

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E POS GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE APOIO A PESQUISA

ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE LINHAGENS ENDOFÍTICAS DE *TRICHODERMASPP.*
AO ENDOFITO *COLLETOTRICHUM GUARANICOLA* ISOLADOS DO
GUARANAZEIRO

Bolsista: Bianca Caroline De Ciccio Oliveira

MANAUS
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E POS GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE APOIO A PESQUISA

RELATÓRIO PARCIAL
PIB-B/0080/2011
ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE LINHAGENS ENDOFÍTICAS DE *Trichoderma spp.* AO
ENDOFITO *Colletotrichum guaranicola* ISOLADOS DO GUARANAZEIRO

Bolsista: Bianca Caroline De Ciccio Oliveira
Orientadora: Profª Dra. Rozana de Medeiros Sousa Galvão
Coorientador: Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto

MANAUS

2012

Todos os direitos deste relatório são reservados á Universidade Federal do Amazonas, ao Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser produzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e se caracteriza como sub projeto do projeto de pesquisa Microrganismos associados ao guaranazeiro com potencial biotecnológico e agrícola: especialmente visando o controle da antracnose.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	5
2. Revisão de Literatura.....	7
2.1 Controle Biológico.....	7
2.2 O gênero <i>Trichoderma</i>	7
2.3 Endofíticos.....	8
2.4 Antagonismo.....	8
2.4.1 Mecanismos de ação dos microrganismos antagonistas.....	8
2.4.2 Seleção de microrganismos antagonistas.....	9
2.4.3 Utilização de fungos no controle biológico de Doenças.....	9
2.4.4 Interações entre patógeno, hospedeiro e antagonistas.....	10
2.4.5 Interações entre antagonista, patógeno e hospedeiro.....	11
3. Materiais e Métodos.....	11
3.1 Material Biológico.....	11
3.2 Atividade Enzimática.....	12
3.3 Inoculação para a antibiose.....	12
3.4 Teste de antagonismo em confrontação direta.....	12
3.5 Avaliação da produção de metabólitos não voláteis pelos antagonistas....	12
3.6 Avaliação da produção de metabólitos voláteis pelos antagonistas.....	13
4. Resultados Parciais.....	13
4.1 Linhagens Reativadas.....	13
4.2 Atividade Enzimática.....	14
5. Referenciais Bibliograficas.....	18
6. Cronograma de Atividades.....	20

1.Introdução

Doenças de plantas, principalmente causadas por patógenos são responsáveis por perdas severas em culturas de importância econômica em todo o mundo.

O controle de doenças de plantas não é totalmente eficiente, uma vez que o patógeno penetra no tecido vascular da planta. Os insumos químicos também têm causado impactos negativos nos mais diferentes compartimentos dos ecossistemas, representados por contaminação das águas, resíduos químicos no solo, efeitos nos microrganismos, danos à saúde humana e dificuldades da ciclagem de resíduos químicos em ambientes protegidos (FRIGHETTO, 2000).

Os métodos de controle de doenças de plantas utilizados vêm sendo aperfeiçoados com o objetivo de assegurar o uso correto e racional de produtos químicos, bem como, garantir a rentabilidade da atividade ao agricultor e diminuir os riscos à saúde humana e ao meio ambiente. Sendo assim, o controle biológico se constitui em demanda atual e de alta importância para viabilizar a substituição dos agroquímicos. Uma alternativa para o controle de fitopatógenos é o uso de microrganismos antagonistas, os quais oferecem potencialmente respostas para muitos problemas enfrentados na agricultura.

O gênero *Trichoderma* é um dos fungos antagonistas mais estudados, exibindo considerável variabilidade entre as linhagens com relação à atividade de biocontrole, espectro de ação contra os hospedeiros, propriedades fisiológicas e bioquímicas, como também, adaptabilidade ecológica e ambiental. Além disso, agentes potenciais de biocontrole pertencentes ao gênero *Trichoderma* podem ser isolados dos ambientes naturais dos patógenos, ou seja, de solos ou de plantas.

Várias espécies de *Trichoderma* são capazes de secretar metabólitos secundários tóxicos a fitopatógenos, sendo que essa característica é variável dependendo da linhagem (HANDELSMAN e STABB, 1996). Ainda não foi comprovado se os antibióticos produzidos por *Trichoderma* exercem efeitos pronunciados contra fitopatógenos *in situ*. Há evidências de que em condições de laboratório, estes fungos sejam capazes de produzir antibióticos que exerçam efeitos contra bactérias e fungos (MELO, 1996).

