

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR



INFLUÊNCIA DE FATORES ABIÓTICOS NO CRESCIMENTO E
ESPORULAÇÃO DE ISOLADOS GENETICAMENTE DISTINTOS DE
TRICHODERMA STROMATICUM

SARAH SANTANA LEITE

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Outubro de 2012

SARAH SANTANA LEITE

**INFLUÊNCIA DE FATORES ABIÓTICOS NO CRESCIMENTO E
ESPORULAÇÃO DE ISOLADOS GENETICAMENTE DISTINTOS DE
*TRICHODERMA STROMATICUM***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: 19 de outubro de 2012

Dr. Alan Willian Vilela Pomella
(Sementes Farroupilha)

Prof. Dr. Andréia Miúra
(UESC)

Prof. Dr. José Luiz Bezerra
(UESC)

Prof. Dr. Leandro Lopes Loguercio
(UESC – Orientador)

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Outubro de 2012

L533

Leite, Sarah Santana.

Influência de fatores abióticos no crescimento e esporulação de isolados geneticamente distintos de *Trichoderma stromaticum* / Sarah Santana Leite. – Ilhéus, BA: UESC, 2012.
xiii, 68f. : il.

Orientador: Leandro Lopes Loguercio.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Inclui referências.

1. Genética vegetal. 2. Trichoderma. 3. Esporos (Botânica). 4. Vassoura- de- bruxa (Fitopatologia) – Controle biológico. I. Título.

CDD 581.35

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Altamiro Leite de Souza e Neuza A. Santana Leite, pelos ensinamentos e apoio e Lucas Teixeira Costa pelo incentivo e apoio.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo à Deus, pela vida, saúde e coragem para persistir na realização deste sonho, pois com fé os obstáculos são vencidos.

Aos meus pais Altamiro Leite de Souza e Neuza A. Santana Leite e meus irmãos Mayra e Marcos Vinicius por serem meu guia essencial em todos os momentos.

Ao meu amado Lucas Teixeira Costa, pelo incentivo e amor e seus pais Miguel e Margarida Costa por me acolherem em sua família em todos os momentos.

Ao meu orientador Dr. Leandro Lopes Loguercio por tantos ensinamentos, que ultrapassou o âmbito científico e que me serão inesquecíveis ao longo da minha jornada.

Ao professor Dr. Fábio Mathias pelo companheirismo e colaboração para execução deste trabalho.

Ao professor Dr. André Ribeiro pela colaboração.

Ao Laboratório de Microbiologia da Agroindústria, representado pelas professoras, Dra. Ana Paula Uetanabaro e Dra. Andréia Miúra por possibilitarem a execução deste trabalho, pela disponibilidade e pelos importantes ensinamentos diários.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório pela amizade e parceria que possibilitou troca de conhecimentos, principalmente Juliane, Roberta e Márcio, com quem pude contar em diversos momentos.

Aos meus inúmeros amigos que, com seus cuidados e carinhos, sempre se fazem presentes em minha caminhada, tais como Chris, Carol, Rodrigo, Verônica e Mari.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular pelos ensinamentos.

A Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e o Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGGBM) pelo suporte técnico e pela oportunidade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa que permitiu a realização do trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
EXTRATO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. IMPORTÂNCIA DO GÊNERO <i>Trichoderma</i>	4
2.2. OCORRÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DE <i>Trichoderma</i> spp	5
2.3. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DO GÊNERO <i>Trichoderma</i>	6
2.4. CONTROLE BIOLÓGICO	7
2.4.1. <i>Trichoderma</i> spp como agentes de biocontrole	7
2.4.2- Mecanismos de ação antagônica.....	9
2.4.3. Contexto Cacau – <i>Moniliophthora perniciosa</i>	11
2.4.4. Produção massal de esporos para comercialização de ABC.....	12
2.5. ESPORULAÇÃO EM <i>Trichoderma</i> spp E OUTROS FUNGOS	14
2.5.1. Fisiologia da produção de conídios.....	14
2.5.1.1. Fonte de Carbono	14
2.5.1.2. Fonte de Nitrogênio	15
2.5.1.3. Depleção nutricional.....	16
2.5.1.4. pH do meio	16
2.5.1.5. Luminosidade	17
2.5.1.6- Injúria mecânica.....	17
2.5.1.7. Ritmo circadiano.....	17
2.5.2. Genética da esporulação	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. CULTIVO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>T. stromaticum</i> (<i>Ts</i>).....	20
3.2. COLETA E ARMAZENAMENTO DE ESPOROS	21
3.3. CONTAGEM DE ESPOROS	22
3.4. VIABILIDADE DOS ESPOROS ESTOCADOS.....	23
3.5. EXPERIMENTOS FATORIAIS COM INTERAÇÃO DE FATORES GENÉTICOS E ABIÓTICOS	24
3.5.1. Meios de Cultura	26
3.5.2. pHs dos meios.....	27
3.5.3. Tratamento de Luz	27
3.5.4. Tratamento de Injúria micelial	28
3.6. REGISTROS FOTOGRÁFICOS	29
3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	29

4. RESULTADOS.....	31
4.1. CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Trichoderma stromaticum</i> (Ts) EM MEIOS BDA NÃO-INDUSTRIALIZADO E INDUSTRIALIZADO	31
4.2. CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DE Ts EM BDA COM SUPLEMENTO DE MALTE ...	33
4.3. ESTOQUE DE ESPOROS OBTIDOS DOS ISOLADOS DE Ts.....	34
4.4. CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DE ISOLADOS DE Ts EM REGIME DE 12 H LUZ / 12 H ESCURO.....	35
4.5. EFEITOS INTEGRADOS DE FATORES ABIÓTICOS EM Ts.....	37
4.5.1. Análise quantitativa	37
4.5.2. Análise qualitativa	41
4.7. ANÁLISE QUALITATIVA DOS EFEITOS DE INJÚRIAS MICELIAIS NA ESPORULAÇÃO DE Ts.....	43
4.8. EFEITOS DAS INJÚRIAS MICELIAIS VS TAMANHO DA PLACA NA CONIDIAÇÃO DE Ts	45
4.8.1 Análise qualitativa	45
4.8.2 Análise quantitativa	47
4.9. EFEITOS DA QUANTIDADE (NÚMERO) DE INJÚRIAS MICELIAIS EM Ts	49
4.9.1 Análise quantitativa	49
4.9.2. Análise quantitativa	50
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÕES	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Trichoderma em suas fases de crescimento: a) hifa, b) ramificações das hifas, c) fiálides hialinas, d) esporos imaturos, e) esporos maduros. (Modificada de STEYAERT et al., 2010c).....6
- Figura 2.** Esquema explicativo do primeiro experimento fatorial. O total de tratamentos foi de 96 placas.....23
- Figura 3.** Morfologia de colônias de isolados de *Trichoderma stromaticum* (Ts) cultivados em meio BDA não-industrializado. A) isolado ALF-672, B) ALF-643 e C) ALF-15.....30
- Figura 4.** Crescimento e morfologia comparados entre os isolados ALF -15, -64 e -643, cultivados em meio BDA não-industrializado (NI) e industrializado (I), ajustados para pHs 3,6 e 4,4.....31
- Figura 5.** Crescimento e esporulação de isolados de Ts em meio BDA (industrializado) + suplemento com extrato de malte. A) ALF-1092 e B) ALF-678, com 10 dias de crescimento.....32
- Figura 6.** Padrões de crescimento e esporulação específicos para quatro isolados de *T. stromaticum* (denominados ALF-15, -64, -113 e -1092), aplicados na forma de esporos em meio BDA industrializado, com fotoperíodo de 12 h luz / 12 h de escuro.....34
- Figura 7.** Análise integrada dos efeitos de fatores abióticos no quantitativo de esporulação de isolados de *Trichoderma stromaticum* em experimentos fatoriais balanceados com 3 isolados x 3 meios x 4 pHs x 2 condições de luz.....35
- Figura 8.** Intervalos de confiança (P = 0,05) para esporulação de três isolados de *T. stromaticum* sob efeito de meios de cultura e tratamentos de luz. Os isolados são mostrados na porção superior do gráfico. 'BD' = BDA; 'N1' = MMN1 (urea); 'N2' = MMN2 (KNO₃).....38
- Figura 9.** Morfologia comparada de colônias pela ação integrada dos fatores bióticos nos isolados de Ts ALF-64, -113 e -1092, registrados após 5 dias de cultivo, ao final dos experimentos fatoriais. A ausência e presença de estímulo luminoso (15 min luz branca após 60h cultivo) estão indicadas pelos sinais '-' e '+', respectivamente.....40
- Figura 10.** Efeito interativo da injúria micelial nos padrões de esporulação *in vitro* do isolado ALF-1092 submetido a diferentes tratamentos de meio de cultura e pH. As culturas ocorreram a 28 °C por 7 dias em regime de fotoperíodo de 12h luz / 12h escuro, em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. As injúrias no micélio foram feitas com bisturi estéril, após 72 horas de incubação42

Figura 11. Isolados incubados em meio BDA, pH 5,2, em diferentes combinações de tratamentos e dois tamanhos de placas de Petri.....44

Figura 12. Aspecto morfológico da esporulação de *Ts* em resposta a múltiplos cortes de hifas no micélio (injúria mecânica). O número de cortes perpendiculares foi de 6 x 6 para os isolados -64 e -113, e 4 x 4 para o -1092.....48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Esporulação obtida para os 14 isolados de *Ts* dos grupos genéticos I e II.....33
- Tabela 2.** Equações dos respectivos modelos lineares para cada combinação de tratamentos em função dos valores de pH.....37
- Tabela 3.** Análise de Variância (ANOVA) para experimento de tratamentos de luz, injúria e tamanhos de placas.....45
- Tabela 4.** Teste de médias por Scott-Knott para as combinações entre isolados e diâmetros da placa quanto ao número de esporos.....46
- Tabela 5.** Teste de Scott-Knott para os efeitos dos tratamento e dos isolados quanto ao número de esporos.....47
- Tabela 6.** Comparação de médias para o efeito de isolados de *Ts*.....49

EXTRATO

LEITE, Sarah Santana, M. Sc. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus- BA, outubro de 2012. **Influência de fatores abióticos no crescimento e esporulação de isolados geneticamente distintos de *Trichoderma stromaticum***. Orientador: Leandro Lopes Loguercio. Co-orientadores: André Ribeiro e Givaldo Niella.

O gênero *Trichoderma* possui uma ocorrência cosmopolita, diversidade genética, grande variação de hospedeiros, e mecanismos de antagonismo que contribuem para a sua ampla utilização como agentes de biocontrole (ABC) de doenças fúngicas em plantas. Preparações comerciais de ABCs microbianos dependem da produção dos respectivos propágulos em larga escala. Para ABCs do gênero *Trichoderma*, estes propágulos constituem-se em esporos (conídios), cuja produção massal depende do entendimento do efeito dos fatores bióticos e abióticos envolvidos no controle desta esporulação.

A cultura do cacau na região sulbaiana foi a principal fonte geradora de riquezas da economia, com grande parte da produção destinada à exportação. Contudo, a doença causada pelo patógeno *Moniliophthora perniciosa* conhecido como “vassoura-de-bruxa” ocasionou enorme queda na produção de cacau. Além dos impactos econômicos resultantes, outras mudanças também ocorreram na região produtora da Bahia, tais como uso da terra, venda de propriedades, aumento no desemprego e danos ao meio ambiente.

O controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro tem se mostrado promissor com o uso de *Trichoderma stromaticum* (*Ts*), por meio do produto comercial ‘Tricovab’ desenvolvido pela CEPLAC, à base de um isolado de *Ts* oriundo do Pará. Porém, os resultados têm se mostrado inconsistentes em diversas situações de microclima e ambientes na região cacauzeira sul-baiana. Além disso, isolados de *Ts* foram naturalmente encontrados nesta região, os quais demonstraram um potencial antagônico superior e com respostas diferentes a variações de microclima. Estes isolados são geneticamente distintos entre si e têm se mostrado, infelizmente, recalcitrantes quanto à produção de esporos (conídios) em larga escala para uso em preparações comerciais, ao menos nas condições usuais de produção do Tricovab. Isto demonstra a necessidade de

aprofundamento nos estudos para o entendimento dos fatores envolvidos no controle fisiológico e genético da esporulação.

Considerando a importância de estudos que avaliem a ação combinada de fatores abióticos na esporulação de *Trichoderma* spp, o objetivo deste trabalho foi entender como diferentes combinações desses fatores interagem e influenciam na esporulação de isolados de *Ts* distintos geneticamente. Neste trabalho, foram realizados experimentos fatoriais, considerando as variáveis independentes genótipos, luminosidade, meios de cultura, pH e injúrias no micélio. As análises foram feitas de modo integrado, utilizando-se isolados de *Ts* dos grupos genéticos I e II (previamente descritos). Delineou-se experimentos fatoriais balanceados, com quatro isolados de *Ts*, definidos como ALF-15 e -1092 (grupo I), e -64 e -113 (grupo II). Avaliou-se cinco fatores relevantes para o controle da esporulação *in vitro*: (i) isolado, (ii) tipo de meio de cultura, com diferentes fontes de N, (iii) pH do meio (2,8; 3,6; 4,4 e 5,2), (iv) presença / ausência de luz, e (v) injúrias miceliais. Avaliou-se duas variáveis dependentes: aspecto fenotípico geral das colônias (qualitativo) e número de esporos produzidos por placa (quantitativo).

Os resultados claramente sugerem que a produção de esporos responde de forma diferente a combinações específicas de fatores abióticos, sendo dependente do genótipo. Ou seja, as respostas de esporulação são isolado-específicas. Esses resultados foram discutidos à luz da perspectiva de produção de esporos em larga-escala, mostrando-se a importância do estabelecimento de condições de cultivo específicas para isolados geneticamente distintos de *Trichoderma stromaticum*. As informações obtidas são úteis para uso no estabelecimento de estratégias mais promissoras para a produção de conídios com fins agrônômicos de controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauieiro.

ABSTRACT

LEITE, Sarah Santana, M.Sc. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, October 2012. **Influence of abiotic factors on growth and sporulation of genetically distinct isolates of *Trichoderma stromaticum***. Supervisor: Leandro Lopes Loguercio. Co-Advisors: André Ribeiro and Givaldo Niella.

The *Trichoderma* genus has a cosmopolitan occurrence, genetic diversity, wide range of hosts, and mechanisms of antagonism that contribute to its widespread use as biocontrol agents (BCAs) of fungal diseases in plants. Commercial preparations of microbial BCAs rely on the production of the respective propagules on a large scale. To BCAs of the genus *Trichoderma*, these propagules are in the form of spores (conidia), whose mass production depends on understanding the effect of biotic and abiotic factors involved in controlling this sporulation.

The cultivation of cacao in the southeastern Bahia region was the main source of wealth of the economy, with much of the production targeted for export. However, the disease caused by the *Moniliophthora perniciosa* pathogen (known as the witches' broom) caused a huge drop in cocoa production. Beyond economic impacts, other changes also occurred in this producing region of Bahia, such as land use, property sales, increase in unemployment and environmental damages.

The biological control of the witches' broom disease of cocoa has been shown to be promising with the use of *Trichoderma stromaticum* (*Ts*), through the 'Tricovab' commercial product developed by CEPLAC, which was based on a *Ts* isolate obtained from the Pará State. However, the results have been inconsistent in different situations of microclimates and environments from the cacao region of southeastern Bahia. In addition, isolates of *Ts* were naturally found in this region, which demonstrated a higher antagonistic potential and different responses to variations in microclimates. These isolates are genetically distinct from each other and have proved, unfortunately, to be recalcitrant as large-scale spore (conidia) producers for use in commercial preparations, at least under the usual conditions of Tricovab production. This demonstrates the need for further studies to understand the factors involved in the physiological and genetic control of sporulation.

Considering the importance of studies on the combined action of abiotic factors on conidiation of *Trichoderma* spp, the aim of this study was to understand how different combinations of these factors interact and influence on sporulation of genetically distinct isolates of *Ts*. In this work, factorial experiments were performed, considering the following independent variables: genotypes, light, culture media, pH, and mycelial injuries. The analyzes were done in an integrated manner, using *Ts* isolates from the genetic groups I and II (previously described). Balanced factorial experiments were designed with four *Ts* isolates, defined as ALF-15 and -1092 (group I), and -64 and -113 (group II). Five factors deemed relevant for the control of sporulation were evaluated *in vitro*: (i) isolate, (ii) medium type, with different N sources, (iii) medium pH (2.8, 3.6, 4.4 and 5,2), (iv) presence / absence of light, and (v) mycelial injuries. We assessed two dependent variables: overall phenotypic appearance of colonies (qualitative) and the number of spores produced by plates (quantitative).

The results clearly suggest that sporulation responds differently to the specific combinations of abiotic factors tested, and it is dependent on genotype. In other words, the physiological responses of sporulation are isolate-specific. These results were discussed in light of the possibility of large-scale spore production, showing the importance of establishing specific conditions for growing genetically distinct isolates of *Trichoderma stromaticum*. The information obtained is useful for use in the establishment of the most promising strategies for the mass production of conidia at an agronomic level, to be used for biological control of witches' broom disease of cacao.

1. INTRODUÇÃO

O uso de biofungicidas para controle biológico apresenta resultados promissores e larga utilização em vários países no controle de diversos patógenos. Os fungos utilizados como agentes de biocontrole possuem ação antagônica através de mecanismos diversos, como antibiose, competição e micoparasitismo, e são amplamente estudados por apresentarem potencial para que novos produtos comerciais sejam lançados no mercado de biofungicidas (CHERNIN & CHET, 2002). As preparações comerciais para uso no controle biológico devem ser compostas de conídios produzidos em massa (esporos assexuais), com suficiente viabilidade para crescimento vegetativo e atividade antagônica quando aplicado nas atividades agrícolas. Portanto, é necessário que a produção ampla de conídios seja custo-efetiva e com longos períodos de viabilidade para e após aplicação no ambiente (HARMAN et al., 2004).

A produção de esporos (conídios) a partir do micélio é estimulada quando há combinação apropriada de fatores ambientais (STEYART et al., 2010a,b,c). Estímulos luminosos, relação Carbono:Nitrogênio, pH do ambiente extracelular, ferimentos físicos no micélio, presença de cálcio e influência de derivados de compostos orgânicos voláteis, são conhecidos por influenciar a produção de esporos (FRIED et al., 2008). Alguns genes-chave específicos encontrados em modelos de pesquisa com fungos filamentosos demonstraram ser reguladores da produção de conídios, destacando-se a importância do estudo de *Trichoderma* como modelo molecular para regulação da produção de esporos (CASAS-FLORES et al., 2006). A conidiogênese é uma resposta integrada determinada pelo estado metabólico celular, e influenciada pelo ambiente e os ritmos biológicos endógenos.

O gênero *Trichoderma* possui ocorrência cosmopolita, diversidade genética e de hospedeiros, e mecanismos de antagonismo que contribuem para a sua ampla utilização como Agentes de Biocontrole (ABCs) de doenças fúngicas em plantas (STEYAERT et al, 2003; BENÍTEZ et al, 2004).

