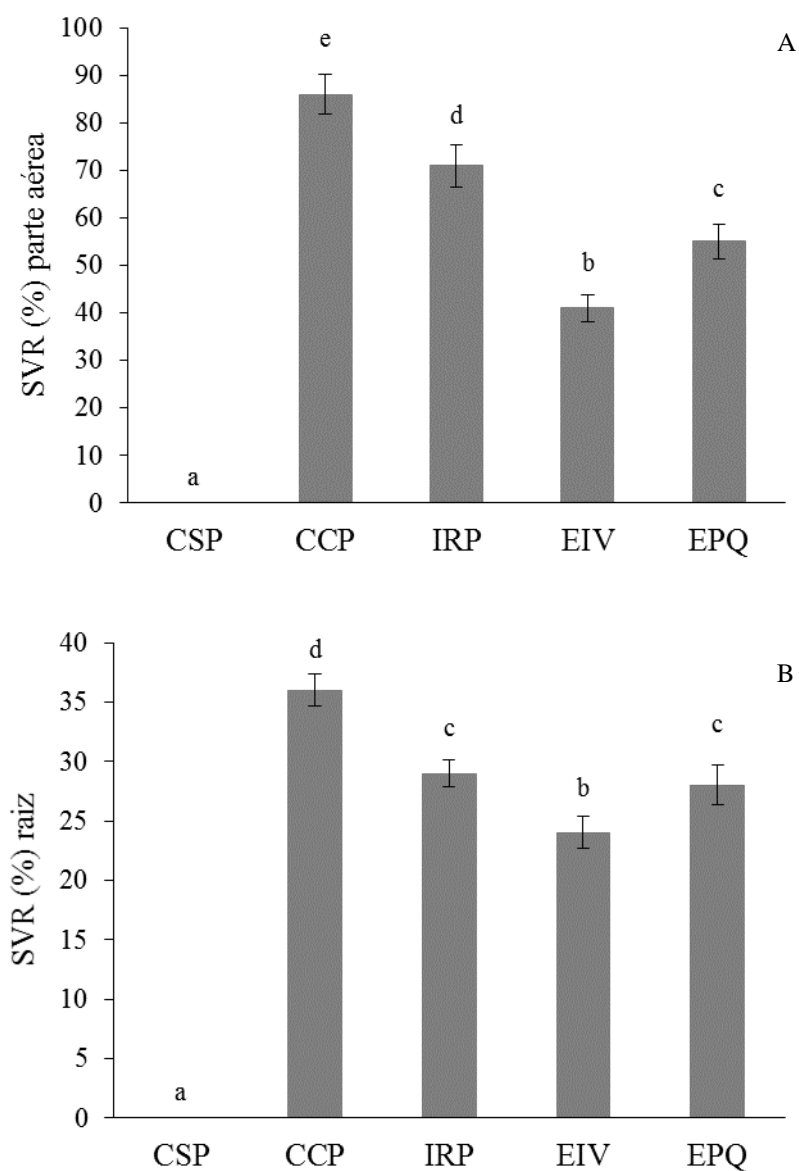


Figura 6. A – Severidade (%) da parte aérea; B – Severidade (%) da parte radicular de mandioca infectada com *Scytalidium lignicola*. CSP = Controle Sem o Patógeno; CCP = Controle Com o Patógeno; IRP = Indutor de Resistência de Plantas (ASM); EIV = *Trichoderma hamatum* (6656) – Eficiente *in vitro*; EPQ =

Trichoderma aureoviride (5158) – Eficiente em Produção de Quitinase. Medias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0.05$).

O confronto antagonista vs. fitopatógeno *in vivo*, contribui com expectativas futuras para agricultura, de maneira a ressaltar a tomada de decisão a possíveis usos de biocontroladores contra diversas doenças (OTADOH et al., 2011) e possíveis promotores de crescimento das plantas (JOSHI et al., 2010). Rinu et al. (2013) verificaram em um estudo que a estirpe do *T. gamsii* foram eficazes em campo, de modo que as plantas leguminas e cereais não apresentaram sintomas de doenças, sendo testado contra inúmeros patógenos, dentre, *Alternaria alternata*, *Cladosporium oxysporum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium pallidoroseum*, *Fusarium solani*, *Pythium afertile*, e *Phomopsis archeri*.

