



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**GUILHERME MATEUS DE ANDRADE**

**POTENCIAL CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS POR**  
***Trichoderma harzianum* P49P11**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Sanchez Farinas**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava**

**Bolsista CAPES - 1725407**

**SÃO CARLOS-SP**

**AGOSTO de 2019**



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

---

## Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Guilherme Mateus de Andrade, realizada em 30/08/2019:

---

Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas  
EMBRAPA

---

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza  
UFSCar

---

Prof. Dr. Rodrigo Klaic  
UFSCar

“Every living being is an engine geared to the wheelwork of the universe. Though seemingly affected only by its immediate surrounding, the sphere of external influence extends to infinite distance.”

Nikola Tesla

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Sanchez Farinas pela oportunidade de desenvolvimento do projeto de Mestrado e auxílio prestado quanto ao desenvolvimento quanto profissional.

Ao Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava por permitir o uso do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB).

Aos Técnicos Dr. Paulo Henrique Marques de Andrade e Carlos Alberto Soares pelo auxílio prestado dentro de laboratório.

Aos doutores Rodrigo Klaic e Felipe de Paula Nogueira Cruz pela ajuda oferecida durante a realização e planejamento do projeto.

Gostaria de agradecer ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos (PPG-Biotec) pela oportunidade de ter desenvolvido um Mestrado tendo como base excelentes professores e pesquisadores.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro a partir do da bolsa CAPES de número 1725407.

À minha família por estar sempre presente com sua amizade e seu calor, tornando qualquer lugar que eu vá em sua companhia, minha casa.

Aos meus amigos por proporcionarem os risos e conselhos nos momentos que precisei.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 0001.

## RESUMO

O estudo de novos microrganismos controladores biológicos visa suprir a necessidade de produtos mais específicos e com capacidade de atuar sobre uma praga ou fitopatologia de forma a controlá-la, diminuindo os impactos econômicos e ambientais causados pelos agroquímicos. A cepa de *Trichoderma harzianum* P49P11, isolada de solo amazônico, teve seu potencial enzimático avaliado em processos envolvendo a degradação de biomassa, além disto, é de conhecimento que a espécie possui a capacidade de produzir compostos bioativos e ter caráter controlador de outros microrganismos. Desta forma, o estudo objetivou a identificação do caráter controlador de fitopatógenos pela cepa *T. harzianum* P49P11. Enzimas líticas foram avaliadas cultivando a cepa em 6 diferentes meios seletivos por 3 dias sob temperatura de 28°C, após este período apresentaram crescimento, caracterizando a produção enzimática, entretanto não houve formação de halo enzimático para quantificação da atividade enzimática. Em meio Batata Dextrose Ágar, o co-cultivo do Agente Controlador Biológico frente à 17 fitopatógenos, resultou na inibição de mais de 50% para as cepas *Colletotrichum* sp. FP9 (65,7%), *Fusarium oxysporum* feijão FP11 (55,8%), *Phytophthora sojae* FP13 (75%) e *Lasiodiplodia eumorhizicola* FP16 (56,3%), destacando a inibição da cepa FP13 que foi a segunda cepa mais inibida pelo ACB durante o trabalho. O co-cultivo em meio Czapek, proporcionou a inibição das cepas *Fusarium oxysporum* ATCC 2163 FP4 (51,7%), *Alternaria alternata* FP7 (52,1%), *Fusarium proliferatum* FP8 (51,8%), *Fusarium oxysporum* feijão FP11 (52,2%), *Phytophthora sojae* FP13 (54,5%) e *Rhizopus microsporus* FP14 (83,3%). Podendo destacar a ação inibitória do ACB sobre a cepa FP 14 que alcançou a maior inibição durante o trabalho, entretanto, esta característica pode ter ocorrido pela deficiência em adaptação da cepa de fitopatógeno ao meio Czapek. Para a avaliação do extrato MeOH/EtOAc, a cepa P49P11 foi cultivada em meio Batata Dextrose líquido por 7 dias, sob temperatura de 28°C, pH 5 e agitação de 120 rpm, para obtenção de caldo fermentativo. Decorrido este tempo de cultivo, o caldo foi centrifugado sob 10.000 rpm e o sobrenadante foi coletado para extração. Resina Amberlite® XAD-16 foi utilizada para a extração dos compostos com possível capacidade bioativa do caldo fermentativo, sendo o extrato eluído em MeOH/EtOAc 1:1 para avaliação da inibição. O extrato não apresentou resultados expressivos contra as cepas de fitopatógenos responsivas ao teste anterior. Entretanto, o potencial controlador da cepa de *T. harzianum* P49P11 é destacável para as cepas FP 14 e FP 13, sendo a cepa de *Phytophthora sojae* candidata para testes futuros com a cepa de ACB.

**Palavra-chave:** Biocontrole; Extrato; Enzimas; Antagonismo; *Phytophthora sojae*.

## ABSTRACT

The study of new biological control microorganisms aims to obtain a product with a specific action and with greater capacity to control plant diseases and the pests, but that lowers the economic and environmental impacts caused by pesticides. The *Trichoderma harzianum* P49P11 strain, isolated from Amazonian soil, had its enzymatic potential evaluated in biomass degradation processes, it is well known that genus can generate bioactive compounds and controlling characters of other microorganisms. Thus, the study aimed to identify the biological control of phytopathogen by *T. harzianum* P49P11 strain. Lytic enzymes were evaluated by cultivating the strain in 6 different selective media for 3 days at 28°C, after this period showed growth, characterizing the enzymatic production, however there was no formation of enzymatic halo to quantify the enzymatic activity. In Potato Dextrose Agar medium, the Biological Control Agent Co-cultivated against 17 phytopathogens, presented an inhibition of 50% for *Colletotrichum* sp. FP9 (65.7%), *Fusarium oxysporum* bean FP11 (55.8%), *Phytophthora sojae* FP13 (75%) and *Lasioidiplodia eufhorbicola* FP16 (56.3%), highlighting the inhibition of the FP13 strain (75%) by the ACB during work, characterizing the second most inhibited phytopathogen in this work. Co-cultivation in Czapek medium inhibited the *Fusarium oxysporum* ATTCC 2163 FP4 (51.7%), *Alternaria alternata* FP7 (52.1%), *Fusarium proliferatum* FP8 (51.8%) and *Fusarium oxysporum* bean FP11 (51.7%), *Phytophthora sojae* FP13 (54.5%) and *Rhizopus microsporus* FP14 (83.3%). Highlighting the inhibitory action of ACB on the FP 14 strain that reached the highest inhibition during the work, however, may have occurred during the adaptation of the phytopathogen strain to the Czapek medium. For MeOH/EtOAc extraction, the P49P11 strain was grown in Potato Dextrose liquid medium for 7 days at 28 ° C, pH 5 and stirring at 120 rpm to obtain fermentation broth. After this cultivation time, the broth was centrifuged under 10,000 rpm and the supernatant was collected for extraction. Amberlite® XAD-16 resin was used for the extraction of the possibly bioactive compounds in the fermentation broth, the extract being eluted with 1: 1 MeOH/EtOAc for evaluation of inhibition. The phytopathogens inhibited in the previous tests were not responsive to the extract. However, the performance of the controlling strain *T. harzianum* P49P11 is highlighted for strains FP 14 and FP 13, being a candidate strain of *Phytophthora sojae* and for future testing with the ACB strain.

**Key-words:** Biocontrol; Extract; Enzymes; Antagonism; *Phytophthora sojae*.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

%I: Índice de Antagonismo  
ACB: Agente Controlador Biológico  
BDA: Batata Dextrose Ágar  
FP: Fitopatógeno  
MIP: Manejo Integrado de Pragas  
Mt: Mega tonelada

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Fitopatógenos e Patógenos avaliados. ....	25
Tabela 2 - Teste de antagonismo in vitro de <i>Trichoderma harzianum</i> P49P11 contra fitopatógenos após 7 dias de cultivo a 28°C. ...	34
Tabela 3 - Teste de antagonismo in vitro de extrato <i>Trichoderma harzianum</i> P49P11 contra fitopatógenos após 7 dias de cultivo a 28°C. ....	40



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Pilares componentes do Manejo Integrado de Pragas (AEAGRO, 2018).....	6
Figura 2 – Formação de escleródios sob tecido da cultivar de soja (PELTIER <i>et al.</i> , 2012).....	9
Figura 3 – Perda de dominância apical em cupuaçuzeiro causada por <i>M. perniciosa</i> (AGRONOMICABR, 2017).....	10
Figura 4 – Ferrugem em folhas e podridão vermelha em raízes de soja ambas causadas por <i>Fusarium</i> (AGROLINK, 2019).....	11
Figura 5 – Presença de Verrugose causada por <i>Sphaceloma</i> sp. em limão (AGROLINK, 2019).....	12
Figura 6 – Apodrecimento em tubérculos causado por <i>C. paradoxa</i> . (AGROFIT, 2019). ....	12
Figura 7 – Mancha de alternaria em folhas de fumo (EPHYTIA, 2019). ....	14
Figura 8 – Antracnose causada por <i>Colletotrichum</i> sp. em maçã (KOCZOR, 2018).....	15
Figura 9 – Podridão de Fitóftora em caule de soja (MUELLER, 2018). ....	16
Figura 10 – Podridão causada por <i>Rhizopus microsporus</i> em flor de girassol (SCHWARTZ, 2019).....	17
Figura 11 – Propagação de <i>Lasiodiplodia</i> sp. sobre a superfície do fruto de mamão (WIKIWAND, 2019). ....	18
Figura 12 – Descrição do Halo de Degradação .....	27
Figura 13 – Raios referentes ao cálculo do índice de inibição (%I), sendo mostrado rm na placa teste com a cepa de <i>Trichoderma harzianum</i> P49P11 a esquerda e a cepa de fitopatógeno a direita, na primeira placa e na segunda placa o controle para o fitopatógeno com os raios RM.....	28
Figura 14 – Crescimento e esporulação da cepa de <i>T. harzianum</i> 49P11 nos meios Saboroud Acumedia (A), BDA Acumedia® (B), BDA Kasvi® (C), Czapek (D), BDA Kasvi® 10% (E) e Ágar Água Kasvi® (F). ....	31
Figura 15 – Formação de exsudatos verde escuro nas extremidades e amarelamento do meio na parte central. ....	32
Figura 16 – Antagonismo por <i>T. harzianum</i> P49P11 em BDA. A. placa controle <i>T. harzianum</i> P49P11 (Th); B. placa controle <i>Colletotrichum</i> sp. (FP 09); Bb. placas de co-cultivo Th/FP 09; C. placa controle <i>Fusarium oxysporum</i> feijão (FP 11); Cc. placas de co-cultivo Th/FP 11; D. placa controle <i>Phytophthora sojae</i> (FP 13); Dd. placas de co-cultivo Th/FP 13; E. placa controle <i>Lasiodiplodia euphorbicola</i> BOT93 (FP 16); Ee. placa de co-cultivo Th/FP 16.....	35
Figura 17 – Antagonismo por <i>T. harzianum</i> P49P11 em Czapek. A. placa controle <i>T. harzianum</i> P49P11 (Th); B. placa controle <i>Fusarium oxysporum</i> ATCC 2163 (FP 04); Bb. placas de co-cultivo Th/FP 04; C. placa controle <i>Alternaria alternata</i> (FP 07); Cc. placas de co-cultivo Th/FP 07; D. placa controle <i>Fusarium proliferatum</i> (FP 08); Dd. placas de co-cultivo Th/FP 08; E. placa controle <i>Fusarium oxysporum</i> feijão (FP 11); Ee. placas de co-cultivo Th/FP 11; F. placa controle <i>Phytophthora sojae</i> (FP 13); Ff. placas de co-cultivo Th/FP 13; G. placa controle <i>Rhizopus microsporus</i> (FP 14); Gg. placas de co-cultivo Th/FP 14. ....	36
Figura 18 – Teste de Antagonismo com extrato bioativo de <i>T. harzianum</i> P49P11. (A) placas teste FP 05; (B) placas teste FP 07; (D) placas teste FP 08; (D) placas teste FP 13; (a) extrato bioativo; (b) controle positivo benlate; (c) controle negativo fitopatógeno.....	39
Figura 19 – Teste enzimático em diferentes meios seletivos para atividade proteolítica (A), lipásica (B), esterásica (C), celulásica (D), amilásica (E), pectinolítica pH 8,0 (F) e pectinolítica pH 5,0 (G).....	59
Figura 20 – Teste de Antagonismo em meio BDA por <i>Trichodemra harzianum</i> cepa P49P11 sobre fitopatógenos durante 7 dias, sob temperatura de 28°C. ....	59
Figura 21 – Teste de Antagonismo em meio Czapek por <i>Trichodemra harzianum</i> cepa P49P11 sobre fitopatógenos durante 7 dias, sob temperatura de 28°C. ....	62
Figura 22 – Teste de Antagonismo com extrato bioativo de <i>T. harzianum</i> P49P11. (A) placas teste FP 04; (B) placas teste FP 09; (D) placas teste FP 10; (D) placas teste FP 11; (a) extrato bioativo; (b) controle positivo benlate; (c) controle negativo fitopatógeno.....	64

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>3</b>
2.1	Objetivo Geral .....	3
2.1	Objetivos Específicos .....	3
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
3.1	Cenário Agrícola e o Consumo de Agroquímicos .....	4
3.2	Manejo Integrado de Pragas .....	6
3.3	Controle Biológico .....	7
3.4	Fitopatógenos e Doenças de Interesse Agrícola .....	8
3.4.1	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	8
3.4.2	<i>Moniliophthora perniciosa</i> .....	9
3.4.3	<i>Fusarium</i> spp. ....	10
3.4.4	<i>Sphaceloma</i> sp. ....	11
3.4.5	<i>Ceratocystes paradoxa</i> .....	12
3.4.6	<i>Alteranaria alternata</i> .....	13
3.4.7	<i>Colletotrichum</i> sp. ....	14
3.4.8	<i>Phytophthora sojae</i> .....	15
3.4.9	<i>Rhizopus microsporus</i> .....	16
3.4.10	<i>Lasiodiplodia</i> spp. ....	17
3.5	Mecanismos do Controle Biológico .....	18
3.5.1	Competição .....	19
3.5.2	Antibiose .....	19
3.5.3	Parasitismo e Predação .....	19
3.5.4	Indução de Resistência ao Tecido Hospedeiro .....	20
3.6	Microrganismos Biocontroladores .....	21
3.6.1	Microrganismos Biocontroladores de Insetos Praga .....	21
3.6.2	Microrganismos Biocontroladores de Nematoides .....	22
3.6.3	Microrganismos Biocontroladores de Patógenos .....	22
3.7	<i>Trichoderma harzianum</i> .....	23
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
4.1	Reativação e Conservação das Cepas .....	25
4.2	Teste de Crescimento e Esporulação .....	26
4.3	Testes Enzimáticos .....	26
4.4	Teste de Antagonismo com Fitopatógenos .....	28
4.5	Produção de Extrato de <i>Trichoderma harzianum</i> P49P11 .....	29
4.6	Antagonismo por Extrato de <i>T. harzianum</i> P49P11 Contra Fitopatógenos .....	30
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
5.1	Crescimento e Esporulação .....	31
5.2	Testes Enzimáticos .....	33
5.3	Teste de Antagonismo .....	33
5.4	Teste de Antagonismo com Extrato de <i>T. harzianum</i> P49P11 .....	38
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>41</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>Apêndice .....</b>	<b>59</b>
7.1	Apêndice A .....	59
7.2	Apêndice B .....	59
7.3	Apêndice C .....	61
7.4	Apêndice D .....	64

## 1 INTRODUÇÃO

A população mundial está se aproximando de 8 bilhões de pessoas, e com isso a demanda por alimentos e recursos energéticos proveniente de plantas e culturas agrícolas também está crescendo a ano. Estudos tem mostrado que nos próximos 30 anos a demanda global por alimentos deverá crescer em torno de 100% em relação ao ano de 2005 (Tilman et al. 2011). Entretanto, mesmo com os avanços científicos e tecnológicos para reduzir a incidência e a severidade de doenças no campo causada principalmente por insetos praga e fitopatógenos, grande parte da produção agrícola é perdida anualmente (Savary et al., 2019) o que reflete a falta de abordagens adequadas de manejo. O uso exacerbado de agroquímicos para conter a ação de diversas pragas e patógenos de plantas podem causar problemas ambientais e comprometem a qualidade dos alimentos. Nesse sentido, o controle biológico é apresentado como uma alternativa, permitindo aumento de produtividade ao mesmo tempo em que reduzimos os impactos negativos no meio ambiente causados pelos produtos químicos aplicado ao campo e não apresentam risco a saúde do ser humano (PIRES *et al.*, 2016; HAHN, 2014; RIGOTTO *et al.*, 2014).

Atualmente, cerca de 272 empresas produzem controladores biológicos no mundo (IBMA, 2019), destas, estão registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) 31 empresas cuja atividade está voltada para a produção de inoculantes (BRASIL - MAPA, 2019 a), o que colaborou para o Brasil se tornar líder mundial em utilização de inoculantes (ANPII, 2017) e demonstrou a crescente confiança e resultados expressivos em novas pesquisas na identificação de novos agentes. No ano de 2018 a 2019, o mercado de produtos biológicos para o controle de pragas e doenças agrícolas cresceu mais de 70%, tendo R\$464,5 milhões movimentados em contraste ao valor de R\$262,4 milhões em 2017 (BRASIL - MAPA, 2019 b).

Dentre os organismos comercializados com capacidade controladora de pragas e doenças, a espécie *Trichoderma harzianum* é empregada e pesquisada por possuir em seu leque de atuação a produção de enzimas e metabólitos secundários, dos quais podem vir a serem utilizados como essências, antibióticos e promotores de crescimento em plantas (FRACETO *et al.*, 2018; LEELAVATHI *et al.*, 2014; DELABONA *et al.*, 2012; VINALE *et al.*, 2009; GOKUL *et al.*, 2000). A cepa atua no controle biológico de diversas pragas e doenças, como: *Fusarium graminearum*, *Phytium ultimum*, *Phytophthora capsici*, *Erysiphe flexuosa*, *Meloidogyne javanica*, *Bipolaris oryzae*, *Guinardia*

*citricarpa*, *Macrophomina phaseolina*, entre outros organismos (KABDWAL *et al.*, 2019, OMOMOWO, *et al.*, 2018, UDDIN *et al.*, 2018, LIMA *et al.*, 2017, SARAVANAKUMAR *et al.*, 2017, AL-HAZMI & TARIQJAVEED, 2016, KHALEDI & TAHERI, 2016, KHALILI *et al.*, 2012); além disso, é destacável sua atuação na promoção de crescimento de Tomate, Feijão-de-corda, entre outras plantas (KABDWAL *et al.*, 2019, OMOMOWO, *et al.*, 2018, UDDIN *et al.*, 2018).

