

Identificação e seleção de espécies de *Trichoderma* spp. endofíticos de bromélias de restingas como agentes de biocontrole da fusariose em frutos de abacaxi

Gustavo de Andrade Bezerra¹, Vicente Mussi-Dias¹, Pedro Henrique Dias dos Santos¹,
Fernanda Abreu Santana Aredes², Silvaldo Felipe da Silveira²

¹Laboratório de Entomologia e Fitopatologia; Laboratório de Genética e Melhoramento de Plantas. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Av. Alberto Lamego, 200,0 CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil. ²Laboratório de Genética e Melhoramento de Plantas. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Av. Alberto Lamego, 2000 CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil. Autor para correspondência: Gustavo de Andrade Bezerra (guandrade.b@gmail.com)
Data de chegada: 15/12/2017 Data de aceite: 01/11/2018

10.1590/0100-5405/189165

RESUMO

Bezerra, G.A.; Mussi-Dias, V.; Santos, P.H.D.; Aredes, F.A.S.; Silveira, S.F. Identificação e seleção de espécies de *Trichoderma* spp. endofíticas de bromélias de restingas como agentes de biocontrole da fusariose em frutos de abacaxi. *Summa Phytopathologica*, v.45, n.2, p.172-178, 2019.

Uma das doenças fúngicas de grande importância que ataca a cultura do abacaxizeiro é a fusariose, causado pelo fungo *Fusarium guttiforme*. A utilização do *Trichoderma* spp. que são fungos habitantes do solo e de ocorrência natural na forma endofítica em bromélias, ainda não foi estudada visando o biocontrole da gomose do abacaxizeiro. O trabalho objetivou identificar espécies de *Trichoderma* endofíticos de bromélias em Restinga e avaliar o antagonismo *in vitro* e *in vivo* a *F. guttiforme*, agente etiológico da gomose do abacaxi. Foram avaliados 5 isolados de *Trichoderma* mantidos em armazenamento na Clínica Fitossanitária da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (CF/UENF440, CF/UENF441, CF/UENF442, CF/UENF443 CF/UENF444). Um isolado de *F. guttiforme* patogênico ao abacaxizeiro também foi utilizado. Para identificação específica dos isolados de *Trichoderma*, efetuou-se a extração do DNA e o sequenciamento dos genes ITS. Procedeu-se a análise filogenética e os isolados endofíticos de bromélias foram agrupados na seção

Longibrachiatum e, com baixa homologia dentre as espécies conhecidas, podendo tratar-se, portanto, de nova espécie, o que ainda será confirmado com a obtenção de novas sequências de genes específicos. Foram realizados testes de antibiose *in vitro* para avaliação e seleção dos isolados antagonistas (antagonismo em cultivo pareado, efeito inibitório de compostos voláteis, não voláteis e não voláteis termoestáveis) e avaliou-se o tratamento biológico de frutos de abacaxi com ferimentos, visando-se avaliar o biocontrole da gomose em pós-colheita. O isolado CF/UENF440 se mostrou como um potencial agente de biocontrole *in vitro* de *F. guttiforme*, pois demonstrou forte antibiose em co-cultivo meio de cultura, tanto para compostos não-voláteis quanto para não-voláteis termoestáveis, diferindo significativamente dos demais isolados testados e do controle. Na avaliação do biocontrole *in vivo* em frutos de abacaxi com ferimentos, os isolados de *Trichoderma* testados não apresentaram significativo efeito protetor no biocontrole da gomose em frutos na pós-colheita.

Palavras-chave: Antibiose, biocontrole.

ABSTRACT

Bezerra, G.A.; Mussi-Dias, V.; Santos, P.H.D.; Aredes, F.A.S.; Silveira, S.F. Identification and selection of *Trichoderma* spp. endophytic to bromeliacea from “restingas” as biocontrol agents of fusariosis in pineapples. *Summa Phytopathologica*, v.45, n.2, p.172-178, 2019.

One of the major fungal diseases affecting the pineapple crop is fusariosis, caused by the fungus *Fusarium guttiforme*. The use of *Trichoderma* spp., which are soil fungi naturally occurring as endophytic forms in Bromeliaceae, has not been studied for the biocontrol of fusariosis in pineapple plants. The present study aimed to identify *Trichoderma* species endophytic to Bromeliaceae in “Restinga” and to evaluate the *in vitro* and *in vivo* antagonism against *F. guttiforme*, the etiological agent of pineapple fusariosis. Five *Trichoderma* isolates were evaluated, which were stored in the Phytosanitary Clinics of the State University of North Fluminense Darcy Ribeiro (CF/UENF440, CF/UENF441, CF/UENF442, CF/UENF443 CF/UENF444). A *F. guttiforme* isolate, pathogenic to pineapple, was also used. For specific identification of *Trichoderma* spp., DNA extraction and sequencing and of ITS genes were carried out. Phylogenetic analysis was conducted and the endophytic isolates from Bromeliaceae were grouped

in the *Longibrachiatum* section, showing low homology among the known species, which may indicate a new species that will be confirmed with the obtaining of additional sequences of specific genes. *In vitro* antibiosis tests were then carried out to select antagonistic isolates (antagonism in matched culture, inhibitory effect of volatile, non-volatile and non-volatile thermostable compounds) and the biological treatment of wounded pineapple fruits was evaluated with the aim of assessing the biocontrol of fusariosis in the post-harvest. The isolate CF/UENF440 was shown to be a potential *in vitro* biocontrol agent of *F. guttiforme* since it demonstrated strong antibiosis in co-cultivation culture medium, for both non-volatile and non-volatile thermostable compounds, significantly differing from the remaining tested isolates and control. Considering the evaluation of *in vivo* biocontrol in wounded pineapple fruits, the tested *Trichoderma* isolates had no significant protectant effect in the biocontrol of fusariosis in post-harvest fruits.