O uso do tratamento com indutor de resistência - IRP (WHAN et al., 2009), vem sendo prática cultural como outra possível alternativa no manejo de doenças causadas por patógenos radiculares. No entanto, pode-se verificar que o tratamento IRP foi o menos eficiente contra a severidade do *S. lignicola* (CFF408), fato que pode ser explicado pelo seu tempo de atuação, já que estudos anteriores na utilização do acibenzolar-S-metil contra patógenos do solo foram satisfatórios após quatro semanas da aplicação (ELMER et al., 2006; EVERTS et al., 2014).

3.3 Indução de respostas de defesas bioquímicas da planta

As plantas são capazes de produzir uma resposta de imunização após infecção de patógenos, que é conhecido como a resistência sistêmica adquirida (RSA) (GÓMEZ-VÁSQUEZ et al., 2004). Embora, alguns fungos em simbiose com as plantas, mais especificadamente os do gênero *Trichoderma*, ajudam as plantas para indução da produção de enzimas contra patógenos que as infectam (JAYALAKSHMI et al., 2009), como resposta tem-se a resistência sistêmica induzida (RSI). Fato de relevante importância, porém, pouco estudado com relação ao uso de *Trichoderma* como biocontrolador em muitas pesquisas da atualidade.

A cultura de mandioca respondeu a todos os testes do grupo de enzimas que combatem as espécies reativas de oxigênio. Destacando as plantas do tratamento

EPQ para todos os testes enzimáticos: peroxidase (POX), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e polifenoloxidase (PFO), com os maiores valores (Figura 7).

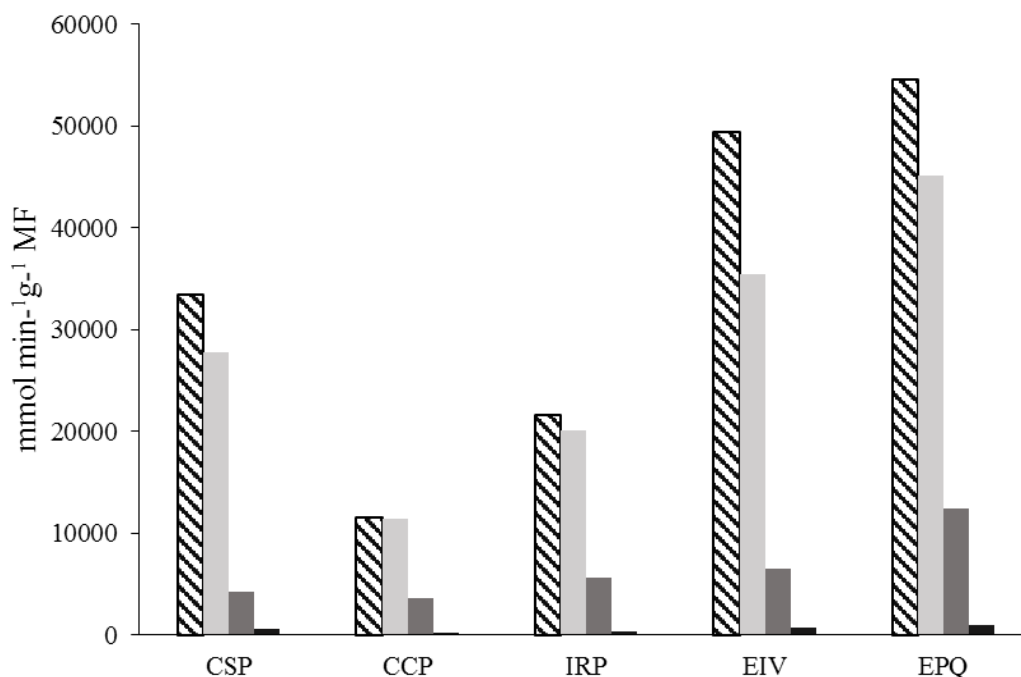


Figura 7. Atividades enzimáticas em plantas de mandioca tratadas com isolados de *Trichoderma* (eficientes no antagonismo *in vitro* e na produção de quitinase) e inoculadas com *S. lignicola* (CFF408). Peroxidase (POX), Catalase (CAT), polifenoloxidase (PFO) e Ascorbato peroxidase (APX). CSP = Controle Sem o Patógeno; CCP = Controle Com o Patógeno; IRP = Indutor de Resistência de Plantas (ASM); EIV = *Trichoderma hamatum* (6656) – Eficiente *in vitro*; EPQ = *Trichoderma aureoviride* (5158) – Eficiente em Produção de Quitinase. Medias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0.05$).