A alta diversidade de enzimas e outros compostos que podem ser produzidos por fungos do gênero *Trichoderma*, se deve principalmente pelo fato dos indivíduos estarem inseridos em ambientes edáficos, naturalmente carregados com uma pluralidade de microrganismos, e estarem amplamente distribuídos pelo globo (SANTOS *et al.*, 2012; DENNIS & WEBSTER, 1971 a). A diversidade de organismos em um meio, influencia o estabelecimento de relações interespecíficas, assim, substâncias com atividade antifúngica e antibacteriana e, outros mecanismos de controle, tornam-se necessários para o fungo poder se desenvolver em meios tão competitivos (VINALE *et al.*, 2014; PAPAVIDAS, 1985).

A cepa de *Trichoderma harzianum* P49P11 caracterizada pelo crescimento em diversos meios, teve sua capacidade celulolítica avaliada no trabalho de Delabona e colaboradores (2013 e 2012). Visto sua alta capacidade em produzir complexos enzimáticos e inespecificidade quanto a meio, a cepa torna-se alvo deste estudo para a avaliação de sua capacidade biocontroladora frente a 17 fungos fitopatogênicos, tendo em vista que uma das formas de controle biológico é a produção de enzimas líticas (JAMALIZADEH *et al.*, 2011).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O trabalho teve como objetivo identificar o potencial controlador biológico da cepa de *Trichoderma harzianum* P49P11 frente a microrganismos fitopatogênicos.

### 2.1 Objetivos Específicos

- Investigar o potencial enzimático de enzimas hidrolíticas.
- Avaliar o antagonismo em placa da cepa de *T. harzianum* P49P11 frente a 17 cepas de fitopatógenos.
- Avaliar a inibição proporcionada por metabólitos de *T. harzianum* P49P11 frente as 17 cepas de fitopatógenos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Cenário Agrícola e o Consumo de Agroquímicos

A população mundial chegou a 7,7 bilhões de pessoas em 2019, e a perspectiva é de 9,7 bilhões para o ano de 2050 (UN, 2019). Nesse contexto, o Índice Global de Produtividade Agrícola (GAP – em inglês) estipula que a produtividade de alimentos deva dobrar em relação ao ano de 2004 para garantir o suprimento de alimentos para a população até o ano de 2050. Entretanto, a taxa de crescimento anual na produção de alimentos se encontra abaixo do valor estipulado para cumprir a estimativa, com valor de 1,66% ao ano, enquanto o crescimento ideal seria de 1,75% ao ano. Embora, a taxa global está próxima ao valor ideal, em países subdesenvolvidos a taxa tende a diminuir, o que refletiu 821 milhões de pessoas com alimentação não suficiente para uma vida ativa e saudável no ano de 2017 (FAO - STATISTICS, 2018).

No Brasil, até o período de junho/2019 as exportações por setores do agronegócio chegaram a valores de US\$ 47.687.659.294,00 (BRASIL - MAPA, 2019), sendo parte deste valor obtido através da grande produção de grãos existente no país, principalmente pela produção de soja de 114,843 Mt, responsáveis por tornar o Brasil segundo maior produtor de grãos de soja no mundo ficando atrás apenas para os EUA (123,664 Mt) (EMBRAPA, 2019). A estimativa de produção de grãos para a safra de 2018/19 é de 240,7 milhões de toneladas, demonstrando um crescimento de 5,7% de produção em relação à safra anterior. Este crescimento pode estar vinculado ao aumento de 1,9% previsto para as áreas plantadas em relação à safra de 2017/18 (CONAB, 2019), bem como o aumento da mecanização e aplicação de biotecnologias (MANTOVANI *et al.*, 2019; RADA *et al.*, 2019; OECD – FAO, 2018; FALEMA *et al.*, 2013).

Importando cerca de US\$ 182 bilhões, a União Europeia é o maior importador agrícola mundial, tendo o Brasil posicionado como o seu segundo país fornecedor, representando 17,5% dos valores sobre a exportação de produtos agropecuários brasileiros (BRASIL - MAPA, 2019) tendo destaque aos insumos para ração animal (US\$ 3,4 bilhões), café (US\$ 2,3 bilhões), oleaginosas e grãos (US\$ 2 bilhões), preparações alimentícias vegetais (US\$ 1,3 bilhão) e carnes (US\$ 989 milhões) (BRASIL - ITAMARATY, 2019).

As commodities exportadas pelo Brasil geraram um valor de aproximadamente 101 bilhões de dólares no ano de 2018, tendo crescimento de 27% nestes valores do ano de 2010 para o ano de 2018 (BRASIL - MAPA, 2019 c). Deste valor, mais de 65% das commodities exportadas são correspondentes ao mercado agrícola que, todos os anos vem aumentando a sua produtividade através da implementação de leis, políticas de crédito e inovações nas técnicas de manejo, biotecnologias e, em novos recursos para a mecanização agrícola (CONTINI & JÚNIOR, 2010).

Dentre os fatores responsáveis pelo crescimento da produtividade do setor agrícola brasileiro, o uso de agroquímicos torna-se bastante enfatizado, visto que, o seu uso no mundo foi de cerca de 4 bilhões de toneladas em 2016, crescendo em sua utilização cerca de 6% do ano de 2010 para 2016. Durante este período, o Brasil se destacou por apresentar o 3º maior índice dentre os países que mais consumiram ingredientes ativos pesticidas, tendo tendência a alcançar o primeiro lugar (FAO a, 2019).

Devido a implementação de novas legislações em relação à aprovação de novos agrotóxicos, 169 novos pesticidas foram sancionados em 21 de maio do ano de 2019, dos quais 78 contêm ingredientes ativos classificados como altamente danosos pela Rede de Ação de Pesticidas (PAN – em inglês) e 24 destes são banidos na União Europeia (PAN, 2019). Estas substâncias ativas pesticidas e herbicidas tem período máximo de aprovação de 10 anos no mercado europeu, após este período, devem ser reavaliadas de acordo com as metodologias e legislações vigentes (EU - EUROPA, 2019). No Brasil, os agrotóxicos possuem registro de validação indeterminado, podendo ser cancelados após reavaliação toxicológica, impossibilidade de cumprimento de regulações, constatação de fraude ou caso tenha o alerta de periculosidade por organizações internacionais responsáveis pelo meio ambiente, pela saúde e pela alimentação das quais o Brasil seja membro integrante ou signatário de acordos (BRASIL - ANVISA , 2019; BRASIL - IBAMA, 2019).

O uso de agroquímicos trata-se de uma solução rápida para insetos praga, doenças e ervas daninhas que atingem a lavoura. Porém seu uso é muitas vezes, de forma indiscriminada e, isto caracteriza uma crescente associação à problemas dermatológicos, gastrointestinais, neurológicos, carcinogênicos, respiratórios, reprodutivos e endócrinos (STAMATI *et al.*, 2016; RIGOTTO *et al.*, 2014; ALEWU & NOSIRI, 2011), bem como problemas ambientais como a morte de colônias de abelhas, desregulação hormonal em animais aquáticos, perturbação da cadeia alimentar entre outros (HARSIMRAN & KAUR, 2014). Estes fatores ocorrem principalmente devido a inespecificidade dos

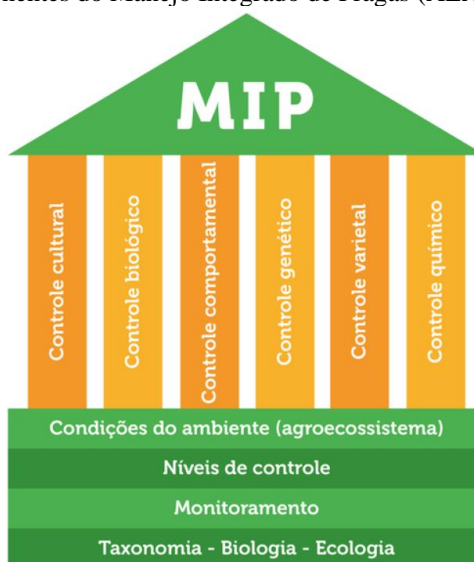
agrotóxicos, estes serem lixiviados para os corpos d'água (PIRES *et al.*, 2016), terem uso incorreto e, também causar pressão de seleção para os organismos, possibilitando o desenvolvimento de resistência (HAHN, 2014).

Devido ao abuso de produtos agroquímicos, houve a necessidade da proposta de uma nova abordagem agrícola que vincularia não somente a preocupação econômica, mas também a preocupação ecológica e social, o Manejo Integrado de Pragas (MIP) (KOOGAN, 1998).

### 3.2 Manejo Integrado de Pragas

A proposta do MIP é o controle populacional de organismos cuja ação traz prejuízos econômicos às atividades de produção. As estratégias utilizadas pelo MIP incluem a utilização de práticas agrícolas, como a rotação de culturas e a utilização de mais de um cultivar; comportamental, através de feromônios; variedades resistentes à praga ou doença; variedades transgênicas, assim como o uso de agroquímicos (**Figura 1**) (LEPPA & WILLIAMS, 1992).

**Figura 1** – Pilares componentes do Manejo Integrado de Pragas (AEAGRO, 2018).



Sendo um dos pilares do MIP, o Controle Biológico é de grande destaque por se tratar de uma alternativa ao uso exacerbado de agroquímicos, visto a utilização de



inimigos naturais e/ ou organismos produtores de substâncias controladoras, tendo atuação mais específica que os compostos pesticidas e herbicidas. Entretanto, para uma melhor atuação no MIP, existe a possibilidade de utilização de agroquímicos, havendo a necessidade de garantir que estes não irão auxiliar no desenvolvimento de organismos resistentes, sendo fundamental a mudança no composto em um determinado período (PARRA, 2014).

### 3.3 Controle Biológico

O termo controle biológico tem sido utilizado em diversos ramos da biologia, mais notavelmente em entomologia e fitopatologia. Em fitopatologia, o termo consiste no uso de antagonistas microbiológicos para a supressão de doenças e controle populacional de ervas-daninhas. Em ambos os campos, o organismo que suprime a praga ou o patógeno em questão, é referido como um Agente de Controle Biológico (ACB). Além disso, o termo controle biológico abrange a aplicação de produtos naturais advindos do uso de extratos ou fermentados de várias fontes. Essas formulações podem ser simples misturas com efeitos específicos ou misturas complexas com múltiplos efeitos no hospedeiro, bem como na praga ou patógeno. (COOK, 1993).

A agência regulatória do governo dos Estados Unidos da América (EUA) *Us Environmental Protection Agency* (EPA) trata os microrganismos ou substâncias que controlam pestes das plantas como “pesticidas microbiológicos ou pesticidas bioquímicos”, sujeitos à regulação da Lei Federal de Inseticidas, Fungicidas, e Rodenticidas (FIFRA – em inglês) ou pela Lei Federal de Alimentos, Drogas, e Cosméticos (FFDCA – em inglês) (EPA, 2018). No Brasil, a Lei nº 7802, de julho de 1989, determina que “produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos”, assim, enquadram os agentes de controle biológico (parasitoides, predadores e nematoides), os agentes microbiológicos (fungos, bactérias e vírus), os semioquímicos, outros bioquímicos, extrato vegetais e minerais, utilizados na agricultura com a finalidade de controlar organismos considerados nocivos; tendo

regulação pelos órgãos Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Anvisa e Ibama (JÚNIOR *et al.*, 2013).

A percepção de que os produtos biológicos são basicamente pesticidas e devem ser registrados como agroquímicos, se deve principalmente ao fato destes serem aplicados diversas vezes quando e onde necessários (COOK, 1991). Entretanto, diferentemente dos agroquímicos, o uso de um controlador biológico sobre uma praga ou doença, pode ser divergente em diferentes culturas e pode variar de acordo com o meio ambiente o qual são submetidos (COOK, 1993).

Mesmo apresentando dificuldades, uso de novos produtos baseados em agentes de biocontrole e/ou em seus metabólitos para controle de doenças e pragas é um dos mais promissores caminhos para a redução da dependência dos agroquímicos na agricultura (CHET & INBAR, 1994). Isso se deve ao fato de que os microrganismos conseguem “entregar” compostos químicos de forma mais econômica, mais específica e em quantidades moleculares mais exatas, contrapondo as aplicações de agroquímicos realizadas por pelo homem que, muitas vezes não são específicas ou muito do material não atinge o alvo (COOK, 1993).

### 3.4 Fitopatógenos e Doenças de Interesse Agrícola

#### 3.4.1 *Sclerotinia sclerotiorum*

Popularmente conhecida como Podridão de Esclerotínia ou Mofo Branco, o agente fitopatogênico *S. sclerotiorum* possui patogenicidade inespecífica, sendo descrito em 408 espécies de diversas famílias (BOLAND & HALL, 2013). Tem sua atuação refletida pela distribuição geográfica ampla, podendo ser localizado em áreas tropicais e subtropicais, capaz de infectar diversas culturas de interesse agroeconômico como: soja, algodão, girassol, feijão, tomate e batata.

A sintomatologia da infecção se dá pelo desenvolvimento de manchas aquosas em partes jovens e em folhas da planta, que causa o amarelamento e secagem da parte exterior das folhas, além disso, também responsável pela podridão da região do caule da planta (PURDY, 1979).

Aliado ao esquema de infecção, a cepa de *S. sclerotiorum* é capaz de produzir uma estrutura de resistência denominada de Escleródio (**Figura 2**). O Escleródio é constituído de um agregado hifal envolto por grossas células contendo melanina, conferindo proteção às condições adversas de umidade e temperatura (BOLTON *et al.*, 2006).

**Figura 2** – Formação de escleródios sob tecido da cultivar de soja (PELTIER *et al.*, 2012).



### 3.4.2 *Moniliophthora perniciosa*

Sendo causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, a Vassoura de Bruxa é uma das principais doenças que atingem os membros do gênero *Theobroma*, acarretando na perda de cerca de 50% a 90% de produtividade (MEINHARDT *et al.*, 2008).

O mecanismo de ação da doença se dá pela perda de dominância apical nas plantas (**Figura 3**) e, conseqüentemente influencia o brotamento lateral de gemas (aparência de vassoura), posteriormente irá causar a necrose tecidual e deformação foliar, que comprometerão o desenvolvimento da planta e de frutos (SENA *et al.*, 2014).

**Figura 3** – Perda de dominância apical em cupuaçuzeiro causada por *M. perniciosa* (AGRONOMICABR, 2017)



### 3.4.3 *Fusarium* spp.

O gênero *Fusarium* inclui um alto número de fungos reconhecidos pela capacidade fitopatogênica capazes de gerar perdas de mais de 50% na produção (DINOLFO *et al.*, 2015), compondo um dos gêneros responsáveis por algumas das mais importantes doenças que afetam os cultivares. As doenças causadas por *Fusarium* incluem murchas, ferrugens, podridões e cancrios (**Figura 4**), de muitas culturas de campo, florestais, ornamentais, e horticuloras, tanto em ecossistemas naturais quanto em agrícolas (MA *et al.*, 2013).

Sendo uma das espécies mais estudadas e importantes do gênero, a espécie de *Fusarium oxysporum* é responsável pela doença chamada de Amarelecimento de Fusarium ou Mancha de Fusarium, capaz de atingir diversas culturas devido à ampla variabilidade genética denominada de “*formae speciales*” (EMBRAPA, 2016; KURAMAE & SOUZA, 2002; SARTORATO & RAVA, 1994). A infecção se inicia das partes mais próximas ao solo para as partes mais aéreas da planta, causando a sua murcha e conferindo às folhas a cor amarelada, as quais entram em senescência prematura. Em casos onde as culturas são atacadas severamente, estas secam e morrem devido a obstrução de vasos pela colonização do agente (GORDON, 2017).

**Figura 4** – Ferrugem em folhas e podridão vermelha em raízes de soja ambas causadas por *Fusarium* (AGROLINK, 2019).



Também com grande importância agroeconômica, as espécies de *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum* são microrganismos responsáveis pelas doenças: Podridão das raízes e Podridão do Colmo. Estas cepas têm atuação fitopatogênica em múltiplas espécies de plantas, entretanto, é destacável a vulnerabilidade das culturas de soja, milho e sorgo. Estas doenças causam alteração na cor da medula que podem variar de esbranquiçada para marrom, culminando na podridão radicular, de espiga, de colmos e de grãos (DEFESA VEGETAL, 2019; STEPIÉN *et al.*, 2011).

Além da preocupação em período de colheita é destacável que 9,7 amostras de grãos e cereais a cada 10 estão contaminadas com toxinas de *Fusarium* (MARCHIORO, 2019), esta contaminação se deve principalmente à demora em realizar o processo de colheita, armazenamento incorreto ou condições adversas de clima (NGUYEN *et al.*, 2018). O acúmulo de micotoxinas em grãos e cereais poderá influenciar a ocorrência de adversidades em animais e em humanos (WHO, 2018).

#### 3.4.4 *Sphaceloma* sp.

Sendo uma das espécies causadoras de Verrugoses ou Antracnose, *Sphaceloma* sp. atinge principalmente as culturas de frutas e leguminosas (AGROFIT, 2019; DEFESA VEGETAL, 2019; AFUTU *et al.*, 2017; POOLSAWAT *et al.*, 2012). A doença irá se

manifestar pela presença de marcas necróticas em folhas, frutos e caule, podendo causar a distorção destes e apresentar a formação de estruturas corticosas, irregulares, semelhantes a verrugas (**Figura 5**) (AFUTU *et al.*, 2017).

**Figura 5** – Presença de Verrugose causada por *Sphaceloma* sp. em limão (AGROLINK, 2019).



#### 3.4.5 *Ceratocystes paradoxa*

Consistindo em uma das causadoras das doenças Podridão da coroa, Podridão mole ou Podridão negra, a infecção por *Ceratocystes paradoxa* acaba culminando em perdas no cultivo e pós-cultivo, afetando principalmente as culturas de cana-de-açúcar e frutos (ROSSETTO *et al.*, 1986). A doença causa o apodrecimento e enegrecimento da base dos frutos maduros, podendo ocorrer a infecção das partes próximas; em cana-de-açúcar fermentos nos colmos irão causar a entrada do fungo que irá fermentar os tecidos internos e causar o apodrecimento (**Figura 6**) (AGROFIT, 2019).

**Figura 6** – Apodrecimento em tubérculos causado por *C. paradoxa*. (AGROFIT, 2019).



#### 3.4.6 *Alternaria alternata*

De nome comum de Mancha de Alternaria, causa a produção de manchas amarronzadas circulares isoladas ou em grupos, com círculos concêntricos visíveis que, irão causar a necrose foliar (**Figura 7**) (VASCONCELOS *et al.*, 2014). A doença atinge diversas culturas de interesse agroeconômico, principalmente as culturas de algodão, arroz, cevada, feijão, milho, sorgo, trigo e citrus (DEFESA VEGETAL, 2019; WANG *et al.*, 2016; CHUNG, 2012).