No contexto do cacau, um isolado da região amazônica descrito como *Trichoderma stromaticum* (*Ts*) (SAMUELS et al., 2000) foi introduzido no sudeste

da Bahia para o controle específico da “vassoura-de-bruxa” do cacaueteiro, por micoparasitismo de *Moniliophthora perniciosa*, o agente causal. Este patógeno do cacaueteiro devastou as plantações nessa região a partir de 1989, resultando em graves perdas econômicas, sociais e ambientais (BASTOS, 1996; 2000). Desde 1999, os esporos deste isolado vêm formando a base da preparação comercial ‘Tricovab’, produzida e distribuída pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), que tem oferecido resultados promissores para o manejo dessa doença, o que levou esforços posteriores de pesquisa visando melhorar a sua produção e a eficiência do controle biológico (POMELLA et al., 2007; LOGUERCIO et al., 2009a,b). Estudos recentes mostraram que *Ts* é naturalmente encontrado no sudeste da Bahia, com seus isolados pertencendo a dois principais grupos genéticos denominados ‘I’ e ‘II’ (DE SOUZA et al., 2006). Além disso, observou-se uma grande variação na capacidade antagônica em isolados *Ts* diferentes (LOGUERCIO et al., 2009a), bem como respostas diferentes desses isolados a variações do microclima no perfil vertical do dossel do cacaueteiro (LOGUERCIO et al., 2009b). Efeitos de variações nas condições ambientais influenciam na sobrevivência, atividade de crescimento, reprodução, abundância e biocontrole de *Ts* sob condições de laboratório e de campo (CARVALHO, 2006; KREDICS et al., 2004, SANOGO et al., 2002.; SANTOS, 2005, TEN HOOPEN et al., 2003). Além disso, diferenças genéticas entre isolados e entre grupos interferem nas respostas de esporulação (DE SOUZA et al., 2006; LOGUERCIO et al., 2009a,b). Isolados de *Ts* originados do sudeste baiano e principalmente pertencentes ao grupo I apresentaram esporulação recalcitrante em condições laboratoriais. Assim, torna-se necessário testar condições experimentais que permitam suplantam essa limitação e apresentem reprodutibilidade suficiente para que novos ABCs possam ser disponibilizados e lançados como produtos comerciais mais eficazes para a agricultura. Neste trabalho foram realizados experimentos considerando as variáveis independentes genótipos, luminosidade, meios de cultura, pH e injúrias no micélio, avaliadas de modo integrado, utilizando isolados do grupo I e II de *Ts*. Considerando a importância dos estudos que avaliam a ação combinada desses fatores na esporulação de *Trichoderma*, o objetivo deste trabalho foi entender como diferentes combinações desses fatores interagem e influenciam na esporulação de isolados de *Ts* distintos

geneticamente. Os resultados aqui apresentados sugerem estratégias e cuidados necessários para o aperfeiçoamento da tecnologia de produção em larga-escala dos isolados mais eficientes de *Ts* para controle biológico da 'vassoura-de-bruxa' a campo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. IMPORTÂNCIA DO GÊNERO *Trichoderma*

Os fungos representam um clado importante na filogenia dos seres vivos. São eucariontes e heterotróficos que se reproduzem por meio de esporos. A natureza única dos fungos, quando comparados a outros organismos, consiste em estratégias incomparavelmente diferentes para reprodução, que pode vir a ser sexuada e, ou assexuada, o que leva ao conceito da existência de uma variedade de espécies sobrepostas (ESPOSITO, 1998). Na agricultura mundial, cerca de 50 – 70% dos rendimentos das culturas de alimentos é perdida devido a doenças de plantas, a maioria das quais causadas por fungos (AGRIOS, 2005). A maioria das doenças fúngicas tem como principal fonte de inóculo seus esporos sexuais e, ou assexuais. Por outro lado, numerosos fungos têm sido desenvolvidos com sucesso como agentes de controle biológico para doenças das plantas, sendo que a maioria destes são vendidos como preparações de esporos. O gênero *Trichoderma* (Ascomycetes, Hypocreales) foi descrito por Person há mais de 200 anos e têm servido de modelo para estudos sobre reprodução assexuada de fungos filamentosos nos últimos 50 anos. As espécies de *Trichoderma* são facilmente encontradas no ambiente, pois estão em todos os tipos de solos (SAMUELS, 1996).

Fungos desse gênero são amplamente conhecidos por produzirem uma gama de antimicrobianos, bem como substâncias que os permitem colonizar e parasitar outros fungos; também podem competir com outros microrganismos, por exemplo, por exsudatos, nutrientes e espaço (ESPOSITO; 1998). Além disso, inibem ou degradam pectinases e outras enzimas que são essenciais para a ação de fungos patogênicos de plantas (LORITO et al., 1998). São utilizados na produção de muitas exoenzimas em escala industrial, como por exemplo, as

enzimas celulíticas, além de serem amplamente utilizadas no controle biológico. Estes efeitos diretos sobre outros fungos são complexos e notáveis e, até o presente, pesquisas vêm sendo realizadas para se saber como *Trichoderma* exerce seus efeitos benéficos no crescimento e no desenvolvimento da planta, além de atuar como agente de biocontrole, principalmente de fitopatógenos.

Em geral, as preparações comerciais de fungos utilizados para o controle biológico consistem de esporos produzidos em massa (conídios e clamidiósporos), os quais são mais resistentes aos fatores do ambiente e, portanto, mais duráveis após a aplicação e eficazes para a obtenção do efeito desejado a campo.

2.2. OCORRÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DE *Trichoderma* spp

Oitenta e três espécies de *Trichoderma* e seus teleomorfos *Hypocrea* incluindo 11 espécies não descritas, indicam que linhagens sexuada e assexuada não são independentes uns dos outros (DODD et al., 2003). Espécies de *Trichoderma* podem estar associadas à rizosfera de plantas diversas, podendo existir como endofíticas. Algumas pesquisas demonstraram que essas espécies (isolados) endofíticas podem apresentar um controle biológico mais eficaz, por estabelecerem uma relação mutualística com o hospedeiro (HANADA et al., 2010). Estes microrganismos são consideradas como simbiontes avirulentos ou oportunistas, capazes de colonizar raízes de planta através de mecanismos semelhantes às micorrizas, e estimular o crescimento e mecanismos de defesa das plantas (HARMAN et al., 2004). Muitos fungos Hypocreales se encontram no interior ou na superfície das folhas, raízes e cascas do caule caídas, especialmente quando estão lesadas ou colonizadas por outros fungos epifíticos ou sapróbios, usando nutrientes disponíveis nos vários nichos (CHAVERRI et al., 2001).

O gênero *Trichoderma* possui uma distribuição bastante ampla ocorrendo no mundo inteiro em quase todos os tipos de solos e outros habitats naturais, especialmente naqueles que contém ou consistem de matéria orgânica. (DANIELSON, 1973). Agregados (ou complexos) de espécies podem estar

restritos a uma determinada área; entretanto, são escassas as informações sobre sítios preferenciais ou fatores críticos para seu estabelecimento e persistência em diferentes ecossistemas. Estudos demonstram que determinantes físicos, químicos e biológicos do solo influenciam a heterogeneidade desses agregados de espécies, tais como pH, propriedades químicas, concentrações de CO₂ e HCO₃, conteúdo de matéria orgânica e sais, microbiota, além da presença de ferro (HUBBARD et al., 1983). Embora pareça ser colonizador secundário por sua presença em matéria orgânica bastante decomposta, é bastante agressivo na competição por nutrientes e exsudatos vegetais.

2.3. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DO GÊNERO *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* é representado por fungos essencialmente não patogênicos a plantas que exercem antagonismo a vários fitopatógenos, através do parasitismo e, ou antibiose (KRUGNER e BACCHI, 1995). De um modo geral, o gênero possui algumas características tais como ser inócuo ao ser humano e não apresentar impacto negativo ao meio ambiente (maioria dos isolados); produzir propágulos (conídios e clamidósporos) em profusão, principalmente em substratos naturais (SPIEGEL & CHET, 1998); apresentar rápido crescimento, poucas exigências nutricionais, e produzir enzimas líticas que digerem a parede celular de fitopatógenos (MELO, 1991); possuir forte habilidade competitiva, com produção de antibióticos e indução de lise celular.

Trata-se de um fungo sapróbio em que, para cada espécie, existe habitualmente uma forma anamórfica (ou clonal) e uma forma teleomórfica (ou sexuada) (FIGUEIREDO, 2007). O gênero *Trichoderma* é caracterizado por possuir conidióforos hialinos, muito ramificados, com ramos terminais, não verticilados e fiálides isoladas ou em grupos (Figura 1) (BARNETT et al., 1972). Os conidióforos são bem definidos e os conídios tendem a acumular-se em massas globulares (SAMUELS, 1996).

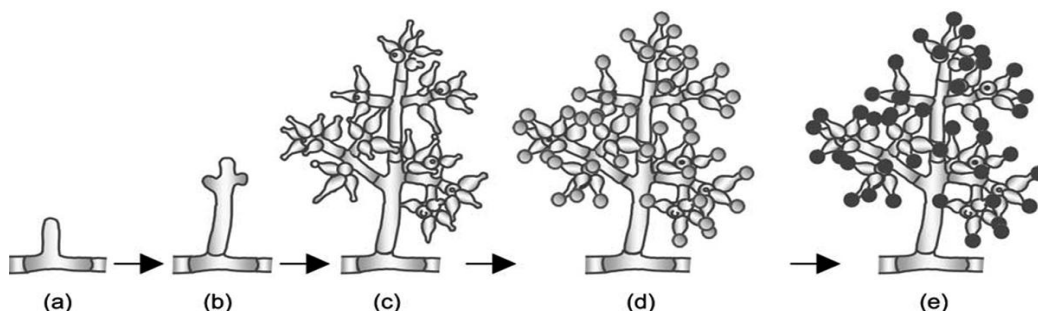


Figura 1: *Trichoderma* em suas fases de crescimento: a) hifa, b) conidióforo jovem, c) fiáldes mucronadas, d) esporos imaturos, e) esporos maduros. (Modificada de STEYAERT et al., 2010d)

As espécies do gênero são caracterizadas por apresentarem colônias de rápido crescimento, atingindo de 2 a 9 cm de diâmetro após quatro dias de cultivo em meio de cultura (ESPOSITO; 1998). As colônias podem se apresentar dispersas e flocosas ou compactadas em tufos. O tamanho e o formato dos conídios são muito variáveis e de limitado valor taxonômico. É observado eventualmente a existência de clamidósporos, os quais são esporos assexuais, originados pela modificação dos segmentos da hifa, podendo ser intercalados ou terminais. Os conídios podem ser verdes, amarelos ou em tons verdes amarelados. Fatores como temperatura, umidade, nutrientes, tipo de solo, microbiota, aeração, pH e teor de matéria orgânica influenciam na sobrevivência de *Trichoderma* no solo ou substrato (HOWELL, 2003).

2.4. CONTROLE BIOLÓGICO

2.4.1. *Trichoderma* spp como agentes de biocontrole

O combate a doenças de plantas ainda é altamente dependente de agrotóxicos, que são eficazes, de modo geral, mas tendem a apresentar efeitos colaterais com consequências indesejáveis; podem ser ou conter substâncias altamente venenosas, podem se acumular no organismo humano, e podem ser capazes de causar câncer e mutações genéticas em descendentes (LIMA, 2000). Desta forma, agricultores e pesquisadores começaram a considerar o uso de

métodos alternativos para o combate a essas doenças (PUNJA, UTKHEDE, 2003).

O controle biológico tem como premissa básica manter a densidade populacional das espécies de pragas associadas à agricultura, em níveis economicamente e ecologicamente aceitáveis (LIMA, 2000). Pode ser definido como a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um fitopatógeno, que deve ocorrer por meio de um ou mais organismos que não o homem. De outro modo mais simples, pode ser considerado como o “controle de um microrganismo através de outro(s) microrganismo(s)”. Para o sucesso de qualquer estratégia de controle de uma determinada doença, o entendimento do ciclo de vida do fitopatógeno é crucial. A maioria dos fitopatógenos que afeta diversas culturas foi razoavelmente estudada e as informações sobre sua biologia estão disponíveis (AGRIOS, 2005).

Diversos fungos têm o seu sucesso comprovado como ABC e muitos outros estão sendo apontados como potenciais para esse fim. A utilização de fungos no controle de doenças requer uma interrupção de algum estágio da doença ou do ciclo de vida do fitopatógeno, e isto pode ocorrer através de diversos mecanismos. A prevenção da infecção, redução na colonização do tecido hospedeiro, e redução da esporulação ou da sobrevivência do fitopatógeno podem proporcionar diferentes níveis de controle através da utilização de agentes biológicos (PUNJA, UTKHEDE, 2003). Nos últimos 20 anos, estudos com microrganismos com potencial de controle biológico têm se intensificado, gerando informações relativas à eficácia, modo de ação, sobrevivência, colonização e potencial toxicidade para espécies não-alvo. Para o desenvolvimento de um produto biológico comercial, é necessária uma pesquisa laboratorial bastante apurada, com resultados consistentes e repetíveis. Além disso, estudos com relação à formulação, estabilidade e vida de prateleira do produto também são necessários (MATHRE, 1999 ; HARMAN, 2000). O controle biológico de fitopatógenos de ocorrência na pós-colheita pode ser feito durante o ciclo da cultura ou após a colheita. Ainda no campo, tem como objetivo evitar a penetração dos fitopatógenos nos tecidos de frutos e hortaliças e seu posterior desenvolvimento durante o armazenamento (pós-colheita). Portanto têm-se dois

objetivos: evitar que os fitopatógenos latentes nos tecidos causem podridões e impedir novas infecções (PUNJA, UTKHEDE, 2003).

Há dados na literatura descrevendo modificações na rizosfera por ABCs do gênero *Trichoderma*, os quais impedem a colonização de plantas por patógenos através da liberação de antibióticos e metabólitos tóxicos. A maioria das espécies de *Trichoderma* produz metabólitos tóxicos voláteis e não-voláteis, tais como ácido harziânico, alameticinas, tricholinas, alguns antibióticos, 6-pentil-pirano, massoilactona, viridinas, gliovirinas, glisopreninas, ácido heptelídico e outros. A combinação de enzimas hidrolíticas e antibióticos resulta em níveis mais elevados de antagonismo do que quando comparado a ação destes isoladamente (HOWELL, 1998).

2.4.2- Mecanismos de ação antagônica

A fundamentação do controle biológico consiste da interação antagonista-patógeno. Para se assegurar o sucesso do método, pode-se empregarum mesmo ABC que atue por meio de mais de um mecanismo de ação antagônica, isoladamente ou combinado com outros. Os mecanismos utilizados por fungos ABC para reduzir o crescimento e desenvolvimento de fitopatógenos fúngicos são: micoparasitismo, produção de compostos antibióticos, produção de enzimas extracelulares, interferências nos fatores de patogenicidade, indução de resistência na planta hospedeira e competição por nutrientes e nichos de colonização (PUNJA, UTKHEDE, 2003). Os seguintes mecanismos diferentes de interação antagônica podem atuar em sinergia:

(i) *Competição*: corresponde à disputa entre patógeno e antagonista pelos mesmos recursos, incluindo nutrientes, espaço, água e oxigênio;

(ii) *Antibiose*: é a ação à distância por meio de metabólitos liberados pelo antagonista que inibem o crescimento e desenvolvimento do patógeno; tais metabólitos são produzidos e secretados no meio externo, podendo variar entre espécies e isolados de uma mesma espécie, com efeitos diversos (BETHIOL; 1995);

(iii) *Micoparasitismo*: é o resultado do contato físico direto entre antagonista e seu hospedeiro (no caso, o fitopatógeno), resultando na penetração das hifas

do antagonista no interior das hifas do patógeno, seguida de metabolização e utilização do conteúdo celular deste hospedeiro. Dentre as etapas deste processo de micoparasitismo, vale destacar a produção e liberação de enzimas hidrolíticas degradadoras da parede celular do patógeno como sendo um fator determinante na eficiência desse processo (LORITO, 1998). Além disso, a espécie *Trichoderma stromaticum* (Ts) apresenta capacidade de recombinação sexual (BEZERRA et al., 2003) o que pode favorecer o surgimento de isolados diferentes geneticamente, que apresentam graus de atividade antagônica distintos;

(iv) *Indução de resistência*: algumas pesquisas demonstram que a ação antagônica direta sobre o fitopatógeno simplesmente não explica o controle da doença, pois não há formação de metabólitos inibidores e, ou o agente causal da doença e, os microrganismos benéficos estão separados temporalmente ou espacialmente. Algumas espécies e, ou isolados ativam de alguma forma o sistema de defesa das plantas hospedeiros, denominando-se o processo como de 'resistência sistêmica induzida'. Assim o microrganismo exerce proteção, manifestada pela redução dos sintomas causados pelo patógeno, quando ambos se encontram separados espacialmente. Por outro lado, a 'resistência sistêmica adquirida' é induzida pelos agentes patogênicos, porém ambas as resistências são fenotipicamente similares e apresentam um espectro de efetividades diferentes em relação aos patógenos (BENHAMON et al., 1996). Outro fator relacionado ao melhor desenvolvimento de plantas por isolados benéficos de *Trichoderma spp* é o aumento da resistência aos estresses abióticos (p. ex.: umidade, pH, temperatura, etc.). Pesquisas sugerem que plantas tratadas com esses agentes podem ter seu desempenho favorecido quando cultivadas em condições subótimas, ou seja, em condições estressantes;

(v) *Promoção de crescimento*: a promoção de crescimento de plantas pela aplicação de isolados de *Trichoderma* foi inicialmente relacionada ao controle de microrganismos prejudiciais presentes na rizosfera e, ou no solo. Mais recentemente, essa promoção de crescimento tem sido relacionada à produção de hormônios ou fatores de crescimento, além de ser também devida a maior eficiência no uso de alguns nutrientes e aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes pela planta. Algumas linhagens de *Trichoderma* aumentam a superfície total do sistema radicular, possibilitando um maior acesso aos

elementos minerais presentes no solo (RUOCCO, 2009). Outras são capazes de solubilizar e disponibilizar o fosfato de rocha, ferro, cobre, manganês e zinco para a planta. Também podem melhorar os mecanismos ativos de absorção de cobre, fósforo, ferro, manganês, sódio, cobalto, cádmio, cromo, níquel, chumbo, vanádio, magnésio, boro, zinco e alumínio; além disso, permitem aumentar a eficiência da planta para utilizar alguns nutrientes importantes, como o nitrogênio (RUOCCO, 2009).

2.4.3. Contexto Cacau – *Moniliophthora perniciosa*

O cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) é uma planta cultivada em regiões tropicais do mundo, do qual se aproveita suas sementes (amêndoas) para produção de cosméticos e chocolate. Na década de 70, a cultura do cacau era uma das principais fontes geradoras de riqueza da economia brasileira, com 90% da produção sendo destinada à exportação, e o sul-sudeste do Estado da Bahia responsável por cerca de 80% da produção nacional. Contudo, a partir de 1997, o Brasil passou a importar o produto. O impedimento maior para a produção de cacau não ter se mantido nos patamares elevados foram, além da queda dos preços no mercado internacional, as doenças fúngicas, com a ‘vassoura-de-bruxa’ (VB) sendo a principal delas. O patógeno correspondente, *Moniliophthora perniciosa* (Stahel), foi introduzido na Bahia em 1989 (PEREIRA et al. , 1998). Os impactos econômicos resultantes da imensa queda na produção de cacau nessa região produtora da Bahia foram desemprego, venda de propriedades, mudanças no uso da terra com consequentes danos ao meio ambiente.

Dentre as estratégias de controle integrado para a VB destacam-se o uso de variedades clonais resistentes, a poda fitossanitária e uso intensivo de fungicidas cúpricos. O controle biológico passou a integrar o rol de estratégias de manejo da doença em 1999, com o fungo micoparásita e antagonista deste patógeno, *Trichoderma stromaticum* (Ts), sendo produzido em larga escala na última década e tendo fornecido níveis razoáveis de controle. Porém, o isolado utilizado no produto ‘Tricovab’ (TVC) foi oriundo do Estado do Pará e tem se mostrado inconsistente em diversas situações de microclima e ambientes na região cacauzeira sul-baiana. Assim, há necessidade de se identificar novos

isolados mais eficientes e de se desenvolver tecnologias alternativas, não somente para suas produções em larga escala, mas também para suas formulações com fins comerciais.

2.4.4. Produção massal de esporos para comercialização de ABC

O uso de inseticidas químicos há muito tempo é questionado, pois podem levar à poluição ambiental, aumentar a resistência do patógeno e ainda causar efeitos prejudiciais ao organismo humano e dos animais. Além disso, os altos custos tornando os mesmos inacessíveis aos pequenos produtores. Assim, considerando todos esses efeitos negativos dos inseticidas químicos, o uso de fungos como ABCs tornou-se importante alternativa. Porém, a necessidade de se estabelecer condições para produção em massa de esporos tende a retardar a comercialização e aplicação final a campo (GAO et al., 2010).

Os esporos constituem-se, essencialmente, em células envolvidas por parede celular que as protegem até as condições ambientais se mostrarem favoráveis à sua germinação. Embora esta capacidade seja vantajosa em termos da sua utilização como um ABC de contato ou biopesticida, a produção desses propágulos requer consideração especial (KUBICEK, 1992). Abordagens voltadas para a otimização de meios de cultura devem considerar não apenas o rendimento de esporos, mas também a qualidade dos mesmos, que inclui aspectos como tolerância à dessecação, estabilidade como uma preparação seca, e eficácia no controle biológico em si. Condições nutricionais adequadas durante o crescimento da cultura e esporulação tendem a favorecer a acumulação de reservas endógenas apropriadas para que os esporos recém-formados apresentem estas qualidades vantajosas (JACKSON et al., 1997).