Os tratamentos com *Trichoderma* (EPQ e EIV) apresentaram os maiores valores para todas as enzimas avaliadas. OJHA e CHATTERJEE (2012), mostram que o uso de *T. harzianum* potencializa as atividades enzimáticas, evidenciando a peroxidase, em tomate contra o *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersicomedii*. Isso acontece pela planta reagir inicialmente a infecção através da produção máxima dessa enzima e, com possível estímulo do antagonista (CHRISTOPHER et al., 2010). A atividade da ascorbato peroxidase, foi a segunda mais alta, porque essa enzima

pertencer a um mecanismo de detoxificação de peróxido (TOMÁNKOVÁ et al., 2006), ajudando na defesa da planta.

Em todos os tratamentos, as atividades CAT e a PFO, foram inferiores comparadas às demais enzimas. Gayatri Devi et al. (2012) relatam que a baixa ou inibição da atividade de CAT, pode ser resultado da ativação da resistência sistêmica adquirida, e Sánchez et al. (2000) explicam a baixa ou inibição da atividade de PFO pela tensão dos patógenos nas plantas quando infectadas.

4. CONCLUSÃO

A estirpe *Trichoderma harzianum* (3086) selecionada no teste antagônico *in vitro* e o *Trichoderma aureoviride* (5158) melhor produtora de quitinase, foram eficientes no controle *in vivo* da podridão negra da mandioca, causada por *S. lignicola* (CFF408), assim como, contribuíram para a produção de enzimas do grupo antioxidante das plantas de mandioca, com destaque para as enzimas peroxidase e ascorbato peroxidase.

5. REFERÊNCIAS

- ABDEL-KADER, M. M.; ABDEL-KAREEM, F.; EL-MOUGY, N.; EL-MOHAMADY, R. S. Integration between compost, *Trichoderma harzianum* and essential oils for controlling peanut crown rot under field conditions. **Journal of Mycology**, v. 3(5), p. 858-866, 2013.
- ANITA, S.; PONMURUGAN, P.; BABU, R. G. Significance of secondary metabolites and enzymes secreted by *Trichoderma atroviride* isolates for the biological control of *Phomopsis canker* disease. **African Journal of Biotechnology**, v. 11(45), p. 10350-10357, 2012.
- BOGUMIL, A.; PASZT, L. S.; LISEK, A.; TRZCINSKI, P.; HARBUZOV, A. Identification of new *Trichoderma* strains with antagonistic activity against *Botrytis cinerea*. **Folia Horticulturae**, v. 25(2), p. 123-132, 2013.
- BUENSANTEAI, N.; ATHINUWAT, D. The antagonistic activity of *Trichoderma virens* strain TvSUT10 against cassava stem rot in Thailand. **African Journal of Biotechnology**, v. 11(84), p. 14996-15001, 2012.

- 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.
- CASTELLANI, A. Viability of mold culture of fungi in distilled water. **Jornal of tropical Medicine and Hygiene**, Detroit, v. 42, p. 225-226, 1939.
- CHRISTOPHER, D. J.; RAJ, T. S.; RANI, S. U.; UDHAYAKUMAR, R. Role of defense enzymes activity in tomato as induced by *Trichoderma virens* against *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. **Journal of Biopesticides**, v. 3(1), p. 158-162, 2010.
- DOLEY, K.; DUDHANE, M.; BORDE, M.; JITE, P. K. Effects of *Glomus fasciculatum* and *Trichoderma asperelloides* in roots of groundnut (cv. western-51) against pathogen *Sclerotium rolfsii*. **International Journal of Phytopathology**, v. 3(2), p. 89-100, 2014.
- EL-GALI, Z. I. Antagonism capability *in vitro* of *Trichoderma harianum* against *Alternaria alternata* on *Ceratonia siliqua*. **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v. 2(2), p. 20-44, 2015.
- ELMER, W. H. Effects of acibenzolar-S-methyl on the suppression of *Fusarium* wilt of cyclamen. **Crop Protection**, v. 25, p. 671-676, 2006.
- EL-MOHAMADY, R.S.R.; EL-MOUGY, N.S.; ABDEL-KADER, M.M.; DAAMI-REMADI M. Physical and biological treatments as integrated control measures against tomato root diseases under field conditions. **International Journal of Engineering and Innovative Technology**, v. 3, p. 141-148, 2013.
- EMBRAPA. **Cultivo da mandioca para a região Semi-árida**, 2003. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_semiarido/doencas.htm>
- EVERTS, K. L.; EGEL, D. S.; LANGSTON, D.; ZHOU, X. Chemical management of *Fusarium* wilt of watermelon. **Crop Protection**, v. 66, p. 114-119, 2014.
- GALLETTI, S.; FORNASIER, F.; CIANCHETTA, S.; LAZZERI, L. Soil incorporation of bassica materials and seed treatment with *Trichoderma*

harzianum: Effects on melon growth and soil microbial activity. **Industrial Crops and Products**, 2015.