Os endófitos apresentam ainda outra característica interessante, é a promoção de crescimento vegetal pela síntese de fitormônios e fixação de nitrogênio (PEIXOTO-NETO et al., 2002). A interação de um fungo com seu hospedeiro vegetal varia e depende da planta. A colonização pode ser sistêmica ou local, inter ou intracelular. Os fungos endofíticos que colonizam seus hospedeiros assintomaticamente (AZEVEDO e ARAÚJO, 2006), são fortes candidatos ao controle biológico de fitopatógenos, por ocuparem o mesmo nicho ecológico destes.

Várias espécies de *Trichoderma* são aptas a controlar fitopatógenos por microparasitismo, produção de toxinas e enzimas (AZEVEDO et al., 2000), competição e indução visível, pois *Trichoderma* cresce, sobrepondo a colônia de *Crinipellis perniciosa*, que cessa o crescimento. O antagonista também esporula na superfície do micélio de *C. perniciosa* e sua hifa enrola-se em torno da hifa do patógeno, penetrando-a, causando lise (ELAD et al., 1983) e morte do patógeno (BASTOS, 1996).

A antracnose, doença causada pelo fungo *Colletotrichum guaranicola* que ataca a planta em qualquer estágio de desenvolvimento de forma altamente destrutiva. Nas plantas atacadas, o fungo induz o crestamento (queima) em folhas jovens, com sua subsequente queda. Em folhas novas, ainda em crescimento e antes da maturidade, os sintomas são lesões necróticas com formato variável de circular a elíptico, caracterizando o quadro da antracnose. Quando numerosas, essas lesões causam deformações e enrolamento das folhas, principalmente quando atingem as nervuras. Folhas maduras ou velhas não são infectadas. Ataques sucessivos deste fungo induzem a morte descendentes dos ramos e por fim a da planta. O controle da antracnose pode ser obtido pelo emprego de pelo menos três estratégias: utilização de clones possuidores de alto níveis de resistência estável, aplicações regulares de fungicidas e redução de severidade de doença mediante utilização de podas em épocas pré-definida.

Algumas espécies de *Trichoderma* têm sido estudadas com relação à sua capacidade competitiva com fungos fitopatogênicos, devido a sua rápida taxa de crescimento micelial e a um antagonismo direto, envolvendo enrolamento de hifas e penetração, com secreção de antibióticos deletérios ao hospedeiro (JEFFRIES;

YOUNG, 1994). Daí esse trabalho ter como objetivo avaliar os efeitos antagônicos do *Trichoderma* spp. sobre o fungo fitopatogênico, *Colletotrichum guaranicola*.

Este projeto tem como objetivos testar e selecionar linhagens de *Trichoderma* spp isoladas como endófitas de plantas tropicais quanto à capacidade antagônica do fitopatôgeno agrícola *C. guaranicola*.

2. Revisão de Literatura

2.1 Controle Biológico

Doenças de plantas causadas por patógenos são responsáveis por perdas severas em culturas de importância econômica em todo o mundo. O controle dessas doenças não é totalmente eficiente, uma vez que o patógeno penetra no tecido vascular da planta. Insumos químicos têm causado impactos negativos nos ecossistemas e para diminuir os riscos a saúde humana e ao meio ambiente, métodos de controle de doenças de plantas vêm sendo aperfeiçoados. Uma alternativa de controle de fitopatógenos são os microrganismos antagonistas.

2.2 O gênero *Trichoderma*

Um dos fungos antagonistas mais estudados, exibindo considerável variabilidade entre as linhagens com relação à atividade de biocontrole, espectro de ação contra os hospedeiros, propriedades fisiológicas e bioquímicas, como também adaptabilidade ecológica e ambiental. É um fungo não patogênico, habitante do solo e de plantas. Exerce antagonismo a vários fitopatógenos e é um importante fungo saprófita de solo. Mecanismos de ação pelos quais *Trichoderma* spp. pode atuar: Antibiose, Hiperparasitismo, Competição e também em alguns casos através de promoção de crescimento.

O gênero *Trichoderma*, pertencente à Ordem Hypocreales, é representado por fungos não patogênicos, que são habitantes do solo e de plantas e que exercem antagonismo a vários fitopatógenos, através do parasitismo e/ou antibiose (KRUGNER e BACCHI, 1995), bem como, por hiperparasitismo (MELO, 1998).

No gênero *Trichoderma*, que é um importante saprófita de solo, apresenta várias espécies que são antagônicas a outros fungos e bactérias, incluindo fitopatógenos, principalmente aqueles com estruturas de resistências consideradas difíceis de serem atacadas por microrganismos (MELO, 1996) e fungicidas benzimidazóis (ZAMBOLIN; VALE; SILVA, 1998). Os mecanismos de ação pelos quais o *Trichoderma* spp pode atuar são: antibiose, hiperparasitismo, competição e também em alguns casos através de promoção de crescimento (MELO, 1996).