Keywords: Antibiosis, biological control

O abacaxi (*Ananas comosus* (L) Merrill var. *comosus* Coppins e Leal) pertencente à família Bromeliaceae é originário da América do Sul e é frutífera de clima tropical e subtropical com grande importância econômica e social em mais de 70 países (6). Um dos fatores que mais interferem na produtividade desta fruteira é a presença de microrganismos causadores de doença, como os fungos que afetam diretamente no desenvolvimento, na qualidade e na produtividade de frutos desta cultura (7). No Brasil, a fusariose, doença causada pelo fungo *Fusarium guttiforme* Nirenberg e O'Donnell (sin. *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas*) é considerada como a doença chave do abacaxizeiro, e a principal cultivar plantada é a Pérola suscetível à fusariose (1).

De maneira geral o controle da fusariose se fundamenta na integração de diversas práticas culturais, entre elas a aplicação de defensivos agrícolas durante o desenvolvimento das inflorescências. Dentre os muitos agentes potenciais de biocontrole, o fungo *Trichoderma* sp. tem sido um dos mais estudados, dado as suas características peculiares de antagonismo em condições naturais (15).

Conforme Luz (16), os bioprotetores apresentam-se como uma tecnologia alternativa para o controle de fitopatógenos e os microrganismos que apresentam esta capacidade, em especial *Trichoderma*, poderão ter um importante impacto na redução do uso de fungicidas químicos, no alcance da agricultura sustentável e na proteção da natureza. Os mecanismos de ação pelos quais *Trichoderma* pode atuar no controle biológico são: antibiose, competição, parasitismo e predação, podendo o antagonista agir por um ou mais mecanismos de interações. Inclusive, quando age por mais de um mecanismo, as chances do sucesso da capacidade de biocontrole são aumentadas (2).

Em avaliações realizadas com o objetivo de comprovar a efetividade de *Trichoderma* no controle de *Fusarium spp.* os resultados são positivos. Como exemplos, trabalhos mostraram que três isolados de *Trichoderma* sp. apresentam-se efetivos no controle de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *in vitro*, quando inoculados 48 horas antes e simultaneamente com o fitopatógeno e, *in vivo*, um isolado foi efetivo no controle do fitopatógeno (20).

Considerando-se a eficácia de *Trichoderma* no controle biológico de doenças de plantas e conhecendo seu efeito de parasita e capacidade de estabelecer competição com outros microrganismos, o presente trabalho objetivou identificar espécies de *Trichoderma* endofíticos a bromélias do ecossistema Restinga e avaliar o antagonismo *in vitro* e *in vivo* a *F. guttiforme*, agente etiológico da fusariose do abacaxi.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem dos isolados de fungos

Foram utilizados 5 isolados de *Trichoderma* mantidos em armazenamento na Clínica Fitossanitária da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (CF/UENF440, CF/UENF441, CF/UENF442, CF/UENF443 CF/UENF444). As culturas foram isoladas de folhas de bromélias (*Aechmea nudicaulis*), do Parque Nacional de Restingas de Jurubatiba (PNRJ), localizado no litoral norte do estado do Rio de Janeiro. O isolado de *F. guttiforme* patogênico à abacaxi também foi obtido de armazenamento da Clínica Fitossanitária, sendo previamente armazenado em água destilada esterilizada (método Castellani).

Extração de DNA e sequenciamento para identificação de isolados de *Trichoderma spp.*

O DNA genômico dos fungos foi extraído por maceração da colônia do fungo utilizando-se protocolo de Santos et al. (28). Após a maceração, a extração foi feita pelo kit de purificação de DNA genômico da Promega (WizardGenomic DNA Purification Kit) (21). O DNA eluído foi armazenado a -20 °C até sua utilização. A qualidade da extração do DNA genômico foi verificada por meio da eletroforese em gel de agarose 1%. O gel consiste em 100 mL de solução TAE 1X e 1 g de agarose. Essa mistura foi dissolvida em forno micro-ondas e posteriormente resfriada para aplicação dos DNAs. Uma alíquota de 2 µL de cada amostra de DNA foi misturada a 3 µL de gelred e 3 µL de blue Juice e aplicados ao gel de eletroforese em tampão TAE 1X. A corrida de eletroforese foi realizada a 80 V por 1 hora. Em seguida, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador. Foi utilizado marcador Kasvi DNA Ladder, RTU modelo K9-100 L.