Para desenvolvimento de biopesticidas fúngicos, as exigências nutricionais disponíveis em meios de cultura devem maximizar o rendimento de esporos, além de ter um custo baixo. Esses são requisitos essenciais para uma adequada produção em massa. É imprescindível encontrar as combinações ideais dos fatores envolvidos para uma produção maior de micélio submerso e maior rendimento de esporos aéreos. Uma alternativa viável é compreender a fisiologia de base para se obter as condições acima (GAO et al., 2010). Alguns estudos

demonstram que o impacto da nutrição interfere na 'aptidão' do esporo para uso como um ACB microbiano que, ao ser produzido em escala industrial, precisa manter, simultaneamente, sua viabilidade celular elevada por longos períodos de tempo na fase estacionária de crescimento, e sua eficácia de biocontrole (MANSO et al., 2010). A viabilidade econômica da produção massal de uma estirpe selecionada, bem como o desenvolvimento de um produto estável e duradouro são fatores-chave para o êxito do produto biológico. Duas fases de desenvolvimento distintas ocorrem: a do processo de produção em si e, posteriormente, a do produto comercializável, que inclui desde o teste de embalagens de formulação até eficácia agrônômica a campo. Os fatores técnicos e econômicos críticos são identificados, avaliados e revistos para os tipos de patógenos e os diversos sistemas de produção. Para cada sistema de produção há vantagens e desvantagens em termos de custos de gerenciamento e versatilidade. O desenvolvimento de um produto estável que seja capaz de fornecer o controle de pragas eficaz necessita de uma formulação, para que se estabilize os propágulos e o produto seja de fácil utilização. A proteção do propágulo, uma vez aplicado, minimiza os riscos de exposição direta do aplicador.

Assim, de acordo com o tipo de patógeno, a formulação é considerada e, juntamente com os testes de campo, constitui-se em fase fundamental no desenvolvimento de produtos. A qualidade dos propágulos produzidos, a eficácia necessária para o registro, a compatibilidade com outros produtos sintéticos ou biológicos, esquemas apropriados para a aplicação do produto, e aspectos associados à comercialização final do produto representam condições indispensáveis. Um modelo de preço de custo de biopesticidas é fornecido com os fatores de custo envolvidos até a chegada de produtos no mercado. O modelo oferece uma perspectiva sobre a composição do preço final para o usuário e todos os custos que devem ser considerados para alcançar um negócio rentável (RAVENSBERG, et al., 2011).

2.5. ESPORULAÇÃO EM *Trichoderma* spp E OUTROS FUNGOS

2.5.1. Fisiologia da produção de conídios

Para se estabelecer um método adequado e eficiente de produção em massa, em que os conídios sejam ativos e mantenham a viabilidade celular elevada por longos períodos de tempo, é necessário um entendimento dos processos fisiológicos mais relevantes associados à conidiação. Portanto, a compreensão de aspectos básicos do crescimento do fungo, incluindo-se o conhecimento detalhado dos requisitos nutricionais e demais fatores ambientais para obter melhor crescimento e esporulação, facilita o uso do mesmo como agente de controle biológico. Os mesmos fatores que interferem na sobrevivência de *Trichoderma* spp no solo (ver item 2.3) também são relevantes para produção em massa de esporos, cujas condições ótimas de concentração e magnitude definem o processo. Dentre estes fatores, os principais tendem a ser concentração de carbono e nitrogênio, disponibilidade nutricional, pH do meio, luz, injúria mecânica, ritmo circadiano, etc (STEYAERT, 2010d), sendo que diferentes combinações de presença / ausência e, ou acréscimo / decréscimo desses componentes devem ser estabelecidas de modo isolado-específico (ver item 4.). Essas respostas fisiológicas específicas permitem elucidar as condições que determinam a ação ou resposta dos fatores e elementos morfogênicos e, assim, o ambiente que proporciona a produção máxima de conídios (e.g. MORENO-MATEOS et al., 2007). Tais procedimentos são necessários em programas de pesquisa visando ao controle biológico de fitopatógenos por fungos antagonistas.

A seguir são revisados esses principais fatores que interferem na fisiologia e respostas de esporulação de fungos, incluindo o gênero *Trichoderma*.

2.5.1.1. Fonte de Carbono

Como já citado, as exigências nutricionais dos fungos são a chave para o eficaz desenvolvimento de biopesticidas a baixos custos. Apesar das fontes e quantidades de carbono presentes no meio serem consideradas determinantes para conidiação (FRIED et al., 2008; GAO et al., 2007), os estudos sobre fatores nutricionais, físicos, químicos e biológicos que governam essa esporulação não

evidenciaram nenhum conjunto de parâmetros ótimos e gerais aplicáveis a uma determinada espécie. Sugere-se que isso seja devido a uma frequente insuficiência de identificação taxonômica dos isolados de *Trichoderma* que leva a confusões na literatura a esse respeito, bem como aos requerimentos específicos de cada isolado dentro das espécies (STEYART et al., 2010b,c). A presença / ausência de luz dentro de um experimento, por exemplo, exerce um efeito interativo com as influências nutricionais na esporulação, e os demais estímulos abióticos combinados em diferentes condições e quantidades resultam em sistemas de interação com as fontes de carbono disponíveis (SCHMOLL et al., 2005; FRIEDL et al., 2008).

2.5.1.2. Fonte de Nitrogênio

O nitrogênio é um dos componentes principais do complexo de macromoléculas centrais para a estrutura e função de todos organismos vivos – DNA, RNA e proteínas –, bem como de moléculas armazenadoras de energia química e de potencial redox, necessárias para o fluxo de energia e metabolismo das células. Assim a maioria dos organismos procariotos e eucariotos têm mecanismos para fornecimento constante do nitrogênio. Os fungos são capazes de utilizar e metabolizar uma surpreendente e diversificada gama de compostos como fonte de nitrogênio e são capazes de expressar enzimas catabólicas de diversas formas (MARZLUF et al., 1997). Nitrato, glutamina, ureia, purina, dentre outras, são fontes deste elemento, podendo elas serem fontes primária (N reduzido) ou secundária (N oxidado) de nitrogênio. Quando as fontes primárias não estão disponíveis, os fungos podem utilizar as secundárias para que não haja limitação no crescimento, porém com alterações no metabolismo, fisiologia e morfologia das colônias. Algumas pesquisas indicam que a absorção do nitrogênio favorece simultaneamente o crescimento e a esporulação. Por exemplo, fontes primárias de nitrogênio quando adicionadas em meios considerados ricos (por ex., batata +dextrose) podem converter um fungo de esporulador periférico na colônia (conidiação em forma de anel) para concêntrico (conidiação na forma de disco) (STEYART et al., 2010c). A razão entre várias concentrações distintas de carbono e nitrogênio tem efeito primordial sobre o crescimento e esporulação dos fungos (GAO, L. et al., 2010). Além disso, essa razão C:N pode estar

relacionada não somente com micélio e conídios, mas também com a eficácia do controle biológico (JACKSON & SCHISLER, 1992).

2.5.1.3. Depleção nutricional

A privação de nutrientes é considerada um indutor universal de esporulação em fungos, e *Trichoderma* não é exceção. A privação de carbono e nitrogênio separadamente parece estar envolvida em diferentes sinais que permitem induzir a conidiação do fungo. As hifas armazenam e podem translocar aminoácidos em um sistema que permite a regulação dos genes envolvidos no processo de formação de esporos, controlando a quantidade intracelular desses compostos (OLSSON, 1999; WATKINSON, 1999). São inúmeras as pesquisas que relatam as respostas de cada espécie e seus isolados a estes efeitos interativos.

2.5.1.4. pH do meio

Demonstrou-se que o pH extracelular do meio de cultura também proporciona efeito sobre a esporulação e crescimento micelial, podendo o seu valor ótimo variar entre pH 4,0 – 6,8, dependendo da espécie fúngica e seus isolados (STEYAERT et al., 2010b). Apesar da importância do pH inicial do meio de cultura, sabe-se que isolados de *Trichoderma* em cultivo são capazes de alterar esse pH do meio, dependendo da fonte de nitrogênio que esteja disponível (LEWIS & PAPAIVIZAS, 1983; STEYAERT et al., 2010b). As fontes de nitrogênio primário promovem a diminuição do pH, enquanto a alcalinização ocorre quando há nitrogênio secundário ou quando o primário está em baixa quantidade (LEWIS & PAPAIVIZAS, 1983; STEYAERT et al., 2010b). A esporulação parece ser dependente da acidificação intracelular, que por sua vez é dependente do pH do ambiente (meio de cultura) e, muitas vezes, também da exposição à luz (GRESÍK et al., 1991). Com base no trabalho de Steyaert et al. (2010b) com três espécies de *Trichoderma* (*T. hamatum*, *T. atroviride* e *T. pleuroticola*), o pH interno possui um limite de acidificação que seria em torno de pH 4,0; entretanto certos aspectos da esporulação dependente de pH necessitam de estudos mais aprofundados, pois as respostas e regulação podem ser espécie-ou isolado-específicas.

2.5.1.5. Luminosidade

A luz influencia os organismos vivos, não somente pela importância como a principal fonte de energia para a biosfera, mas também devido à sua capacidade de induzir mudanças fisiológicas e morfológicas em quase todas as formas de vida. Para produção comercial de conídios de *Trichoderma* sabe-se que o regime de luz é um fator importante e determinante dos fenótipos de esporulação. Para a maioria dos isolados/espécie deste gênero, com base na suposição de que tal regime reflete aproximadamente o ambiente natural, a utilização de ciclos alternados de 12h luz : 12h escuro pode favorecer a formação de anéis concêntricos de conídios, resultantes do período sob estímulo luminoso . A fase de resposta metabólica para que o estímulo luminoso possa induzir a fotoesporulação ocorre a partir de aproximadamente 10h de crescimento e desenvolvimento das células fúngicas (GRESSSEL & GALUN, 1967).

2.5.1.6- Injúria mecânica

As injúrias mecânicas consistem de ferimentos físicos no micélio, realizados com bisturi; foi demonstrado que tais ferimentos são capazes de induzir a esporulação em várias espécies de *Trichoderma* (CASAS-FLORES et al., 2004). Em estudo realizado com *T. atroviridae*, no qual se removeu os efeitos dos genes envolvidos na mediação das respostas aos estímulos e sinalização por luz azul (CASAS-FLORES et al., 2004), observou-se claramente um efeito de indução da esporulação como resposta à realização de ferimentos no micélio. Em outros estudos realizados com *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, dentre outros, sugere-se que a diferenciação de hifas para formação de conídios ocorreria como resposta ao estresse oxidativo, porém não se sabe ainda precisamente o mecanismo pelo qual as injúrias no micélio estimulam a esporulação em *Trichoderma* (STEYAERT et al., 2010d).

2.5.1.7. Ritmo circadiano

Os organismos de forma geral se adaptam as influências ambientais, tais como variações cíclicas de luz, temperatura, dentre outras. Com a evolução do ritmo circadiano os organismos se antecipam às mudanças diárias

desencadeadas pelos ciclos de luz : escuro do ambiente (THAKORE, 2004). Estes ritmos têm sido bastante estudados e descritos em *Neurospora crassa*, onde se tem demonstrado regulação da esporulação como sendo diretamente vinculado ao relógio molecular circadiano, envolvendo os genes *frq*, *wc-1* e *wc-2* (LAKIN & BRODY, 2004)(ver item 2.5.2 a seguir); *Trichoderma* também apresenta ritmos endógenos associados à conidiação (STEYAERT et al., 2010a), porém não parece que o mecanismo de regulação dessa esporulação envolvendo luz seja regulado circadianamente, (STEYAERT et al., 2010d). Até o momento, não se conhece exatamente se, e como, a regulação circadiana de ritmos endógenos em *Trichoderma* interage com mecanismos de indução da conidiação por luz – a fotoconidiação (STEYAERT et al., 2010d; LOGUERCIO L.L., comunic. pess).

2.5.2. Genética da esporulação

Diversos genes têm sido estudados, cujos produtos e efeitos estão associados à conidiação em *Trichoderma* (revisado em STEYAERT et al., 2010d). Conforme citado, uma característica típica de espécies deste gênero é a produção de anéis concêntricos de conídios em resposta a ciclos de alternância entre luminosidade e escuridão (ver item 2.5.1.5). Tal resposta tem demonstrado ser devida a luz azul e, ou ultravioleta tipo A (UV-A). Em *Trichoderma*, os reguladores de luz azul *blr-1* e *blr-2* são fatores de transcrição ortólogos das proteínas WC-1 e WC-2 (*'white collar'*) de *Neurospora crassa* e são reguladores chaves das respostas de fotoconidiação (CASAS-FLORES et al, 2004). Além da indução por luz, a conidiação mostrou também ser induzida por estresse nutricional e por injúria micelial; evidências tem demonstrado que esses os fatores de transcrição *blr-1* e *blr-2* podem estar envolvidos na regulação desses outros estímulos não-luminosos, porém os mecanismos parecem ser complexos e não foram elucidados ainda (STEYAERT et al., 2010d).

Algumas evidências sugerem que conidiação em *Trichoderma* está sob influência de ritmos endógenos, direta ou indiretamente associados à regulação molecular circadiana (item 2.5.1.7). Em *T. atroviride*, um gene ortólogo ao *frq* (*'frequency'*) de *N. crassa* foi identificado (Steyaert, J.M., não publicado). Nesta espécie modelo para estudos com fungos filamentosos, as duas proteínas WC

citadas acima formam um 'relógio circadiano' em conjunção com a proteína Frq, cujo resultado da interação entre elas resulta na ativação e desativação de diversos outros genes, num ciclo que possui ritmo diário de aproximadamente 24 h (LIU & BELL-PEDERSEN, 2006). Novamente, há uma possível (provável) influência dos ortólogos *blr-1* e *blr-2* de *Trichoderma* neste processo de ritmo endógeno da conidiação (STEYAERT et al., 2010a), apesar de ainda não se conhecer exatamente estes mecanismos nem se ter certeza se este ritmo é regulado circadianamente de modo direto, ou indireto, como consequência do estabelecimento de ritmos biológicos (STEYAERT et al., 2010d; Loguercio, L.L., comunic. pess.)

Numa outra linha de investigação, tem sido estudado o papel de um gene repressor, *rco1*, na regulação da conidiação em *T. atroviride*; em *N. crassa*, o gene de conidiação *con-10* é expresso em micélios de mutantes de deleção para *rco1*, sugerindo, portanto, regulação negativa deste gene sobre os genes de conidiação, durante crescimento vegetativo (LEE & EBBOLE, 1998). Para se verificar se *rco1* tem papel similar em *Trichoderma* ao proposto para *Neurospora*, mutantes de 'perda de função' de *rco1* foram gerados em *T. atroviride*, bem como um ortólogo de *con-10* foi isolado. A produção de transformantes para este gene com respectiva análise de expressão de *con-10* foram iniciados, assim como estudos de alinhamento de seqüências e homologia/ortologia de funções (STEYAERT, 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CULTIVO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS DE *T. stromaticum* (Ts)

Obteve-se 14 isolados de *Trichoderma stromaticum* (Ts), os quais foram previamente coletados na região cacauera que engloba os diversos municípios sul-baianos e foram cedidos pelo Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, membro do grupo de pesquisa. Os isolados pertencem a dois grupos genéticos, conforme estudos prévios (DE SOUZA et al., 2006): os do grupo I são denominados ALF-15, -541, -639, -643, -672, -678 e -1092; os do grupo II são ALF-64 (TVC), -56, -74, -113, -323, -408, -658. O isolado ‘TVC’ (originário do Estado do Pará) vem sendo utilizado para a produção em larga-escala de ‘Tricovab’ (CEPEC/CEPLAC), utilizado nos últimos 15 anos para controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauero; foi utilizado neste trabalho como referência de comparação com os demais isolados. Para estocagem, os isolados foram mantidos em óleo mineral e, ou em ‘Castelani’ (armazenamento de *plugs* de micélio e em água bidestilada e autoclavada).

Após informação prévia obtida com os membros do Laboratório de Biocontrole do CEPEC (Niella, G.R., comunic. pess.), os 14 isolados foram cultivados em meios de cultura sólido Batata-Dextrose-Agar (BDA) que, como para a maioria das espécies fúngicas, é o meio padrão de utilização também para Ts. Foram utilizadas duas formas distintas de preparação deste meio, as quais foram denominadas de ‘não-industrializado’ e ‘industrializado’; o primeiro se refere a decocção de batatas (cozimento em água e retirada do caldo) e adição de dextrose e ágar separadamente, enquanto o outro refere-se à preparação do meio a partir de meio ‘BD’ comercial, acrescentando-se ágar de forma separada.

Para a produção de BDA ‘não-industrializado’, utilizou-se 1 L de água destilada, dividido igualmente em dois recipientes, um para cozimento de 200 g

de batatas e outro para suspender 17 g de ágar. Após a coleta do caldo resultante do cozimento da batata por 30 min, acrescentou-se 20 g de dextrose, mais o ágar pesado (para uma concentração final de 1,7%), completando-se o volume desejado de 1000 mL e autoclavando-se durante 15 minutos.

Para preparação do meio BDA 'industrializado', utilizou-se meio BD em pó (Hymedia[®]) na proporção de 40 g para 1000 ml; este meio foi adicionado à metade do volume total, aquecido com agitação constante para completa dissolução, ajustado em relação ao pH (com HCl e NaOH) para os valores a serem testados nos experimentos (ver item 3.5.2), e autoclavado. Em outro frasco foi pesado 17g de ágar, adicionado à outra metade do volume (500 mL) e autoclavado. A esterilização de forma separada foi necessária para permitir o ajuste de pH, visto que o meio BDA industrializado (isto é, já contendo ágar) quando ajustado para pH muito ácido antes da autoclavagem prejudica a polimerização do meio (informação obtida de experimentos preliminares). Em alguns tratamentos com este meio foi adicionado extrato de malte a 10% em sua concentração final, constituindo-se o meio 'BDA + suplemento'.

Para os experimentos iniciais de obtenção de esporos para estocagem, os isolados de *Ts* foram cultivados em meio BDA (sem e com suplemento) por 10 a 15 dias, em incubadora do tipo BOD, com fotoperíodo de 12 h luz / 12 h escuro, e temperatura de 25 °C. Para os experimentos fatoriais descritos mais abaixo (com exceção da temperatura que foi sempre a mesma), algumas das condições acima descritas foram alteradas por serem parte dos tratamentos a serem testados (ver item 3.5).

3.2. COLETA E ARMAZENAMENTO DE ESPOROS

Os conídios (esporos) correspondentes àqueles isolados que esporularam em placa de Petri contendo meio BDA + suplemento (ver seção Resultados) foram coletados para formação de estoques, visando servir como inóculo inicial padronizado para os experimentos posteriores com os tratamentos sob estudo. Estes estoques de conídios formados nas primeiras colônias cultivadas dos isolados a partir dos *plugs* de micélio fornecidos para o estudo foram

denominados esporos de 1ª geração. A partir destes esporos, foram cultivadas de 2 a 3 placas com mesmo meio para obtenção da 2ª geração de esporos de cada isolado, em quantidades suficientes para a realização de todos os experimentos posteriores deste trabalho. Dentre os isolados que esporularam (ver Tabela 1, seção Resultados), foram utilizados no decorrer do presente estudo o ALF-15 e -1092 do grupo I, e os isolados ALF-64 (TVC) e -113 do grupo II.

Foram coletados esporos das culturas que apresentaram crescimento micelial em toda placa de Petri; apesar da conidiação ter sido visível com esporos de cores branca, amarelada e verde, estes últimos foram preferencialmente utilizados por serem esporos maduros. O procedimento de coleta foi realizado em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar), a partir da lavagem da superfície micelial com 10 ml de água Mili-Q estéril. Os esporos foram raspados com alça de Drigálski e cerca de 5 ml dessa suspensão era coletada com micropipeta, contendo ponteira com filtro para separação de eventuais pedaços de hifas carregadas junto com os esporos. Essa suspensão foi transferida para tubo de 15 ml estéril do tipo 'Falcon', na abertura do qual foi acondicionado papel filtro '3MM' estéril para filtragem dos resquícios miceliais, assegurando o máximo de limpeza na suspensão dos esporos coletados. Estes tubos Falcon contendo as suspensões de esporos coletadas eram mantidos no gelo durante o procedimento. Após a coleta dos esporos a partir das placas, as respectivas suspensões foram centrifugadas a 2000 rpm por 1 min em centrífuga refrigerada, para concentração dos esporos. A maior parte do sobrenadante remanescente foi descartado, restando usualmente 500 – 700 µl de suspensão concentrada de esporos por isolado. A esta suspensão, foi adicionado igual volume de Glicerol a 50%, homogeneizado inteiramente em vórtex com rotação lenta antes do armazenamento em freezer -20 °C.