A espécie *Alternaria alternata* caracteriza-se por produzir toxinas hospedeiro-seletivas, geralmente sendo metabólitos secundários de baixo peso molecular que funcionam como efetores para o controle da virulência em certas interações planta-patógeno (TSUGE *et al.*, 2013).

**Figura 7** – Mancha de alternaria em folhas de fumo (EPHYTIA, 2019).



#### 3.4.7 *Colletotrichum* sp.

O gênero *Colletotrichum* é caracterizado pela manifestação da Antracnose em regiões subtropicais e tropicais, a qual é uma das doenças de maior importância para as plantas cultivadas, vindo a ocorrer em diversas plantas herbáceas ou lenhosas (CANNON *et al.*, 2012). É possível identificar a doença principalmente pela sua ação sobre os frutos, onde estes irão apresentar depressões circulares escuras com possível presença de esporulação, dependendo da umidade (**Figura 8**) (JÚNIOR *et al.* 2006). No caso da cultura de citrus, o fungo poderá causar a doença chamada Podridão Floral, no qual o ataque do fungo irá causar a necrose dos tecidos florais ou o retardo no desenvolvimento dos frutos, tendo a queda das pétalas e frutos restando apenas o cálice (MELO & MORAIS, 1999).

A infecção pode se tornar um fator preocupante, pois pode afetar parte da produção com apenas aspectos visuais, infectar e comprometer toda a produção ou ter uma infecção latente e manifestar os sintomas em período pós-colheita (KUROZAWA & PAVAN, 1997). Em ambos os casos existem perdas econômicas que prejudicam tanto o comércio interno quanto externo, principalmente do setor fruticultor (SILVA *et al.*, 2006).



**Figura 8** – Antracnose causada por *Colletotrichum* sp. em maçã (KOCZOR, 2018)



#### 3.4.8 *Phytophthora sojae*

Podridão Radicular de Fitóftora tem como principal cultivar alvo a cultura de soja e tremoço (TYLER, 2007). A doença causa a podridão de sementes, das quais se tornam marrons, murchas e com o passar da infecção elas morrem. Em plantas desenvolvidas ocorre o tombamento de pré e pós-emergência causado pelo amarelamento, a seca dos tecidos entre as nervuras, destruição das raízes secundárias e apodrecimento da raiz principal, que virão causar a perda de vigor na planta. Em campo, é principalmente identificada pela coloração amarronzada do caule na porção próxima ao solo (**Figura 9**) (CHANG *et al.*, 2016).

Nos anos de 1996 e 1998 nos Estados Unidos da América (EUA), a doença foi responsável pela perda de mais de 12 milhões de toneladas de soja (WRATHER *et al.*, 2001), já no período de 1999 a 2002, os EUA registraram a Podridão Radicular de Fitóftora como sendo a segunda maior doença causadora de prejuízos na cultura de soja tendo perdas estimadas de 2,3 Mt de redução de produtividade por ano (WRATHER *et al.*, 2010; WRATHER *et al.*, 2003).

**Figura 9** – Podridão de Fitóftora em caule de soja (MUELLER, 2018).



#### 3.4.9 *Rhizopus microsporus*

Pertencente ao filo Zygomycota a espécie *Rhizopus microsporus*, possui cepas que auxiliam na fermentação de alimentos e outras que apresentam característica patogênicas, seja sendo patógenos oportunistas de humanos ou de plantas (LACKER & HERTWECK, 2011).

A cepa de *Rhizopus microsporus* é um dos agentes causadores da ferrugem em plântulas de arroz. Uma das primeiras características da doença o inchaço do tecido da planta (**Figura 10**), que irá acarretar na morte do tecido infectado e conseqüentemente da planta, este sintoma característico é causado pela produção de um metabólito chamado rizoxina que é sintetizada por bactérias endosimbiontes do gênero *Burkholderia* que habitam o interior de células fúngicas (PARTIDA-MARTINEZ & HERTWECK, 2005). O fungo *Rhizopus microsporus* por si só é um patógeno necrotrófico, tendo sua energia extraída das células mortas de seu hospedeiro.

**Figura 10** – Podridão causada por *Rhizopus microsporus* em flor de girassol (SCHWARTZ, 2019).



#### 3.4.10 *Lasiodiplodia* spp.

Membro da família *Botryosphaeriaceae*, as cepas pertencentes ao gênero *Lasiodiplodia* são consideradas patógenos secundários, tendo característica saprofítica, entretanto, sob as devidas condições estas podem vir a se tornarem patógeno à diversas cultivares (AGROLINK, 2019; FREIRE *et al.*, 2004).

Os sintomas mais comumente apresentados por plantas infectadas caracterizam-se pela necrose dos tecidos que, pode afetar galhos, brotos, folhas e frutos (**Figura 11**). No nível foliar, é possível observar folhas necróticas por toda a copa, causando a perda foliar da planta e diminuição da fotossíntese. Nas seções de caule e galhos, ocorrem lesões necróticas que ao longo do tempo liberam uma substância resinosa e podem se espalhar em direção à raiz. A resina irá comprometer o transporte de água e nutrientes pela planta e, junto aos demais sintomas, causar a morte da mesma (NETTO *et al.*, 2017; RODRÍGUEZ -GÁLVEZ *et al.*, 2017;).

Sendo um gênero característico de regiões tropicais e subtropicais, o gênero *Lasiodiplodia* pode infectar cerca de 500 espécies de plantas. Dentre as culturas afetadas, são descritas na literatura as cultivares de: algodão, anonáceas, anacardiáceas, citros, coco, mamão, manga, noz pecan, Seringueira e a emergente cultura de pinhão manso (AGROLINK, 2019; COUTINHO *et al.*, 2017; RODRÍGUEZ-GÁLVEZ *et al.*, 2017; POLETTO *et al.*, 2016, MACHADO *et al.*, 2014). Devido ao seu atributo de infectar

frutos, este patógeno caracteriza-se por um dos maiores causadores de doenças pós-colheita (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

**Figura 11** – Propagação de *Lasiodiplodia* sp. sobre a superfície do fruto de mamão (WIKIWAND, 2019).



### 3.5 Mecanismos do Controle Biológico

O Controle Biológico é o resultado das diferentes interações entre microrganismos de forma direta e indireta (HEYDARI & PESSARAKLI, 2010). Dentre os métodos envolvidos no controle de outros organismos, é destacável a competição por nutrientes e espaço, antibiose causada pela produção de compostos ativos, hiperparasitismo e, indução sistêmica da resistência de plantas (VINALE *et al.*, 2008; BENÍTEZ *et al.*, 2004; HARMAN *et al.*, 2004).

Essas interações irão influenciar a forma de aplicação dos biocontroladores, podendo ser: uma aplicação direta à região infectada com uma alta população; aplicação em um único lugar, o qual o biocontrolador irá se multiplicar e espalhar para as demais regiões; ou a aplicação ocasional que mantém as populações de insetos praga ou patógenos abaixo do limite (HEYDARI & PESSARAKLI, 2010).

### 3.5.1 Competição

Um aspecto importante e comum entre os organismos, é a competição existente entre as espécies, a qual pode ser realizada através de relações diretas ou indiretas entre consumidores quanto à nutrientes, recursos, espaço e etc. A competição pode ser classificada em intraespecífica, ocorrendo dentre indivíduos de uma mesma espécie, e interespecífica, sendo a relação competitiva entre duas espécies diferentes (BHUVANESWARI & PRASAD, 2016).

O controle das populações ocorre muitas vezes de forma natural tendo o crescimento limitado pela quantidade de recursos disponíveis para aqueles indivíduos. Entretanto, quando as interações ambientais estão desestabilizadas, alguma população estará em vantagem e, conseqüentemente, irá se expandir devido à falta de um fator limitante. Devido ao controle competitivo intraespecífico ocorrer de forma tardia, o controle biológico busca fazer o uso de diferentes espécies com baixo impacto econômico (MOON, 1980).

### 3.5.2 Antibiose

Definida como a inibição ou destruição de organismos por substâncias como metabólitos específicos ou não específicos, agentes líticos ou enzimas (JAMALIZADEH *et al.*, 2011). Esta interação envolve compostos difusíveis, podendo ter característica volátil ou não volátil. A maioria dos organismos produzem toxinas, antibióticos e enzimas líticas, após serem expostos à um estresse. Em microrganismos geralmente o estresse se dá pela depleção da concentração de carbono disponível, entretanto, sua produção pode também pode ser realizada após algum ataque ou estágio de vida (BENÍTEZ *et al.*, 2004).

### 3.5.3 Parasitismo e Predação

Parasitismo ou predação ocorre quando o antagonista se alimenta do ou através do alvo, resultando na destruição direta ou na lise de estruturas (JAMALIZADEH *et al.*, 2011).

Devido à alta competição existente por nutrientes, durante a evolução, muitos organismos desenvolveram mecanismos capazes de explorar outras espécies ao seu redor. Assim, muitos grupos de fungos apresentam característica micoparasítica, podendo ser subdividida em micoparasitismo biotrófico ou micoparasitismo necrótico. O micoparasitismo biotrófico, se dá pela absorção dos nutrientes advindos do hospedeiro através de estruturas externas, por penetrar hifal do hospedeiro e crescimento interno, aproveitando dos recursos do alvo sem lhe causar aparente prejuízo. Já o micoparasitismo necrotrófico, o parasita destrói a célula hospedeira por meio de enrolamento ou por penetração hifal, este ataque acaba causando a morte do hospedeiro (MELO, 2007; BENÍTEZ *et al.*, 2004; LORITO *et al.*, 1996).

#### 3.5.4 Indução de Resistência ao Tecido Hospedeiro

Diferentemente dos mecanismos de ação diretos, a indução de resistência ocorre através da sinalização do mecanismo de defesa do hospedeiro (DESAI *et al.*, 2002).

Em plantas, a indução de resistência pode ocorrer de três formas: resposta hipersensitiva, resistência sistêmica adquirida e resistência sistêmica induzida (BENÍTEZ *et al.*, 2004). Resposta hipersensitiva em plantas caracteriza-se pelo rápido e localizado colapso do tecido vegetal ao redor do sítio de infecção, compreendendo o acúmulo de peróxido de hidrogênio que, forma lesões em volta do local da infecção e ocasiona a morte celular programada. São estas lesões que impossibilitam a propagação do patógeno para outros tecidos da planta parando, assim, a manifestação da doença. A resistência sistêmica induzida ocorre após a formação de lesões necróticas decorridas da manifestação da resposta hipersensitiva ou por sintomas de doenças. Após o retardo da infecção pela resistência sistêmica induzida, ocorre a sinalização para as demais partes da planta constituindo a resistência sistêmica adquirida (FERNANDES *et al.*, 2009).

### 3.6 Microrganismos Biocontroladores

#### 3.6.1 Microrganismos Biocontroladores de Insetos Praga

O controle biológico de insetos praga é amplamente pesquisado desde a demonstração por Agostino Bassi da ocorrência de infecção em bichos-da-seda chamada de muscardina e provocada por um agente microbiano denominado *Botrytis paradoxa*. As pesquisas quanto aos controladores biológicos de inseto praga tomaram força após o período da revolução verde e inclusão de agroquímicos não específicos como o DDT (CLAUSEN, 1958).

Tendo o seu controle realizado por macro e microfauna, os insetos praga são controlados por microrganismos, nematoides, insetos predadores e substâncias produzidas endogenamente na planta (KERGUNTEUIL *et al.*, 2016).

Dentre os microrganismos, os vírus possuem um papel importante em virtude do seu diversificado sistema de habitats, assim, a família *Baculoviridae* são parasitas obrigatórios evoluídos para parasitar insetos. O vírus da traça-de-batata (PoGV em inglês) é responsável pela mortalidade de 73% a 100% de *Phthorimaea operculella*, uma praga comum em solanáceas capaz de causar perda econômica de 100% (ARTHURS *et al.*, 2008). A espécie de *Baculovirus anticarsia* é capaz de infectar lagarta-de-soja (*Anticarsia gemmatalis*) fazendo esta perder sua morfologia gradativamente e causando o rompimento do seu corpo após a morte (MOSCARDI, 2019).

Bactérias entomopatogênicas são reconhecidas pela sua produção de toxinas inseticidas de atuação específica ou ampla desde a sua descoberta no século XIX. Representando cerca de 95% dos produtos biocontroladores a base de bactérias, a cepa de *Bacillus thuringiensis* atua na produção da “toxina Cry”. A toxina caracteriza-se por cristais que ao serem ingeridos por insetos praga são solubilizados pelas proteases em seus tratos digestivos e ativam toxina Cry que, irá causar a fissuração do trato digestivo de inseto praga (KERGUNTEUIL *et al.*, 2016).

Já o gênero de fungos *Beuveria* e *Metharizium* possuem indivíduos capazes de colonizar insetos praga pela produção de quitinases e projeção hifal para dentro dos tecidos do hospedeiro. Possuem como grande vantagem a capacidade de persistir no solo após a safra e atuar no controle de pragas em uma próxima colheita (PILZ *et al.*, 2011).

Assim como os fungos, nematoides entomopatogênicos são capazes de persistir no solo após a colheita, além disso, estes possuem amplo espectro de atuação sobre insetos praga, possuem comportamento ativo e rapidamente matam o inseto hospedeiro (LACEY *et al.*, 2015).

### 3.6.2 Microrganismos Biocontroladores de Nematoides

Nematoides todos os anos causam diversas perdas na lavoura devido à sua atuação parasítica principalmente em raízes de plantas formando galhas (TRANIER *et al.*, 2014). Microrganismos naturalmente existem no solo e atuam com atividade antagonística aos nematoides em geral, principalmente fungos. O processo de infecção se dá pela penetração da camada de cutícula, imobilização, invasão e digestão do nematoide (HUANG *et al.*, 2004). Alguns fungos possuem a habilidade de prender nematoides para se alimentar destes, a forma com que o mecanismo de armadilha atua sobre os nematoides difere, podendo ser: armadilhas de redes, no caso dos microrganismos *Arthrobotrys oligospora* e *A. superba*; anéis contráteis, no caso de *A. anchonia*, *A. dactyloides* e *Dactylaria brochopaga*; ou estruturas adesivas presentes em *Monacrosporium cianopagum* (CAYROL *et al.*, 1992).

Substâncias produzidas por diversos microrganismos possuem atuação em nematoides, podendo ter atuação nematicida ou nematostática, exemplos destas substâncias são enzimas líticas produzidas por diversos microrganismos ou compostos voláteis como o 6-pentil- $\alpha$ -pirona produzido por *T. harzianum* (SARHY-BAGNON *et al.*, 2000).

### 3.6.3 Microrganismos Biocontroladores de Patógenos

Sendo mais frequentemente empregado no controle de fitopatologias, os microrganismos biocontroladores muitas vezes se encontram em relações de simbiose ou comensalismo, como por exemplo a associação de bactérias do gênero *Rhizobium* com raízes de plantas leguminosas onde, se reproduzem com mais frequência através da relação mutualística e provê à planta nutrientes e estimulação do sistema de defesa



(HEYDARI & PESSARAKLI, 2010). Alguns outros tipos de microrganismos atuam como parasitas, como o caso de micovírus, atuando sobre fungos fitopatogênicos (HURST, 2011).

O biocontrole de microrganismos também pode ser realizado através da produção de enzimas líticas e substâncias antibióticas capazes de degradar as estruturas microbianas e causar a morte (ANDERSON *et al.*, 2004).

### 3.7 *Trichoderma harzianum*

Pertencentes ao Reino Fungi, Filo *Ascomycota*, Subfilo *Pezizomycotina*, Classe *Sordariomycetes*, Subclasse *Hypocreomycetidae*, Ordem *Hypocreales*, Família *Hypocreaceae*, Gênero *Trichoderma*, Espécie *Trichoderma harzianum* (Index Fungorum, 2019). Em meio Ágar Batata Dextrose após 72 h, sob temperatura de 25°C, a espécie de *Trichoderma harzianum* apresenta uma morfologia de círculos concêntricos amplos, com presença de esporos verde escuro e baixa difusão de um pigmento amarelado em meio, além de um característico odor adocicado (CHAVERRI *et al.*, 2016).

Esta espécie vem sendo pesquisada devido à sua ampla gama de compostos e complexo comportamento. Dentre as diversas aplicações, a capacidade de controlar outros microrganismos é de grande destaque, pois o gênero *Trichoderma* possui comportamento predador, micoparasítico e nematófago, além da produção de enzimas líticas e metabólitos secundários (GUPTA *et al.*, 2014). Atualmente estão registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 31 empresas cuja atividade está voltada para a produção de inoculantes no Brasil (MAPA, 2019), sendo os isolados de *T. harzianum* avaliados pela Anvisa ESALQ-1306, IBLF006, CCT7589, BK-Th001 e isolado 6550 (BRASIL - ANVISA, 2016).

*Trichoderma harzianum* atua no controle de vários fungos, sendo o seu controle realizado principalmente através da interferência de hifas e pela secreção de enzimas hidrolíticas (DOOHAN, 2005). O fungo *Trichoderma harzianum* é responsável por uma complexa gama de compostos produzidos em seu metabolismo secundário, muitos deles são capazes de controlar outros organismos principalmente outros fungos (GHISALBERTI & ROWLAND, 1993). O composto 6-pentil-alpha-pirona produzido por *T. harzianum* demonstrou atividade inibitória de 66% em testes de discos de papel

em placas de petri contra *Rhizoctonia solani* e inibiu a germinação de esporos de *Fusarium oxysporum* (SCARSELETTI & FAULL, 1994). O Ácido Harziânico é identificado como um promotor de crescimento em plantas sendo responsável pelo aumento de 52% no crescimento de caules, inibição de 100% das cepas de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Phytium irregulare* sob aplicação de 100 µg por disco de cepa (VINALE *et al.*, 2009). Harzianum A, entretanto, apresentou modesta atividade antifúngica sob concentração de 100 µg/mL (CARDOZA *et al.*, 2005).

A espécie também é capaz de parasitar outros fungos, tendo mecanismo de caracterizado pelo quimiotropismo, reconhecimento por mediação de lectina e formação de estruturas de penetração, sendo este processo corroborado pela secreção de enzimas como quitinases, β-glucanases e proteinases, assim como metabólitos secundários. (LORITO *et. al*, 1996).

Além do controle direto de outros fungos, a espécie *T. harzianum* produz hidrolases capazes de degradar Aflatoxina B1 e Ocratoxina A (VINALE *et al.*, 2009). Este fato tem chamado a atenção a indústria alimentícia, uma vez que estas micotoxinas podem acumular principalmente em grãos no pré e pós-colheita prejudicando a qualidade alimentar e conseqüentemente a saúde humana (AGROLINK, 2019).