GAYATRIDEVI, S.; JAYALAKSHMI, S. K.; SREERAMULU, K. Salicylic acid is a modulator of catalase isozymes in chickpea plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceri*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 52, p. 154-161, 2012.

GÓMEZ-VÁSQUEZ, R.; DAY, R.; BUSCHMANN, H.; RANGLES, S.; BEECHING, J. R.; COOPER, R. M.; Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and peroxidases in elicitor-challenged cassava (*Manihot esculenta*) suspension cells and leaves. **Annals of Botany**, v. 94(1), p. 87–97, 2004.

HAIJEGHRARI, B.; TORABI-GIGLOU, M.; MOHAMMADI, M. R.; DAVARI, M. Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. **African Journal of Biotechnology**, v. 7(8), p. 967-972, 2008.

HARMAN, G. E.; HERRERA-ESTRELLA, A. H.; HORWITZ, B. A.; LORITO, M. Special issue: *Trichoderma* - from basic biology to biotechnology. **Microbiology**, v. 158, p. 1-2, 2012.

HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v. 158, p. 17–25, 2012.

JAYALAKSHMI, S. K.; RAJU, S.; USHA-RANI, S.; BENAGI, V. I.; SREERAMULU, K. *Trichoderma harzianum* L₁ as a potential source for lytic enzymes and elicitor of defense responses in chickpea (*Cicer arietinum* L.) against wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. **Australian Journal of Crop Science**, v. 3(1), p. 44-52, 2009.

JOSHI, B. B.; BHATT, R. P.; BAHUKHANDI, B. Antagonistic and plant growth activity of *Trichoderma* isolates of Western Himalayas. **Journal of Environmental Biology**, v. 31(6), p. 921-928, 2010.

- KIPNGENO, P.; LOSENGE, T.; MAINA, N.; KAHANGI, E.; JUMA, P. Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma asperellum* against *Pythium aphanidermatum* in tomatoes. **Biological Control**, v. 90, p. 92-95, 2015.
- KUMAR, V.; SHAHID, M.; SRIVASTAVA, M.; SINGH, A.; PANDEY, S.; MAURYA, M. K. Screening of *Trichoderma* species for virulence efficacy on seven most predominant phytopathogens. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9(11), p. 793-799, 2015.
- LÓPEZ-MONDÉJAR, R.; ROS, M.; PASCUAL, J. A. Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent. **Biological Control**, v. 56, p. 59–66, 2011.
- MARCELLO C. M.; STEINDORFF A. S.; SILVA S. P.; SILVA R. N.; BATAUS L. A. M.; ULHOA, C. J. Expression analysis of the exo- β -1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. **Microbiological Research**, v. 165, p. 75-81, 2010.
- MOHAMED, H. A. A.; HAGGAG-WAFAA, M.; ATTALLAH, A. G. Genetic enhancement of *Trichoderma viride* to overproduce different hydrolytic enzymes and their biocontrol potentiality against root rot and white mold diseases in bean plants. **Agriculture and Biology Journal of North America**, v. 1(3), p. 273-284, 2010.
- MOKHTAR, M. M.; EL-MOUGY, N. S. Antagonistic yeast for controlling bean root rot disease under field conditions. **International Journal of Engineering and Innovative Technology**, v. 4, p. 128-132, 2014.
- NOTARO, K. A.; MEDEIROS, E. V.; SILVA, C. A. D.; BARROS, J. A. Prospecção de fitopatógenos associados à podridão radicular da mandioca em Pernambuco, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 5, p. 1832-1839, 2013.
- OJHA, S.; CHATTERJEE, N. C. Induction of resistance in tomato plants against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* mediated through salicylic acid and *Trichoderma harzianum*. **Journal of Plant Protection Research**, v. 52(2), p. 220-225, 2012.