3.3. CONTAGEM DE ESPOROS

Este procedimento é necessário para os estoques de trabalho de T_s , para assegurar uniformidade de inoculação com a mesma quantidade de esporos em todas as placas, independente do isolado e do tratamento. Do mesmo modo, a

contagem foi utilizada após a condução dos experimentos e ocorrência de conidiação nos tratamentos, para compor os dados relativos à variável dependente quantitativa, isto é, 'número de esporos por placa'. Para o procedimento de contagem, primeiramente os tubos Falcon contendo os esporos coletados das placas foram centrifugados a 2000 rpm (1600 g) a 4 °C por 2 min. Após a centrifugação, para cada isolado, foram preparados 2 microtubos com volume igual cada um de 900 µL de água Mili-Q estéril, para serem usados nos passos de diluição seriada 1 : 10. Adicionou-se 100 µL da suspensão de esporos no primeiro microtubo (diluição 10^{-1}) e, após completa homogeneização, retirou-se novamente 100 µL deste para adicionar ao segundo microtubo (diluição 10^{-2}). A contagem foi realizada a partir dessas diluições em hemacitômetro (câmara de Neubauer), seguindo os procedimentos padronizados. A contagem dos esporos foi considerada suficientemente precisa quando havia de 40-70 esporos em cada um dos quadrados do *grid* de contagem da câmara; quantidades superiores ou inferiores levaram a ajustes na diluição da suspensão de esporos usada para a contagem. A concentração de esporos em cada suspensão (tubo Falcon) pôde ser obtida, utilizando-se a câmara de Neubauer, onde [esporos/ml] = total de esporos para o *grid* central x 10^4 .

3.4. VIABILIDADE DOS ESPOROS ESTOCADOS

Os procedimentos para verificar o percentual de germinação dos conídios de cada suspensão-estoque foram realizados, inoculando-se $2,5 \times 10^5$ esporos em 1 ml de meio BD líquido (1/2 da concentração padrão) em microtubos de 1,5 ml. Posteriormente, os tubos com as amostras de esporos homogeneizadas foram colocados em estufa com haste giratória interna (para rotação dos tubos durante a incubação), com temperatura de 22 °C e tempo de incubação de 16-18 horas a ~25 rpm. Após este período, os microtubos foram levados para contagem na Câmara de Neubauer em microscópio óptico. Para se determinar o percentual de germinação dos esporos, obteve-se o total de conídios germinados e não-germinados, contados em 5 quadrados do *grid* central do hemacitômetro, e dividiu-se o número de conídios germinados pelo total de conídios, multiplicando-

se por 100. Foram considerados como germinados aqueles esporos que apresentaram tubos germinativos com comprimento superior a ~2 vezes o diâmetro do esporo. Para as inoculações, utilizou-se pelo menos 500 conídios viáveis nas suspensões de inóculo.

3.5. EXPERIMENTOS FATORIAIS COM INTERAÇÃO DE FATORES GENÉTICOS E ABIÓTICOS

Estudos anteriores sobre as respostas fisiológicas de *Trichoderma ssp* quanto à conidiação determinaram a atuação de diversos fatores ambientais, que incluem luz, ritmos endógenos, quantidade e relação entre C e N, pH do meio extracelular e fermentos no micélio (STEYAERT et al., 2010d). Utilizando-se os quatro isolados escolhidos e indicados no item 3.2 acima, avaliou-se os efeitos de quatro variáveis independentes (fatores) relevantes para o controle da esporulação *in vitro*, em relação a duas variáveis dependentes: uma qualitativa (categórica) correspondendo aos padrões morfológicos de crescimento e conidiação das colônias fúngicas; a outra quantitativa (numérica) referindo-se ao número de esporos produzidos por placa. Foi estabelecido um fatorial de 96 tratamentos (variáveis independentes), incluindo (i) genótipos (4 isolados), (ii) níveis nutricionais e fonte primária ou secundária de N (3 meios), (iii) pH do meio (4 valores na faixa do ácido), e (iv) estímulo luminoso (presença ou ausência de luz), conforme esquematizado na Figura 2. Foram realizadas três repetições do experimento, aplicando-se todos os 96 tratamentos em três momentos, com intervalos de 2 dias entre eles (total de placas = 96 tratamentos x 3 repetições = 288 unidades experimentais).

Foram realizadas diferentes versões deste estudo fatorial. Na primeira versão, os isolados foram inoculados com pelo menos 500 esporos viáveis por placa (ver item 3.4) e incubados a 28 °C em BOD, por 5 dias (120 h). A condição de escuro total durante as incubações foi produzida pelo envolvimento das placas com 3 – 4 camadas de papel alumínio durante todo o período de incubação. O tratamento de luz consistiu em um pulso de luz branca por 15 min, aplicado após 2 dias (48 h) de incubação; neste momento, metade das placas contendo todos

os tratamentos foram desembrulhadas do papel alumínio pelo tempo indicado, retornando imediatamente à condição de escuro total até o final do experimento (ver item 3.5.3 abaixo).



Figura 2: Esquema explicativo do primeiro experimento fatorial. O total de tratamentos foi de 96.

Nesta primeira versão do experimento, somente uma análise qualitativa (avaliação morfológica) foi realizada. Na versão seguinte do experimento, todas as condições acima foram reproduzidas, exceto que (i) o período total de incubação foi de 7 dias, (ii) o tratamento de ausência-presença de luz foi substituído por ausência-presença de injúria mecânica (cortes paralelos e perpendiculares do micélio), (iii) a aplicação do tratamento foi feito após 3 dias de cultivo, e (iv) as condições de luz foram estabelecidas como fotoperíodo de 12 h luz / 12 h escuro.

Uma terceira versão do experimento com delineamento fatorial foi realizada em que as condições de meio (BDA) e de pH (5,2) foram fixadas. O experimento foi conduzido por 5 dias e a aplicação de tratamentos, quando necessária, ocorreu aos 2,5 dias. Foram realizadas três repetições para todos os tratamentos (total de 12 tratamentos x 3 repetições = 36 placas) no mesmo esquema anterior, com cada repetição dos tratamentos realizada a cada intervalo de 2 dias. Testou-se as variáveis independentes 'isolados' (-64, -113 e -1092) e 'estímulos físicos', sendo estes correspondendo a 4 tratamentos: (i) escuro total, (ii) pulso de 15 minutos de luz após 48 h de cultivo, (iii) injúrias no micélio no escuro, e (iv) injúrias no micélio + pulso de luz de 15 minutos. Foram observadas as duas principais variáveis de resposta: a qualitativa, que é o aspecto fenotípico geral das

colônias nas placas, e outra quantitativa, que é o número de conídios produzidos por placa, ambas após o tempo definido de incubação. Nesta versão do experimento, uma terceira variável independente foi testada – o ‘diâmetro das placas’ de cultura –, buscando-se verificar os efeitos potenciais do espaço disponível / volume de meio para crescimento do micélio. Os diâmetros comparados foram 9 cm (placas pequenas) e 14 cm (placas grandes), aumentando assim o total de placas para 72 (metade de cada tamanho). A altura de ambos os tipos de placas foi de ~1 cm, sendo que os meios de cultura eram vertidos até ~2/5 desta altura (portanto, placa grande recebia mais meio).

3.5.1. Meios de Cultura

Para testar o efeito dos meios de cultura no crescimento e esporulação de *Ts*, foram testados 3 meios: (i) meio rico em C e N, contendo extrato de Batata + dextrose (BD) que, quando industrializado, foi da marca Hymedia® e preparado de acordo com a indicação do fabricante; (ii) meio mínimo (MM) com fonte de nitrogênio primária (forma reduzida ‘NH₃’), correspondendo à Uréia; e (iii) MM com fonte de nitrogênio secundária (forma oxidada ‘NO₃’), correspondendo ao nitrato de potássio (KNO₃). Os MM foram preparados de acordo com o protocolo de Steyaert et al. (2010b), com concentrações finais de 2% de glicose + 25 mM de Uréia (para MM-1) ou 50 mM de KNO₃ (para MM-2). As soluções-estoque destes compostos foram esterilizadas por filtração em membranas de 0,45 µm. O MM foi composto por 0,2g de MgSO₄·7H₂O; 0,9g de K₂HPO₄; 0,2g de KCl, 2 mg de FeSO₄·7H₂O; 2 mg de ZnSO₄·7 H₂O; 2 mg de MnCl₂·7 H₂O, sendo todas essas quantidades para 1 L. Os compostos foram dissolvidos em 500 ml de água bidestilada e 15 g de ágar foi dissolvido separadamente também em água, em volume adequado para completar 1000 ml após a adição da glicose e das fontes de N. Os MM e ágar foram autoclavados separadamente antes da adição dos estoques estéreis de glicose e uréia ou KNO₃ (em volumes corretos para as respectivas concentrações finais indicadas). A mistura destes compostos autoclavados ou esterilizados foi realizada em ambiente estéril (fluxo laminar). Os meios de cultura completos, após serem vertidos em placas de Petri, por

segurança, permaneceram 24-48h horas sem serem inoculados, para verificar algum eventual sinal de contaminação.

3.5.2. pHs dos meios

Para os meios de cultura descritos acima, o pH foi devidamente ajustado (com NaOH e HCl) em quatro valores diferentes, em intervalos regulares, na faixa de acidez: pH 2,8; 3,6; 4,4 e 5,2. Para preparação do meio BDA foi necessário utilizar o meio líquido BD (Hymedia[®]), conforme indicado no item anterior, para o qual ajustou-se os respectivos pHs e, em outro frasco, pesou-se o equivalente a 17g de ágar para 1000 mL de água, para autoclavá-los separadamente. O meio e o ágar autoclavados separadamente foram misturados e homogeneizados em condições estéreis (câmara de fluxo laminar) antes de serem adicionados às placas de Petri. Por fim, para preparação dos Meios Mínimos com fontes de nitrogênio primária (Uréia) e secundária (KNO₃), ajustou-se os pHs de acordo com o indicado, antes de autoclavar. Ao MM esterilizado, foi adicionado o ágar também autoclavado e, por fim, adicionou-se as fontes de nitrogênio e glicose (item 3.5.1).

3.5.3. Tratamento de Luz

As placas de Petri, após a inoculação com os isolados, foram incubadas em BOD, sendo distribuídas aleatoriamente no interior da incubadora. Os tratamentos de luz aplicados, dependendo do experimento (ver item 3.5 acima), consistiram em: (i) fotoperíodos de 12 h luz / 12 h escuro, conforme permitido pela programação da BOD; (ii) escuro completo durante o período experimental; e (iii) pulsos de luz de 15 min em 48 h de crescimento no escuro quando o tempo total de incubação foi de 5 dias. A condição de escuro total foi obtida pelo acondicionamento de todas as placas em bandejas ou caixas e cobertura completa das mesmas com papel alumínio, tendo sido usadas 4 camadas para assegurar proteção contra eventuais rasgos ou perfurações das camadas mais externas durante o manuseio. Todas as placas foram identificadas com os respectivos tratamentos de isolamento, pH, meio de cultura e luminosidade correspondentes. O estímulo luminoso (pulso de 15 min de luz ambiente) ocorreu

com 48 horas de crescimento e consistiu simplesmente da abertura da câmara escura montada com papel alumínio, com cronômetro ligado para controle adequado do tempo de exposição. Nestes momentos de abertura das câmaras escuras, todas as placas do tratamento ficavam expostas à luz do laboratório, composto de lâmpadas fluorescentes brancas. Quando os estímulos de luz foram combinados com injúria (ver a seguir), eles ocorreram no mesmo momento.

3.5.4. Tratamento de Injúria micelial

Os experimentos em que foram testados os efeitos das injúrias como um tipo de 'estímulo físico' para a conidiação (ver acima) foram realizados com base em cortes das hifas aproximadamente na metade do período de crescimento das colônias. Estes cortes foram realizados no local da placa onde havia crescimento micelial, utilizando-se bisturi para o procedimento. Este era esterilizado com álcool 70% entre placas de diferentes tratamentos de corte, para evitar contaminação cruzada.

As injúrias foram realizadas em bancadas devidamente desinfestadas com álcool 70%, assim como os materiais utilizados. Quando não havia necessidade das injúrias serem realizadas no escuro, os cortes foram feitos no laboratório, com abertura rápida das placas somente durante o procedimento; quando os cortes eram feitos sem luz, utilizou-se câmara escura (para revelações fotográficas) com luz vermelha de segurança (que não é 'sentida' molecularmente por fungos do gênero *Trichoderma*, não induzindo respostas fisiológicas). Um experimento específico testando o efeito do número de cortes (intensidade de injúria) na conidiação, em placas grandes (14 cm x 1cm), foi realizado com os isolados ALF-64, -113 e -1092, em meio BDA, pH 5,2, sob condições de escuro completo. Os tratamentos foram 4 diferentes números de corte, em padrão paralelo e perpendicular (em forma de grade), que foram de 2 x 2; 4 x 4; 6 x 6 e 8 x 8 cortes. Estes foram feitos somente na área de meio coberta por micélio, sendo realizadas 3 repetições para cada tratamento e cada isolado testado (total de 36 placas).

3.6. REGISTROS FOTOGRÁFICOS

Para todos os experimentos descritos, o registro fotográfico das placas foi realizado de forma padronizada, em local adequado, em mesa estativa com base escura. Por meio de uma haste de acoplamento, a câmera fotográfica foi posicionada sempre na mesma altura, assegurando homogeneidade de tamanho e resolução das fotografias para as observações qualitativas das morfologias/fenótipos das colônias.

3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a análise do experimento fatorial envolvendo os efeitos integrados de isolados, meios, pH e luz (item 3.5) na quantidade de esporos produzidos, os dados foram analisados utilizando um modelo linear generalizado, considerando uma distribuição de Poisson. A função geral de definição dos modelos foi estabelecida conforme abaixo, considerando a transformação logarítmica dos dados da variável dependente (número de esporos).

$$\log(E[Y]) = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \delta_l + \alpha\beta_{(ij)} + \alpha\gamma_{(ik)} + \alpha\delta_{(il)} + \beta\gamma_{(jk)} + \beta\delta_{(jl)} + \gamma\delta_{(kl)} + \alpha\beta\gamma_{(ijk)} + \alpha\beta\delta_{(ijl)} + \alpha\gamma\delta_{(jkl)} + \alpha\beta\gamma\delta_{(ijkl)} + \epsilon_{ijklm}$$

μ = constante associada a todas observações;

α_i = efeito do isolado, $i = 1, 2$;

β_j = efeito do meio de cultura, $j = 1, 2, 3$;

γ_k = efeito da luz, $k = 1, 2$;

δ_l = efeito linear do pH, $l = 2.8, \dots, 5.2$;

ϵ_{ijklm} = erro associado a todas observações.

Os demais efeitos são as interações dos efeitos principais. As variáveis independentes 'isolado', 'meio' e 'luz' são variáveis categóricas, definidas pelos números de 1 a 3 acima; a variável 'pH' é numérica e contínua. Foi utilizado software específico da plataforma 'R' (R.2.15.0).

Para a análise do efeito da presença de injúria, com e sem interação com a ausência-presença de luz, no número de esporos, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 4, sendo 3 isolados e 4 tipos de tratamentos (ver item 3.5). Para a análise do efeito da intensidade de injúria na

esporulação, o delineamento foi também inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 4, sendo 3 isolados e 4 tipos de tratamentos (ver item 3.5.5). Em ambos os casos, foi realizada Análise de Variância (ANOVA) pelo teste F a 5% de probabilidade, testando-se os efeitos individuais e as interações entre os fatores de variação. As médias dos tratamentos foram classificadas pelo teste de Scott-Knott, utilizando a respectiva biblioteca do software R.2.15.1.

4. RESULTADOS

4.1. CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DE ISOLADOS DE *Trichoderma stromaticum* (Ts) EM MEIOS BDA NÃO-INDUSTRIALIZADO E INDUSTRIALIZADO

Os estudos se iniciaram com quatorze isolados de *Trichoderma stromaticum* (Ts), sendo sete do grupo genético I e sete do grupo II (DE SOUZA et al., 2006), os quais foram estudados quanto ao potencial de biocontrole de *Moniliophthora perniciosa* em ensaios de campo (LOGUERCIO et al, 2009a), foram utilizados para estudos comparativos quanto às suas respostas de esporulação a diferentes 'estímulos físicos' em cultura *in vitro*. Como referência, foi utilizado o isolado ALF-64 (grupo II), o qual é utilizado para a fabricação do produto 'Tricovab', produzido em larga escala e distribuído aos produtores de cacau pela CEPLAC desde 1999 (G.R. NIELLA, comunic. pess.).

Para os experimentos de comparação entre os isolados de Ts desta pesquisa, era necessária a produção de esporos (conídios), de uma mesma geração, em quantidades suficientes para servirem de inóculo padronizado para os experimentos em desenho fatorial (ver item 3.5). Os isolados descritos acima foram colocados para crescimento, em meio de cultura BDA não industrializado (Figura 3), no qual se esperava suficiente desempenho no crescimento e esporulação, baseado em informações preliminares de pesquisadores da CEPLAC. (G.R. NIELLA, comunic. pess.)

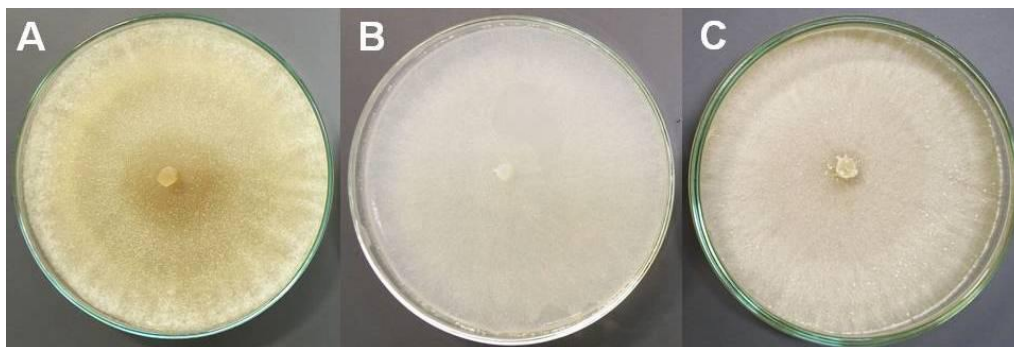


Figura 3: Morfologia de colônias de isolados de *T. stromaticum* (*Ts*) cultivados por 10 dias a 30°C em meio BDA não-industrializado. Isolados ALF-672 (A), ALF-643 (B) e ALF-15 (C).

No entanto, inconsistências no crescimento e grandes variações morfológicas e na quantidade de crescimento micelial, no mesmo tempo de crescimento, pôde ser observada entre os isolados cultivados. Além disso, em um mesmo isolado, não foi possível determinar padrões de crescimento entre as repetições testadas, sendo que alguns deles apresentaram baixa quantidade ou nenhuma esporulação. Não foi possível observar repetibilidade entre os mesmos quando testados em mesmas condições, mas em momentos diferentes (não mostrado).

Portanto, com o objetivo de testar se, de fato, havia variação de comportamento em cultura dos isolados de *Ts* devido a possíveis inconsistências de composição de meio BDA não-industrializado, comparou-se dois tipos de BDA: não-industrializado e industrializado (ver seção 3.1).

Tomando como base resultados da literatura (STEYART et al., 2010b,c), a variação do pH do meio de cultura BDA pode influenciar a conidiação (esporulação) de *Trichoderma* spp. Assim, foram testados dois pHs distintos em ambos os meios BDA (não-industrializado e industrializado), com objetivo de verificar o crescimento dos isolados e os níveis de esporulação. Considerando que foram mantidas as mesmas condições gerais de temperatura e luminosidade para as culturas, os resultados mostraram padrões de crescimento variados entre tipos de meio e entre pHs, tanto entre repetições de um mesmo isolado, quanto entre isolados (Figura 4).

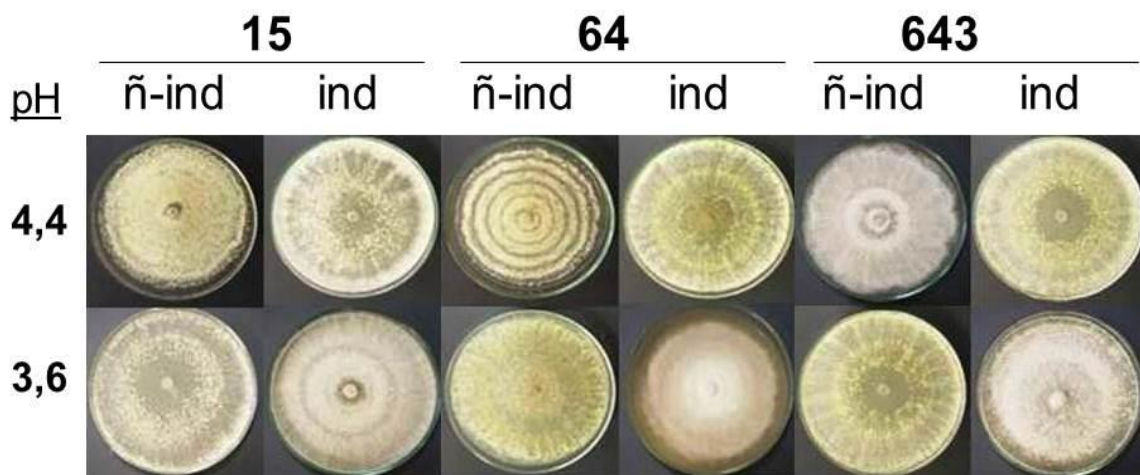


Figura 4: Crescimento e morfologia comparados entre os isolados ALF -15, -64 e -643, cultivados por 10 dias em meio BDA não-industrializado ('ñ-ind') e industrializado ('ind'), com pHs ajustados para 3,6 e 4,4.