Entretanto, não são todas as linhagens de *Trichoderma* spp que apresentam atividade antibiótica, pois esta capacidade pode variar de indivíduo para indivíduo ou mesmo estar ausente como ocorreu com as linhagens de *Trichoderma* spp isolados de *Strychnos cogens* (Loganiaceae), testadas por Souza et al. (2004).

O gênero *Trichoderma* tem sido isolado também como microrganismos endofíticos em espécies tropicais. Fungos endofíticos podem conferir resistência à planta contra herbivoria por meio de dois mecanismos principais: 1) estímulo direto do vigor da planta e 2) produção de metabólitos que aumentam a resistência à herbivoria (CLAY et al., 1993). Os endófitos colonizam a planta como um todo e o hospedeiro recebe proteção contra herbivoria, pela produção de toxinas alcalóides por esses endófitos. Tal é a eficiência dos endófitos na proteção de seus hospedeiros, que alguns autores relatam a preferência dos herbívoros à ingestão de plantas e/ou folhas que não contém endófitos (CLAY et al., 1993).

2.3 Endofíticos

Os endofíticos colonizam a planta como um todo e o hospedeiro recebe proteção contra herbivoria, pela produção de toxinas alcalóides por esses endófitos e eles são fortes candidatos ao controle biológico de fitopatógenos, por ocuparem o mesmo nicho ecológico destes.

2.4 Antagonismo

2.4.1 Mecanismos de ação dos microrganismos antagonistas

Os princípios do controle biológico baseiam-se na relação antagônica entre microrganismos, como: predação, competição, amensalismo e parasitismo. Para que um antagonista seja bem sucedido é preciso que ele tenha capacidade de se multiplicar e colonizar a superfície da planta.

O parasitismo parece ser o mecanismo mais eficiente de antagonismo do controle biológico natural, pois os hiperparasitas por viverem às custas do patógeno, estão sujeitos as mesmas variações ambientes e dependem das mesmas condições do organismo parasitado. Dentre os fungos filamentosos, o *Trichoderma* é reconhecidamente o hiperparasita mais importante e um dos mais estudados.

O desenvolvimento de microrganismos na superfície foliar é afetado pela quantidade e pela qualidade dos nutrientes disponíveis no filoplano. Os microrganismos selecionados do mesmo ambiente onde serão utilizados, tem bastante chance de se adaptarem e de serem eficientes, e neste caso são conhecidos como microrganismos residentes. O microrganismo estranho (exótico ou introduzido), geralmente tem pouca persistência no ambiente, devendo ser reaplicados com mais freqüência.

Não basta o antagonista ser um potente agente de controle in vitro. É preciso, pois, conhecer os fatores ecológicos que podem afetar o desempenho e, via de conseqüência, adotar práticas de manejo adequadas para favorecer a sua permanência e atividade no ambiente.

2.4.2 Seleção de microrganismos antagonistas

Os testes de seleção de microrganismos com potencial antagonista podem ser realizados in vitro e in vivo. Neste caso, em condições controladas ou em condições naturais. Ambos os métodos são complementares.

A seleção de microrganismo in vivo é realizada através da aplicação do antagonista, seguida da inoculação do patógeno no hospedeiro por meio de pulverização de suspensão de células, imersão de raízes, ferimentos, dentre outros.

Os principais métodos de seleção de microrganismos in vitro descritos são: pareamento de culturas, papel celofane, placa sobreposta, camada dupla, líquido metabólico, entre outros.

2.4.3 Utilização de fungos no Controle Biológico de Doenças:

Controle biológico visa manter, através de certas práticas, um equilíbrio no agroecossistema, de modo que o hospedeiro, na presença do patógeno, não sofra danos significativos, em função da ação controladora dos organismos não patogênicos do sistema.

Na abordagem de controle biológico, doença é mais do que uma íntima interação do patógeno com o hospedeiro influenciada pelo ambiente. É o resultado de uma interação entre hospedeiro, patógeno e uma variedade de não-patógenos que também repousam no sítio de infecção e que apresentam potencial para limitar ou aumentar a atividade do patógeno, ou a resistência do hospedeiro. Portanto, patógeno, hospedeiro e antagonistas, interagindo num sistema biológico, são os fatores componentes do controle biológico.

O controle biológico é a “redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno ou parasita nos seus estados de atividade ou dormência, por um ou mais organismos, realizado naturalmente ou através da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas”.