As reações de amplificação foram realizadas com os primers ITS1 (5' -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al. 1990). As condições da reação foram as seguintes: 50 ng de DNA, tampão PCR 1x, 1,5U de Taq polimerase, 0,06 µM de primers (3 pmol/reação), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, e volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada em termociclador modelo Veriti® Thermal Cycler, com desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 55 °C, 1 minuto a 72 °C; seguida de extensão final de 3 minutos a 72 °C. Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados e quantificados em gel de agarose 1% (p/v) com o marcador de massa Kasvi DNA Ladder, RTU modelo K9-100 L.

Os produtos amplificados foram purificados utilizando o sistema comercial de purificação Agencourt AMPure XP (Ambion Magnetic Stand-96). As amostras purificadas foram enviadas para sequenciamento na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda (Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil).

As sequências de nucleotídeos foram editadas com o software DNA Dragon (12). Todas sequências foram corrigidas manualmente e o arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas corrigidos utilizando as sequências dos primers no sentido 5'-3' e 3'-5'. As novas sequências foram depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

A identificação dos isolados seguiu o protocolo sugerido pela Comissão Internacional de Taxonomia de *Trichoderma* e *Hypocrea* (ISTH), utilizando o programa TrichOKEY (3). Os isolados foram alocados na seção Longibrachiatum. Como a identidade dos isolados com as espécies do banco de dados da ISTH foi baixa, necessitou-se realizar estudo filogenético com espécies dentro desta seção.

Análise filogenética

Regiões consenso foram comparadas no banco de dados do GenBank utilizando o programa Mega BLAST. As novas sequências foram adicionadas ao conjunto de sequências obtido no Genbank e alinhadas no programa MUSCLE® (5) existente no software MEGA v. 5 (30). Espaços (Gaps) (inserções/deleções) foram tratados como inexistentes.

A análise de Inferência Bayesiana (BI) empregando o método da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) foi realizada. MrMODELTEST (22) foi utilizado para selecionar o modelo de substituição de nucleotídeos para análise de BI. Os valores de verossimilhança foram calculados e o modelo selecionado de acordo com Akaike Information Criterion (AIC). O modelo de evolução selecionado para ITS foi HKY+I+G. A análise de BI foi concluída com MrBayes v.3.1.1 (26). As quatro cadeias MCMC foram conduzidas simultaneamente, iniciando

Tabela 1. Isolados de *Trichoderma* incluídos na comparação filogenética de espécies endofíticas de bromélia

Espécie	Isolado	Fonte	Genbank – ITS ¹
<i>T. citrinoviride</i>	B163	Ninhos de <i>Atta cephalotes</i>	KR812250
	GJS 90-140	-	X93957
<i>T. reesei</i>	ATCC 13631	-	Z31016
	IMI 192654*	<i>Gossypium hirsutum</i>	NR120297
<i>Hypocrea novaezelandiae</i>	GJS 81-264	-	X93968
	GJS 81-265	-	X93969
<i>T. andinense</i>	LESF560	Ninhos de <i>Atta cephalotes</i>	KT278909
	LESF541	Ninhos de <i>Atta cephalotes</i>	KT278891
<i>T. patella</i>	BPI GJS 91-141*	Madeira decortcada	NR134338
	GJS 91-141	-	AF487663
<i>T. poronioideum</i>	BPI GJS 01-203*	Madeira decortcada	NR134446
	GJS 01-203	Madeira decortcada	KP109821
<i>T. cerebriforme</i>	GJS 85-245	Madeira	KP109822
	BPI GJS 85-245*	Madeira	NR134447
<i>T. pseudokoningii</i>	T-KN9	Solo	LT707591
	GJS 81-300	Casca de Árvore	DQ083025
<i>T. effusum</i>	MYA-4837*	Solo	NR111833
	UFMGCB9736	Endofítico em <i>Vellozia gigantea</i>	KU727722
<i>T. ghanense</i>	HB40016	Solo	KY764894
	ATCC 208858*	Solo	NR120299
<i>T. konilangbra</i>	SD3604	Solo de plantação de Arroz	KT314324
	CY161	Ninhos de <i>Cyphomyrmex wheeleri</i>	HQ607999
<i>T. saturnisporum</i>	ATCC 28023	-	X93977
	QT22143	Solo	KY225677
<i>T. sinensis</i>	SH4206	-	JQ040381
	DAOM 230004	Casca de Árvore	HQ260623
<i>Trichoderma</i> sp. MA 3642	mms1397	Sedimentos	JQ653083
	mms852	Sedimentos	JQ653070
<i>T. orientale</i>	CBS 130428*	Toco de <i>Plagianthus</i> sp. queimado	NR111317
	LESF544	Ninhos de <i>Atta capiguara</i>	KT278894
<i>T. longibrachiatum</i>	LESF009	Ninhos de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	KT278853
<i>Trichoderma</i> spp.	CF/UENF440		MF164017
	CF/UENF441		MF164018
	CF/UENF442	Endofítico em <i>Aechmea nudicaulis</i>	MF164019
	CF/UENF443		MF164020
	CF/UENF444		MF164021

¹ITS = internal transcribed spacer; *Espécie Tipo. Isolados obtidos neste estudo estão destacados em negrito.

as árvores aleatoriamente até 107 de gerações. As árvores foram amostradas a cada 1 000 gerações, resultando em 10 000 árvores. As primeiras 2 500 árvores foram descartadas da análise. Os valores de probabilidade posterior (25) foram determinados da árvore consenso através das 7 500 árvores remanescentes. A convergência dos log de verossimilhança foi analisada com o software TRACER v. 1.4.1 (24). A árvore foi visualizada no software FigTree (23) e exportada para programas gráficos. A espécie *Penicillium glabrum* SQU-QU09 foi utilizada como grupo externo (outgroup) nas análises.