Entretanto, essa variação ocorreu de forma bem menos intensa entre as repetições de isolados cultivados em BDA industrializado (dados não mostrados). Foram observadas, com pouca frequência, formação de anéis de esporulação entre isolados e repetições, mas as mesmas não se mostraram reprodutíveis, isto é, foram inconsistentes. Neste experimento, observou-se o crescimento radial das colônias e esporulação circular em maior proporção, porém sem clara formação dos esperados anéis concêntricos de conídios. Nas placas em que esporulação foi constatada, não foi possível identificar padrões entre os meios de cultura e os pHs testados. Em meio BDA industrializado, as diferenças morfológicas entre as repetições de um mesmo isolado ocorreram em menor magnitude(não mostrado).

4.2. CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DE *Ts* EM BDA COM SUPLEMENTO DE MALTE

A necessidade de se obter esporos dos 14 isolados propostos (ver seção 4.1.1) em quantidades suficientes para formação de estoques para o estudo fez com que a busca por novas formas de estimular a esporulação fossem testadas. Assim, a partir de informações complementares sobre esporulação *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp (STEYAERT,2007), foi testada a suplementação de meio BDA com extrato de malte.

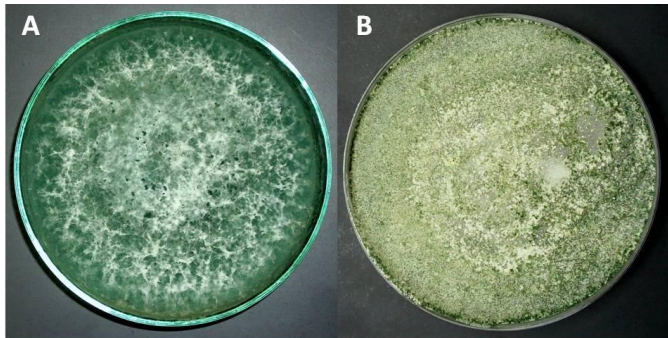


Figura 5: Crescimento e esporulação de isolados de *Ts* em meio BDA (industrializado) + extrato de malte. A) ALF-1092 e B) ALF-678, com 10 dias de crescimento.

Os isolados inoculados em meio de cultura BDA industrializado com suplementação apresentaram, em sua maioria, um crescimento superior, sendo que em alguns deles obteve-se uma visível produção de esporos, com a coloração verde e com quantidades suficientes para formação do estoque necessário (Figura 5). Foi recorrente nas placas com grande quantidade de esporulação que, após crescimento e presença de esporos verdes, o micélio tendeu a continuar o crescimento, atingindo as bordas das placas. Neste ponto, observou-se inversão no sentido de crescimento, com este ocorrendo da periferia para o centro das placas e causando sobreposição aos esporos maduros.

4.3. ESTOQUE DE ESPOROS OBTIDOS DOS ISOLADOS DE *Ts*

Após a realização de inúmeros experimentos para crescimento e esporulação dos 14 isolados de *Ts*, a partir do material armazenado no sistema 'Castelani', a observação geral foi de que os mesmos apresentaram diferenças no crescimento micelial, bem como dificuldades de esporulação. Foi possível obter esporos, com quantidades suficientes para os experimentos posteriores deste estudo, para oito dos isolados testados, sendo quatro para cada grupo genético (Tabela 1). Dentre esses que esporularam, destaca-se o isolado ALF-64 utilizado para produção do 'Tricovab' que apresentou crescimento e esporulação

suficientes para estocagem, tendo sido utilizado como controle nos próximos experimentos.

Tabela 1: Esporulação obtida para 14 isolados de *Ts* dos grupos genéticos I e II.

Isolados c/ esporulação		Isolados s/ esporulação	
G-I	G-II	G-I	G-II
ALF-15	ALF-64 (TVC)	ALF-639	ALF-56
ALF-541	ALF-74	ALF-643	ALF-323
ALF-678	ALF-113	ALF-672	ALF-658
ALF-1092	ALF-408		

4.4. CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DE ISOLADOS DE *TS* EM REGIME DE 12 H LUZ / 12 H ESCURO

A partir dos isolados de *Ts* que esporularam para comporem os estoques, definiu-se dois isolados de cada grupo genético para os experimentos fatoriais, sendo eles o ALF-15, -1092 do grupo I e o ALF-64 e -113 do grupo II.

De acordo com os relatos da literatura (por ex. BETINA, 1978), espécies/isolados de *Trichoderma* cultivados a partir de esporos em regime de fotoperíodo de 12 h / 12 h tendem a formar anéis concêntricos de conidiação, como resultado de um efeito de resposta generalizada deste gênero (HORWITZ, 1990; STEYAERT, 2007). Assim, buscou-se verificar se esse efeito também ocorria em *Ts* sob mesmas condições de fotoperíodo (Figura 6).

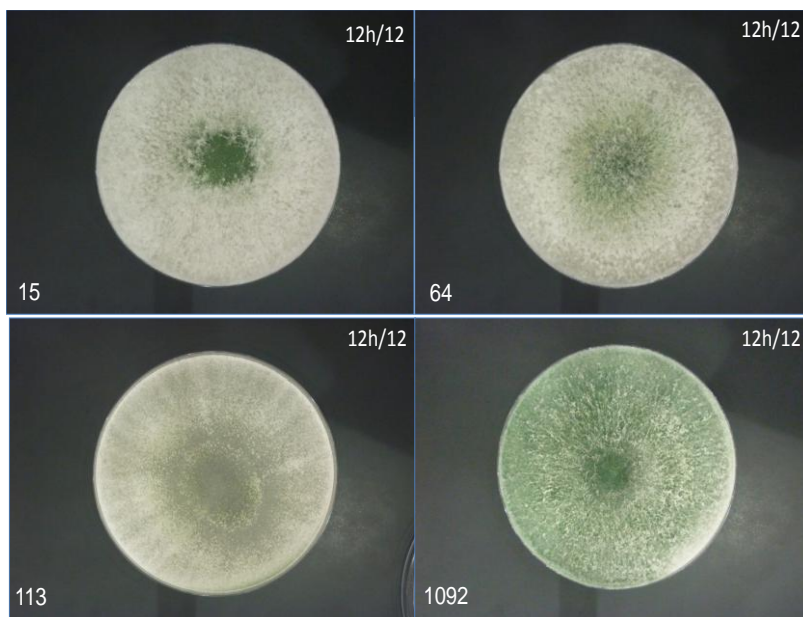


Figura 6: Padrões de crescimento e esporulação específicos para quatro isolados de *T. stromaticum* (ALF-15, -64, -113 e -1092), aplicados na forma de esporos em meio BDA industrializado, com fotoperíodo de 12 h luz / 12 h de escuro, e após 7 dias de incubação.

Os resultados para os isolados sob estudo revelaram que, além de não se ter observado os anéis concêntricos de conidiação, os padrões de crescimento e esporulação foram diferentes entre eles (Figura 6). Enquanto alguns cresceram com morfologia radial de colônia (-113, grupo II), outros apresentaram sobreposição de micélio (-15, grupo I; -64, grupo II). Os procedimentos de inoculação nos meios de cultura a partir de suspensão de esporos ao invés de discos de micélio não evitou que os padrões de esporulação fossem específicos para cada isolado, tanto na quantidade, quanto no aspecto morfológico das colônias. Em um mesmo isolado, observou-se padrões de esporulação distintos entre si (Figuras 4 e 6) quando houve alteração na forma de inoculação nos meios de cultura (disco de micélio x esporos no centro da placa). Porém, novamente, não se observou a formação de anéis concêntricos de esporulação nesses isolados, após crescimento *in vitro* em fotoperíodo de 12 h luz / 12 h escuro.

4.5. EFEITOS INTEGRADOS DE FATORES ABIÓTICOS EM *Ts*

4.5.1. Análise quantitativa

Informações recentes da literatura sugerem fortemente a existência de possíveis interações entre importantes fatores abióticos que definem condições essenciais de esporulação (STEYAERT et al., 2010a,b,c). Com o intuito de verificar se é possível reconhecer padrões quantitativos de produção de conídios entre isolados (variável genética) a partir da ação combinada destes fatores abióticos, testou-se os efeitos integrados resultantes dessa ação a partir de modelos lineares generalizados (Figura 7).

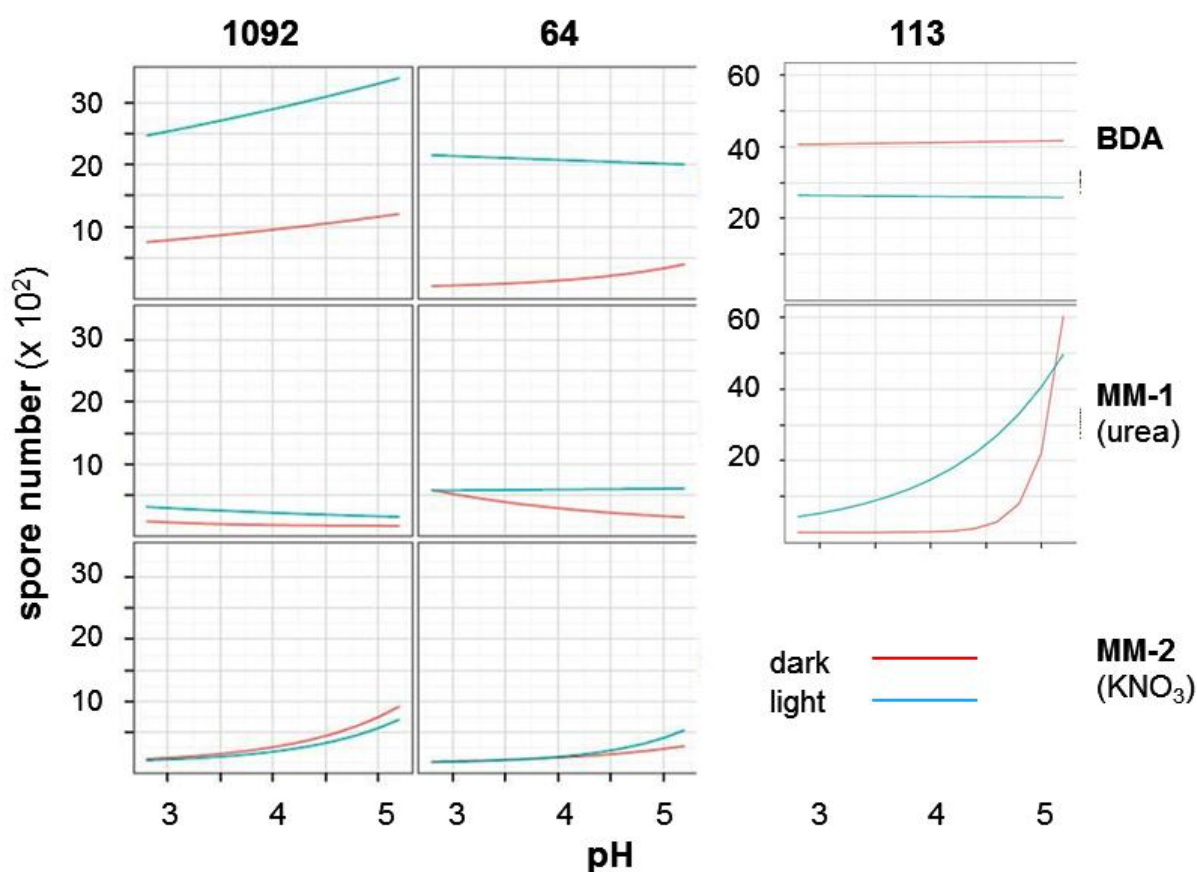


Figura 7: Análise integrada dos efeitos de fatores abióticos no quantitativo de esporulação de isolados de *Trichoderma stromaticum* em experimentos fatoriais balanceados com 3 isolados x 3 meios x 4 pHs x 2 condições de luz.

A análise dos efeitos resultantes da interação dos fatores abióticos testados indicou a existência de respostas diversas em diferentes isolados. Primeiramente, ALF-15 apresentou pouco crescimento e baixíssima produção de esporos no experimento, com apenas algumas placas mostrando alguns sinais de esporulação. Deste modo, os resultados para este isolado foram considerados erráticos e inconclusivos, sem condições de participar das análises integradas mostradas na Figura 7, bem como da definição dos intervalos de confiança (ver a seguir). Os padrões e magnitude geral de esporulação entre as combinações de meios, pHs e luz foi bastante aproximada entre os isolados ALF-64 (grupo II) e ALF-1092 (grupo I), mas substancialmente diferente para o ALF-113 (grupo II) (Figura 7).

A presença de um pulso de luz por 15-20 min no meio do período de crescimento demonstrou, para a maioria das combinações, ser fator importante para produção de esporos, exceto para o isolado 113: para este, apesar de ter ocorrido uma esporulação maior em relação aos outros dois isolados, houve inversão do efeito do fator luz em meio BDA (maior esporulação na ausência de luz), e não houve esporulação em meio mínimo com fonte secundária de N (MM-2, Figura 7).

O efeito dos diferentes pHs na faixa ácida também apresentou grande variação na quantidade de esporos produzidos ao se combinarem com os demais fatores, demonstrando padrões de esporulação isolado-específico. Observou-se as três possibilidades de efeito (aumento, diminuição e sem efeito) que variaram entre meios, isolados e tratamentos de luz. O efeito mais marcante da elevação de pH foi observado para o isolado ALF-113 em meio mínimo com fonte primária de N (MM-1): a resposta de esporulação na ausência da luz foi inexistente até pH 4,4, com um salto abrupto nos níveis de esporulação em pH 5,2 (inclusive ultrapassando os valores de esporulação na presença de luz); para a presença de luz, o aumento de esporulação foi gradual.

Quanto ao efeito dos componentes nutricionais e fontes de N, meio BDA no geral apresentou melhor desempenho no número de esporos em todos os isolados quando comparado com os tratamentos de meio mínimo; no entanto, o isolado 113 apresentou pico de produção em meio mínimo com fonte primária de N em pH 5,2 que foi acima de todos os outros obtidos com BDA (Figura 7). De

uma maneira geral, o meio mínimo com fonte secundária de N (MM-2) apresentou baixo crescimento e número de esporos em dois isolados (um de cada grupo genético), e quantidades mínimas (impossibilitando análise estatística) para o isolado 113.

A análise quantitativa integrando as quatro variáveis independentes (fatores de variação) por meio de modelos lineares generalizados (ver Métodos) produziu as curvas apresentadas na Figura 7. As respectivas equações dos modelos lineares referentes a cada combinação aparecem na Tabela 2. Importante salientar que tais modelos basearam-se no fato de que três das quatro variáveis são categóricas, restando somente a variável 'pH' como numérica, com escala própria e específica de valores.

Tabela 2: Equações dos respectivos modelos lineares para cada combinação de tratamentos em função dos valores de pH.

Isolado	Meio	Luz	Equação
64	BDA	+	$7.757 - 0.0299 \times \text{pH}$
		-	$6.068 + 0.1972 \times \text{pH}$
	MMN1	+	$6.287 + 0.0229 \times \text{pH}$
		-	$8.00 - 0.5852 \times \text{pH}$
	MMN2	+	$-0.693 + 1.3419 \times \text{pH}$
		-	$0.920 + 0.9074 \times \text{pH}$
1092	BDA	+	$7.437 + 0.1329 \times \text{pH}$
		-	$6.068 + 0.1972 \times \text{pH}$
	MMN1	+	$7.774 - 1.2185 \times \text{pH}$
	MMN1	-	$7.774 - 1.2185 \times \text{pH}$
	MMN2	+	$0.8653 + 1.0956 \times \text{pH}$
	MMN2	-	$1.3887 + 1.0452 \times \text{pH}$
113	BDA	+	$7.907 - 0.0096 \times \text{pH}$
	BDA	-	$8.2785 + 0.01098 \times \text{pH}$
	MMN1	+	$3.2332 + 1.0148 \times \text{pH}$
	MMN1	-	$-17.5599 + 5.0511 \times \text{pH}$

A partir dos resultados anteriores que indicaram um efeito do pH mais marcante somente para o tratamento combinado 'ALF-113' + 'MM1' (Figura 7), buscou-se avaliar estatisticamente os efeitos individuais e interações entre as variáveis 'isolados', 'meios' e 'luz'. Neste caso, comparou-se estatisticamente a

esporulação entre os isolados, considerando o efeito médio dos valores de pH (Figura 8).

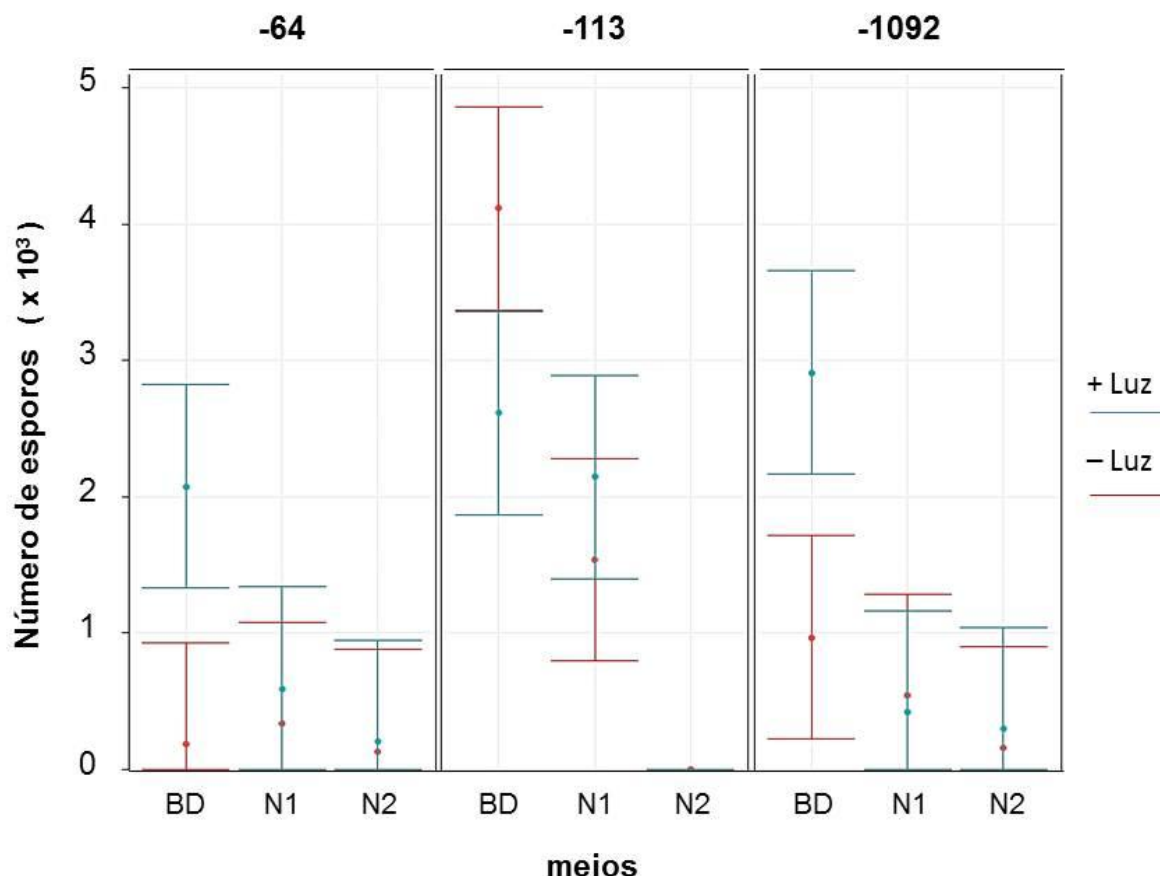


Figura 8: Intervalos de confiança ($P = 0,05$) para esporulação de três isolados de *T. stromaticum* sob efeito de meios de cultura e tratamentos de luz. Os isolados são mostrados na porção superior do gráfico. 'BD' = BDA; 'N1' = MM-1 (uréia); 'N2' = MM-2 (KNO_3).