O potencial da espécie *T. harzianum* para promover o controle biológico é destacável em diversos trabalhos (SINGH *et al.*, 2018; VINALE *et al.*, 2014), entretanto, algumas cepas podem apresentar diferenças quanto ao potencial de biocontrole e os tipos de patógenos que podem combater. Nesse contexto, a cepa de *Trichoderma harzianum* P49P11, isolada de solo amazônico contendo material vegetal em decomposição, teve suas características celulolíticas avaliadas, demonstrando o potencial da cepa para produção de complexos enzimáticos para a sacarificação de biomassa vegetal (DELABONA *et al.*, 2013). Visto enzimas líticas estarem envolvidas na lise da parede celular de muitos fungos fitopatógenos (JAMALIZADEH *et al.*, 2011), a cepa de *T. harzianum* P49P11 torna o alvo deste estudo para a avaliação de sua capacidade e biocontroladora sob 17 fitopatógenos tendo em vista sua atuação sob diversos substratos e ampla gama de enzimas produzidas durante o processo de degradação de biomassa vegetal.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Reativação e Conservação das Cepas

A cepa de Agente Controlador Biológico (ACB), *Trichoderma harzianum* P49P11 foi isolada de solo amazônico, o qual continha biomassa em decomposição (DELABONA *et al.*, 2012). Essa cepa foi depositada na coleção Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, Brasil), sob o número BRMCTAA 115. As cepas de fitopatógenos (**Tabela 1**) foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB), localizado no Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade Federal de São Carlos (DMP – UFSCar).

**Tabela 1** - Fitopatógenos e Patógenos avaliados.

Código	Espécie	Doenças	Principais Alvos
FP1	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Podridão de Esclerotínia	Soja, Algodão, Feijão
FP2	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	Vassoura de Bruxa	Cacau
FP3	<i>Fusarium solani</i>	Amarelecimento de Fusarium, Mancha de Fusarium, Fusariose	Soja, Feijão, Café
FP4	<i>Fusarium oxysporum</i> (ATCC 2163)	Amarelecimento de Fusarium, Mancha de Fusarium, Fusariose	Feijão
FP5	<i>Sphaceloma</i> sp. (CNPUV 102)	Verrugose, Antracnose	Frutos, Leguminosas
FP6	<i>Ceratocystes paradoxa</i>	Podridão da coroa, Podridão mole ou Podridão negra	Frutas, Cana-de-açúcar
FP7	<i>Alternaria alternata</i>	Mancha de Alternaria	Milho, Citrus, Arroz
FP8	<i>Fusarium proliferatum</i>	Podridão das raízes e Podridão do Colmo	Soja, Milho, Feijão
FP9	<i>Colletotrichum</i> sp.	Antracnose	Frutos
FP10	<i>Fusarium verticillioides</i>	Podridão das raízes e Podridão do Colmo	Soja, Milho, Feijão
FP11	<i>Fusarium oxysporum</i> (feijão)	Amarelecimento de Fusarium, Mancha de Fusarium, Fusariose	Soja, Milho, Feijão
FP12	<i>Fusarium oxysporum</i> (algodão)	Amarelecimento de Fusarium, Mancha de Fusarium, Fusariose	Soja, Milho, Feijão
FP13	<i>Phytophthora sojae</i>	Podridão radicular de fitóftora	Soja
FP14	<i>Rhizopus microsporus</i>	Ferrugem	Arroz
FP15	<i>Lasiodiplodia subglobosa</i> (BOT 11)	Podridão negra de raiz	Citrus, Algodão, Seringueira
FP16	<i>Lasiodiplodia eufhorbicola</i> (BOT 93)	Podridão negra de raiz	Citrus, Algodão, Seringueira
FP17	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	Podridão negra de raiz	Citrus, Algodão, Seringueira

Para manutenção de suas características e formação de estoque de trabalho, as cepas de *T. harzianum* P49P11 e fitopatógenos foram conservadas de três formas: em meio Batata Dextrose Ágar (BDA), cultivadas até suas devidas esporulações em 28°C e posteriormente mantidas em geladeira 4°C; Castellani (CASTELLANI, 1939); e em microtubos contendo discos miceliais suspensos em solução Água e Glicerol 1:1, mantida em freezer -80°.

#### 4.2 Teste de Crescimento e Esporulação

A cepa de *T. harzianum* P49P11 teve seu crescimento e esporulação avaliados em placas petri sob o meio BDA (marca Kasvi®, Fabricante) e (marca Acumedia®, Fabricante), Sabouroud (marca Acumedia®, Fabricante), 10% BDA (marca Kasvi®, Fabricante), Ágar Água (marca Kasvi®, Fabricante) e meio Czapek (Sacarose 30 g/L, NaNO<sub>3</sub> 2 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g/L, KCl 0,5 g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,01 g/L, Ágar 15 g/L) (CZAPEK, 1902); tendo cultivo de 7 dias em temperatura de 28°C, sob ausência de luz, visando identificar os melhores meios para o cultivo pareado.

#### 4.3 Testes Enzimáticos

Para os testes de atividade amilolítica, celulolítica e pectinolítica, o ACB foi cultivado em meio Mínimo M9 composto de: MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1M 2,0 mL/L, CaCl<sub>2</sub> 1M 0,1 mL/L, Ágar 15 g/L, Glicose 10 g/L, Solução estoque 200 mL/L (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 64 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15 g/L, NaCl 25 g/L e NH<sub>4</sub>Cl 5 g/L) (SAMBROOK *et al.*, 1989), sendo a glicose substituída por 1% de amido solúvel, carboximetilcelulose ou pectina ácida.

Para o meio contendo amido e carboximetilcelulose, o pH foi ajustado para 7,2, avaliando as enzimas amilase e endoglucanase, respectivamente. O meio contendo pectina ácida teve seu pH modificado para pH 5 e 8, proporcionando a visualização da atividade das enzimas poligalaturonase e pectato liase (SILVA *et al.*, 2016).

A atividade proteolítica foi avaliada pelo meio Triptona 5 g/L, Extrato de levedura 2,5 g/L, Glicose 1,0 g/L, NaCl 2,5 g/L, Ágar 15 g/L e Leite desnatado 10% v/v, sendo

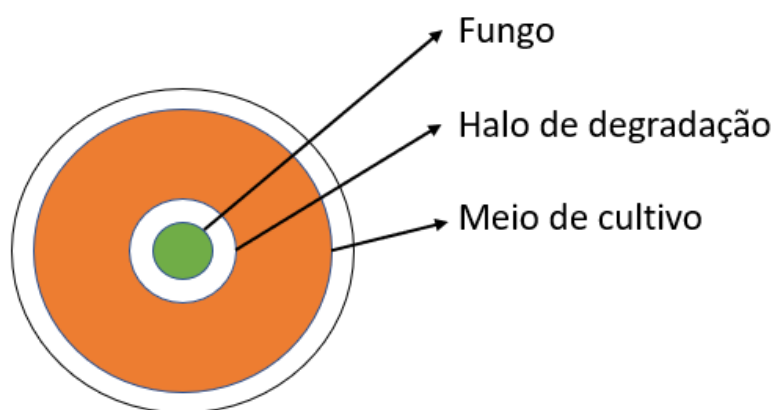
este inserido após a autoclavagem para não desnaturação das proteínas (CASTRO *et al.*, 2014).

As enzimas lipase e esterase foram avaliadas pelo meio Peptona 10 g/L, NaCl 5 g/L, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,1 g/L, Ágar 15 g/L, tendo a adição de 1% de Tween 20 ou Tween 80 ao meio pós a autoclavagem, respectivamente adaptado de SIERRA (1957).

Em cada meio houve a inoculação de 10 µL de solução 1x10<sup>6</sup> esporos/mL da cepa de *T. harzianum* P49P11 e as placas foram levadas à Demanda Biológica de Oxigênio (DBO), sendo a avaliação da produção enzimática realizada após 3 dias de cultivo sob temperatura de 28°C (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975). Para visualização dos testes amilolíticos e pectinolíticos, houve adição de 10 mL de Lugol na placa, tingimento de 30 s e lavagem com água destilada. Para a atividade celulolítica, à placa foram adicionados 10 mL de Vermelho Congo 2,5 M, tingido por 15 min. e lavado com solução salina 5 M por 15 min. As atividades lipolíticas, esterásicas e proteolíticas, tiveram suas análises pela visualização de halos de degradação (SILVA *et al.*, 2016).

Os halos de degradação são regiões em que houve a atuação de enzimas na transformação de compostos, gerando uma diferença de cor em relação à cor do meio de cultivo podendo ter o acréscimo de um corante para a melhor visualização deste (**Figura 12**).

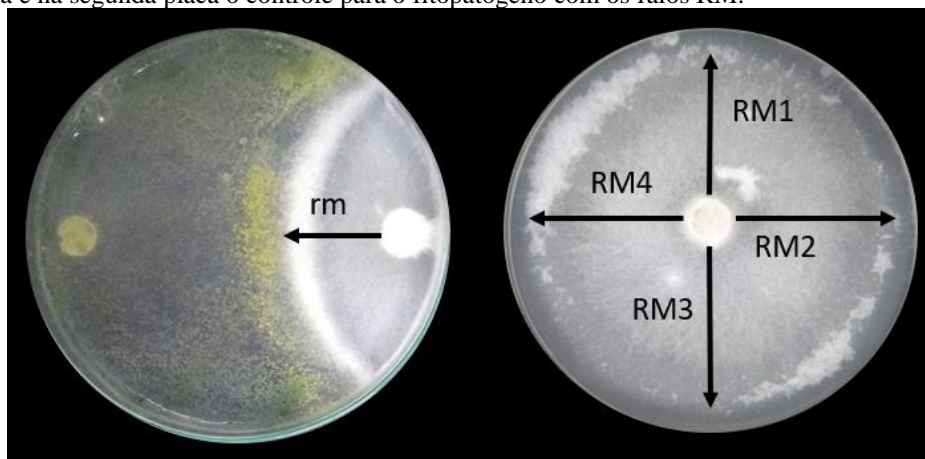
**Figura 12** – Descrição do Halo de Degradação



#### 4.4 Teste de Antagonismo com Fitopatógenos

Para a análise do potencial antagonístico da cepa de *T. harzianum* P49P11 foi utilizado o método de pareamento de culturas em placa de Petri contendo meio BDA e meio Czapek, sendo os testes conduzidos em triplicata. Em cada placa, foram colocados em extremidades opostas, discos miceliais de aproximadamente 0,7 cm retirados da parte mais externa de uma placa de cultivo puro, tanto das cepas de fitopatógenos quanto da cepa de ACB (**Figura 13**) (SARAVANAKUMAR *et al.*, 2017). Após colocados os discos em placas, estas foram incubadas durante 7 dias sob temperatura de 28°C, sem a presença de luz, sendo o Índice de Antagonismo (%I) foi gerado pela **Equação 1**.

**Figura 13** – Raios referentes ao cálculo do índice de inibição (%I), sendo mostrado *rm* na placa teste com a cepa de *Trichoderma harzianum* P49P11 a esquerda e a cepa de fitopatógeno a direita, na primeira placa e na segunda placa o controle para o fitopatógeno com os raios RM.



**Equação 1** – Cálculo do Índice

$$\%I = \frac{(Rm - rm)}{Rm} * 100 \quad (1)$$

Sendo que:

RM: média dos raios (RM1, RM2, RM3 e RM4) da placa controle;

rm: raio do fitopatógeno em direção ao ACB na placa teste.

#### 4.5 Produção de Extrato de *Trichoderma harzianum* P49P11

A produção de extrato de *T. harzianum* P49P11 foi realizada a partir da metodologia modificada de Park e colaboradores (2016), utilizada para extrair compostos com capacidade inibitória de biofilmes por *Streptomyces gandocaensis*.

A cepa de ACB foi cultivada em placas de petri contendo meio Czapek durante 7 dias sob temperatura de 28°C e ausência de luz, para a produção de esporos. Os esporos foram extraídos por 10 mL de solução 1% de Tween 80 durante 15 min, após os esporos foram contados em câmara de Neubauer e volume corrigido para atingirem a concentração de esporos de  $1 \times 10^6$  esporos/mL (Embrapa – Meio Ambiente, 2016). O cultivo em estado líquido se deu em Erlenmeyer de 1 L contendo 500 mL de meio Batata Dextrose tendo inóculo de  $2 \times 10^3$  esporos, durante 7 dias, sob temperatura de 28°C, pH 5, agitação de 120 rpm, sem a presença de luz. Após o período, o meio foi centrifugado sob rotação de 10.000 rpm por 30 min para a remoção dos esporos e hifas. O sobrenadante foi recolhido e inserido em novo Erlenmeyer de 1 L autoclavado.

A extração foi realizada pelo uso de resina não-iônica macrorretinal Amberlite® XAD-16 (Sigma-Aldrich®), capaz de absorver e liberar espécies iônicas através de interações hidrofóbicas e polares, utilizada para a extração de possíveis compostos bioativos presentes no sobrenadante (SIGMA, 2019). Sendo previamente lavada com água destilada, a resina foi utilizada em proporção de 1 g/100 mL de meio de cultura e embalada em envelopes de polipropileno de 0,02µm. A extração foi conduzida após a submersão do envelope no meio de cultivo e estes rotacionados em shaker sob 150 rpm a 28°C, por período de 24 h, após esse período o envelope foi retirado e inserido em um novo Erlenmeyer contendo 100 mL de Metanol:Acetato de Etila 1:1 (MeOH/EtOAc) em shaker sob 150 rpm por 30 min para extração dos componentes aderidos à resina.

O extrato foi transferido para tubos falcon de 50 mL e então foi seco sob temperatura ambiente. Os tubos falcon tiveram seus pesos aferidos vazios e após a secagem, afim de determinar a massa do extrato para suas suspensões em Dimetilsulfóxido (DMSO) autoclavado, tornando assim a concentração do extrato comparável aos respectivos controles positivos em suas concentrações.

#### 4.6 Antagonismo por Extrato de *T. harzianum* P49P11 Contra Fitopatógenos

Os fitopatógenos foram cultivados em meio BDA durante 7 dias para sua ativação. Após o período, discos de fitopatógenos foram inseridos no centro de três tipos diferentes de placas de petri contendo meio BDA: placas que possuíam discos de 500 µg de extrato bioativo, 500 µg de benlate (DuPont®), como controle positivo e, apenas o fitopatógeno crescendo como controle negativo. A leitura dos resultados foi realizada com base na **Equação 1**.

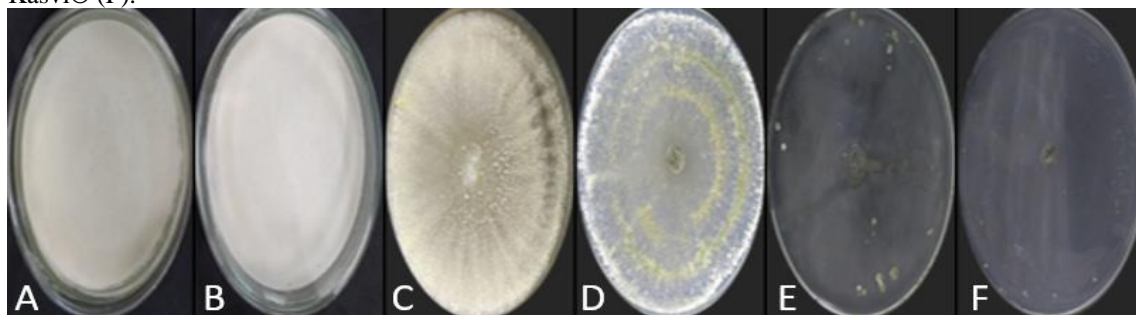


## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Crescimento e Esporulação

Decorrido o tempo de cultivo da cepa de *T. harzianum* P49P11 sob os meios de cultura BDA (marca Kasvi®, Fabricante) e (marca Acumedia®, Fabricante), Sabouroud (marca Acumedia®, Fabricante), 10% BDA (marca Kasvi®, Fabricante), Ágar Água (marca Kasvi®, Fabricante) e meio Czapek, foi possível visualizar diferenças morfológicas existentes pela variação entre marcas e meios de cultivo, sendo que esta mudança ocorre, pelo provável esgotamento das fontes de nitrogênio enquanto as fontes de carboidrato ainda estão disponíveis, o que pode provocar ao *Trichoderma* produzir esporos em tempos diferentes de acordo com o meio (**Figura 14**). Devido à exaustão ou redução de nitrogênio assimilável causar a indução da esporulação (MORTON, 1961), o meio BDA e o meio Ágar Sabouraud, com relação de C/N de 10:1 e 2:1 respectivamente, possibilitaram o crescimento hifal da cepa de *T. harzianum*, já o meio Czapek com relação de C/N 35:1 estimulou a esporulação da cepa durante os 7 dias de incubação (MUSTAFA & KAUR, 2009; SAID, 2007; PAPAIVIZAS, 1985; COOKE, 1967).

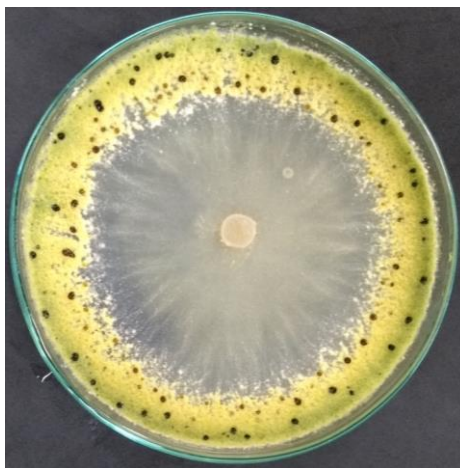
**Figura 14** – Crescimento e esporulação da cepa de *T. harzianum* 49P11 nos meios Sabouroud Acumedia (A), BDA Acumedia® (B), BDA Kasvi® (C), Czapek (D), BDA Kasvi® 10% (E) e Ágar Água Kasvi® (F).



O meio de cultura BDA (marca Kasvi®, Fabricante) e meio Czapek apresentaram sinais mais frequentes de esporulação da cepa de *T. harzianum* P49P11, sendo possível identificar a formação de esporulação em círculos concêntricos em ambos, porém apenas o meio BDA possibilitou um amarelamento do fundo e presença de exsudatos (**Figura 15**) (CHAVERRI *et al.*, 2015). A ampla formação de esporos permite que o controlador biológico complete seu ciclo de vida e seu ciclo de agente controlador, além de se tratar

da forma mais comumente utilizada em sua comercialização (GAO & LIU, 2010; GAO, 2014).