Outra definição de controle biológico é, “Controle de um microrganismo por outro microrganismo”.

Por esses conceitos, o controle biológico inclui práticas culturais para criar um ambiente favorável aos antagonistas e à resistência da planta hospedeira ou ambas; melhoramento da planta para aumentar a resistência ao patógeno ou adequar o hospedeiro para as atividades antagônicas de microrganismos; introdução em massa de antagonistas, linhagens não patogênicas ou outros organismos ou agentes benéficos.

2.4.4 Interações entre Patógeno, Hospedeiro e Antagonistas

Interação com o Ambiente : O ambiente é composto de vários fatores (solo, temperatura, potencial hídrico, ph) que devem estar relacionados entre si e com os organismos habitantes do sistema. A interação entre antagonista, hospedeiro e patógeno não ocorre de maneira particular , mas mutuamente. A ocorrência de

doenças em plantas indica que muitos aspectos do balanço biológico não está em equilíbrio. O desenvolvimento de doenças em plantas ocorre quando uma ou mais das seguintes condições ocorrem:

O patógeno é altamente virulento, a densidade do inóculo é maior e não há um equilíbrio com o antagonista. O ambiente abiótico é especialmente favorável ao patógeno, e desfavorável ao hospedeiro ou antagonista, ou ambos. A planta hospedeira é altamente suscetível, crescendo continuamente e extensivamente.

Os antagonistas estão ausentes ou em baixa população, há falta de nutrientes e ambiente próprio para a função do antagonista, os antagonistas são inibidos por outros microrganismos, ou a produção de antibióticos é absorvido pelo solo ou inativado por outros microrganismos.

2.4.5 Interações entre o antagonista, patógeno e hospedeiro:

Perda por doenças severas - Produção moderadamente suscetível, bem adaptado ao ambiente; patógeno bem adaptado, antagonista não tão bem adaptado e ineficiente.

Perda por doenças leves - Produção suscetível bem adaptada ao ambiente; patógeno pobremente adaptado, antagonista moderadamente adaptado e completamente eficiente.

Quando não há perda por doenças - Controle Biológico. Produção suscetível, antagonista e patógeno bem adaptado ao ambiente. O antagonista reprime o patógeno.

Quando não há perda por doenças - Produção resistente, antagonista e patógeno bem adaptado ao ambiente. Hospedeiro resistente, prevenido de doenças.

3. Material e Métodos

3.1 Material Biológico

Foram reativadas 11 linhagens endofíticas de *Trichoderma* spp obtidas de plantas tropicas (*P. cupana* Kunth var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, *Dipteryx odorata*, *Theobroma grandiflorum* e *Bactris gasipaes* Kunth), que se encontram armazenadas,

em frascos de penicilina pelo método de Castelani, no laboratório de Genética de Microrganismos (LAGEM). Para reativá-las, foram cultivadas em placas com meio BDA (Batata, Dextrose e Agar).

3.2. Atividade Enzimática

Das 11 linhagens que foram reativadas foram utilizadas quatro linhagens de *Trichoderma* spp, (D* (MC); DC3; DC1 e SR1 MD), para um teste de atividade enzimática. Após crescimento em meio BDA por 24 horas a 28 °C, as linhagens foram transferidas para placas de Petri contendo meio específico (amido). Após crescimento 24 horas a 28 °C as placas de Petri foram coradas utilizando o vapor de iodo resublimado para verificação do halo de degradação.

3.3 Inoculação para antibiose

As linhagens foram cultivadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA com temperatura controlada em câmara incubadora a 28 °C. Após cinco dias de cultivo os discos da cultura foram utilizados para o teste de antagonismo.

3.4 Teste de Antagonismo em Confrontação Direta

Linhagens de *Trichoderma* spp. foram testadas contra o fungo fitopatógeno *C. guaranicola*. Discos de ágar contendo micélio e conídios de fitopatógenos foram colocados em placas de Petri (90 mm), contendo meio de BDA, a uma distância de aproximadamente 1,0 da borda. As culturas foram incubadas por sete dias (em temperatura ambiente, na ausência de luz). Linhagens de *Trichoderma* spp. foram repicadas nas placas de Petri, em posição oposta à colônia do fitopatógeno. As colônias foram incubadas durante cinco dias, em temperatura ambiente e em fotoperíodo de 12 horas. O potencial de antagonismo das linhagens foram avaliadas três dias após a transferência dos organismos, adaptando-se a metodologia proposta por Bell et al (1982), que estabelece o grau de antagonismo, por meio da divisão de cinco classes de notas: Nota 1: Antagonista cobrindo totalidade da superfície da placa. Nota 2: Antagonista cobrindo pelo menos 2/3 da superfície. Nota 3: Antagonista cobrindo pelo menos 50% da superfície. Nota 4: Patógeno cobrindo ao menos 2/3 da

superfície. Nota 5: Patógeno cobrindo a totalidade da superfície, anulando o antagonista.