Os resultados confirmaram estatisticamente a superioridade dos efeitos do BDA + luz na esporulação para os isolados -64 e -1092, em relação aos respectivos efeitos dos meios mínimos com ambas fontes de N; além disso, também foi confirmada a superioridade de esporulação para o isolado -113 em meio BDA com ausência de luz, não somente em relação ao BDA e MM-1 na presença de luz intra-isolado, mas também em relação aos demais tratamentos e isolados, configurando-se no maior quantitativo de esporulação do experimento (Figura 8). Dentre os tratamentos com meios mínimos, no geral, não houve diferença estatística entre as esporulações dos três isolados testados, exceto

para MM-1 do isolado -113, cuja esporulação foi significativamente maior que ambos os MM para os demais isolados (Figura 8).

Os resultados destas análises estatísticas demonstraram que, apesar das evidentes interações já identificadas entre os fatores testados, os efeitos mais marcantes no fenômeno de esporulação, ao menos para os isolados sob estudo, foram principalmente causados pelos tipos e quantidades de fontes de C (meio BDA em relação aos meios mínimos), sendo o efeito da interação com a luz de caráter isolado-específico.

4.5.2. Análise qualitativa

Considerando que os efeitos integrados dos fatores abióticos e genéticos também podem ser observados e avaliados em seus aspectos qualitativos (padrões de crescimento e morfologia de colônias), os fenótipos de esporulação *in vitro* para os três isolados foram observados. Importante salientar que estes resultados apresentaram reprodutibilidade de fenótipos entre suas repetições, e lembrar que foram previamente avaliados de modo quantitativo (Figuras 7 e 8). Na Figura 9 são mostrados os exemplos de variação e contrastes visualmente detectáveis entre os tratamentos e suas interações para os fenótipos de morfologia *in vitro* das colônias.

Foi observado que a presença de um pulso de 15 min de luz branca após 48 h de cultura possibilitou a formação de um disco de esporulação (com esporos na periferia mais maduros em relação aos do centro) em praticamente todos os tratamentos com meio BDA e todos os valores de pH para os isolados ALF-64 e -113 (grupo II), com este último mostrando uma maior intensidade de verde na faixa periférica de esporos; porém, o efeito do fator isolado ficou evidente no escuro, onde o -113 produziu muitos esporos distribuídos por toda a área das colônias, ao contrário do -64 (Figura 9). No geral, estes resultados confirmaram qualitativamente os resultados quantitativos (número de esporos por placa) para estes tratamentos (Figuras 7 e 8), bem como as tendências de interações observadas. Além disso, o efeito da interação do pH com a luz em meio BDA ficou evidente, morfologicamente, para o isolado -1092 (grupo I), em que se observou

elevada variação quanto à presença-ausência de disco definido de conídios, bem como quanto aos padrões de distribuição de conídios pelas colônias (Figura 9).

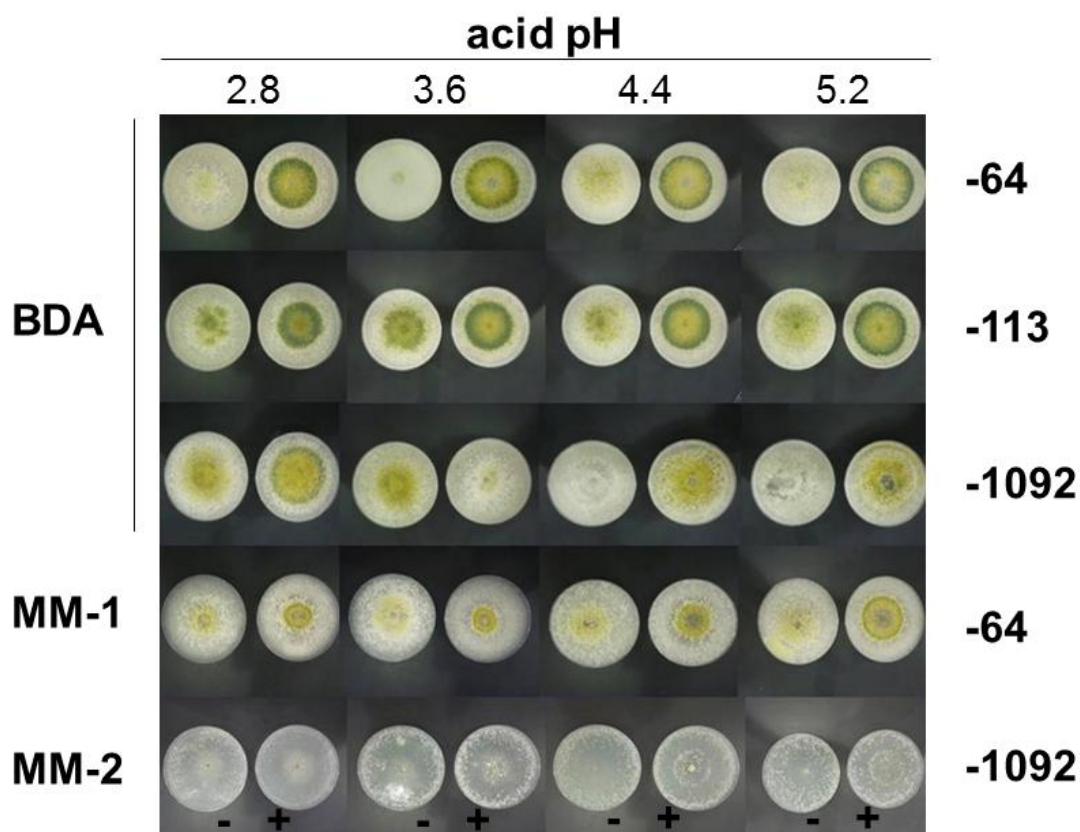


Figura 9: Morfologia comparada de colônias pela ação integrada dos fatores abióticos nos isolados de *Ts* ALF-64, -113 e -1092, registrados após 5 dias de cultivo, ao final dos experimentos fatoriais. A ausência e presença de estímulo luminoso (15 min luz branca após 48h cultivo) estão indicadas pelos sinais '-' e '+', respectivamente.

Considerando os isolados -64 (grupo II) e -1092 (grupo I), as respostas observadas de esporulação, em termos de padrões de morfologia de colônias, foram distintas para os meios mínimos em relação ao BDA, novamente evidenciando efeito da interação entre os fatores (Figura- 9). Por exemplo, para MM-1, foram observados discos de conídios similares aos obtidos em BDA para um mesmo isolado (-64), porém de diâmetro sistematicamente menor; o maior deles foi visto em pH 5,2 mas ainda menor e menos denso que qualquer disco observado para os tratamentos com BDA. Para MM-2, observou-se discretos anéis de esporulação centrais para os pHs 4,4 e 5,2 sob efeito da luz, mas ambos os tratamentos com e sem luz apresentaram esporos esparsamente distribuídos

pela colônia, mais concentrados em uma faixa periférica, próxima a borda da colônia (Figura 9).

Importante observar que ambos os MM testados apresentaram uma maior quantidade de esporos na coloração branca, indicando conídios ainda em estágios iniciais de desenvolvimento (imatuross). Para o meio MM-2 (fonte secundária de nitrogênio, KNO_3), além de se ter observado exclusivamente conídios brancos, também houve crescimento em menor proporção, com micélios rasteiros e menos densos.

No geral, foi possível observar que um maior efeito da variação de pH por isolado foi mais evidente para todos os tratamentos no escuro, o que foi verificado por uma grande variedade de colorações de conídios, com as tonalidades de amarelo e verde aparecendo difusas entre si (Figura 9). Ao contrário, quando ocorreu tratamento de luz, houve tendência nítida de padronização da distribuição de conídios, havendo esporos amarelados ao centro e verdes no entorno dos discos de conídios.

4.7. ANÁLISE QUALITATIVA DOS EFEITOS DE INJÚRIAS MICELIAIS NA ESPORULAÇÃO DE *Ts*

Considerando a possibilidade de indução de esporulação em *Trichoderma* spp como resultado de quebras ou cortes de hifas no micélio (injúria mecânica) (STEYAERT et al, 2010b,c), procurou-se testar o efeito deste fator nos padrões morfológicos e quantitativos de resposta de esporulação dos isolados de *Ts*. Além disso, testou-se a interação da injúria com os demais fatores em fotoperíodos de 12 h luz / 12 h escuro, considerando serem estas as condições de luminosidade mais usuais de serem encontrados em condições naturais. Os resultados evidenciaram, em termos de morfologia de colônias, variação de resposta de esporulação para os quatro isolados submetidos às diversas combinações dos fatores que incluíram injúria mecânica (não mostrado); na Figura 10 são mostrados exemplos de padrões distintos de resposta de esporulação relacionados aos efeitos interativos dos cortes miceliais com os demais fatores abióticos sob estudo (pHs e meios de cultura), obtidos para um único isolado

(ALF-1092). Este foi escolhido por ter apresentado maior crescimento micelial e esporulação na maioria dos tratamentos testados (dados não mostrados).

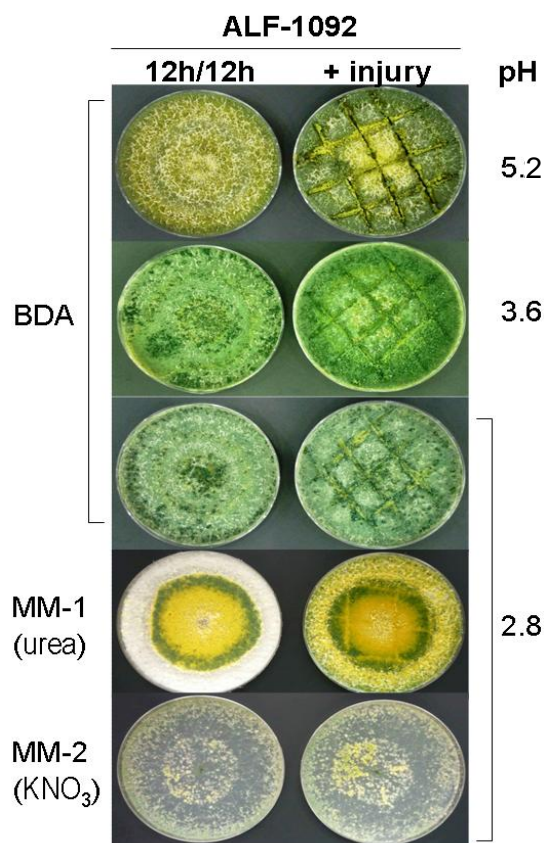


Figura 10: Efeito interativo da injúria micelial nos padrões de esporulação *in vitro* do isolado ALF-1092, submetido a diferentes tratamentos de meio de cultura e pH. As culturas ocorreram a 28 °C por 7 dias em regime de fotoperíodo de 12h luz / 12h escuro (para todas os tratamentos), em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. As injúrias no micélio foram feitas com bisturi estéril, após 72 horas de incubação.

Em meio rico (BDA), o isolado ALF-1092 apresentou grandes quantidades de esporulação, com esporos amarelos e verdes e distribuídos por toda a placa. Além disso, observou-se nítido sobrecrescimento de micélios após estes terem atingido as bordas das placas. Para o MM-1, a morfologia observada para o tratamento com 12 h luz / escuro assemelhou-se àquela vista para os tratamentos de pulsos de luz (Figura 9), isto é, com formação de um disco central de esporulação com os esporos mais maduros (verdes) localizados na periferia deste

disco; para o MM-2, houve menor crescimento micelial e menor produção de conídios, sendo que se formou um anel de esporulação numa região semelhante ao contorno do disco de conídios citado para o tratamento MM-1 (Figura 10).

O efeito interativo do pH com os demais fatores abióticos (regime de luz, injúria e tipo de meio) foi observado pela diferença de coloração predominante na esporulação apresentada pelas colônias num mesmo meio (BDA), e por diferentes padrões de esporulação entre meios, num mesmo pH (Figura 10). A interação das injúrias com os demais fatores foi observada pela presença de 3 padrões de resposta, diretamente associados ao tipo de meio: (i) estímulo de produção de conídios diretamente sobre os cortes, com aparente aumento da esporulação no restante da colônia e com efeito de pH não detectável (em BDA); (ii) estímulo de esporulação para toda a área da colônia, sem aumento aparente sobre os cortes (em MM1); e (iii) sem resposta de esporulação à injúria (em MM2).

4.8. EFEITOS DAS INJÚRIAS MICELIAIS VS TAMANHO DA PLACA NA CONIDIAÇÃO DE *Ts*

4.8.1 Análise qualitativa

Os resultados do experimento anterior com as injúrias miceliais, nos quais observou-se sinais de estresse fisiológico na colônia (sobrecrescimento micelial) (GRESÍK, 1991), indicaram a necessidade de verificar se parte daquele efeito observado estaria sofrendo interferência da limitação de nutrientes durante o cultivo (depleção nutricional do meio) e, ou da limitação de espaço físico (placas pequenas demais para o volume de crescimento micelial). Assim, considerando fornecer distintos espaços de cultivo e volumes de meio, testou-se os efeitos do diâmetro (\emptyset) das placas de Petri sobre os padrões morfológicos de esporulação dos isolados; além disso, testou-se os tratamentos de luz (pulso de luz branca de 15 min após 2,5 dias) e, ou injúria de formas isolada e combinada, em comparação com cultivo no escuro. Estes tratamentos foram realizados em condições fixas de meio (BDA) e de pH (5,2).

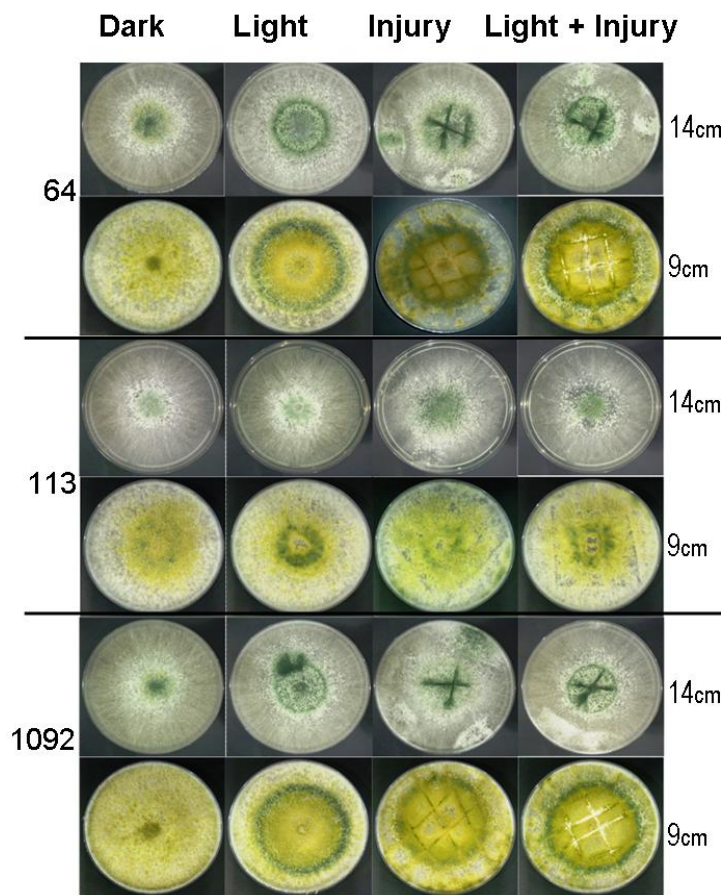


Figura 11: Isolados incubados em meio BDA, pH 5,2, em diferentes combinações de tratamentos e dois tamanhos de placas de Petri.

Alguns aspectos importantes foram observados nos fenótipos das colônias (Figura 11). Primeiro, apesar de todos os tratamentos terem sido realizados num mesmo tempo de cultivo (5 dias), houve uma evidente maior abundância de esporulação nas placas de menor tamanho (9 cm de Ø), com os esporos apresentando estádios de maturação variados (amarelos e verdes). Segundo, quando discos de esporulação foram formados nos tratamentos com luz dos isolados ALF-64 (grupo II) e -1092 (grupo I), apesar de pertencerem a grupos genéticos distintos, seus aspectos foram muito semelhantes em ambos os diâmetros de placas. Terceiro, o isolado -113 aparentou não responder aos estímulos de luz e, ou injúria em placas grandes, mas somente à luz nas placas pequenas. Finalmente, nas condições de meio, pH e isolados testadas, a formação de esporos sobre as linhas de corte das hifas (injúrias) ocorreu

independentemente do tamanho das placas e da presença ou não da luz (Figura 11).

4.8.2 Análise quantitativa

A comparação entre os tratamentos neste experimento foi também realizada em termos quantitativos, ou seja, computando-se o número de esporos produzidos por placa. Realizou-se análise de variância para os fatores de variação ‘tratamentos’ (luz e injúria), ‘isolados’ e ‘diâmetro’ de placas, observando-se os efeitos individuais e as interações (Tabela 3). Para melhor ajuste do teste estatístico, a variável de resposta foi transformada em log (Y).

Tabela 3: Análise de Variância (ANOVA) para contagem de esporos no experimento de tratamentos de luz, injúria e tamanhos de placas, em meio BDA, pH 5,2.

fontes de variação	GL	quadrado médio
luz/injúria	3	6,89 *
isolado	2	13,15 *
diâmetro placa	1	28,11 *
luz/injúria x isolado	6	1,32 *
luz/injúria x diâmetro	3	0,65
isolado x diâmetro	2	10,89 *
luz/injúria x isolado x diâmetro	6	0,35
Resíduo	48	0,25

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste *F*.

Os resultados da ANOVA indicaram efeito significativo para cada fator de variação individualmente, bem como para as interações duplas que envolveram o fator ‘isolado’, isto é, deste com diâmetros de placas e com os tratamentos de luz+injúria. Não detectou-se efeito significativo para a interação tripla entre os fatores de variação (Tabela 3).

Com o intuito de verificar as melhores combinações de tratamento em termos de números de esporos produzidos (análise quantitativa), foi realizado o teste de Scott-Knott para as médias obtidas (AYRES et al.,2007).

Tabela 4: Teste de médias por Scott-Knott para as combinações entre isolados e diâmetros da placa quanto ao número de esporos em meio BDA, pH 5,2.

tamanho placas	Isolado de <i>Ts</i>		
	64	113	1092
Grande (14 cm)	6,5 aA	6,5 aA	8,1 aB
Pequena (9 cm)	8,2 bA	8,2 bA	8,5 aA

Letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. Valores transformados em log(Y).

As análises estatísticas dos resultados de esporulação indicaram haver diferença significativa em favor do isolado -1092 em relação aos demais, mas somente para placas grandes. Além disso, confirmando o aspecto morfológico das colônias (Figura 11), os tratamentos em placas pequenas esporularam mais do que em placas grandes, exceto para o isolado -1092 (Tabela 4).

Considerando as respostas isolado-específicas em relação aos tratamentos de luz e injúria (Tabela 4), os resultados da análise estatística revelaram que, injúria combinada com luz no isolado -1092 produziu uma significativa maior quantidade de esporos que os demais tratamentos para este isolado. Para os tratamentos de luz e injúria individualmente, o isolado -113 foi significativamente distinto dos demais por ter produzido menos esporos, enquanto os demais isolados não diferiram entre si; porém, injúria isoladamente foi o tratamento de maior esporulação dentre os demais para este isolado. Importante ressaltar que todos os tratamentos de luz e, ou injúria para todos os isolados foram significativamente maiores do que as respectivas produções de conídios no escuro (Tabela 5). Confirmando resultados preliminares (não mostrados), o

isolado -1092 produziu significativamente mais esporos que os demais no escuro e o limite inferior de esporos produzidos no experimento foi definido pelo isolado -113 no escuro.

Tabela 5: Teste de Scott-Knott para os efeitos dos tratamentos e dos isolados quanto ao número de esporos, em meio BDA, pH 5,2.

Tratamentos	Isolados de <i>Ts</i>		
	64	113	1092
Escuro	6,28 aA	6,16 aA	7,48 aB
Injúria + Luz	8,41 bB	6,88 bA	9,00 cC
Injúria	8,39 bB	7,27 cA	8,65 bB
Luz	8,35 bB	6,83 bA	8,30 bB

Letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. Valores transformados em $\log(Y)$. O número de esporos por tratamento computou o total de ambas as placas, grande e pequena, por repetição do experimento (ver Métodos).