**Figura 15** – Formação de exsudatos verde escuro nas extremidades e amarelamento do meio na parte central.



Portanto, observou-se que uma maior relação de C/N possibilitou a esporulação da cepa de *T. harzianum*, contrapondo as menores relações que ocasionaram o retardo na esporulação. Este efeito também foi observado por Said e colaboradores (2007), que também verificou que a alta relação de C/N proporciona uma mais rápida esporulação, tendo o começo da esporulação em 12 h para uma relação de 64:1 e no período de 24 h para relações de 44:1 e 24:1.

Além disso, o tipo de fonte de carbono e nitrogênio bem como sua concentração exercem influência sob o crescimento e esporulação, como identificado por Rajput e colaboradores (2014). Em seu trabalho comparando sacarose a outras fontes de carbono, esta apresentou a melhor promoção de crescimento hifal e esporulação, como também verificado neste trabalho. Entretanto, quando feita a relação com as fontes de nitrogênio, identificou que concentrações mais elevadas de nitrogênio em meio retardam o crescimento e esporulação cepa, fato verificado neste trabalho e por Said e colaboradores (2007).

## 5.2 Testes Enzimáticos

Outra característica de extrema importância no controle biológico é a avaliação do potencial enzimático (SILVA *et al.*, 2016), visto que, as enzimas irão cumprir o papel de degradação do meio em que o microrganismo está inserido e conferir vantagem na competição espacial e de nutrientes, também podendo participar na degradação de componentes de outros microrganismos alvo (DESAI *et al.*, 2002).

A cepa de *T. harzianum* teve seu crescimento em todos os meios seletivos, conferindo assim a produção de enzimas, porém, não houve a formação de halos enzimáticos (**Apêndice A**), designando uma baixa secreção nas condições de cultivo. As condições analisadas não proporcionaram a visualização do potencial enzimático apresentado em trabalhos anteriores (DELABONA *et al.*, 2013), podendo ser ocasionado devido algumas das metodologias utilizadas neste trabalho não serem específicas para fungos ou para a cepa de *T. harzianum* P49P11.

## 5.3 Teste de Antagonismo

O teste de antagonismo em co-cultivo visa analisar o perfil da cepa de ACB frente à um microrganismo de interesse econômico, podendo destacar algumas peculiaridades como a produção de compostos bioativos, parasitismo e esporulação (DESAI *et al.*, 2002).

**Tabela 2** - Teste de antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* P49P11 contra fitopatógenos após 7 dias de cultivo a 28°C.

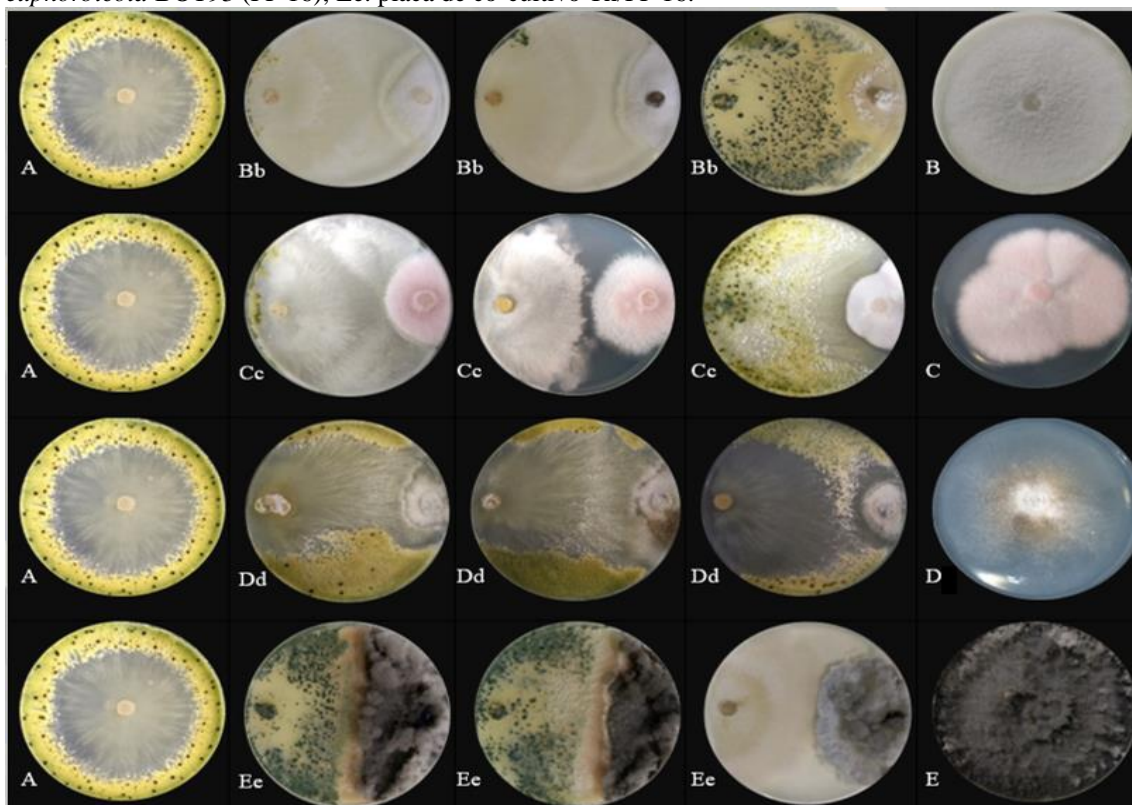
Fitopatógenos	Código	Meios de cultura			
		BDA		Czapek	
		Raio rm (mm)	Inibição (%I)	Raio rm (mm)	Inibição (%)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	FP 01	37±7	13,4	33±4	22
<i>Moniliophthora perniciosa</i>	FP 02	42±20	15,8	35±5	16
<i>Fusarium solani</i>	FP 03	33±22	10,9	25,5±3,5	35,9
<i>Fusarium oxysporum</i> (ATTCC 2163)	FP 04	19,5±5,5	37,3	23,5±1,5	51,7
<i>Sphaceloma</i> sp. (CNPUV 102)	FP 05	12,5±0,5	22,1	15,5±4,5	40
<i>Ceratocystis paradoxa</i>	FP 06	32±8	29,7	30,5±4,5	27,6
<i>Alternaria alternata</i>	FP 07	21±8	38,7	21,5±1,5	52,1
<i>Fusarium proliferatum</i>	FO 08	15,5±4,5	36,1	22±1	51,8
<i>Colletotrichum</i> sp.	FP 09	15,5±1,5	65,7	22,5±4,5	39,6
<i>Fusarium verticillioides</i>	FP 10	17±1	38,6	26±6	22,6
<i>Fusarium oxysporum</i> (feijão)	FP 11	16±6	55,8	23±2	52,5
<i>Fusarium oxysporum</i> (algodão)	FP 12	25±5	24,3	22,5±1,5	34,3
<i>Phytophthora sojae</i>	FP 13	6,5±0,5	75	5±1	54,5
<i>Rhizopus microsporus</i>	FP 14	27,5±2,5	37,5	0,5±0,5	83,3
<i>Lasiodiplodia subglobosa</i> (BOT 11)	FP 15	43±12	0	56±13	0
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i> (BOT 93)	FP 16	18,5±12,5	56,3	31,5±3,5	25,4
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	FP 17	41,5±17,5	11,9	35,5±2,5	12,4

\*Raio rm – Raio de crescimento em direção à cepa de *T. harzianum* P49P11.

Analisando o co-cultivo das 17 cepas de fitopatógenos frente a cepa de *T. harzianum* P49P11 (**Tabela 2**), pode-se identificar que a morfologia apresentada no meio Czapek foi bem característica, sendo marcada por círculos concêntricos de esporos, alta esporulação e baixa produção de exsudatos. Em contrapartida, no meio BDA, a morfologia identificada foi de baixa esporulação, 8 das 17 cepas apresentaram a produção de exsudatos (FP 01, FP 03, FP 09, FP 11, FP 12, FP 13, FP 16 e FP 17). Das cepas de fitopatógenos, 4 cepas das 17 cepas não foram inibidas no meio BDA (FP 01, FP 02, FP 15 e FP 17), apresentando crescimento em direção ao *T. harzianum* P49P11 de acima de 37 mm (Raio rm) e, 3 cepas tiveram o crescimento pareado com o *T. harzianum* P49P11 (FP 01, FP 14 e FP16); já no meio Czapek, apenas 2 cepas tiveram o crescimento sob o

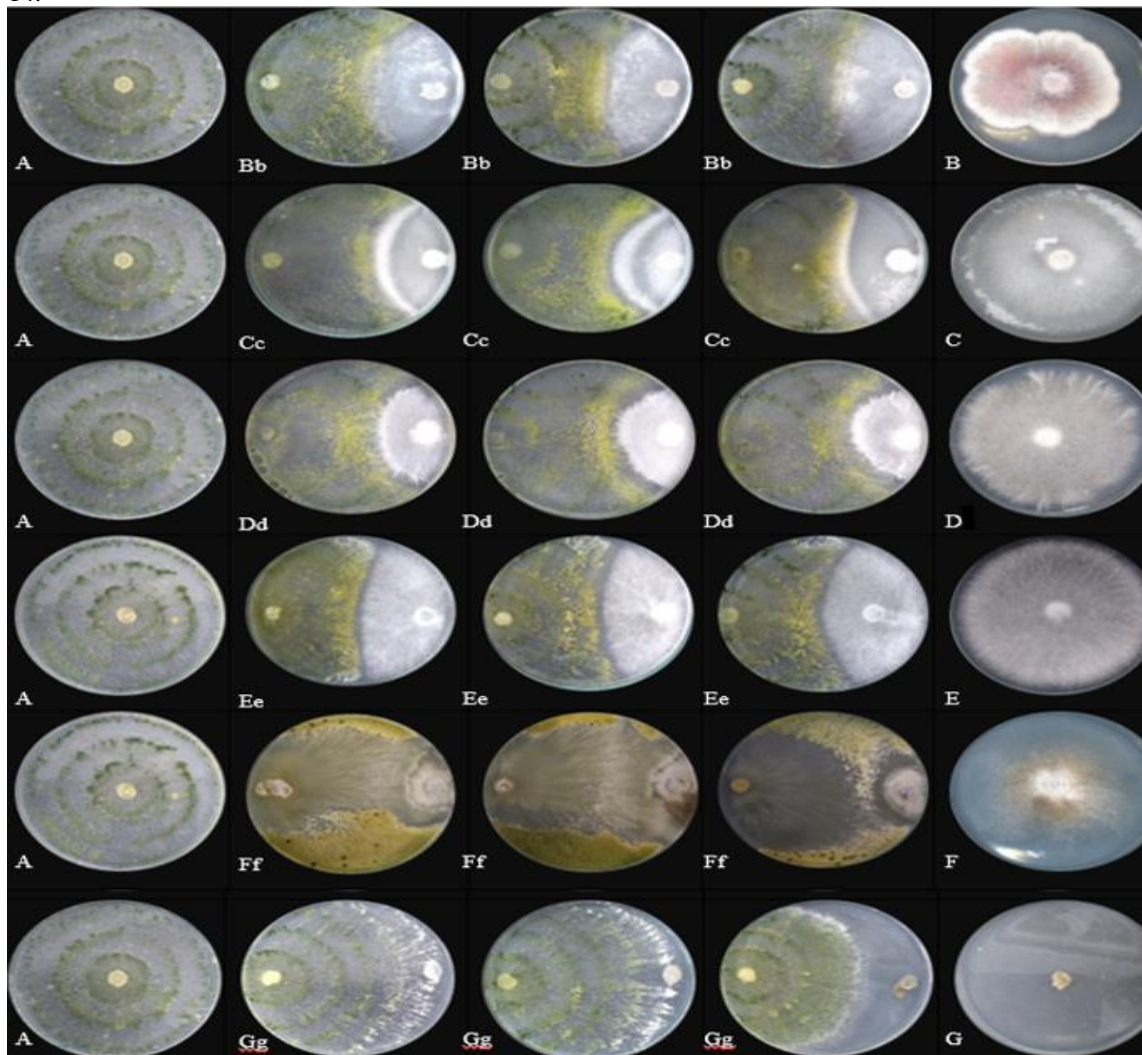
ACB (FP 02 e FP 15) e 3 cepas parearam o seu crescimento com este (FP 01, FP 16 e FP17) (**Apêndice B e C**).

**Figura 16** – Antagonismo por *T. harzianum* P49P11 em BDA. A. placa controle *T. harzianum* P49P11 (Th); B. placa controle *Colletotrichum* sp. (FP 09); Bb. placas de co-cultivo Th/FP 09; C. placa controle *Fusarium oxysporum* feijão (FP 11); Cc. placas de co-cultivo Th/FP 11; D. placa controle *Phytophthora sojae* (FP 13); Dd. placas de co-cultivo Th/FP 13; E. placa controle *Lasioidiplodia euphorbicola* BOT93 (FP 16); Ee. placa de co-cultivo Th/FP 16.



As cepas FP4, FP7, FP8, FP11, FP13 e FP14 cultivadas em meio Czapek apresentaram inibição (%I) em valores superiores à 50,0% (**Figura 17**), em contrapartida, apenas 4 cepas em meio BDA obtiveram tal resultado, sendo as cepas FP 9, FP11, FP13 e FP16 (**Figura 16**).

**Figura 17** – Antagonismo por *T. harzianum* P49P11 em Czapek. A. placa controle *T. harzianum* P49P11 (Th); B. placa controle *Fusarium oxysporum* ATCC 2163 (FP 04); Bb. placas de co-cultivo Th/FP 04; C. placa controle *Alternaria alternata* (FP 07); Cc. placas de co-cultivo Th/FP 07; D. placa controle *Fusarium proliferatum* (FP 08); Dd. placas de co-cultivo Th/FP 08; E. placa controle *Fusarium oxysporum* feijão (FP 11); Ee. placas de co-cultivo Th/FP 11; F. placa controle *Phytophthora sojae* (FP 13); Ff. placas de co-cultivo Th/FP 13; G. placa controle *Rhizopus microsporus* (FP 14); Gg. placas de co-cultivo Th/FP 14.



Saravanakumar e colaboradores (2016) com a cepa de *T. harzianum* CCTCC-SBW0095 e *T. harzianum* CCTCC-RW0001, cultivadas em meio BDA modificado com corante e antibióticos, durante 5 dias, sob temperatura de 28°C, sob ausência de luz, obtiveram porcentagens de inibição em cultivo pareado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* de 88,0% e 90,0%, respectivamente. Entretanto, neste trabalho o cultivo pareado da cepa de *T. harzianum* P49P11 contra as cepas de *Fusarium oxysporum* FP 11 e FP 12 foi realizado em tempo superior (7 dias) e em meios diferentes, sem a presença de corantes e antibióticos, resultando em valores inferiores aos encontrados por

Saravanakumar e colaboradores (2016), sendo em meio BDA a porcentagem de inibição foi de: 37,3% (FP4), 55,8% (FP11) e 24,3% (FP 12); já em meio Czapek: 51,7% (FP4), 52,5% (FP11) e 34,3% (FP 12).

O ACB apresentado neste estudo demonstrou valores de 65,7% (BDA) e 39,6% (Czapek) para a cepa de *Colletotrichum* sp. (FP9), sendo estes resultados superiores aos encontrados por Živković e colaboradores (2010), no qual em seu trabalho a cepa de *T. harzianum* DSM 6305 exibe uma diminuição do crescimento radial de aproximadamente 38% fitopatógenos *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Contudo, o estudo de Živković e colaboradores (2010) foi realizado em um menor tempo de cultivo e temperatura, 24 h e 25°C.

No presente trabalho a cepa de *Phytophthora sojae* (FP 13) teve uma inibição de 75,0%, representando o segundo maior valor de porcentagem de inibição do trabalho. A cepa de *Phytophthora sojae* é o agente causal da doença chamada de Podridão Radicular de Fitóftora, uma das doenças mais destrutivas da cultura de soja capaz de causar perda de 100% da lavoura caso não sejam utilizadas medidas corretivas (COSTAMILAN, 2007). É responsável por causar a morte de plantas em qualquer fase de desenvolvimento, estando associada com a relação de umidade de solo e compactação. Na fase inicial do ciclo de vida da soja a doença manifesta-se causando o apodrecimento de sementes e flacidez na radícula, as sementes infectadas possuem germinação retardada, quase sempre morrendo. Em plantas mais desenvolvidas a doença irá causar o amarelecimento de folhas, causar a seca de tecidos e apodrecimento das raízes principais e secundárias, ocasionando uma dificuldade de resistência da planta a posteriores períodos de seca.

A doença é mais comumente controlada a partir da utilização de variedades mais resistentes expressando genes de resistência dominante (Rps), entretanto alguns dos genes descritos não possuem a capacidade do controle total da doença (COSTAMILAN *et al.*, 2012), necessitando de outros vieses para diminuição de perdas. O uso de controladores biológicos tais como no trabalho de Bae e colaboradores (2015) e neste estudo, consistem em estratégias vantajosas para a complementação da utilização de cultivares resistentes, visto possibilitar o controle e não oferecer pressão de seleção como os agroquímicos, que ao passar do tempo poderiam ocasionar a resistência das cepas de *P. sojae* tanto para o composto em questão, quanto para os genes *Rps*.

Este comportamento inibitório também foi apresentado contra 5 cepas virulentas de *Phytophthora capsici*, apresentando inibição de mais de 85%, porém após o tempo de

8 dias (NAWAZ *et al.*, 2018). No trabalho de Uddin e colaboradores (2018) a cepa de *Trichoderma harzianum* da mesma forma, apresentou inibição capaz de inibir 100% das cepas de *Phytophthora capsici* e *P. ultimum* de forma em tempo inferior (5 dias).

A cepa de *Rhizopus microsporus* (FP 14) causadora da ferrugem em arroz (PARTIDA-MARTINEZ & HERTWECK, 2005), apresentou inibição de 85% de seu crescimento em co-cultivo com a cepa de *T. harzianum* P49P11 em meio Czapek. A cepa de *R. microsporus* teve desenvolvimento deficiente sob o meio Czapek, já a cepa de *T. harzianum* P49P11 demonstrou morfologia bem característica, com ampla densidade de esporos e círculos concêntricos. Em meio BDA a cepa FP 14 foi inibida em 37,5%, entretanto seu crescimento não foi deficiente. Demonstrando que a inibição pode estar relacionada com a dificuldade de assimilação dos nutrientes por parte da cepa FP 14 e facilidade por parte da cepa de *T. harzianum*.