3.5 Avaliação da produção de metabólitos não voláteis pelos antagonistas

A Avaliação será feita pelo Método do papel celofane descrito por Gibbs (1967), IN: Mariano (1993): Transferência de um disco de crescimento do antagonista para o centro de placas de Petri contendo meio BDA, sobreposto por papel celofane lavado e esterilizados, que será utilizado para avaliar a produção de metabólitos voláteis. Serão selecionadas linhagens de *Trichoderma* spp e *C. guaranicola*. Após sete dias da transferência do antagonista para a superfície do papel celofane, será retirado este papel com o crescimento aderente e será transferido um disco de meio BDA com o patógeno para o centro da placa. A avaliação será feita sete dias após a repicagem, onde será medido os diâmetros das colônias do patógeno em contato com os metabólitos produzidos pelos antagonistas, comparando-se com a testemunha. Quando a testemunha atingir a extremidade da placa, será medido o crescimento micelial e será calculado a percentagem de inibição.

3.6 Avaliação da produção e metabólitos voláteis pelos antagonistas

Em uma placa de Petri, contendo BDA, será colocado um disco de cultura do patógeno e em outra será colocado um disco de cultura do antagonista. A placa com o patógeno será sobreposta à placa com o antagonista e estas serão envolvidas por filme plástico. A incubação ocorrerá em temperatura ambiente e a avaliação será realizada 11 dias após a montagem do experimento, por meio da medição dos diâmetros das colônias do patógeno, comparando-os com a testemunha. No caso da testemunha, a placa com o patógeno em cima da outra placa contendo somente meio BDA.

4.Resultados

4.1 Linhagens Reativadas.

Foram reativadas 11 linhagens de *Trychoderma* spp que estão discriminadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Linhagens de *Trychoderma* spp que foram reativadas.

Linhagens <i>Trychoderma</i> spp	Hospedeiro
DC1	<i>Dipterix odorata</i> (Cumaru)
DC3	<i>Dipterix odorata</i> (Cumaru)
D822	<i>Dipterix odorata</i> (Cumaru)
D102 (PM)	<i>Dipterix odorata</i> (Cumaru)
DW (MC)	<i>Dipterix odorata</i> (Cumaru)
D* (MC)	<i>Dipterix odorata</i> (Cumaru)
SR1 M D	<i>Dipterix odorata</i> (Cumaru)
SR1 M E	<i>Dipterix odorata</i> (Cumaru)
D51	<i>Dipterix odorata</i> (Cumaru)
D1	<i>Dipterix odorata</i> (Cumaru)
D51E	<i>Dipterix odorata</i> (Cumaru)

4.2. Atividade Enzimática

Das quatro linhagens testadas de *Trychoderma* spp, para a produção de enzimas hidrolíticas (amilase) todas produziram atividade enzimática. Como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Teste para a Atividade Enzimática (Amilase) para quatro linhagens de *Trychoderma* spp.

Linhagens <i>Trychoderma</i> spp	Atividade Enzimática (Amilase)
DC1	+
DC3	+
D* (MC)	+
SR1 M D	+

4.3 Teste de Antagonismo em Confrontação Direta

Para o teste de Antagonismo foram utilizadas onze linhagens de *Trichoderma* spp denominadas DC1; DW (MC); DC3; D* (MC); SR1 M D; SR1 M E; D822; D102 (PM); D1; D51 e D51E em confrontação direta com uma linhagem endofítica de *Colletotrichum guaranicola* (2GM11 2.3/3) e outra patogênica (GM59-1/1b M2).

Fragmentos circulares de micélios foram retirados das linhagens de *Colletotrichum guaranicola* e colocados nas placas contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar) para inoculação e sendo observados por três dias. A seguir, fragmentos circulares de micélios do *Trichoderma* spp. também foram retirados e colocados nas placas junto ao *Colletotrichum guaranicola* e observados por até dez dias a uma temperatura de 28°C. Foi relatado que todas as linhagens de *Trichoderma* spp. se mostraram antagônicas ao endófito *Colletotrichum guaranicola*, porém dentre essas onze linhagens, apenas três (DC1; D1 e DC3) não apresentaram antagonismo ao patógeno *Colletotrichum guaranicola*.