Antagonismo em cultura pareada

O antagonismo dos isolados de *Trichoderma* contra *F. guttiforme*

foi avaliado utilizando o método de pareamento de culturas, de acordo com Isaias et al. (13) modificado. A multiplicação dos isolados de *Trichoderma* e do patógeno, foi procedida em placas de Petri contendo o meio de batata-dextrose-ágar (BDA), mantidas a 25 °C e fotoperíodo de 12 h, por 7 dias. Posteriormente, discos de 5 mm de diâmetro foram retirados da cultura pura dos fungos e foram depositados a 1,0 cm de distância da borda da placa de Petri, contendo o mesmo meio. O antagonista foi posicionado no lado oposto ao patógeno e as placas foram mantidas nas mesmas condições descritas acima.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada quando toda a superfície do meio se apresentava colonizada pelo *F. guttiforme* no tratamento controle com ausência do antagonista. O experimento foi

realizado com seis repetições com os tratamentos (T0 – controle; T1 – CF/UENF440; T2 – CF/UENF441; T3 – CF/UENF442; T4 – CF/UENF443; T5 – CF/UENF444) distribuídos ao acaso na câmara de crescimento. Com o término do período de cultivo, foram realizadas as avaliações, onde foram aferidas as medidas do diâmetro das colônias do patógeno com o auxílio de régua milimetrada.

Ação inibitória de metabólitos voláteis, não-voláteis e termoestabilidade de não-voláteis de isolados de *Trichoderma* spp.

A avaliação do efeito inibidor de metabólitos voláteis (13) foi procedida com o uso de duas bases de placas de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo BDA, que receberam individualmente, discos de 5 mm, das culturas do patógeno e do antagonista. Após 24 h, as bases contendo antagonista e patógeno foram sobrepostas e unidas com filme de PVC. Como testemunha, foram sobrepostas duas bases contendo o patógeno. As placas foram incubadas a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h. Cada tratamento foi composto por seis repetições em delineamento inteiramente casualizado.

Posteriormente, para metabólitos não-voláteis, os isolados de *Trichoderma* foram cultivados em frascos Erlenmeyer contendo 250 mL de meio líquido contendo batata-dextrose. Foram incubadas em agitador orbital a 150 rpm, a 25 °C, em ausência de luz, durante cinco dias. Após esse período, a parte líquida foi filtrada em papel de filtro e centrifugada a 6.000 rpm por 12 minutos. A fase líquida foi esterilizada em membrana de celulose (0,45 µm) e incorporada ao meio BDA, na proporção de 25% (v/v). Foram preparadas seis placas com filtrado de cada antagonista, para confronto com o patógeno. Discos de ágar (5 mm) retirados de cultura do patógeno, foram depositados no centro de cada placa de Petri contendo meio BDA suplementado com filtrado de culturas do antagonista. As culturas foram incubadas a 25 °C. O tratamento controle consistiu do patógeno cultivado na ausência de filtrados de culturas dos antagonistas. As avaliações do crescimento micelial foram realizadas quando toda a superfície do meio foi colonizada pelo *F. guttiforme* nas placas do tratamento controle.

Concomitantemente, realizou-se avaliação da termoestabilidade dos metabólitos não-voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. Os procedimentos para avaliação foram conduzidos em paralelo com a avaliação de metabólitos não-voláteis, porém os filtrados de cultura foram previamente submetidos ao aquecimento a 121 °C por 20 min, antes de serem plaqueados com meio de cultivo. Utilizou-se seis placas para cada agente obtido dos antagonistas. O tratamento controle consistiu do patógeno. As avaliações do crescimento micelial foram realizadas quando toda a superfície do meio foi colonizada pelo *F. guttiforme* nas placas do tratamento controle.

Teste de biocontrole *in vivo*

Para avaliar a eficácia do antagonismo mediado por isolados de *Trichoderma* spp. contra o fungo patogênico *F. guttiforme*, agente causal da gomose do abacaxi, foi realizado um teste *in vivo* em frutos de abacaxi. Foram utilizados frutos de abacaxi da cultivar Pérola, suscetível à doença. Os frutos utilizados foram selecionados de acordo com o estágio de maturação, que foi o estágio 1, em que os segmentos do fruto são, na sua parte central, de cor verde, passando a verde bem escuro na sua periferia e a marrom escuro nos sulcos divisórios.