Diversas espécies de *Trichoderma* possuem o crescimento mais rápido que muitos outros fungos, assim, quando competindo pelo mesmo substrato esses tendem a ser mais eficientes em obter nutrientes e impedir que os demais fungos possam ter acesso ao meio. Desta forma, a competição por substrato consiste em uma forma de controle biológico, visto que, os fungos pareados às cepas de *Trichoderma* tendem a ter o seu crescimento retardado e, conseqüentemente, não possuirão virulência usual (MOKHTAR & AID, 2013).

A cepa *L. euphorbicola* (FP 16) é caracterizada por ser um patógeno da emergente cultura de Pinhão Manso (*Jatropha curcas*) (MACHADO *et al.*, 2014). A cultura de Pinhão Manso recebe amplo destaque atualmente devido seu amplo potencial para utilização de energias renováveis como Biodiesel (SALGADO *et al.*, 2019; GONZÁLEZ *et al.*, 2016). Por se tratar de uma cultura recém explorada características agrônômicas são amplamente pesquisadas para possibilitar que esta seja cultivada em larga escala, uma destas é a fitossanidade (FERNANDES *et al.*, 2015), assim, é destacável a atuação da cepa de *T. harzianum* P49P11 sobre a cepa FP 16 em meio BDA, com inibição de 56,3%.

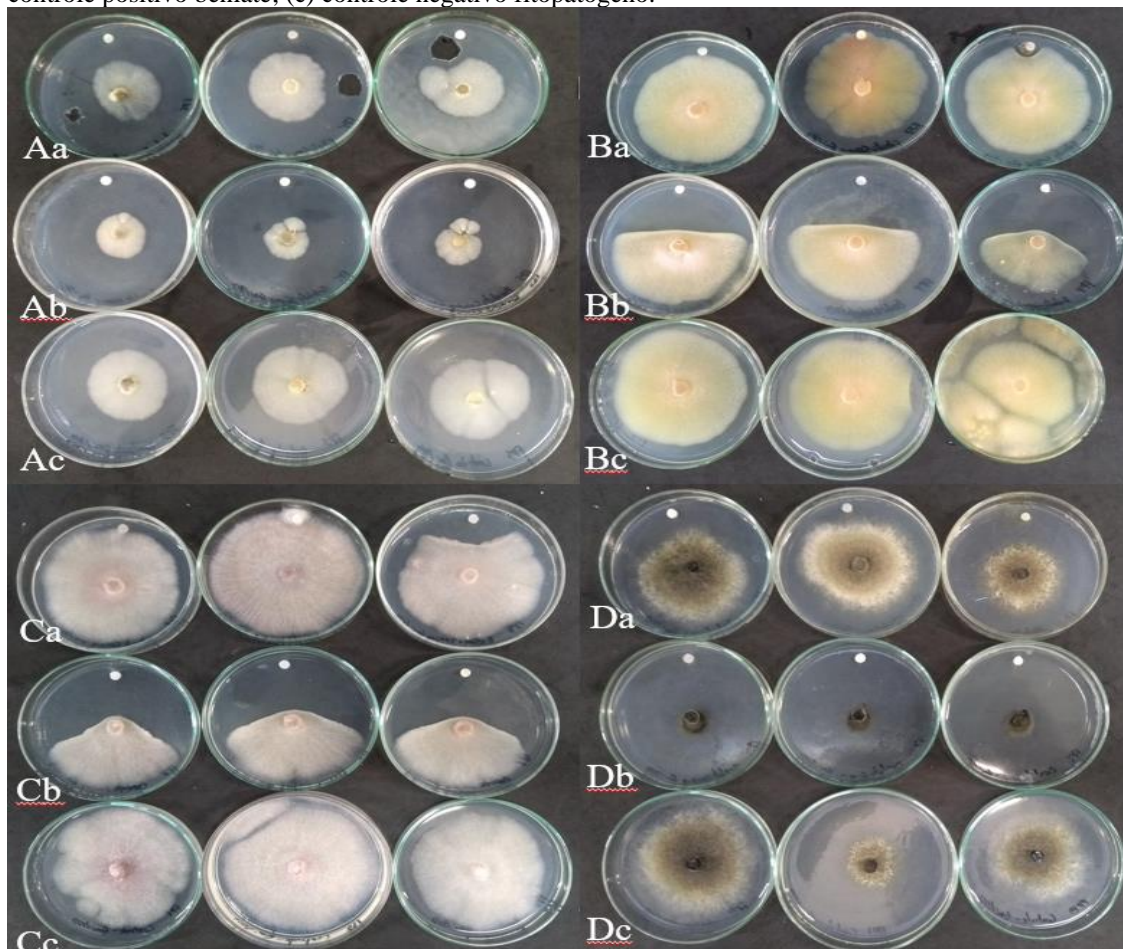
#### 5.4 Teste de Antagonismo com Extrato de *T. harzianum* P49P11

As cepas FP4, FP5, FP7, FP8, FP9, FP10, FP11 e FP13, apresentaram inibição nos dois meios de cultivo analisados de seu crescimento contra o ACB, assim foram



submetidas ao teste contra o extrato de bioativo por se tratarem de cepas mais responsivas ao *Trichoderma harzianum* P49P11 (**Figura 18**).

**Figura 18** – Teste de Antagonismo com extrato bioativo de *T. harzianum* P49P11. (A) placas teste FP 05; (B) placas teste FP 07; (D) placas teste FP 08; (D) placas teste FP 13; (a) extrato bioativo; (b) controle positivo benlate; (c) controle negativo fitopatogênico.



Contrariando seus resultados nos testes de pareamento de culturas, as cepas de fitopatogênos em questão, não foram inibidas pelo extrato do ACB (**Apêndice D**). Tendo %I menores que 15% (**Tabela 3**), as cepas mantiveram sua morfologia e crescimento em relação ao controle negativo, indicando assim que o extrato não apresenta ação controladora sob o fitopatógeno e conseqüentemente, a não presença de compostos fungistáticos e/ou fungicidas. As prováveis causas podem estar relacionadas a pequena quantidade de inóculo em relação ao meio líquido utilizado para o cultivo de *T. harzianum* P49P11, a falta de pré-cultivo para possibilitar que a cepa estivesse em seu ápice reprodutivo, não otimização das condições de cultivo para a cepa em questão. Também é

válido destacar que a metodologia de extração utilizada neste trabalho não foi desenvolvida especificamente para fungos, podendo assim em seu uso, ter incapacitado a extração de compostos bioativos da cepa de *T. harzianum*.

**Tabela 3** - Teste de antagonismo in vitro de extrato *Trichoderma harzianum* P49P11 contra fitopatógenos após 7 dias de cultivo a 28°C.

Fitopatógenos	Meios de cultura		
	BDA		
	Raio médio (mm)	Inibição (%)	Controle positivo (mm)
FP 04	34,5±11,5	0	5,5±0,5
FP 05	18,0±2,0	8,3	11,5±1,5
FP 07	12,0±4,0	13,3	6,0±2,0
FP 08	29,0±11	14,0	4,0±1,0
FP 09	29,5±9,5	0	1,0±0,1
FP 10	21,0±1,0	0	4,0±1,0
FP 11	32,5±1,5	1,0	4,5±1,5
FP 13	24,0±4,0	8,9	1,5±0,5

A cepa FP 13 apresentou 75% de inibição no teste de antagonismo, entretanto, não teve inibição significativa no teste contra o extrato bioativo de *T. harzianum* P49P11, o que demonstra a necessidade de otimização do teste de antagonismo com extrato para a cepa ou que o mecanismo de ação do ACB seja através de competição por nutrientes ou parasitismo.

## 6 CONCLUSÃO

A cepa de *Trichoderma harzianum* P49P11 mostrou ter um potencial biocontrolador para fitopatógenos nos testes enzimáticos e de co-cultivo, visto que, apresentou crescimento em todos os meios seletivos e teve inibição de mais de 50% em 4 das 17 cepas para o meio BDA e contra 6 cepas para o meio Czapek. A cepa foi capaz de inibir em 83,3% a cepa de *Rhizopus microsporus* (FP14) quando co-cultivada em meio Czapek, entretanto este valor pode ter sido ocasionado pelo deficiente desenvolvimento da cepa FP 14 e não competição com a cepa de *T. harzianum* P49P11 pelo meio. A cepa de *Trichoderma harzianum* P49P11 também promoveu uma inibição de 75% do fitopatógeno *Phytophthora sojae* (FP13) em meio BDA. A inibição de FP 13 é destacável, pois este fitopatógeno pode causar grandes perdas de produtividade nos campos de soja. Portanto, constatou-se que a cepa de *Trichoderma harzianum* P49P11 apresenta potencial para ser utilizado como agente de controle biológico, principalmente para o controle de *Phytophthora sojae*, tornando assim a cepa uma candidata para futuros testes em planta contra a atuação dessa cepa nas culturas da soja.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, G.M.; SHABANA, Y.M.; ISMAIL, A.D.; RASHAD, Y.M. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent against *Bipolaris oryzae*. **Mycopathologia**, v.164, p.81-89, 2007.
- AEAGRO. Manejo Integrado de Pragas. Disponível em: < <https://blog.aegro.com.br/manejo-integrado-de-pragas/>>. Acessado em: 01/09/2019.
- AFUTU, E.; AGOYI, E.E.; AMAYO, R.; BIRUMA, M.; RUBAIHAYO, P.R. Cowpea Scab Disease (*Sphaceloma* sp.) in Uganda. **Crop Protection**, v.92, p.213-220, 2017.
- AGROLINK. Micotoxinas no Milho Podem Afetar Humanos e Animais. Disponível em: < [https://www.agrolink.com.br/noticias/micotoxinas-no-milho-podem-afetar-humanos-e-animais\\_419860.html](https://www.agrolink.com.br/noticias/micotoxinas-no-milho-podem-afetar-humanos-e-animais_419860.html)>. Acessado em: 08/07/2019.
- AGROLINK. Podridão da raiz (*Lasiodiplodia theobromae*). Disponível em: <[https://www.agrolink.com.br/problemas/podridao-de-raiz\\_2509.html](https://www.agrolink.com.br/problemas/podridao-de-raiz_2509.html)>. Acessado em: 12/06/2019.
- AGROLINK. Problemas causados por fungos. Disponível em: <<https://www.agrolink.com.br>>. Acessado em: <28/01/2019>.
- AGROLINK. Podridão Vermelha das Raízes da Soja. Disponível em: < [https://www.agrolink.com.br/problemas/podridao-vermelha-das-raizes-da-soja\\_3044.html](https://www.agrolink.com.br/problemas/podridao-vermelha-das-raizes-da-soja_3044.html) >. Acessado em: 01/09/2019.
- AGROLINK. Verrugose. Disponível em: < [https://www.agrolink.com.br/problemas/verrugose\\_1598.html](https://www.agrolink.com.br/problemas/verrugose_1598.html)>. Acessado em: 01/09/2019.
- AGRONOMICABR. Vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro em Belém do Pará. Disponível em: <<http://www.agronomicabr.com.br/agriporticus/detalhe.aspx?id=646>>. Acessado em: 01/09/2019.
- AL-HAZMI, A.S.; TARIQJAVEED, M. Effects of different inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Meloidogyne javanica* on tomato. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, p.288-292, 2016.
- ALEWU, B.; NOSIRI, C. Pesticides and Human Health. In: STOYTCHIEVA, M. Pesticides in the Modern World – Effects of Pesticides Exposure. **InTech**, p.231-250, 2011.
- ALMASSI, F.; GHISALBERTI, E.L.; NARBAY, M.J. New Antibiotics from Strains of *Trichoderma harzianum*. **Journal of Natural Products**, v.54, n.2, p.396-402, 1991.
- ANDERSON, L.M.; STOCKWELL, V.O.; LOPER, J.E. An Extracellular Protease of *Pseudomonas fluorescens* inactivates antibiotics of *Pantoea agglomerans*. **Phytopathology**, v.15, p.1147-1156, 2004.

ANPII – Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes. Como o Brasil se Tornou Líder Mundial no Uso de Inoculantes. Disponível em: <<http://www.anpii.org.br/como-o-brasil-se-tornou-lider-mundial-no-uso-de-inoculantes/>>. Acessado em: 08/07/2019.

ARTHURS, S.P.; LACEY, L.A.; DE LA ROSA, F. Evaluation of a granulovirus (PoGV) and *Bacillus thuringiensis* sub sp. Kurstaki for control of the potato tuberworm (*Lepidoptera: Gelechiidae*) in stored tubers. **J. Econ. Entomol.** 2008, 101, 1540–1546

AZERÊDO, G.A.; STAMFORD, T.L.M.; SOUZA, E.L.; VERAS, F.F.; ALMEIDA, E.R.; ARAÚJO, J.M. *In vivo* Assessment of Possible Probiotic Properties of *Zymomonas mobilis* in Wistar Rat Model. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.13, n.2, 2010.

BAE, S.J.; MOHANTA, T.K.; CHUNG, J.Y.; RYU, M.; PARK, G.; SHIM, S.; HONG, S.B.; SEO, H.; BAE, D.W.; BAE, I.; KIM, J.J.; BAE, H. *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. **Biological Control**, v.92, p.128-138, 2016.

BARRAT, B.I.P.; MORAN, V.C.; BIGLE, F.; LENTEREN, J.C. The Status of Biological Control and Recommendations for Improving Uptake for the Future. **Biocontrol**, v. 63, i.1, p.155-167, 2017.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CODÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strain. **International Microbiology**, v. 7, p.249-260, 2004.

BHUVANESWARI, M.S.; PRASAD, B.S.R.V. Biological Pest Control by Using a Competitive Species and with Provision of Additional Food. **International Journal of Pure and Applied Mathematics**, v.109, n.2, p.295-309, 2016.

BIOMIN. BIOMIN World Mycotoxin Survey 2018. Disponível em: <<https://www.biomin.net/>>. Acessado em: 05/07/2019.

BOLAND, G.J.; HALL, R. Index of Plant Hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.16, i.2, p.93-108, 2013.

BOLLAND, G.J.; HALL, R. Epidemiology of *Sclerotinia* stem rot of soybean in Ontario. **Phytopathology**, v.78, p.1241-1245, 1988.

BOLTON, M.D.; THOMMA, B.P.H.J.; NELSON, B.D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and Molecular Traits of a Cosmopolitan Pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v.7, i.1, p.1-16, 2006.

BRASIL. AGROFIT - MAPA. Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitário. Disponível em: <<http://agrofit.agricultura.gov.br>>. Acessado em: <28/01/2019>.

BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regularização de Produtos – Agrotóxicos. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/registo>>. Acessado em: 07/07/2019.

BRASIL. ANVISA. *Trichoderma harzianum*. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br> >. Acessado em 08/07/2019.

BRASIL. CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira – Grãos, V.6 – SAFRA 2018/19. Disponível: <<https://www.conab.gov.br>>. Acessado 06/07/2019.

BRASIL. IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais. Reavaliação Ambiental. Disponível em: < <https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/reavaliacao-ambiental#sobre-a-reavaliacao-ambiental> >. Acessado em: 07/07/2019.

BRASIL. ITAMARATY. Acordo de Associação Mercosul-União Europeia. Disponível em: <<http://www.itamaraty.gov.br>>. Acessado em: 09/07/2019.

(a) BRASIL. MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Consulta de Registros. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/registro-de-produtos-e-estabelecimentos/consulta-de-registros> >. Acessado em: 23/01/2019.

(b) BRASIL. MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Mercado de Biodefensivos Cresce mais de 70% no Brasil em Um Ano. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/noticias/feffmercado-de-biodefensivos-cresce-em-mais-de-50-no-brasil> >. Acessado em: 08/07/2019.

(c) BRASIL. MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. AGROSTAT – Estatísticas de Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro. Disponível em: < <http://indicadores.agricultura.gov.br/> >. Acessado em: 23/01/2019.

CAIRNS, T.C.; NAI, C.; MEYER, V. How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 5, i.13, p.1-14, 2018.

CAMPANILE, G.; RUSCELLI, A.; LUISI, N. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by in vitro in planta tests. **European Journal of Plant Pathology**, v.117, p.237-246.

CANNON, P.F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P.R.; WEIR, B.S. *Colletotrichum* – Current Status and Future Directions. **Studies in Mycology**, v.23, p.181-213, 2012.

CARDOZA, R.E.; HERMOSA, R.; VIZCAINO, J.A.; SANZ, L.; MONTE, E.; GUTIERREZ, S. Secondary Metabolites Produced by *Trichoderma* and Their Importance in the Biocontrol Process. **Microorganisms for Industrial Enzymes and Biocontrol**, p.1-22, 2005.

CARVALHO, D.D.C.; GERALDINE, A.M.; JÚNIOR, M.L.; MELLO, S.C.M. Biological control of white mold by *Trichoderma harzianum* in common bean under field conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.50, n.12, p.1220-1224, 2015.

CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; JÚNIOR, M.L.; GERALDINE, A.M. Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.8, p.822-828, 2011.

CASTELLANI, A. A viability of some pathogenic fungi in distilled water. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.24, p.270-276, 1939.

CASTRO, R.A.; QUECINE, M.C.; LACAVAL, P.T.; BATISTA, B.D.; LUVIZOTTO, D.M.; MARCON, J.; FERREIRA, A.; MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. **Springer Plus**, v. 3, 382, 2014.

CAYROL JC, DIJAN-CAPORALINO C, PANCHAUD-MATTEI E. La lutte biologique contre les Nématodes phytoparasites. **Courrier de la cellule Environnement de l'INRA**, v.17, p.31-44, 1992.

CDDEP - The Center for Disease Dynamics, Economics & Policy. Resistance Map.2017. Disponível em: <<https://resistancemap.cddep.org/AntibioticResistance.php>>. Acessado em:26/03/2019.

CHANG, K.F.; HWANG, S.F.; AHMED, H.U.; ZHOU, Q.; STRELKOV, S.E.; CONNER, R.L.; McLAREN, D.L.; HENRIQUEZ, M.A.; HARDING, M.W.; TURNBULL, G.D. First Report of *Phytophthora sojae* Causing Root Rot in Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] in Alberta Canada. **Crop Protection**, v.91, p.49-56, 2016.

CHAVERRI, P.; BRANCO-ROCHA, F.; JAKLITSCH, W.; GAZIS, R.; DEGENKOLB, T.; SAMUELS, G.J. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. **Mycologia**, v.107, n.3, p.558-590, 2015.

CHOKSHI, A.; SIFRI, Z.; CENNIMO, D.; HORNG, H. Global Contributors to Antibiotic Resistance. **Journal of Global Infectious Diseases**, v.11. i.1, p.36-42, 2019.

CHUNG, K. Stress Response and Pathogenicity of the Necrotrophic Fungal Pathogen *Alternaria alternata*. **Scientifica (Cairo)**, 2012.

CLAUSEN, C.P. Biological of Insect Pests. **Annual Review of Entomology**, v.3, i.1, p.291-310, 1958.