É importante salientar que a linhagem de *C. guaranicola* está sendo testada para verificação de sua Patogenicidade por meio do Postulado de Henle-Koch, mais conhecido como Postulado de Koch. Inicialmente a linhagem foi borrifada em uma planta de fácil crescimento, e o resultado foi satisfatório. A partir de fevereiro será montado novo experimento utilizando mudas de *Paullinia cupana* (Guranazeiro).

<i>Trichoderma</i> spp.	<i>C. guaranicola</i> (endófito)	<i>C. guaranicola</i> (patógeno)
DC1	+	-
DC3	+	-
DW (MC)	+	+
D1	+	-
D822	+	+
D102 (PM)	+	+
D51E	+	+
D51	+	+
D* (MC)	+	+
SR1 M D	+	+
SR1 M E	+	+

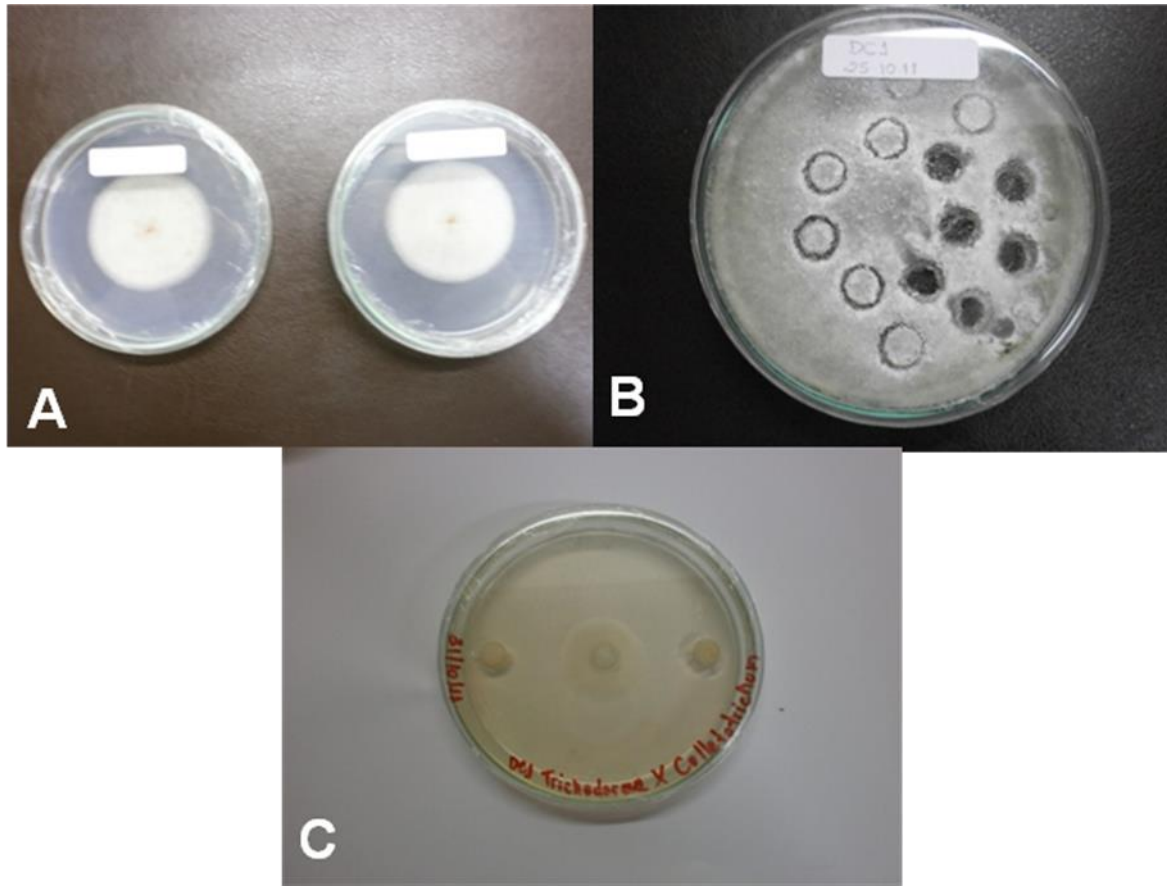


Figura 1 – **A)** Linhagens de *C. guaranicola* (2GM11 2.3/3 e GM50-1/1b M2) em meio BDA; **B)** Padronização dos blocos para que as quantidades retiradas dos fungos fossem iguais **C)** – Confrontação entre os microrganismos (ao centro *C. guaranicola* (2GM11 2.3/3 e GM59-1/1b M2) e paralelamente *Trychoderma* spp (DC1)