Os frutos passaram por desinfestação superficial, onde foram mergulhados em hipoclorito de sódio (água sanitária comercial) a 0,5% para limpeza, por 5 minutos e colocados em bancada para secagem. Após a secagem, receberam uma perfuração de 1 cm de profundidade, na região do terço inferior, utilizando-se, para isso, uma

ponteira de 100 µL de capacidade. Posteriormente, os frutos foram imersos em suspensão de 10⁷ conídios/mL obtida individualmente de cada um dos cinco isolados de *Trichoderma* spp. A imersão ocorreu por um tempo de 2 minutos seguida por incubação dos frutos em câmara úmida por 24 horas para aderência da suspensão e início do crescimento do antagonista nos frutos. Passado esse período, os frutos foram inoculados, nos orifícios anteriormente feitos, com um disco de 0,5 cm da colônia da cultura pura de *F. guttiforme*, permanecendo em câmara úmida por mais 48 horas. Após esse tempo, os frutos foram retirados de câmara úmida e deixados em bancada de 7 a 10 dias até a avaliação da infecção.

Foram utilizados 4 frutos para cada tratamento que consistiu de: T1 – controle sem *F. guttiforme* (fruto sem tratamento com antagonista e sem a inoculação de *F. guttiforme*; T2 – controle com *F. guttiforme* (fruto sem tratamento com antagonista e com inoculação do fungo patogênico); T3 – suspensão do isolado CF/UENF440; T4 - suspensão do isolado CF/UENF441; T5 - suspensão do isolado CF/UENF442; T6 – suspensão do isolado CF/UENF443; T7 – suspensão do isolado CF/UENF444. O ensaio foi repetido três vezes. Os frutos foram abertos e foram realizadas medidas de largura, comprimento e área da lesão formada pelo fungo patogênico em todos os tratamentos.

Análises estatísticas

Para cada isolado, realizou-se um teste de comparação de médias de inibição de crescimento do patógeno *F. guttiforme* sob efeito inibitório por metabólitos voláteis, não-voláteis, termoestáveis e biocontrole *in vivo* através do teste de Skott-knott, considerando o nível de 5% de significância estatística. O mesmo foi aplicado ao biocontrole *in vivo*. Para as análises adotou-se o programa de linguagem estatística R, livre para download no site <http://www.r-project.org/>. Utilizou-se o pacote ExpDes para obtenção das análises.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação de espécies de *Trichoderma* spp.

A análise filogenética foi realizada com 38 táxons e o alinhamento das sequências resultou num total de 746 caracteres, dos quais 89 foram informativos para parcimônia, 227 foram variáveis e 473 foram conservados. Pela análise filogenética utilizando o gene *ITS* foi possível a identificação de um novo clado, bem suportado (pp = 0.99), entre os cladros de *T. andinense* e *T. citrinoviride*, indicando a possibilidade de estes isolados pertencerem à uma nova espécie. Todos os isolados de bromélias estudados parecem se tratar de uma mesma espécie de *Trichoderma* spp., com base na análise filogenética.

Os isolados foram alocados na seção *Longibrachiatum*, porém a identidade dos isolados com as espécies do banco de dados da ISTH foi baixa. Taxonomicamente, *Trichoderma* foi dividido em cinco seções, incluindo a seção *Longibrachiatum*, mas com análises filogenéticas moleculares crescentes, a nomenclatura seccional de *Trichoderma* foi abandonada em favor da nomeação de cladros filogenéticos (14). Curiosamente, porém, a seção *distintiva* morfológica e metabólica *Longibrachiatum* é uma das duas únicas seções que permaneceu intacta na sequência da análise filogenética (4).

O clado *Longibrachiatum* compreende as espécies de *Trichoderma* mais intensamente estudadas, compreende espécies que são utilizadas industrialmente na produção de enzimas celulolíticas e hemicelulases envolvidas na indústria alimentar, têxteis e tecnologia biocombustível (8, 14).

Avaliação do antagonismo em cultura pareada

Para o antagonismo em cultivo pareado, avaliou-se inibição do crescimento micelial de *F. guttiforme* confrontado com os 5 isolados de *Trichoderma*. Os isolados CF/UENF441, CF/UENF442 e CF/UENF443 foram os que apresentaram inibição de crescimento micelial do agente patogênico, com 82.62%, 83.3% e 80.63%, respectivamente de percentuais de inibição de crescimento micelial.

A maior inibição de crescimento micelial de *F. guttiforme* a 5 isolados de *Trichoderma* pode estar relacionada à origem dos isolados de *Trichoderma*, já que os mesmos foram obtidos de forma endofítica em bromeláceas de restinga. Como *F. guttiforme* foi isolado de abacaxi infectado, pode-se supor que os isolados de *Trichoderma* provenientes de bromeláceas tenham uma ação mais efetiva do que os provenientes de outras culturas e apresente estratégia de defesa mais eficazes.

O *Trichoderma* utiliza diferentes mecanismos de ação contra seus competidores, incluindo ação direta, degradação e uso de carboidratos complexos pela ação de enzimas produzidas (10), tornando-os, como um dos mais bem-sucedido colonizadores dos seus habitats (29).