CLAYDON, N.; HANSON, J.R.; TRUNEH, A.; AVENT, A.G. Harzianolide, a Butenolide Metabolite from Cultures of *Trichoderma harzianum*. **Phytochemistry**, v.30, i.11, p.3802-3803, 1991.

CNA – Confederação Agrícola e Pecuária do Brasil. PIB do Agronegócio. Disponível em: <<https://www.cnabrazil.org.br>>. Acessado em: 07/07/2019.

CONTINI, E.; JÚNIOR, G.M. Brazilian Agriculture, its Productivity and Change. Conference on “Food Security and the Futures of Farms: 2020 and Toward 2050”. Falkenberg: **Royal Swedish Academy of Agriculture and Forestry**, p.1-14, 2010.

COOK, R.J. Making a greater use of microbial inoculants in agriculture. **Annual Reviews in Phytopathology**, v.31, p.53-80, 1993.

COOK, R.J. Making Greater Use of Introduced Microorganisms for Biological Control of Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, v.31, p.53-80, 1993.

COOK, R.J., Success with biological control requires new thinking by industry. Counterpoint, Impact **AgriBusiness**, p.3-4, 1991.

COOKE, W.M.B. Carbon/Nitrogen Relationships of Fungus Culture Media. ***Mycopathologia et Mycologia Applicata***, v.34, p.305-316, 1968.

COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLLI, P.F.; CLEBSCH, C.C.; SOARES, R.M.; SEIXAS, C.D.S.; GODOY, C.V. Possible *Rps* Genes in Soybean Genotypes from Embrapa Trigo. **VI Congresso Brasileiro de SOJA**, Cuiabá – MT, 2012.

COSTAMILAN, L.M.; BERTAGNOLLI, P.F.; MORAES, R.M.A. Podridão Radicular de Fitóftora em Soja. Embrapa – Documentos Online. Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do79.pdf](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do79.pdf)>. Acessado em: 18/06/2019.

COUTINHO, I.B.L.; FREIRE, F.C.O.; LIMA, C.S.; LIMA, J.S.; GONÇALVES, F.J.T.; MACHADO, A.R.; SILVA, A.M.S.; CARDOSO, J.E. Diversity of Genus *Lasiodiplodia* Associated with Perennial Tropical Fruit Plants in Northeastern Brazil. ***Plant Pathology***, n.66, i.1, p.90-104, 2017.

CZAPEK, F. Studies on nitrogen production and protein formation of plants. Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie, v.1, i.12, p.538–560, 1902. In: FOUNDIN, A.S.; WYNN, W.K. Growth of *Puccinia graminis* f. sp. Triticici on a Defined Medium. ***Phytopathology***, v.62, n.9, p.1032-1040, 1972.

DEFESA VEGETAL. *Alternaria alternata*. Disponível em: <<http://www.defesavegetal.net/alteal>>. Acessado em: 26/06/2019.

DELABONA, P.S.; COTA, J.; HOFFMAN, Z.B.; PAIXÃO, D.A.A.; FARINAS, C.S.; CAIRO, J.P.L.F.; LIMA, D.J.; SQUINA, F.M.; RULLER, R.; PRADELLA, J.G.C. Understanding the Cellulolytic System of *Trichoderma harzianum* P49P11 and Enhancing Saccharification of Pretreated Sugarcane Bagasse by Supplementation with Pectinase and  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase. ***Bioresource Technology***, v.131, p.500-507, 2013.

DELABONA, P.S.; FARINAS, C.S.; LIMA, D.J.S.; PRADELLA, J.G.C. Experimental Mixture Design as a Tool to Enhance Glycosyl Hydrolases Production by a New *Trichoderma harzianum* P49P11 Strain Cultivated Under Controlled Bioreactor Submerged Fermentation. ***Bioresource Technology***, v.132, p.401-405, 2013.

DELABONA, P.S.; PIROTA, R.D.P.B.; CODIMA, C.A.; TREMACOLDI, C.R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C.S. Using Amazon Forest Fungi and Agricultural Residues as a Strategy to Produce Cellulolytic Enzymes. ***Biomass and Bioenergy***, v.37, p.243-250, 2012.

(a) DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic Properties of Species-Group of *Trichoderma* – I. Production of Non-Volatile Antibiotics. ***Transactions in British Mycological Society***, v.57, i.1, p.25-39, 1971.



(b) DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic Properties of Species-Group of *Trichoderma* – II. Production of Volatile Antibiotics. **Transactions in British Mycological Society**, v.57, i.1, p.41-48, 1971.

DESAI, S.; REDDY, M.S.; KLOEPPER, J. Comprehensive Testing of Biocontrol Agents. In: GNANAMANICKAM, S.S. **Biological Control of Crop Diseases**. Marcel Dekker, Inc. New York. p.391-424, 2002.

DICKINSON, J.K.M.; HANSON, J.R.; HITCHCOCK, P.B.; CLAYDON, N. Structure and Biosynthesis of Harzianopyridone, an Antifungal Metabolite of *Trichoderma harzianum*. **Journal of the Chemical Society**, Perkin Transactions, v.1, i.11, 1885.

DINOLFO, M.I.; CASTAÑARES, E.; STENGLEIN, S.A. *Fusarium* – Plant Interaction: State of the Art – a Review. **Plant Protection Science**, n.53, i.2, 61-70, 2017.

DOELLE, H.W.; KIRK, L.; CRITTENDEN, R.; TOH, H. *Zymomonas mobilis* – Sciences and Industrial Application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.13, i.1, p.57-98, 1993.

DOOHAN, F. Fungal Pathogens of Plants. In: KAVANAGH K., (Ed.). **Fungi – Biology and Applications**. John Wiley & Sons, Ltd, 2005, p. 219-250.

EPHYTIA. *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. (1992). Disponível em: <<http://ephytia.inra.fr/en/C/10798/Tobacco-Brown-spot-Alternaria-leaf-spot-Alternaria-alternata>>. Acessado em: 01/09/2019.

EMBRAPA MEIO AMBIENTE. Avaliação da qualidade de produtos à base de *Trichoderma*. Disponível em: <[http://www.cnpma.embrapa.br/down\\_site/forum/2012/trichoderma/Apostila\\_Trichoderma\\_2012.pdf](http://www.cnpma.embrapa.br/down_site/forum/2012/trichoderma/Apostila_Trichoderma_2012.pdf)>. Acessado em: 01/10/2016.

EMBRAPA. Projeto de Melhoramento Genético Desenvolve Cultivares Resistentes às Raças do *Fusarium oxysporum*. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/11127012/projeto-de-melhoramento-genetico-desenvolve-cultivares-resistentes-as-racas-do-fusarium-oxysporum>>. Acessado em: 04/07/2019.

EMBRAPA. Soja em números (safra 2018/19). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acessado em 06/07/2019.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. EPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Biopesticides. Disponível em: <<https://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>>. Acessado em: 05/04/2019.

(a) ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. USDA – United States Department of Agriculture. World Agricultural Weather, 2019. Disponível em: <<https://www.usda.gov>>. Acessado em: 07/07/2019.

(b) ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. USDA – United States Department of Agriculture. Disponível em: <<https://www.usda.gov/>>. Acessado em: 07/07/2019.

FALEMA, J.; RAIHER, A.P.; FERREIRA, C.R. Brazilian Agriculture: Regional Performance and Determinants of Productivity. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v.51, n.3, p.555-574, 2013.

(a) FAO – FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Pesticide use. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/>>. Acessado em: 01/04/2019.

(b) FAO – FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Mechanization for Rural Development: A review of patterns and progress from around the world 2013. Disponível em: < <http://www.fao.org/3/i3259e/i3259e.pdf>>. Acessado em: 01/03/2019.

(c) FAO – FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Statistical Pocketbook – World food and agriculture 2015. Disponível em: < <http://www.fao.org/3/a-i4691e.pdf>>. Acessado em: 01/03/2019.

FAO – STATISTICS. World Food and Agriculture – Statistical Pocketbook 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acessado em: 07/07/2019.

FERNANDES, C.F.; JÚNIOR, V.J.R.; SILVA, D.S.G.; REIS, N.D.; JÚNIOR, H.A. Mecanismos de Defesa de Plantas Contra o Ataque de Agentes Fitopatogênicos. Embrapa – Documentos, 2009. Disponível em: < <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/710939/1/133fitopatogenos.pdf>; Mecanismos >. Acessado em 08/07/2019.

FERNANDES, F.L.; FERNANDES, M.E.S.; LOPES, E.N.; VENZON, M.; DINIZ, J.F.S.; DIAS, L.A.S. Biological Control of Phytophagous Arthropods in the Physic Nut Tree *Jatropha curcas* L. in Brazil. **Acta Scientiarum Agronomy**, v37, p.29-36, 2015.

FRACETO, L.F.; MARUYAMA, C.R.; GUILER, M.; MISHRA, S.; KESWANI, C.; SINGH, H.B.; LIMA, R. *Trichodema harzianum*-base novel formulations: potential applications for management of Next-Generation agricultural challenges. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v.93, i.8, p.2056-2063, 2018.

FREIRE, F.C.O.; VIANA, F.M.P.; CARDOSO, J.E.; SANTOS, A.A. Novos Hospedeiros do Fungo *Lasiodiplodia theobromae* no Estado do Ceará. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. 6p. (Comunicado Técnico, 91).

GAO, L. Application of Two-Stage Cultivation for Exploring the Nutritional Requirements of Three Biocontrol Fungi. **Biotechnology Research International**, v.2015, p.1-5, 2015.

GAO, L.; LIU, X. Sporulation of Several Biocontrol Fungi as Affected by Carbon and Nitrogen Sources in a Two-Stage Cultivation System. **The Journal of Microbiology**, v.48, n.6, p.767-770, 2010.

GAP – REPORT. Global Agricultural Productivity Report – A World of Productive Sustainable Agriculture 2017. Disponível em: <<https://globalagriculturalproductivity.org>>. Acessado em 07/07/2019.

GELAIN, L. PRADELLA, J.G.C.; COSTA, A.C. Mathematical Modeling of Enzyme Production Using *Trichoderma harzianum* P49P11 and Sugarcane as Carbon Source. **Bioresource Technology**, v.198, p.101-107, 2015.

GHISALBERTI, E.L., NARBAY, M.J., DEWAN, M.M. AND SIVASITHAMPARAM, K. Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrones. **Plant Soil**, 121, 287– 291, 1990.

GHISALBERTI, E.L.; ROWLAND, C.Y. Antifungal Metabolites from *Trichoderma harzianum*. **Journal of Natural Products**, v.56, i.10, p.1799-1804, 1993.

GILL, H.K.; GARG, H. Pesticides: Environmental Impacts and Management Strategies. In: MARCELO, L.; SOLONESKI, S. **Pesticides – Toxic Aspects**, p.187-230, 2014.

GOKUL, B.; LEE, J.H.; SONG, K.B.; RHEE, S.K.; KIM, C.H.; PANDA, T. Characterization and applications of chitinases from *Trichoderma harzianum* – A review. **Bioprocess Engineering**, v. 23, i.6, p.691-694, 2000.

GONZÁLEZ, C.N.F. International Experiences with the Cultivation of *Jatropha curcas* for Biodiesel Production. **Energy**, v.112, p.1245-1258, 2016.

GORDON, T.R. *Fusarium oxysporum* and *Fusarium* Wilt Syndrome. **Annual Review of Phytopathology**, n.55, p.23-39, 2017.

GUPTA, V.K.; SCHMOLL, M.; HERRERA-ESTRELA, A.; UPADHYAY, R.S.; DRUZHININA, I.; TUOHY, M. Biotechnology and Biology of *Trichoderma*. Elsevier. 2014.

HAHN, M. The Rising Threat of Fungicide Resistance in Plant Pathogenic Fungi: *Botrytis* as a Case Study. **Journal of Chemical Biology**, v.7, i.4, p.133-141, 2014.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycologia**, v.63, i.3, p.597-607, 1975.

HARMAN, E.G.; HOWELL, C.R.; VITERBO A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* Species – Opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews**, v.2, p.43-66, 2004.

HEYDARI, A.; PESSARAKLI, M. A Review on Biological Control of Fungal Plant Pathogens Using Microbial Antagonists. **Journal of Biological Sciences**, v.10, n.4, p.273-290, 2010.

HEYDARI, A.; PESSARAKLI, M. A Review on biological Control of Fungal Pathogens Using Microbial Antagonists. **Journal of Biological Sciences**, v.10, n.4, p.273-290, 2010.

HUANG XW, ZHAO N.H, ZHANG K.Q. Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. **Res Microbiol.** v.155, i.10, p.811-816, 2004.

HURST, D. J. (ed.). *Studies in viral ecology: microbial and botanical host systems*, Volume 1. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2011.

IBMA – International Biocontrol Manufacturers Association. IBMA Members. Disponível em: < <http://www.ibma-global.org/en/all-ibma-members>>. Acessado em: 08/07/2019.

INDEX FUNGORUM. Disponível em: < <http://www.indexfungorum.org>>. Acessado em: <21/01/2019>.

JACKSON, C.; HSIA, Y.; BIELICKI, J.A.; ELLIS, S.; STEPHENS, P.; WONG, I.C.K.; SHARLAND, M. Estimating Global Trends in Total and Childhood Antibiotic Consumption, 2011-2015. **BMJ Global Health**, v. 4.i.1, 2019.

JAMALIZADEH, M.; ETEBARIAN, H.R.; AMINIAH, H.; ALIZADEH, A. A Review of Mechanisms of Action of biological Control Organisms Against Post-Harvest Fruit Spoilage. **EPPO Bulletin**, v.41, n.1, p.64-71, 2011.

JÚNIOR, H.J.T.; MELLO, M.B.A.; JÚNIOR, N.S.M. Caracterização Morfológica e Fisiológica de Isolados de *Colletotrichum* sp. Causadores de Antracnose em Solanáceas. **Summa Phytopathologica**, v.32, n.1, p.71-79, 2006.

JÚNIOR, T.J.R.; VENZON, M.; TEIXEIRA, H.; BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B.; VILELLA, F.M.F.; CASTRO, M.L.M.P. Regulamento e uso de produtos à base de agentes biológicos para controle de doenças de plantas e pragas no Brasil. Defesa Vegetal e Sustentabilidade do Agronegócio, Informe Agropecuário, v.34, n.276, p.50-57, 2013.

KABDAL, B.C.; SHARMA, R.; TEWARI, R.; TEWARI, A.K.; SINGH, R.P.; DANDONA, J.K. Field efficacy of different combinations of *Trichoderma harzianum*, *Pseudomonas fluorescens*, and arbuscular mycorrhiza fungus against the major diseases of tomato in Uttarakhand (India). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 29, i.1, 2019.

KERGUNTEUIL, A.; BAKHTIARI, M.; FORMENTI, L.; XIAO, Z.; DEFOSSEZ, E.; RASMANN, S. Biological Control Beneath the Feet: A Review of Crop Protection Against Insect Root Herbivores. **Insects**, v.7, i.70, p.1-22, 2016.

KHALEDI, N.; TAHERI, P.; Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against soybean charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*. **Journal of Plant Protection Research**, v. 56, i.1, p.21-31, 2016.

KHALILI, E.; SADRAVI, M.; NAEIMI, S.; KHOSRAVI, V. **Journal of Plant Protection Research**, v.43, n.1, 2012.

KOOGAN, M. Integrated Pest Management: Historical Perspectives and Contemporary Development. **Annual Review of Entomology**, v.43, p.243-270, 1998.

KURAMAE, E.E.; SOUZA, N.L. Variabilidade Gnética entre *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* e Raças 1 e 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Através de RAPD e Sequências de Regiões ITS e rDNA. **Acta Scientiarum**, v.24, n.5, p.1481-1485, 2002.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças das solanáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 3.ed. São Paulo: **Agronômica Ceres**, v.2., cap.62, p.665-675, 1997.

KOCZOR, A. *Colletotrichum* sp. – *Malus domestica*. Disponível em: <<https://www.flickr.com/photos/adamkoczor/31227006358>>. Acessado em: 01/09/2019.

LACEY, L.A.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D.I.; Frutos, R.; Brownbridge, M.; Goettel, M.S. Insect pathogens as biological control agents: **Back to the future.J. Invertebr. Pathol.**, v.132, p.1–41, 2015.

LACKNER, G.; HERTWECK, C.; Impact of Endofungal Bacteria on Infection Biology, Food Safety, and Drug Development. **PLOS – Pathogens**, v.7, i.6, 2011.

LEAL, G.A.; GOMES, L.H.; ALBUQUERQUE, P.S.B.; TAVARES, F.C.A.; FIGUEIRA, A. Searching for *Moniliophthora perniciosa* Pathogenicity Genes. **British Mycological Society**, v.114, p.842-854, 2010.

LEELAVATHI, M.S.; VANI, L.; REENA, P. Antimicrobial activity of *Trichoderma harzianum* against bacteria and fungi. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.3, n.1, p.96-103, 2014.

LEPPA, N.C.; WILLIAMS, D.W. Mass Rearing Beneficial Insects and the Renaissance of Biological Control. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, p.231-238.

LIMA, F.B.; FÉLIX, C.; OSÓRIO, N.; ALVES, A.; VITORINO, R.; DOMINGUES, P.; RIBEIRO, R.T.S.; ESTEVES, A.C. **Biological Control**, v.106, p.99-109, 2017.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial – Processo Fermentativos e Enzimáticos Vol. 3. Edgard Blucher LTDA. 2007.

LORITO, M.; FARKAS, V.; REBUFFAT, S.; BODO, B.; KUBICEK, C. Cell Wall Synthesis is a Major Target of Mycoparasitic Antagonism by *Trichoderma harzianum*. **American Society for Microbiology**, v.178, n.21, p.6382-6385, 1996.

LORITO, M.; FARKAS, V.; REBUFFAT, S.; BODO, B.; KUBICEK, C. Cell Wall Synthesis Is a Major Target of Mycoparasitic Antagonism by *Trichoderma harzianum*. **American Society for Microbiology**, v.178, n.21, p.6382-6385, 1996.

LORITO, M.; HARMAN, G.E.; HAYES, C.K.; BROADWAY, R.M.; TRONSMO, A.; WOO, S.L.; DI PIETRO, A. Chitinolytic Enzymes Produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal Activity of Purified Endochitinase and Chitobiosidase. **Phytopathology**, v.83, n.3, p.302-307, 1993.

MA, L.J.; GEISER, D.M.; PROCTOR, R.H.; ROONEY, A.P.; O'DONEEL, K.; TRAIL, F.; GARDINER, D.M.; MANNERS, J.M.; KAZAN, K. *Fusarium* Pathogenomics. **Annual Review of Microbiology**, n.67, p.399-416, 2013.