4.9. EFEITOS DA QUANTIDADE (NÚMERO) DE INJÚRIAS MICELIAIS EM *Ts*

4.9.1 Análise quantitativa

Com base nos resultados obtidos no experimento anterior com placas grandes (14 cm de Ø) (Figura 11), levantou-se a hipótese de que o número de cortes nas hifas em crescimento da colônia do fungo poderia correlacionar-se diretamente com a produção de esporos; ou seja, mais cortes poderiam gerar mais esporos. Assim, realizou-se experimento nas mesmas condições gerais anteriores, porém com intensidade crescente de injúrias no micélio, feitas com mesmos números de cortes paralelos e perpendiculares. Os tratamentos de número de cortes testados foram 2 x 2, 4 x 4, 6 x 6, e 8 x 8. Na Figura 12 ilustra-se o aspecto morfológico geral da esporulação nesses tratamentos.

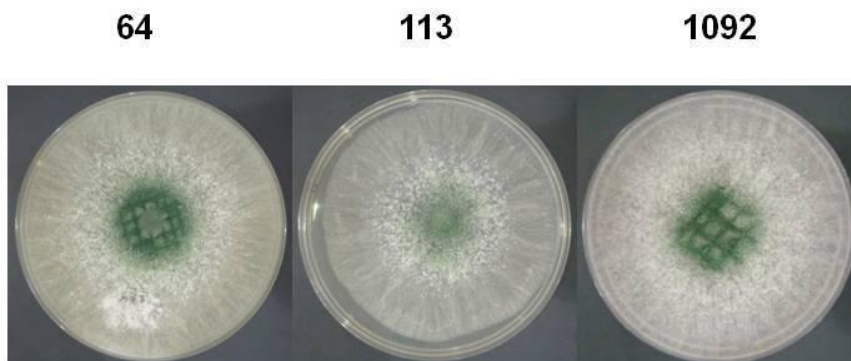


Figura 12: Aspecto morfológico da esporulação de *Ts* em resposta a múltiplos cortes de hifas no micélio (injúria mecânica). O número de cortes perpendiculares foi de 6 x 6 para os isolados -64 e -113, e 4 x 4 para o -1092.

Os resultados confirmaram o experimento anterior (Figura 11) no sentido de que houve a indução de esporulação sobre as linhas dos cortes para os mesmos isolados -64 e -1092, bem como não houve resposta ao estímulo de injúria para o isolado -113, em nenhuma das intensidades de injúria testadas (Figura 12).

4.9.2. Análise quantitativa

Do ponto de vista quantitativo (número de esporos), realizou-se análise de variância (ANOVA) para os efeitos individuais e da interação entre os fatores 'isolados' e 'intensidade de injúria', sendo que a variável de resposta foi transformada em $\log(Y)$. Os resultados da ANOVA indicaram efeito significativo ($P < 0,05$) no número de esporos produzidos apenas para o fator 'isolado'. Este resultado demonstra que, quantitativamente, não houve resposta estatística diferente entre as diversas intensidades de injúria aplicada dentro de cada isolado. Da mesma forma, não foi significativo o efeito da interação entre os dois fatores (dados não mostrados).

A comparação entre as médias de esporulação para os isolados (com dados transformados para variável de resposta) foi realizada pelo teste de Scott-Knott, e aparece na Tabela 6. Os resultados indicaram que aqueles isolados que responderam ao estímulo de injúria (independentemente da intensidade da

mesma) esporularam significativamente mais que o isolado -113 (que não respondeu às injúrias), porém não diferiram entre si.

Tabela 6: Comparação de médias para o efeito de isolados de *Ts*.

Isolado	Número de esporos [transformado log(Y)]
-64	8,21 a
-113	6,32 b
-1092	7,91 a

Letras iguais não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

5. DISCUSSÃO

A formação de estoques de esporos dos isolados de *Trichoderma stromaticum* (Ts) deste estudo foi necessária para assegurar que os padrões de crescimento basais fossem semelhantes do ponto de vista fisiológico. Conídios de diferentes isolados de uma mesma espécie tendem a possuir menos diferenças entre si do que fragmentos de micélio desses isolados. Deste modo, comparações que se deseje fazer entre os isolados durante as diferentes fases das culturas, ou como resposta aos tratamentos sob teste, podem ocorrer a partir de uma fonte de inóculo *in vitro* com menor variação entre isolados (esporos), controlando melhor um fator importante para diminuir o erro experimental. Os resultados apresentados (Figuras 3 e 4) sugerem que há, de fato, variações e inconsistências nas composições dos meios não-industrializados em relação aos industrializados, provavelmente causadas pelas variações entre lotes de batatas usadas para a decocção (diferenças nas origens, idades, tratos culturais, fertilidade do solo, composição final de nutrientes, etc.). Isto também pode ser confirmado, pela constatação de que as variações entre repetições de um mesmo isolado, foram bem maiores do que quando cultivados em meio industrializado com composições nutricionais mais uniformes, entre lotes de meios.

Ainda assim houve alguma variação entre repetições de um mesmo isolado para meio industrializado. Uma possível explicação adicional para tamanha variação de comportamento de um mesmo isolado em condições de meio aparentemente pouco distintas, seria o fato dos inóculos para estes experimentos terem sido 'discos' de micélio ao invés de 'esporos'. Neste caso, sabe-se que zonas distintas da colônia de fungos apresentam estádios fisiológicos distintos (STEYAERT, 2007), os quais tendem a se refletir no início de formação de uma

nova colônia a partir dessas hifas e, posteriormente, no fenótipo da colônia madura. As variações nas colônias também pareceram ser decorrentes de efeitos de diferentes pHs no meio de cultura (Figura 4), confirmando resultados obtidos com outras espécies de *Trichoderma* (STEYAERT et al, 2010b).

Assim, analisando-se o conjunto desses resultados, é possível sugerir que experimentos comparativos entre isolados de *Ts*, para que sejam válidos cientificamente, precisam dispor de condições bastante uniformes de cultivo intra-tratamentos (ou seja, entre as repetições de um mesmo tratamento). Assim, os padrões de resposta específicos aos tratamentos e, ou aos isolados podem ser identificados em meio às inúmeras variações experimentais e aleatórias possíveis.

A baixa esporulação geral encontrada entre esses tratamentos sugere que as condições gerais de cultivo não estavam sendo favoráveis. Conforme indicações prévias (J.M. STEYAERT, comunic. pess.), possíveis formas de se superar experimentalmente esse entrave de obtenção de esporos para os experimentos subsequentes poderiam ser (i) suplementação nutricional com fontes distintas de carboidratos e de proteínas/aminoácidos (mais C e N de diferentes fontes), e, ou (ii) diferentes formas de estímulos luminosos.

Interessantemente, a ocorrência de esporulação em meio BDA (sem suplemento) para alguns isolados (Figuras 4 e 6), os quais não haviam produzido esporos nesse meio antes (Figura 3), sugere que o tipo de inóculo (disco de micélio vs esporos) pode, de fato, ter contribuído para essa diferença.

Os resultados de ausência de anéis de esporulação após crescimento em fotoperíodo 12 h luz / 12 h escuro, contraria o esperado para a maioria das espécies de *Trichoderma* (STEYAERT et al., 2010c); isto sugere ser esta uma característica espécie-específica de *Ts* que foi observada em ambos os grupos genéticos (Figura 6). Contudo, cautela deve ser exercida nessa interpretação, uma vez que o tempo de cultura e o tamanho das placas mostraram um efeito modificador do fenótipo final das colônias (ver item 4.8).

Analisou-se as variáveis genéticas (isolados) e abióticas (meio, pH, luz, e injúria micelial) de forma integrada, tanto quali- quanto quantitativamente, ao longo do estudo. Tomados em conjunto, os resultados, discutidos nos parágrafos seguintes, sugerem claramente a existência de uma interação biológica entre

esses fatores em *Ts*, de tal forma que os fenótipos observados tendem a ser isolado-específicos. Trabalhos anteriores de análise molecular de uma coleção de isolados de *Ts*, que incluiu os deste trabalho, permitiram agrupá-los em dois grandes grupos genéticos, I e II, com base em marcadores AFLP (de SOUZA et al., 2006); além disso, as diferenças individuais observadas com esses marcadores permitem considerar que os isolados deste estudo podem ser definidos como genótipos distintos. Assim sendo, os efeitos discutidos abaixo referentes ao fator 'isolados' podem ser considerados como genotípicos.

Pelos resultados obtidos para o isolado ALF-15, sugere-se que as faixas de condições testadas para os fatores sob estudo não devem ser as mais apropriadas para esporulação *in vitro*. Isto indica a necessidade de se testar outros tratamentos, como por exemplo (i) a inclusão de extrato de malte (Figura 5) ou hidrolisado de caseína (STEYAERT, 2007); (ii) valores de pH acima de 5,2; (iii) tamponamento do meio (STEYAERT et al, 2010b); (iv) maior tempo de cultivo; etc. É possível também que alguns isolados não apresentem condições apropriadas de desenvolvimento *in vitro*, independentemente das condições e substratos que se teste (isolado da classe dos não-cultiváveis *in vitro*).

Com o mesmo objetivo de caracterização (identificação) específica de isolados de *Trichoderma* spp (ex. RIDGWAY et al., 2005; LANGE et al., 2012), as curvas de modelos lineares apresentadas (Figura 7, Tabela 2) sugerem que cada isolado (genótipo) pode vir a ser identificado de forma específica (diferente dos demais) por um conjunto de equações representativas das condições de esporulação testadas.

O efeito da luz como indutor de esporulação em *Trichoderma* spp tem sido amplamente estudado (BETINA & ZAJACOVA, 1978, HORWITZ et al., 1990); nossos resultados de resposta diferenciada aos estímulos luminosos confirmam alguns estudos recentes (STEYAERT et al., 2010a,b; CASAS-FLORES et al., 2004). A esporulação induzida pela luz em espécies de *Trichoderma* é mediada por genes reguladores de percepção e resposta à luz azul, *blr-1* e *blr-2* (CASAS-FLORES et al., 2004; STEYAERT, 2007; STEYAERT et al., 2010d). Estudos prévios comprovaram que os produtos destes genes são fatores de transcrição que possuem regiões conservadas, características de envolvimento em processos de transdução de sinal (pela percepção do estado de energia da célula), em

interações proteína-proteína e na detecção de sinais do ambiente (MOGLICH et al., 2009; CASTELLANOS et al., 2010). Outros estudos sugerem que todas as células são sensíveis à luz, porém a resposta de conidiação tende a ser localizada (CASAS-FLORES et al., 2006); um único pulso de exposição à luz branca desencadeia a produção de conídios (esporos) apenas nas células que situavam-se na borda da colônia no momento do pulso, formando os reconhecidos 'anéis' de conidiação (STEYAERT, 2007). Esses dados sugerem fortemente a existência de mecanismos/funções fisiológicas independentes, porém interconectados: percepção de luz e produção de conídios (CASAS-FLORES et al., 2006). No entanto os genes que sintetizam os fatores de transcrição BLR-1 e BLR-2 são responsáveis pela regulação de mais de 40 outros genes, demonstrando sua importância crucial nos processos de crescimento e esporulação (MIKUS et al., 2009).

Estudos sugerem que o pH do ambiente contribui para crescimento e morfologia das colônias de espécies de *Trichoderma*, bem como para a esporulação; o processo é imaginado como consequência de uma acidificação intracelular (GRESÍK, 1991). A expressão do gene *Pac1* é reconhecida como crítica para a regulação da conidiação em diversas espécies de *Trichoderma* (PEÑALVA & ARST, 2004). O pH do meio externo interfere mais ou menos na regulação da conidiação a depender das condições de tamponamento do meio (STEYAERT, 2007). STEYAERT et al. (2010b) detectou em seus experimentos que ocorreu esporulação em todas as placas testadas com pH não-tamponado (faixas 2,8-5,2), enquanto que para os tamponados, não houve esporulação em pH acima de 3,6. Alterações no padrão de esporulação foram observadas, combinando-se variações de pH com exposição à luz; ao invés de anel de esporulação obtido com pH padrão, formou-se um disco na placa cultivada em pH ácido e exposição única à luz (MORENO-MATEOS, 2007).

É reconhecida a existência de uma interação entre o pH do meio e diferentes fontes e abundâncias de C e, ou N nos mecanismos fisiológicos de regulação da conidiação (STEYAERT, 2007). Tal efeito nutricional e suas interações com pH puderam ser observadas neste estudo, como por exemplo a ocorrência de esporulação em um mesmo pH na presença de extrato de malte em BDA (Figura 5) e variações de resposta em meios diferentes, dependentes de pH (Figuras 7 e

8). Estes resultados confirmaram estudos de Steyaert et al. (2010b,c), sugerindo que, de uma maneira geral, uma maior abundância de C e N como fonte primária, na faixa do ácido e em presença da luz, tende a favorecer a produção de esporos em *Ts*; porém, as respostas tendem a ser isolado-específicas (Figuras 7 – 10). Interessantemente, alguns isolados (ex. -113) podem passar a responder muito fortemente em termos de esporulação em pH acima de 5,2 em condições mais estritas de C (como meio mínimo) e N (oferecido da forma primária, i.e. na forma reduzida NH_3). Neste caso, é possível que o mecanismo de resposta de conidiação seja disparado por estresse nutricional, como relatado por Chalot & Brun (1998) para *Trichoderma* spp, vinculado a condições específicas de interação com pH (Figura 7). Outros testes com outros isolados nessas condições, e em outras condições ainda não testadas para estes isolados poderão clarear essa questão.

Ao se observar a Figura 9, nota-se a presença de anéis ou discos de esporulação mais próximo do centro das placas. Isto sugere que o estímulo luminoso foi detectado e percebido pelas hifas durante o crescimento do micélio, sendo que a borda do micélio encontrava-se na posição do anel ou circunferência do disco (dados não mostrados). No caso dos anéis, a resposta de esporulação ocorreu para as hifas novas que se encontravam na fronteira de crescimento da colônia; no caso dos discos, esta idéia é reforçada pelo fato de que os conídios mais maduros (primeiros a serem formados) localizaram-se na circunferência do disco. Tais resultados corroboram os estudos de Steyaert (2007). Ao se analisar os meios mínimos (MM), os menores discos de esporulação observados para -64 em MM-1, bem como os discretos anéis de esporulação para -1092 em MM-2, sugerem que, também para estes meios, as respostas de conidiação aos estímulos luminosos dão-se novamente na fronteira de crescimento das colônias; estas encontravam-se com os diâmetros (dos discos/anéis de esporulação) mostrados na Figura 9, no momento da aplicação do pulso de luz (dados não mostrados). Cabe ressaltar que era relativamente esperado um menor crescimento geral das colônias para os MM, especialmente para fonte secundária de N (na forma de NO_3), o que explica diâmetros menores de colônias às 48 h de cultivo.

Apesar dos resultados de morfologias de esporulação terem sido marcadamente distintos entre os meios BDA e MM com distintas fontes de N, observou-se, em todos os tratamentos, conídios brancos esparsos na região periférica das colônias (próximos às bordas das placas), externos aos discos/anéis de esporulação centrais (Figura 9), fenômeno este melhor visualizado para o isolado -1092 em MM-2. Com isto, sugere-se a possibilidade de existir duas respostas de esporulação distintas e independentes em *Ts*, mas operando simultaneamente: uma independente da luz (escuro) com distribuição esparsa de conídios pela superfície da colônia, e outra dependente da luz, mais intensa e com formação de discos de esporos em estádios mais avançados de maturação (amarelos e verdes). Interessantemente, ao se observar a Figura 10, os resultados dos tratamentos em MM-1 sugerem que os dois estímulos, luz e injúria, mantêm seus mecanismos específicos de indução da esporulação de forma independente, porém atuando simultaneamente na colônia do fungo: enquanto o efeito da luz produz esporos concentrados no disco central de esporulação, as injúrias parecem induzir uma resposta de esporulação em toda a colônia, evidenciada pelos conídios formados fora da área do disco central (Figura 10). Contudo, tomando estes resultados em conjunto (Figuras 9 e 10), deve-se considerar a possibilidade de estar ocorrendo simultaneamente estímulos por déficit nutricional (causado por crescimento excessivo da colônia no período de 7 dias para a quantidade de nutrientes disponível no meio) ou limitação de espaço físico (iniciados quando a colônia atinge as bordas das placas), os quais podem trazer elementos de confundimento para a análise. Esta possibilidade levantou a necessidade de outros experimentos para contornar esses aspectos (ver Discussão adiante). As prováveis interações entre os elementos nutricionais (fonte de C e N) e a injúria num mesmo genótipo foram marcadamente visíveis no caso apontado para MM-2 e -1092 (Figura 10); neste caso, a interação da injúria com o tipo de meio ocorreu no sentido de que, provavelmente, as condições de limitação nutricional aliadas à fonte de N secundária impediram a expressão da resposta de esporulação à injúria neste isolado. Tais resultados apontam para uma regulação de comunicação cruzada entre dois ou mais mecanismos de resposta fisiológica a estímulos ambientais distintos (CASAS-FLORES et al., 2006; STEYAERT et al., 2010d)

Em todos os tratamentos com placas pequenas (9 cm de \varnothing) os micélios atingiram as bordas antes dos respectivos correspondentes nas placas grandes (14 cm \varnothing). Como foram observados estádios de maturação mais avançados (amarelos e verdes) no geral para os conídios das placas pequenas em todos os tratamentos (Figura 11), estes resultados sugerem que o diâmetro da placa de cultivo tem efeito não desprezível nos padrões qualitativos de conidiação observada. Deste modo, entende-se que um novo fator passa a participar das interações dos demais fatores sob estudo. Além do possível estímulo de limitação de espaço físico (toque das fronteiras de crescimento das colônias nas bordas das placas), é também possível que os micélios em crescimento nas placas menores entraram em um período de depleção nutricional antecipado, pelo menor volume de meio disponível. Não é possível, neste momento, identificar qual desses dois efeitos (ou ambos) estariam ocorrendo, sendo portanto necessários experimentos futuros específicos para resolver esta questão. Foi interessante verificar, porém, que o cultivo em placas grandes (14 cm) para o isolado -1092 permitiu confirmar o padrão proposto anteriormente (Figura 10) de mecanismos independentes para a resposta aos fatores luz e injúria que podem, porém, ocorrer simultaneamente (Figura 11). Estes efeitos observados nas placas grandes claramente sugerem que foi possível eliminar as possíveis interferências do espaço limitado e, ou depleção nutricional mencionados na observação e constatação desses efeitos específicos (Figuras 10 e 11).

Em relação aos dados quantitativos submetidos à análise estatística, os resultados confirmaram claramente os efeitos individuais do fator tamanho das placas (Tabela 4) e dos tratamentos de luz e, ou injúria (Tabela 5), os quais foram observados morfológicamente. Portanto, a limitação de espaço e, ou depleção nutricional do meio com o crescimento da colônia provavelmente é/são estímulo(s) reconhecido(s) pelos mecanismos de sinalização correspondentes que interferem na produção de conídios (MOGLICH, et al., 2009). Assim, como este efeito ocorre primeiro nas placas menores, em relação ao tempo de cultivo, os mesmos podem ser os responsáveis pela maior esporulação observada, quando comparado com as placas grandes. Experimentos posteriores em que se variem os volumes (profundidades) de meio disponível para as colônias fúngicas, porém em espaços mais confinados de placas com diâmetro de 9-10 cm podem

auxiliar a entender mais claramente como se dá esse(s) fenômeno(s). A idéia é que mesmos volumes de meio aplicados nas placas grandes sejam também aplicados em placas de diâmetro menor, porém mais profundas; deste modo, verificar-se-á o efeito da limitação de espaço. Por sua vez, o uso de placas grandes com volumes distintos de meio poderão permitir verificar o efeito da depleção nutricional.

Os resultados qualitativos mostrados nas Figuras 10 e 11, e os quantitativos analisados na Tabela 5, sugerem a interação do fator tamanho de placa com os demais estímulos abióticos de luz e, ou injúria aplicados no experimento. Porém, é muito importante ressaltar que as interações duplas significativas observadas ocorreram nos pares de fatores de variação que incluem a variável genotípica, isto é, os diferentes isolados (Tabela 3). Esses dados indicam que, ao menos nas condições de um único tipo de meio de cultura (BDA) e um único valor de pH (5,2), os fatores tamanho das placas e tratamentos de luz/injúria agem de forma significativa, porém independente entre si (Tabela 3).