Os fungos com mecanismos antagonistas utilizam diferentes mecanismos de interações com patógenos. A avaliação de cultura pareada serve para selecionar isolados que tenham maior atividade antagonista e de micoparasitismo (19). Nas aplicações de antagonistas no controle de fitopatógenos têm sido utilizadas diferentes espécies de isolados *Trichoderma* e a antibiose tem sido considerada um dos principais mecanismos de ação realizados pelo antagonista (27).

Efeito inibitório de metabólitos voláteis, não-voláteis e não-voláteis termoestáveis produzidos por isolados de *Trichoderma* spp.

A inibição de crescimento de *F. guttiforme* mediado pelo efeito inibitório de metabólitos voláteis, não-voláteis e não-voláteis termoestáveis de isolados de *Trichoderma* spp. está representado na Tabela 2. Para os metabólitos voláteis, os isolados CF/UENF441, CF/UENF442, CF/UENF443, CF/UENF444, foram os que apresentaram menores média de crescimento de *F. guttiforme*, onde os percentuais de inibição de crescimento promovido pela ação antagonista de *Trichoderma* spp. variam de 67,30% a 71,66%, mostrando que os isolados dos antagonistas atuam diretamente na inibição de crescimento do agente patogênico por ação de metabólitos voláteis.

Para metabólitos não-voláteis e não voláteis termoestáveis, o isolado CF/UENF440 foi o que se mostrou promissor na inibição de crescimento de *F. guttiforme* segundo demonstra os dados estatísticos da Tabela 2.

Os dados de percentuais de inibição de crescimento, mostram que o isolado endofítico CF/UENF440, apresentou 88,43% de inibição

para o ensaio de metabólitos não-voláteis e de 77,30% para o ensaio de metabólitos não-voláteis termoestáveis. Esses dados mostram que o *Trichoderma* spp. vem se mostrando como um agente promissor de biocontrole de *F. guttiforme* *in vitro*.

Na avaliação, os metabólitos voláteis, não-voláteis e não-voláteis termoestáveis produzidos pelos isolados de *Trichoderma*, proporcionaram uma variação no percentual de inibição do crescimento micelial desse patógeno, dependendo do metabólito avaliado. Os resultados mostraram que *F. guttiforme* foi mais suscetível a ação dos metabólitos não-voláteis e não-voláteis termoestáveis produzidos pelos isolados de *Trichoderma*, com inibição acima de 70%.

No teste de termoestabilidade, os metabólitos de *Trichoderma* spp. se mantiveram ativos mesmo após autoclavagem, pois inibiram o crescimento micelial do patógeno, indicando o potencial desses metabólitos antifúngicos, nas condições experimentais utilizadas.

Gruber & Seidel-Seiboth (9), avaliaram e constataram que, o crescimento em direção à hifa do patógeno, o *Trichoderma* produz metabólitos voláteis e enzimas hidrolíticas que, ao degradar a parede celular do patógenos e ativam a expressão de genes envolvidos no micoparasitismo.

Vários estudos apontam uma susceptibilidade dos fungos fitopatogênicos a metabólitos produzidos por antagonistas, inclusive por isolados de *Trichoderma* spp. A capacidade de *Trichoderma* produzir metabólitos secundários e o seu efeito fungicida pode variar entre espécies, entre isolados da mesma espécie e de suas fontes de isolamento, como ocorre com os endofíticos e em função dos compostos antifúngicos secretados (17).

Biocontrole *in vivo* de *F. guttiforme* em frutos de abacaxi

Nas análises realizadas nos testes *in vivo* para avaliação do potencial de biocontrole de *F. guttiforme* com suspensões de isolados de *Trichoderma* spp. endofíticos, pode-se constatar que os isolados do antagonista não apresentaram efeito de biocontrole sobre o agente patogênico aplicando-se esta metodologia. Na tabela 3, no parâmetro comprimento da lesão não houve diferença significativa entre o controle e os isolados e o controle. O mesmo aconteceu com o parâmetro largura e área das lesões, onde os isolados CF/UENF440 e CF/UENF443 obtiveram médias relativamente mais altas que o controle.

Com as análises realizadas, ressalta-se que os isolados não proporcionaram efeito antagonista contra o *F. guttiforme*. Os metabólitos produzidos pelos isolados sob condições controladas podem se distinguir funcional e quantitativamente daqueles presentes nos fermentos em fruto. Isto pode ocorrer devido a variações nas condições de temperatura, umidade, fatores nutricionais e estagio de maturação

Tabela 2 - Médias (mm) do diâmetro das colônias de *F. guttiforme* por metabólitos voláteis, não-voláteis e não voláteis termoestáveis produzidos por isolados de *Trichoderma* spp.

	Efeito inibitório		
	Voláteis	Não-voláteis	Termoestáveis
Controle	83,00 a	77,00 a	77,00 a
CF/UENF440	54,08 b	26,00 d	36,66 e
CF/UENF441	47,16 c	34,91 c	50,00 b
CF/UENF442	45,08 c	42,75 b	42,91 d
CF/UENF443	44,16 c	33,33 c	46,66 c
CF/UENF444	43,50 c	42,25 b	40,66 d
CV(%)	12,53	7,70	4,89

Letras iguais mostram que o isolado não difere entre si quanto à inibição do patógeno por compostos voláteis, não-voláteis e não-voláteis termoestáveis, segundo o teste de Skott-knott, ao nível de 5% de significância estatística.