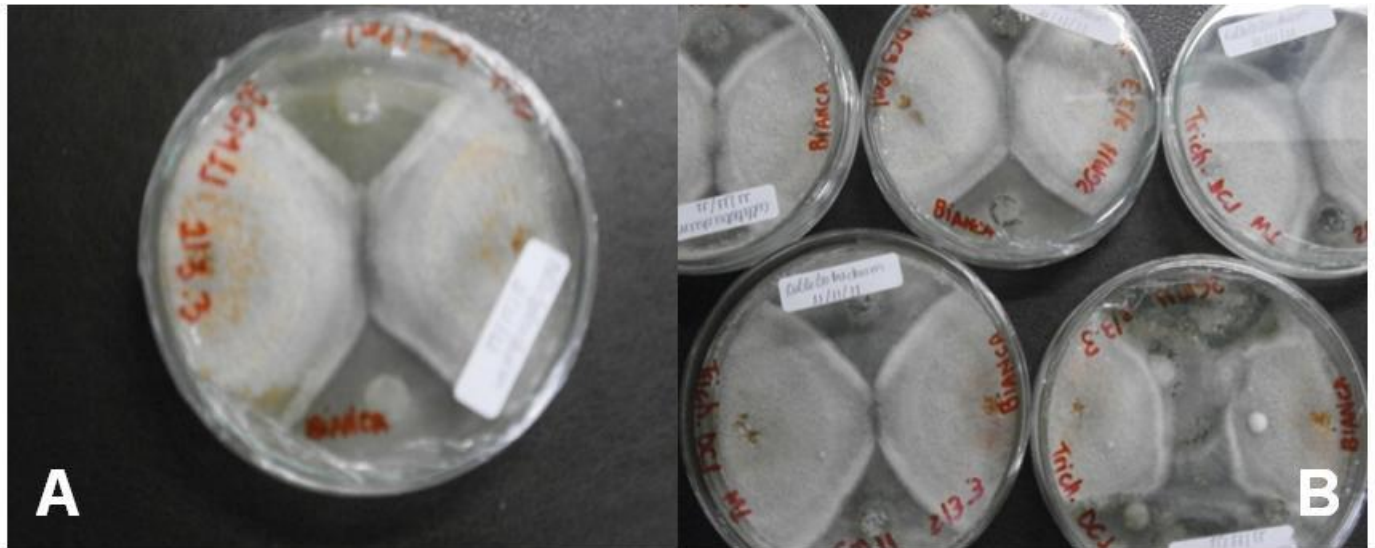


Figura 2 – A – Linhagens de *C. guaranicola* e *Trichoderma spp.* com 10 dias de cultivo .**B –** Teste de Antagonismo em Confrontação Direta

Observações: A linhagem de *Colletotrichum guaranicola* foi colocada na placa para crescer e só a partir do terceiro dia que o *Trichoderma* foi colocado a placa, devido o seu crescimento ser mais rápido que o do patógeno. Até a análise final, as placas ficaram sendo observadas durante 10 dias, onde os resultados foram positivos no teste de antagonismo. As placas onde foram colocadas as linhagens para o teste de antagonismo continham meio BDA (Batata, Dextrose e Agar). As quantidades retiradas de cada linhagem, foram padronizadas com tubos pequenos com 1 cm de diâmetro e as linhagens foram colocadas na placa à 1 cm da borda.

5 Referências Bibliográficas

ALVES, S. B., Ed. Controle microbiano de insetos. Piracicaba, **FEALQ**, 1998. 1163p.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR. W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal Biotechnology* [online]. April 15th. (<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol3/issue1/full/4/index.html>). ISSN 0717-3458, 2000.

AZEVEDO, A. C. S.; SOSA-GO'MEZ, D. R.; FARIA, M. R.; FUNGARO, M. H. P. Effects of double-stranded RNA on virulence of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the silverleaf whitefly, *Bemisa tabaci* strain b (Homoptera: Aleyrodidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.23, p. 61-63, 2000.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and Applications of Endophytic Fungi Isolated from Tropical Plants. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. (Ed). **Fungi: Multifaceted Microbes**, New Delhi: Anamaya Publishers, 2006.

BAKER, K. F.; COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens** . San Francisco: W. H. Freeman, 1974. 433p.

BASTOS, C. N. Mycoparasitic nature of the antagonism between *Trichoderma viride* and *Crinipelis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, p. 50-54, 1996.

BETTIOL, W. Componentes do Controle biológico de doenças de plantas. In: **Controle biológico de doenças de plantas** . Bettiol, W. (Org.) Jaguariúna: Embrapa-Cnpda, 1991a. 338p. (Embrapa-Cnpda. Documentos, 15).

BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plants pathogens. **Phytopathology**, v.72, p.379-283, 1982.

CARDOSO, E. J. B. N. Relações ecológicas entre microorganismos. In: **Manual de Fitopatologia**, v. 1. GALLI, F. São Paulo, SP, Editora Agronômica Ceres LTDA. 1978. 373 p.

CASTELANI, A. Viability of mold culture of fungi in destied water. **J. Trop. Med. Hyg.** v.42, p. 225. 1939.

CAMPOROTA, P. (1985). Antagonisme in vitro de *Trichoderma* spp vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* Khun. **Agronomie** 5,613-620.

CLAY, K.; MARKS, S.; CHEPLICK, G. P. Effects of insect herbivory and fungal endophyte infection on competitive interations among grasses. **Ecology, Brooklin**, v.74, p. 1767-1777.

DENNIS, C. J.; WEBSTER, J. Antagonism properties of species-groups os *Trichoderma*, II. Hypal interaction. **Transactions of British Mycological Society**, v.57, p. 363-369, 1971a.

ELAD, Y. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited iseases **European Journal Plant Pathology**, v.102, p. 719-732, 1996.

FRIGHETTO, R. T. S. Análise da biomassa microbiana em carbon método de fumigação extração **IN: FRIGHETTO, R. T. S. e VALARINI, P. J. coords. Indicadores biológicos e bioquímicos da qualidade do solo. Jaguariúna, EMBRAPA, p. 157-166, 2000.**

GRIGOLETTI Jr, A.; Santos, A. F. dos.; Auer, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. In: **Floresta**, v. 30. Edição especial. 2000. 200 p.

HANDELSMAN, J. e STABB, E. V. The Plant Cell, vol, 8, 1855-1869, October. American Society of Plant Physiologists, 1996.

KRUGNER, T. L.; BACCHI, LMA. Fungos, **In:** BERGAMIN FILHO, A; KIMATI, H AMORIN, L (Eds). **Manual de Fitopatologia**. Volume I. Princípios e Conceitos. São Paulo, SP. p. 46-95, 1995.

JEFFRIES, P.; YOUNG, T. W. K. Interfungal parasitic relationships. **Cambridge: University Press**, 296p. 1994.

MARIANO, R. DE R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **In: Revisão anual de patologia de plantas** . LUZ, W.C. (Ed.) Passo Fundo, RS, Gráfica Editora Pe. Berthier, 1993. 416 p.

MELO, I. S. de, AZEVEDO, J. L. de, ed. **Controle biológico**: v. 1. Jaguariúna, SP, Embrapa, 1998. 262p.

MELO, I. S. de. *Trichoderma* e *Gliocladium* como Bioprotetores de plantas. **In: Revisão anual de patologia de plantas**. LUZ, W. C. (Ed.) Passo Fundo, RS, Gráfica Editora Pe. Berthier, 1996. 415 p.

MELO, I. S. Agentes microbiano de controle de fungos fitopatogênico. **In:** Melo, I. S.; Azevedo, J. L. (Coord). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa, cap.1, v.1, p. 17-67, 1998.

PEIXOTO-NETO et. al., 2002. **Microrganismos endofíticos. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, nº 29. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio29/micro.asp> Acessado em 14/04/2008.

PEIXOTO NETO, P. A de S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. de Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 62-77, 2002.

PILLAY, V.J. and J. NOWAK. 1997. Inoculum density, temperature and genotype effects on *in vitro* growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. **Can. J. Microbiol.** 43, 354-361.

SOUZA, A. Q. L. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Lich e *Stychnos cogens* Benth. 2004.

STURTZ, A. V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.175, p. 257-263, 1995.

ZAMBOLIN, L.; VALE, F. X. R.; SILVA, M. B. Curso de proteção de plantas: controle de doenças de plantas, principais fungicidas sistêmicos. Brasília: **ABEAS**, 1998.

6. Cronograma de Atividades

Nº	Descrição	Ago 2011	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2012	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Revisão de Literatura	X	X	X							X	X	X
2	Reativar as Linhagens de <i>Trichoderma</i> spp e <i>Colletotrychum guaranicola</i>	X	X	X									
3	Inoculação para o teste de antibiose			X	X	X							
4	Teste de Antagonismo em Confrontação Direta				X	X	X						
5	Avaliação da produção de metabólitos não voláteis pelos antagonistas					X	X	X					
6	Avaliação da produção de metabólitos voláteis pelos antagonistas							X	X	X			
7	Elaboração do Resumo e Relatório Final										X	X	X
8	Preparação da Apresentação Final para o Congresso											X	X