No geral, as respostas obtidas de indução de conidiação para isolados de *Ts* neste estudo sugerem que esta espécie de *Trichoderma* tenderá a responder positivamente a estímulos físicos dessa natureza (luz e injúria) em seu quantitativo de produção de esporos, desde que ajustadas outras condições de crescimento, tais como tipo e composição dos meios de cultura, valores de pH, tamponamento ou não deste pH, e tamanho (espaço) da placa de cultivo. Foi interessante observar que, apesar de morfologicamente não se ter percebido efeitos de indução de maior esporulação pelos tratamentos com luz e, ou injúria para o isolado -113 (Figuras 10 e 11), o mesmo apresentou diferença estatisticamente significativa na quantidade de esporos produzidos para estes tratamentos em relação ao crescimento no escuro (Tabela 5); essas diferenças, porém, foram de menor magnitude para este isolado do que para os demais.

Os resultados obtidos de indução de esporulação por injúrias mecânicas, quando se observa o aspecto morfológico geral das colônias em alguns isolados (a ocorrência de esporos amarelos e, ou verdes sobre as linhas de injúrias), sugeriram a possibilidade de que o número de cortes nas hifas poderia induzir a uma maior esporulação da colônia, proporcional ao número dos cortes, o que foi testado neste trabalho. Apesar dessa hipótese ter sido rejeitada por não ter sido

detectada diferença estatística de esporulação entre os números de cortes aplicados, verificou-se que aqueles isolados que responderam mais aos tratamentos de injúria (em diferentes intensidades) esporularam significativamente mais que o isolado -113, confirmando a tendência já apresentada por este isolado de responder muito menos com sua esporulação em relação aos estímulos físicos.

Tomados em conjunto, os dados e informações obtidas neste estudo sugerem que experimentos fatoriais com maior número de tratamentos sendo testados simultaneamente (incluindo-se aí testes com substratos econômicos para produção de conídios em larga escala) poderão revelar condições específicas por isolado para uma melhor esporulação com potencial de exploração econômica. A preponderância do fator genotípico como principal interferente nos padrões morfológicos e quantitativos de esporulação *in vitro* de *Ts* ficou evidenciada. Também foi relevante a aparente interconexão de mecanismos fisiológicos de resposta aos estímulos abióticos testados na definição dos padrões de conidiação.

6. CONCLUSÕES

- Na maioria dos isolados de *Ts* estudados, o meio rico com abundância de carbono e, ou nitrogênio de fonte primária, com pH na faixa do ácido e em presença de estímulo luminoso tendem a favorecer a esporulação, porém em padrões de resposta isolado-dependentes.
- As condições específicas de fatores abióticos que desencadeiam maior esporulação, devido às interações dos fatores, dependem dos genótipos individuais de *Ts*, e não estão associadas aos grupos genéticos I e II previamente caracterizados.
- O diâmetro da placa de Petri interfere nas respostas de conidiação de *Ts in vitro*, restando confirmar se tal efeito é devido à limitação de espaço físico, à limitação nutricional, ou ambos, durante o tempo de cultivo.
- A resposta dos isolados ao estímulo das injúrias miceliais foram aproximadamente independentes do número de cortes miceliais, bem como do pH, meio de cultura e luz, sendo mais relevante a interação deste estímulo com o fator genótipos de *Ts*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYRES, M.; AYRES JR. , M.; AYRES, D.L.; DOS SANTOS, A.A.S. **BioEstat – Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biomédicas**. Belém, Pará, Brazil: Fundação Mamirauá (<http://www.mamiraua.org.br>). 2007.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**, 5th edn. San Diego: Academic Press, 2005.
- BASTOS, C.N. Mycoparasitic nature of the antagonism between *Trichoderma viride* and *Crinipelis pernicioso*, **Fitopatol Bras**, v. 21, p. 50-54, 1996.
- BARNETT, H. L.; BRINDER, F. L. The fungal host-parasite relationship. **Ann. Rev. Phytopathol.** V. 11, p. 273-292, 1972.
- BENHAMON, N. Elicitor-induced plant defense pathways. **Trend in Plant Science**, v.7, p.233-240, 1996.
- BENITEZ, T.; RINCON, A.M.; LIMON, M.C.; CODON, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains, **Int. Microbiol.** v.7 n.4 p.249-260, 2004.
- BETINA, V. ZAJACOVA, J. Regulation of periodicity and intensity of photo induced conidiation of *Trichoderma viride*. **Folia Microbiol (Praha)**, v.23, p. 453-459, 1978.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN FILHO, A. KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1. cap.36.p.717-728, 1995
- BEZERRA, J.L.; COSTA, J.C.B.; FALEIRO, F.G.; BASTOS, C.N.; BEZERRA, K.M.T.; MENEZES, P.V.S. *Hypocrea stromatico* sp. nov. Teleomorfo de *Trichoderma stromatico*, **Fitopatol Bras**, v. 25, p.85, 2003.
- CARVALHO, A.C. Bioprospecção de isolados de *Trichoderma stromatico* para controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauero. (**Dissertação de Mestrado**). Ilhéus-BA, Universidade Estadual de Santa Cruz, 82 p., 2006.
- CASAS-FLORES, S., RIOS-MOMBERG, M., BIBBINS, M., PONCE-NOYOLA, P. & HERRERA-ESTRELLA, A. BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. **Microbiology** 150, 3561–3569, 2004
- CASAS-FLORES, S., RIOS-MOMBERG, M., ROSALES-SAAVEDRA, T., MARTINEZ-HERNANDEZ, P., OLMEDO-MONFIL, V. & HERRERA-ESTRELLA, A. Cross talk between a fungal blue-light perception system and the cyclic AMP signaling pathway. **Eukaryot Cell** 5, 499–506, 2006.
- CASTELLANOS, F., SCHMOLL, M., MARTINEZ, P., TISCH, D. KUBICEK, C.P., HERRERA-ESTRELLA, A. ESQUIVEL-NARANJO, E.U., Crucial factors of the light perception machinery and their impact on growth and cellulose gene transcription in *Trichoderma reesei*. **Fungal Genet Biol**, v. 47, p. 468-476, 2010. CHAVERRI, P.; SAMUELS, G.J.; STEWART. E.L. *Hypocrea virens* sp.

- nov., the teleomorph of *Trichoderma virens*. **Mycologia**, v.93, p. 1113-1124., 2001.
- CHALOT, M, BRUNN, A. Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. **FEMS. Microbiology Reviews**. v.22,p.21-44, 1998.
- CHERNIN, L. & CHET, I. Microbial enzymes in the biocontrol of plant pathogens and pests. In *Enzymes in the Environment: Activity, **Ecology**, and Applications*, pp. 171–226. Edited by R. G. Burns & R. P. Dick. New York: CRC Press, 2002.
- DANIELSON, R.M.; DAVEY, C.B. The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.5, p.485-94, 1973.
- DE SOUZA, J.T.; POMELLA, A.W.V.; BOWERS, J.; PIROVANI, C.P.; LOGUERCIO, L.L.; HEBBAR, P. Genetic and Biological Diversity of *Trichoderma stromaticum*, a Mycoparasite of the Cacao Witches' Broom Pathogen. **Phytopathology**, v. 96, p. 61-67, 2006.
- DODD, L.S.; SAMUELS, G.J.; *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. **Mycology**. v.95, p.27-40, 2003.
- ESPOSITO, E.; SILVA, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. **Critic Rev Microbiol**, v. 24, p. 89-98, 1998.
- FIGUEIREDO, B.M.; ANDRADE, M.C.N.; FILHO, J.K.; MINHONI, J.T.A.; COUTINHO, L.N. Productivity, biological efficiency, and number of *Agaricus blazei* mushrooms grown in compost in the presence of *Trichoderma* sp and *Chaetomium olivacearum* contaminants. **Brasilian Journal Microbiology**. vol. 38, 2007.
- FRIEDL, M. A., KUBICEK, C. P. & DRUZHININA, I. S. Carbon source dependence and photostimulation of conidiation in *Hypocrea atroviridis*. **Appl Environ Microbiol** 74, 245–250, 2008.
- GAO, L.; XINGZHONG, L.; Nutritional requirements of mycelial growth and sporulation of several biocontrol fungi in submerged and on solid culture. **Microbiology**. v.79, p.612-619, 2010.
- GRESI'K, M., KOLAROVA, N. & FARKAS, V. Hyperpolarization and intracellular acidification in *Trichoderma viride* as a response to illumination. **J Gen Microbiol** 137, 2605–2609, 1991.
- GRESSEL, J. & GALUN, E.. Morphogenesis in *Trichoderma*: photoinduction and RNA. **Dev Biol** 15, 575–598, 1967.
- HANADA, R.J.; POMELLA, A.W.V.; COSTA, H.S.; BEZERRA, J.L.; LOGUERCIO, L.L. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. **Fungal Biology**, v.114, p.901-910, 2010.

- HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol-changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v.84,p.377-393, 2000.
- HARMAN, G. E., HOWELL, C. R., VITERBO, A., CHET, I. & LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nat Rev Microbiol** 2, 43–56, 2004.
- HORWITZ, B.A., PERLMAN, A., GRESSEL, J. Induction of *Trichoderma* sporulation by nan second laser pulses: evidence against cryptochrome cycling. **Photochem Photobiol.** V.51, p.99-104, 1990.
- HOWELL, C.R. The role of antibiosis in biocontrol. **Trichoderma and Gliocadium** v. 2, p. 173-184, HARMAN, G.E. and KUBICEK, C.P.ed Taylor e Francis, London,.
- HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v. 87, p. 4-10, 2003.
- HUBBARD, J.P., HARMAN, G.E., HADAR, Y. Effect of soilborne *Pseudomonas* spp. On the biological control agent, *Trichoderma hamatum*, on pea seeds. **Phytopathology**, v. 73, p. 655-659, 1983.
- JACKSON, A. M., WHIPPS, J. M. & LYNCH, J. M. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.19 p.180-187, 1997.
- JACKSON, A. M.; SCHISLER, D.A. The composition and attributes of *Colletotrichum truncatum* spores are altered by nutritional environment. **Environ Microbiol**, v. 58, p. 2260-2265, 1992.
- KREDICS, L., MANCZINGER, L., ANTAL, Z., PENZES, Z., SZEKERES, A., KEVEI, F.& NAGY, E. In vitro water activity and pH dependence of mycelia growth and extracellular enzyme activities of *Trichoderma* strains with biocontrol potential. **Appl Microbiol** 96, 491–498, 2004.
- KUBICEK, C.P.; MACH, R.L.; PETERBAUER, C.K.; LORITO, M. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. **J Plant Pathol**, v. 83, p. 11-23, 2001.
- KRUGNER, T.L.; BACCHI, L.M.A. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorin, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Principios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres,. p. 46-95, 1995.
- LAKIN-THOMAS, P. L. & BRODY, S. Circadian rhythms in microorganisms: new complexities. **Annu Rev Microbiol** 58, 489–519, 2004.
- LANGE, L., WU, W., ALBERT, D., LANDWICK, S., SCHONNNOR, K.M., CLAUSEN, I.B. Polypeptides Having Cellobiohydrolase 1 Activity an polynucleotides encoding same. **Documenter type patent** application: 2012237993, United States, 2012.

- LEE, K.; EBBOLE, D.J. Tissue-specific repression of starvation and stress responses of the *Neurospora crassa* con-10 gene is mediated by RCO1. **Fungal Genet Biol**, v. 23, p. 269-278, 1998.
- LEWIS, J. A. & PAPAIVIZAS, G. C. Production of chlamydospores and conidia by *Trichoderma* spp. in liquid and solid growth media. **Soil Biol Biochem** 15, 351–357, 1983.
- LIMA, L.H.C.; MARCO, J.L. de; FELIX, C.R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, cap. 8. p. 263-284, 2000.
- LIU, Y.; BELL-PEDERSEN, D. Circadian rhythms in *Neurospora crassa* and other filamentous fungi. **Eukar Cell**, v. 5, p. 1184-1193, 2006
- LOGUERCIO, L.L.; CARVALHO, A.C.; NIELLA, G.R.; SOUZA, J.T.; POMELLA, A,W.V. Selection of *Trichoderma stromaticum* isolates for efficient biological control of witches' broom disease in cacao. **Biol Control**, v. 51, p. 130-139, **2009a**.
- LOGUERCIO, L.L. ; SANTOS, L.S.; NIELLA, G.R. ; MIRANDA, R.A.C.; SOUZA, J.T.; COLLINS, R.T.; POMELLA, A.W.V. Canopy-microclimate effects on the antagonism between *Trichoderma stromaticum* and *Moniliophthora perniciosa* in shaded cacao. **Plant Pathol**, v. 58, p. 1104-1115, **2009b**.
- LORITO, M. Chitinolytic enzymes and their genes. In: **Trichoderma and Gliocladium – enzymes, biological control and commercial applications** (HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P., eds). London, Taylor & Francis, vol. 2, pp. 73-99, 1998.
- MANSO, T.; NUNES, C.; RAPOSO, S.; LIMA, C.M. Primary Title: Production of the biocontrol agent <i>Pantoea agglomerans</i> PBC-1 in a stirred tank reactor by batch and fed-batch cultures. **JJournal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p.725-735, 2010.
- MATHRE, D.E; COOK, R.J.; CALLAN, N. W. From discovery to use traversing the world of commercializing biocontrol agents for plant disease control. **Plant Disease**, v. 83, p. 972-983, 1999.
- MARZLUF, G. A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. **Microbiol Mol Biol Rev** 61, 17–32, 1997.
- MELO, I.S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. No controle biológico de doenças de plantas. In **Controle Biológico de doenças de plantas** (BETTIOL, W., org.) Jaguariúna, EMBRAPA-CNPDA, Cap.9, p. 388, 1991.
- MIKUS, M., HATVANI, L., NEUHOF, T., KOMON-ZELAZOWSKA, M., DIECKMANN, R., SCHWECKE, T., DRUZHININA, I.S., VON DOHREN, H., KUBICEK, C.P. Differential regulation and posttranslational processing of the class II hydrophobin genes from the biocontrol fungus *Hypocrea atroviridis*. **Appl Environ Microbiol**. v. 75, p. 3222-3229, 2009.

- MOGLICH, A., AYERS, R. A. & MOFFAT, K. Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. **Structure** 17, 1282–1294, 2009.
- MORENO-MATEOS, M. A., DELGADO-JARANA, J., CODON, A. C. & BENITEZ, T. pH and Pac1 control development and antifungal activity in *Trichoderma harzianum*. **Fungal Genet Biol** 44, 1355–1367, 2007.
- OLSSON, S. Nutrient translocation and electrical signalling. In *The Fungal Colony*, pp. 25–48. Edited by N. A. R. Gow, G. D. Robson & G. M. Gadd. Cambridge, UK: **Cambridge University Press**, 1999.
- PEÑALVA, M.A.; ARST, H.N. Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. **Annu Rev Microbiol**, v. 58, p. 425–451, 2004.
- PEREIRA. J.L. Alternative strategies for the chemical control of Phytophthora pod rot of cocoa in Bahia, Brazil, p.220 (Tese Ph.D)- University of Bristol, Bristol Kingdom, 1998.
- POMELLA, A.W.V.; DE SOUZA, J.T.; NIELLA, G.R.; BATEMAN, R.P.; HEBBAR, P.K.; LOGUERCIO, L.L.; LUMSDEN, R.D. The use of *Trichoderma stromaticum* in the management of witches' broom disease of cacao in Bahia State, Brazil. In: Vincent, C., Goettel, M., Lazarovits, G. (Eds.) *Biological Control: A Global Perspective - Case Studies from Around the World*. CABI Publishing, Wallingford-UK, p. 210-217, **2007**
- PUNJA, Z.K.; UTKEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, v. 21, p.400-407, 2003.
- RAVENSBERG, J.W.; Mass Production and Product Development of a Microbial Pest Control Agent Book Title: A Roadmap to the Successful Development and Commercialization of Microbial Pest Control Products for Control of Arthropods. **Progress in Biological Control**, v.10, p.59-127, 2011.
- RIDGWAY, H.J., CARPENTER, M.A., STEWART, A. Identification of novel *Trichoderma hamatum* genes expressed during mycoparasitism using subtractive hybridization, **FEMS Microbiology**, v. 251, p.105-112, 2005.
- RUOCCO, M.; LANZUISE, S.; WOO, S.L.; REVERBERI, M.; MARRA, R.; VINALE, F.; ALOY V.; LORITO, M.; Plant growth and isr promotion by *Trichoderma habzianum* T-22. **Journal of Plant Patology**. v. 91, p.34-39, 2009.
- SAMUELS, G.J.; *Trichoderma*, a review of biology and sistematics of the genus. **Mycol Res**, v. 100, p.923-35, 1996.
- SAMUELS, G.J; PARDO-SCHULTHEISS, R.; HEBBAR, K.P.; LUMSDEN, R.D.; BASTOS, C.N.; COSTA, J.C.; BEZERRA, J.L. *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. **Mycol Res**, v.104, p.760-64, 2000.

- SAMUELS, G.J. et al. Trichoderma Online. Systematic Botany & Mycology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved August 31, from <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>, 2012.
- SANOGO, S.; POMELLA, A.; HEBBAR, P.K.; BAILEY, B.; COSTA, J.C.B.; SAMUELS, G.J.; LUMSDEN, R.D. Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipelis perniciosa* on cacao. **Phytopathology**, v.92, p. 1032-37, 2002.
- SANTOS, L.S. Efeito integrado dos fatores meteorológicos na esporulação de *Trichoderma stromaticum*, micoparásita do agente causal da doença vassoura-de-bruxa em cacau. (**Dissertação de mestrado**). Ilhéus-BA. Universidade Estadual de Santa Cruz, 72 p., 2005.
- SCHMOLL, M., FRANCHI, L. & KUBICEK, C. P. Envoy, a PAS/LOV domain protein of *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*), modulates cellulase gene transcription in response to light. **Eukaryot Cell** 4, 1998–2007, 2005.
- SCHMOLL, M., ESQUIVEL-NARANJO, E. U. & HERRERA-ESTRELLA, A.. *Trichoderma* in the light of day: physiology and development. **Fungal Genet Biol** May 11 [Epub ahead of print]. doi: 10.1016/j.fgb.2010.04.010, 2010.
- SOKOLOVSKY, V. Y., LAUTER, F. R., MULLERROBER, B., RICCI, M., SCHMIDHAUSER, T. J. & RUSSO, V. E. A. Nitrogen regulation of blue light-inducible genes in *Neurospora crassa*. **J Gen Microbiol** 138, 2045–2049, 1992
- SOUZA, J.T.; POMELLA, A.W.V.; BOWERS, J.; PIROVANI, C.P.; LOGUERCIO, L.L.; HEBBAR, P. Genetic and Biological Diversity of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the Cacao witches Broom Pathogen. **Phytopathology**, v.96, p.61-67, 2006.
- SPIGGEL, Y.; CHET, I. Evaluation of *Trichoderma* spp as a Biocontrol agent against soilborne fungi and plant parasitic nematodes in Israel **Eukaryot Cell**.v.3, 169-175, 1998.
- STEYAERT, J.M.; RIDGWAY, H.J. ELAD, Y.; STEWART, A. Genetic basis of mycoparasitism: a mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. **New Zeal J Crop Hortic Sci**, v.31, p. 281-91, 2003.
- STEYAERT, J. M. Studies on the regulation of conidiation in species of *Trichoderma*. **PhD thesis**, Lincoln University, Lincoln, New Zealand, 2007.
- STEYAERT, J. M., WELD, R. J., LOGUERCIO, L. L. & STEWART, A. Rhythmic conidiation in the blue-light fungus *Trichoderma pleuroticola*. **Fungal Biol** 114, 219–223, 2010a.
- STEYAERT, J. M., WELD, R. J. & STEWART, A. Ambient pH intrinsically influences *Trichoderma conidiation* and colony morphology. **Fungal Biol** 114, 198–208, 2010b.

- STEYAERT, J. M., WELD, R. J. & STEWART, A. Isolate-specific conidiation in *Trichoderma* in response to different nitrogen sources. **Fungal Biol** 114, 179–188, 2010c.
- STEYAERT, J. M., WELD, R. J., MENDOZA-MENDOZA, A. & STEWART, A. Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. **Microbiology** 156, 2887–2900, 2010d.
- WATKINSON, S. Metabolism and hyphal differentiation in large basidiomycete colonies. In **The Fungal Colony**, pp. 126–156. Edited by N. A. R. Gow, G. D. Robson & G. M. Gadd. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1999
- THAKORE, Y. The biopesticide market for global agricultural use. **Ind Biotechnol**, v. 2, p. 194-208, 2006.
- TEN HOOPEN, G.M.; REES, R.; AISA, P.; STIRRUP, T. KRAUSS, U. ; Population dynamics of epiphytic mycoparasites of the genera *Clonostachys* and *Fusarium* for the biocontrol of black pod (*Phytophthora palmivora*) and moniliasis (*Moniliophthora roreri*) on cocoa (*Theobroma cacao*). **Mycol Res** v.107, p.587-596, 2003.