Tabela 3 – Comparação do crescimento de lesões de *Fusarium guttiforme* em frutos de abacaxi protegidos com suspensão de por isolados de *Trichoderma* spp.

Biocontrole de <i>F. guttiforme</i>			
	Comprimento (cm)	Largura (cm)	Área (cm ²)
Controle com <i>F. guttiforme</i>	3,725 a	3,750 b	14,267 b
CF/UENF440	3,675 a	5,825 a	24,400 a
CF/UENF441	3,575 a	4,125 b	14,957 b
CF/UENF442	3,875 a	4,125 b	16,675 b
CF/UENF443	4,200 a	6,975 a	29,130 a
CF/UENF444	3,750 a	3,875 b	14,267 b
CV (%)	11,74	26,57	32,01

Letras iguais mostram que o isolado não difere entre si quanto à inibição do patógeno volátil, não-volátil e não-volátil termoestável, segundo o teste de Skott-knott, ao nível de 5% de significância estatística.

dos frutos. Além disso, a ação antagonista pode resultar do efeito sinérgico da atividade enzimática dos fungos nos tecidos internos do fruto. Assim, faz-se necessário avaliar se os isolados oferecem proteção as mudas e durante a floração no campo.

Uma hipótese que pode ser levantada a respeito dos dados obtidos no experimento é que, no momento de interação entre os isolados endofíticos de *Trichoderma* spp. com o *F. guttiforme*, a ação de enzimas hidrolíticas secretadas pelo antagonista pode ter efetuado um sinergismo sobre o fungo patogênico, potencializando sua ação no fruto, aumentando o tamanho e a área da lesão.

Segundo Huang et al. (11), o processo de como os agentes de biocontrole efetivamente atuam na proteção é um requisito para sua aplicação prática, exemplo disso, na identificação dos genes que são expressos preferencialmente e que podem significar um determinado processo biológico.

Para *Trichoderma* spp., o mecanismo de biocontrole mais aceito tem sido o micoparasitismo mediado pela produção de quitinases e outras enzimas que degradam a parede celular do patógeno (9). Em estudos *in vitro*, confrontando-se *Trichoderma* spp. com *F. culmorum* e *F. graminearum*, os resultados mostraram uma regulação positiva de todos os genes testados durante o micoparasitismo, indicando o envolvimento de enzimas quitinolíticas nessa interação (18). Todavia, em frutos de abacaxi, a metodologia utilizada não possibilitou a avaliação e a atividade de enzimas sobre o patógeno pode não ter sido expressa ou rápida ao ponto de impedir a rápida infecção de *F. guttiforme* em frutos com fermento na pós-colheita.

Os Isolados de *Trichoderma* spp. endofíticos de bromeliáceas de restingas, realizada segundo análise filogenética com base no gene ITS, propõe que estes isolados, (CF/UENF440, CF/UENF441, CF/UENF442, CF/UENF443, CF/UENF444), pertencem a uma provável nova espécie do clado *Longibrachiarum*.

Para os testes de antagonismo em culturas pareadas para inibir crescimento de *F. guttiforme*, o isolado CF/UENF440, se mostrou como um potencial agente de controle *in vitro* do agente patogênico.

Para avaliação do efeito inibitório por metabólitos voláteis, os isolados CF/UENF441, CF/UENF442, CF/UENF443, CF/UENF444 não apresentaram diferença significa na inibição de crescimento do agente patogênico; na avaliação dos metabólitos não-voláteis e não-voláteis termoestáveis, destaca o isolado CF/UENF440 como potencial inibidor de crescimento de *F. guttiforme*, resultado esse, se equiparando com o teste de antagonismo por pareamento de culturas.

Na avaliação do biocontrole *in vivo* em frutos de abacaxi com fermentos, os isolados do antagonista não apresentaram efeito sobre o agente patogênico *F. guttiforme*.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