- OTADOH, J. A.; OKOTH, S. A.; OCHANDA, J.; KAHINDI, J. P. Assessment of *Trichoderma* isolates for virulence efficacy on *Fusarium oxysporum* F. sp. *Phaseoli*. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 13, p. 99-107, 2011.
- PATIL, A.; LADDHA, A.; LUNGE, A.; PAIKRAO, H.; MAHURE, S. *In vitro* antagonistic properties of selected *Trichoderma* species against tomato root rot causing *Pythium* species. **International Journal of Science, Environment and Technology**, v. 1 (4), p. 302-315, 2012.
- REDDY, B. N.; SARITHA, K. V.; HINDUMATHI, A. *In vitro* screening for antagonistic potential of seven species of *Trichoderma* against different plant pathogenic fungi. **Research Journal of Biology**, v. 2, p. 29-36, 2014.
- RINU, K.; SATI, P.; PANDEY, A. *Trichoderma gamsii* (NFCI 2177): A newly isolated endophytic, psychrotolerant, plant growth promoting, and antagonistic fungal strain. **Journal of Basic Microbiology**, v. 0, p. 1-10, 2013.
- SALAS-MARINA, M.A.; SILVA-FLORES, M.A.; URESTI-RIVERA, E.E.; CASTRO-LONGORIA, E.; HERRERA-ESTRELLA, A.; CASAS-FLORES, S. Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. **European Journal of Plant Pathology**, v. 131, p. 15–26, 2011.
- SÁNCHEZ, E.; SOTO, J. M.; GARCIA, P. C.; LÓPEZ-LEFEBRE, L. R.; RIVERO, R. M.; RUIZ, J. M.; ROMERO, L. Phenolic compounds and oxidative metabolism in green bean plants under nitrogen toxicity. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 27, p. 973-978, 2000.
- SERRA, I. M. R. S.; SILVA, G. S.; NASCIMENTO, F. S.; LIMA, L. F. L. *Scytalidium lignicola* em mandioca: ocorrência no Estado do Maranhão e reação de cultivares ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, v. 35(4), p. 327-328, 2009.
- SHORESH, M.; HARMAN, G. E.; MASTOURI, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, p. 21–43, 2010.

- SINGH, V.; SINGH, P. N.; YADAV, R. L.; AWASTHI, S. K.; JOSHI, B. B.; SINGH, R. K.; LAL, R. J.; DUTTAMAJUMDER, S. K. Increasing the efficacy of *Trichoderma harzianum* for nutrient uptake and control of red rot in sugarcane. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 2, p. 66-71, 2010.
- SILVA, C. A. D.; MEDEIROS, E. V.; BEZERRA, C. B.; SILVA, W. M.; BARROS, J. A.; SANTOS, U. J. Interferência da incorporação de matéria orgânica no solo no controle da podridão negra da mandioca, causada por *Scytalidium lignicola*. **Bioscience Journal**, v. 29, p. 1823-1831, 2013.
- SOBOWALE, A. A.; ODEYINGBO, O. A.; EGBERONGBE, H. O.; FEYISOLA, R. T.; AYINDE, O. A.; ADESEMOWO, A. Growth inhibition (*in vitro*) of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from cassava (*Manihot esculenta*) using *Trichoderma longibrachiatum*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4(21), p. 2196-2201, 2010.
- SRIVASTAVA, M.; SINGH, A.; SHAHID, M. *In vitro* growth performance of *Trichoderma* species and antagonistic activity against soil borne pathogens. **International Journal of Science and Research**, v. 3(7), p. 672-675, 2014.
- STEYAERT, J. M.; WELD, R. J.; STEWART, A. Ambient pH intrinsically influences *Trichoderma* conidiation and colony morphology. **Fungal Biology**, v. 114, p. 198–208, 2010.
- SUNDARAMOORTHY, S.; BALABASKAR, P. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* spp. against wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v.1(03), p. 036-040, 2013.
- TAPWAL, A.; THAKUR, G.; TYAGI, A.; CHANDRA, S. *In-vitro* evaluation of *Trichoderma* species against seed borne pathogens. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, v. 1, p. 14-19, 2015.
- TOMÁNKOVÁ, K.; LUHOVÁ, L.; PETRIVALSKÝ, M.; PEC, P. LEBEDA, A. Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction

between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 68, p. 22–32, 2006.

UBALUA, A. O.; OTI, E. Evaluation of antimicrobial properties of some medicinal plants for fresh cassava roots preservation. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 7(5), p. 679-681, 2008.

WHAN, J. A.; DANN, E. K.; SMITH, L. J.; AITKEN, E. A. B. Acibenzolar-S-methyl-induced alteration of defence gene expression and enzyme activity in cotton infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 73, p. 175-182, 2009.