REFERÊNCIAS

1. Aquije, G.M.F.V.; Zorzal, P.B.; Buss, D.S.; Ventura, J.A.; Fernandes, P.M.B.; Fernandes, A.A.R. Cell wall alterations in the leaves of fusariosis resistant and susceptible pineapple cultivars. **Plant Cell Reports**, Zurique, v.9, n.10, p.1109-1117, 2010.
2. Bettiol, W. Métodos Alternativos para o Controle de Doenças de Plantas. In: Michereff, S.J.; Barros, R. **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2001.
3. Druzhinina, I.; Koptchinski, A.; Komon, M.; Bissett, J.; Szakacs, G.; Kubicek, C.P. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. **Fungal Genetic and Biology**, v.42, p.813-828, 2005.
4. Druzhinina, I.S.; Komoń-Zelazowska, M.; Ismaiel, A.; Jaklitsch, W.M.; Mulaw, T.; Samuels, G.J.; Kubicek, C.P. Molecular phylogeny and species delimitation in the Longibrachiatum Clade of *Trichoderma*. **Fungal Genetic and Biology**, v.49, n.5, p.358-368, 2012.
5. Edgar, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v.32, p.1792-1797, 2004.
6. França-Santos, A.; Alves, R.S.; Leite, N.S.; Fernandes, R.P.M. Estudos bioquímicos da enzima bromelina do *Ananas comosus* (abacaxi). **Scientia Plena: Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**, Aracajú, v.5, n.11, p.1-6, 2009.
7. Granada, G.G.; Zambias, R.C.; Mendonça, C.R.B. **Abacaxi: produção, mercado e subprodutos**. Curitiba: C. CEPPA, 2004.
8. Gal-Hemed, I.; Atanasova, L.; Komon-Zelazowska, M.; Druzhinina, I.S.; Viterbo, A.; Yarden, O. Isolados marinhos de *Trichoderma* como possíveis agentes halotolerantes de controle biológico para zonas áridas agricultura. **Applied Environmental Microbiology**, v.77, n.15, p.5100-5109, 2011.
9. Gruber, S.; Seidl-Seiboth, V. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. **Microbiology**, v.158, p.26-34, 2012.
10. Harman, G.E.; Howell, C.R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature reviews/Microbiology**, v. 2, n.1, p.43-56, 2004.
11. Huang, X.; Li, Y.; Niu, Q.; Zhang, K. Suppression Subtractive Hybridization (SSH) and its modifications in microbiological research. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.76, n.4, p.753-760, 2007
12. Hepperle, D. **DNA Dragon 1.4.1 - DNA Sequence Contig Assembler Software**. 2011. Disponível em: <www.dna-dragon.com>. Acesso em: 22 maio 2017.
13. Isaias, C.O.; MartinS, I.; Silva, J.B.T.; Silva, J.P.; Mello, S.C.M. Ação antagonica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os pató-

- genos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.40, n.1, p.34-41, 2014.
14. Kubicek, C.P.; Mikus, M.; Schuster, A.; Schmoll, M.; Seiboth, B. Estratégias de engenharia metabólica para a melhoria da produção de celulase pela *Hipocereia jecorina*. **Biotechnology Biocombustíveis**, v.2, p.19, 2009.
 15. Lohmann, R.T.; Pazuch, D.; Stangarlin, J.R.; Selzlein, C.; Nacke, H. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para controle de *Sclerotium rolfsii* em soja. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.2, p.1665-1668, 2007.
 16. Luz, W.C. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.1, p.16-20, 2001.
 17. Lorito, M.; Woo, S.L.; Harman, G.E.; Monte, E. Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. **Annual Review Phytopathology**, v.49, p.395-417, 2010.
 18. Matarese, F.; Sarrocco, S.; Gruber, S.; Seidl-Seiboth, V.; Vannacci, G. Bio-control of *Fusarium* head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. **Microbiology**, v.158, p.98-106, 2012.
 19. Mello, S.C.M.; Ávila, Z.R.; Braúna, L.M.; Pádua, R.R.; Gomes, D. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Fitosanidad**, v.11, n.1, p.3-9, 2007.
 20. Pandolfo, J.D. **Associação de *Trichoderma* sp. a fungicidas no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. Phaseoli**. 2007. 78p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
 21. Pinho, D.B.; Dutra, D.C.; Pereira, O.L. Notes on *Ceratocystis paradoxa* causing internal post-harvest rot disease on immature coconut in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.38, p.152-157, 2013.
 22. Posada, D.; Buckley, T.R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over relationships ratio tests. **Systematic Biology**, v.53, p.793-808, 2004.
 23. Rambaut, A. **FigTree 1.2.2**. 2009. Disponível em: <tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>. Acesso em: 22 maio 2017.
 24. Rambaut, A.; Drummond, A.J. **Tracer version 1.2**. 2013. Disponível em: <http://evolve.zoo.ox.ac.uk>. Acesso em: 22 maio 2017.
 25. Rannala, B.; Yang, Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference. **Journal of Molecular Evolution**, v.43, p.304-311, 1996.
 26. Ronquist, F.; Heulsenbeck, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v.19, p.1572-1574, 2003.
 27. Reino, J.L.; Guerrero, R.F.; Hernández-Galán, R.; Collado, I.G. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. **Phytochemistry Reviews**, v.7, p.89-123, 2008.
 28. Santos, P.H.D.; Carvalho, B.M.; Aguiar, K.P.; Aredes, F.A.S.; Poltronieri, T.P.S.; Vivas, J.M.S.; Mussi Dias, V.; Bezerra, G.A.; Pinho, D.B.; Pereira, M.G.; Silveira, S.F. Phylogeography and population structure analysis reveals diversity by mutations in *Lasiodiplodia theobromae* with distinct sources of selection. **Genetics and Molecular Research**, v.16, n.2, p.gmr16029681, 2017.
 29. Schuster, A.; Schmoll, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.87, p.787-799, 2010.
 30. Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipiński, A.; Kumar, S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, p.2725-2729, 2013.