MACHADO, A.R.; PINHO, D.B.; PEREIRA, O.L. Phylogeny, Identification and Pathogenicity of the Botryodphaeriaceae Associated with Collar and Root Rot of the Biofuel Plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a Description of New Species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Diversity**, v.67, p.231-247, 2014.

MANTOVANI, E.C.; OLIVEIRA, P.E.B.; QUEIROZ, D.M.; FERNANDES, A.L.T.; CRUVINEL, P.E. Current Status and Future Prospect of the Agricultural Mechanization in Brazil. **Agricultural Mechanization in Asia, Africa and Latin America**, v.50, n.2, p.20-28, 2019.

McFARLAND, J. The Nephelometer: An Instrument for Estimating the Number of Bacteria in Suspension Used for Calculating the Opsonic Index and for Vaccines. **The Journal of the American Medical Association**, v.54, i.14, p.1176-1178, 1907.

MEINHARDT, L.W.; RINCONES, J.; BAILEY, B.A.; AIME, M.C.; GRIFFITH, G.W.; ZHANG, D.; PEREIRA, G.A.G. *Moniliophthora perniciosa*, the Causal Agent of Witches' Broom Disease of Cacao: What's New from This Old Foe? **Molecular Plant Pathology**, v.9, i.5, p.577-588, 2008.

MELO, I.S. Agência Embrapa de Informação Tecnológica – Fungos. Disponível em: <[https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura\\_e\\_meio\\_ambiente/arvore/CONTAG01\\_52\\_210200792814.html](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_52_210200792814.html)>. Acessado em: 08/07/2019.

MELO, M.B.; MORAIS, C.F.M. Citrus: A Podridão Floral. **Embrapa – Circular Técnica** n.7, 199.

MOKHTAR, H.; AID, D. Efficacy of *Trichoderma* species on *Phytophthora dresekeri* f. sp. *cajani* of Pigeonpea. *Annals of Plant Protection Sciences*, v.16, p.162-164. In: TOGHUEO, R.M.K.; EKE, P.; ZABALGOGUEAZCOA, I.; ALDANA, B.R.V.; NAN, L.W.; BOYOM, F.F. Biocontrol and growth enhancement potential of two endophytic *Trichoderma* spp. From *Terminalia catappa* against the causative agent of Common Bean Root Rot (*Fusarium solani*). **Biological Control**, v. 93, p.8-20, 2016.

MOON, R.D. Biological Control Through Interspecific Competition. **Environmental Entomology**, v.9, n.6, p.723-728, 1980.

MORTON, A.G. The Induction of Sporulation in Mold Fungi. *Proceeding of the Royal Microscopical Society B*, p.548-596, 1961.

MOSCARDI, F. *Baculovirus anticarsia*. Ageitec – Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em: <<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soja/arvore/CONT000g0gza9sb02wx5ok026zxpgsx7fgi4.html>>. Acessado em: 08/07/2019.

MUELLER, D. Root and Stem Rot (*Phytophthora sojae*). Disponível em: <<https://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5465804>>. Acessado em: 01/09/2019.

MUSTAFA, U.; KAUR, G. Effects of Carbon and Nitrogen Sources and Ratio on the Germination, Growth and Sporulation Characteristics of *Metharhizium anisopliae* and

*Beuveria bassiana* isolates. **African Journal of Agricultural Research**, v.3, i.10, p.922-930, 2009.

NAWAZ, K.; SHAHID, A.A.; BENGUELLA, L.; SUBHANI, M.N.; ALI, M. ANWAR, W.; IFTIKHAR, S.; ALI, S.W. Diversity of *Trichoderma* Species in Chili Rhizosphere that Promote Vigor and Antagonism Against Virulent *Phytophthora capsici*. **Scientia Horticulturae**, v.239, p.242-252, 2018.

NETTO, M.S.B.; LIMA, W.G.; CORREIA, K.C.; SILVA, C.F.B.; THON, M.; MARTINS, R.B.; MILLER, R.N.G.; MICHEREFF, S.J.; CÂMARA, M.P.S. Analysis of Phylogeny, Distribution and Pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* Species Associated with Gummosis of *Anacardium* in Brazil, with a New Species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Biology**, n.121, i.4, p.437-451, 2017.

NGUYEN, P.A.; STRUB, C.; DURAND, N.; ALTER, P.; FONTANA, A.; SCHORR-GALINDO, S. Biocontrol of *Fusarium verticillioides* Using Organic Amendments and Their Actinomycete Isolates. **Biological Control**, v. 118, p.55-66, 2018.

OECD – FAO. Agricultural Outlook 2018-2027. Disponível em: <<http://www.agri-outlook.org>>. Acessado em: 07/07/2019.

OLIVEIRA, M.Z.A.; JÚNIOR, P.P.; BARBOSA, C.J.; ASSMAR, C.C. Fungo *Lasiodiplodia theobromae* – um problema para a agricultura baiana. Embrapa Mandioca e Fruticultura. **Bahia Agrícola**, v.9, n.2, p.24-29, 2013.

OMOMOWO, I.O.; FADIJI, A.E.; OMOMOWO, O.I. Assessment of bio-efficacy of *Glomus versiforme* and *Trichoderma harzianum* in inhibiting powdery mildew disease and enhancing the growth of cowpea. **Annals of Agricultural Sciences**, v.63, i.1, p.9-17, 2018.

PAN – Pesticide Action Network. Highly Hazardous Pesticides (HHPs). Disponível em: <<http://www.pan-uk.org/highly-hazardous-pesticides/>>. Acessado em: 07/07/2019.

PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v. 23, p.23-54, 1985.

PARRA, J.R.P. Biological Control in Brazil: An Overview. **Scientia Agricola**, v.71, n.5, p.345-355, 2014.

PARK, S.R.; TRIPATHI, A.; WU, J.; SCHULTZ, P.J.; YIM, I.; MCQUADE, T.J.; YU, F.; AREVANG, C.J.; MENSAH, A.Y.; CASTILLO, G.T.; XI, C.; SHERMAN, D.H. Discovery of cahitamycins as biofilm inhibitors derived from a convergent biosynthetic pathway. **Nature Communications**, v.7, a.10710, 2016.

PARTIDA-MARTINEZ, L.P.; HERTWECK, C. Pathogenic Fungus Harbors Endosymbiotic Bacteria for Toxin Production. **Nature – Letter**, v.437, p.884-888, 2005.

PELTIER, A.J.; BRADLEY, C.A.; CHILVERS, M.I.; MALICK, D.K.; MUELLER, D.S.; WISE, K.A.; ESKER, P.D. Biology, Yield Loss and Control of Sclerotinia Stem Rot of Soybean. **Journal of Integrated Pest Management**, v.3, n.2, 2012.

PILZ, C.; ENKERLI, J.; WEGENSTEINER, R.; KELLER, S. Establishment and persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in maize fields. **J. Appl. Entomol.** 2011, 135, 393–403.

PIRES, C.S.S.; PEREIRA, F.M.; LOPES, M.T.R.; NOCELLI, R.C.F.; MALASPINA, O.; PETTIS, J.S.; TEIXEIRA, E.W. Enfraquecimento e Perda de Colônias de Abelhas no Brasil há Casos de CCD? **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, n.5, p.422-442, 2016.

POLETTO, T.; MACIEL, C.G.; MUNIZ, M.; BLUME, E.; POLETTO, I.; BRIOSO, P. First Report of Stem Canker Caused by *Lasiodiopodia subglobosa* on *Carya illinoensis* in Brazil. Disease Notes – The American **Phytopathological Society**, 2016.

POOLSAWAT, O.; THARAPREULSAPONG, A.; WONGKAEW, S.; CHAOWISET, W.; TANTASAWAT, P. Laboratory and Field Evaluations of Resistance to *Sphaceloma ampelinum* Causing Anthracnose in Grapevine. **Australasian Plant Pathology**, v.41, i.3, p. 263-269, 2012.

PURDY, L.H. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, Diseases and Symptomatology, host Range, Geographic Distribution, and Impact. **The American Phytopathological Society**, v.69, n.8, p.875-880, 1979.

RADA, N.; HELFAND, S.; MAGALHÃES, M. Agricultural Productivity Growth of the Brazilian Model of Agricultural. **Food Policy**, v.84, p.176-185, 2019.

RAJPUT, A.Q.; KHANZADA, M.A.; SHAHZAD, S. Effect of Different Organic Substrates and Carbon and Nitrogen Growth and Shelf Life of *Trichoderma harzianum* P49P11. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v.16, n.4, p.731-745, 2014.

RIGOTTO, R.M.; VASCONSELOS, D.P.; ROCHA, M.M. Pesticide use in Brazil and Problems fo Public Health. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n.7, 2014.

RODRÍGUEZ-GÁLVEZ, E.; GUERRERO, P.; BARRADAS, C.; CROUS, P.W.; ALVEZ, A. Phylogeny and Pathogenicity of *Lasiodiopodia* Species Associated with Dieblack of Mango in Peru. **Fungal Biology**, n.121, i.4, p.452-465, 2017.

ROSSETTO, C.J.; LOURENÇÃO, A.L.; ESPIRONELO, A.; IGUE, T.; RIBEIRO, I.J.A. Ocorrência do Complexo – *Carpophilus humeralis* (Fabricius) – *Ceratocystis paradoxa* (De Seynes) Moreu em Cana-de-Açúcar no Estado de São Paulo. **Bragantia**, v.45, n.1, 1986.

SAID, S.D. Spore production of biocontrol agent *Trichoderma harzianum*: effect of C/N ration and glucose concentration. **Journal ReKayasa kimia dan Lingkundan**, v.6, p. 35-40, 2007.

SALGADO, M.A.H.; TARELHO, L.A.C.; RIVADENEIRA, D.; RAMÍREZ, V.; SINCHE, D. Energy Valorization of the Residual Biomass Produced During *Jatropha curcas* oil extraction. **Renewable Energy**, 2019.



SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª Edição, Cold Spring Harbour laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y. 1989.

SANTOS, E.K.N.; HONDA, R.T.; NOZAWA, S.R.; NOZAWA, M.S.F. Microbial Diversity of Soil on the Banks of the Solimões and Negro Rivers, State of Amazonas, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.35, i.1, p.134, 141, 2012.

SANTOS, P.H.D.; DIAS, M.V.; FREIRE, M.G.M.; CARVALHO, B.M.; SILVEIRA, S.F. Diagrammatic Scale of Severity for Postharvest Black Rot (*Ceratocystis paradoxa*) in Coconut Palm Fruits. **Summa Phytopathologica**, v.43, n.4, p.269-275, 2017.

SARAVANAKUMAR, K.; LI, Y.; YU, C.; WANG, Q.; WANG, M.; SUN, J.; GAO, J.; CHEN, J. Effect of *Trichoderma harzianum* on maize rhizosphere microbiome and biocontrol of *Fusarium* Stalk rot. **Scientific Reports**, v.7, i.1, n.1771, 2017.

SARAVANAKUMAR, K.; YU, C.; DOU, K.; WANG, M.; LI, Y.; CHEN, J. Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. **Biological Control**, v.94, p.37-46, 2016.

SARHY-BAGNON V, LOZANO P, SAUCEDO-CASTANEDA G, ROUSSOS S. Production of 6-pentyl-alpha-pyrone by *Trichoderma harzianum* in liquid and solid-state cultures. **Process Biochem.**, v.36, p.103-109, 2000.

SARTORATO, A.; RAVA, C.A. Murcha ou Amarelecimento de *Fusarium*. Embrapa – Publicações, 1994. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/199903/murcha-ou-amarelecimento-de-fusarium>>. Acessado em: 04/07/2019.

SAVARY, S.; WILLOCQUET, L.; PETHYBRIDGE, S. J.; ESKER, P.; MCROBERTS, N.; NELSON, A. The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology & Evolution**, v. 3, n. 3, p. 430, 2019.

SCARSELETTI, R.; FAULL, J.L. *In vitro* Activity of 6-pentyl-alpha-pirone, a Metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the Inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. **Mycological Research**, v.98, i.10, p.1207-1209, 1994.

SCHMIDELL, WILLIBALDO. Microrganismos e Meios de Cultura para Utilização Industrial. In: SHCMIDELL, WILLIBALDO *et al.* Biotecnologia Industrial Vol. 2. São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 2001.

SCHWARTZ, H.F. Rhizopus Soft Rots (*Rhizopus microsporus*). Disponível em: <<https://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=5365931>>. Acessado em: 01/09/2019.

SENA, K.; ALEMANNI, L.; GRAMACHO, K.P. The Infection Process of *Moniliophthora perniciosa* in Cacao. **Plant Pathology**, n.63, p.1272-1281, 2014.

SIDDIQUI, Z.; MAHMOOD, I. Biological Control of Plant Parasitic Nematodes by Fungi: A Review. **Bioresource Technology**, v.58, p.229-239, 1996.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.23, i.1, p.15-22, 1957.

SIGMA. Amberlite® XAD16N. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/xad16?lang=pt&region=BR>>. Acessado em: 20/03/2019.

SILVA K.S.; REBOUÇAS, T.N.H.; LEMOS, O.L.; BOMFIM, M.P.; BOMFIM, A.A.; ESQUIVEL, G.L.; BARRETO, A.P.P.; JOSÉ, A.R.S.; DIAS, N.O.; TAVARES, G.M. Patogenicidade Causada pelo Fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) em Diferentes Espécies Fúrferas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, p.131-133, 2006.

SILVA, M.C.S.; POLONIO, J.C.; QUECINE, M.C.; ALMEIDA, T.T.; BOGAS, A.C.; PAMPHILE, J.A.; PEREIRA, J.O.; ASTOLFI-FILHO, S.; AZEVEDO, J.L. Endophytic Cultivable Bacterial Community Obtained from the *Paullinia cupana* seed in Amazonas and Bahia Regions and its Antagonistic Effects Against *Colletotrichum gloeosporioides*. **Microbial Pathogenesis**, v. 98, p.16-22, 2016.

SINGH, A.; SHUKLA, N.; KABADWAL, B.C.; TEWARI, A.K.; KUMAR, J. Review on Plant-*Trichoderma*-Pathogen Interaction. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.7, n.2, p.2382-2397, 2018.

SOUZA, E.S.; SILVA, J.R.A.; ASSUNÇÃO, I.P.; MELO, M.P.; FEIJÓ, F.M.; MATOS, K.S.; LIMA, G.S.A.; BESERRA Jr., J.E.A. *Colletotrichum* Species Causing Anthracnose on Lima Bean in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.43, p.78-84, 2017.

STAMATI, P.N.; MAIPAS, S.; KOTAMPASI, C.; STAMATIS, P.; HENS, L. Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. **Frontiers in Public Health**, v.4, i.148, 2016.

STEPIEŃ, L. KOCZYK, G.; WAŚKIEWICZ, A. Genetic and Phenotypic Variation of *Fusarium proliferatum* Isolates from Different Host Species. **Journal of Applied Genetics**, v.52, i.4, p.487-496, 2011.

SUN, S.; LUI, Q.; HAN, L.; MA, Q.; HE, S.; LI, X.; ZHANG, H.; ZHANG, J.; LIU, X.; WANG, L. Identification and Characterization of *Fusarium proliferatum*, a New Species of Fungi that Cause Fungal Keratitis. **Nature – Scientific Reports**, v.8, i.4859, 2018.

SUSTAINABLE DEVELOPMENT. Transforming our World: the 2030 Agenda for Sustainable Development. Disponível em: <<https://sustainabledevelopment.un.org/post2015/transformingourworld>>. Acessado em: 07/07/2019.

TILMAN, D.; BALZER, C.; HILL, J.; BEFORT, B. L. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 50, p. 20260-20264, 2011.

TRANIER, M.S.; GROS, J.P.; QUIROZ, R.D.C.; GONZÁLEZ, C.N.A.; MATEILLE, T.; ROUSSOS, S. Commercial Biological Control Agents Targeted Against Plant-Parasitic Root-rot Nematodes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.57, n.6, 2014.

TSUGE, T.; HARIMOTO, Y.; AKIMITSU, K.; OHTANI, K.; KODAMA, M.; AKAGI, Y.; EGUSA, M.; YAMAMOTO, M.; OTANI, H. Host-Selective Toxins Produced by the Plant Pathogenic Fungus *Alternaria alternata*. **Microbiology Reviews**, v.37, p.44-66, 2013.

TÜRDER, M. Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. *Advances in Science and Industrial Productions of Baker's Yeast*, 2014.

TYLER, B.M. *Phytophthora sojae*: Root Rot Pathogen of Soybean and Model Oomycete. **Molecular Plant Pathology**, v.8, n.1, p.1-8, 2007.

UDDIN, M.N.; RAHMAN, U.; KHAN, W.; UDDIN, N.; MUHAMMAD, M. Effect of *Trichoderma harzianum* on tomato plant growth and its antagonistic activity against *Phytophthora altimum* and *Phytophthora capsici*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v.28, i.32, 2018.

UN – United Nations. World Population Prospects 2019. Disponível em: <[https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019\\_Highlights.pdf](https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_Highlights.pdf)>. Acessado em: 07/07/2019.

UNIÃO EUROPEIA. EUROPA – European Commission. Renewal of Approval. Disponível em: <[https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval\\_active\\_substances/approval\\_renewal\\_en](https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval_active_substances/approval_renewal_en)>. Acessado em: 07/07/2019.

VASCONCELOS, C.V.; SILVA, D.C.; CARVALHO, D.D.C. Ocorrência de *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Krissl. em Tubérculos de Batata, no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n.2, 2014.

VASCONCELOS, Y. Pesticides in the Balance. Disponível em: <<https://revistapesquisa.fapesp.br/en/2019/02/25/pesticides-in-the-balance/>>. Acessado em: 07/07/2019.

VINALE, F.; FLEMATTI, G.; SIVASITHAMPARAM, K.; LORITO, M.; MARRA, R.; SKELTON, B.W.; GHISALBERTI, E.L. Harzianic Acid, an Antifungal and Plant Growth Promoting Metabolite from *Trichoderma harzianum*. **Journal of Natural Products**, v.72, n.11, p.2032-2035, 2009.

VINALE, F.; MARRA, R.; SCALA, F.; GHISALBERTI, E.L.; LORITO, M.; SIVASITHAMPARAM, K. Major Secondary Metabolites Produced by Two Commercial *Trichoderma* Strains Active Against Different Phytopathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v.43, i.2, 2006.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; MARRA, R.; WOO, L.; LORITO, M. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 40, p.1-10, 2008.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; WOO, S.L.; NIGRO, M.; MARRA, R.; LOMBARDI, N.; PASCALE, A.; RUOCCO, M.; LANZUISE, S.; MANGANIELLO, G.; LORITO, M. *Trichoderma* Secondary Metabolites Active on Plants and Fungal Pathogens. **The Open Mycology Journal**, v.8, p.127-139, 2014.

WANG, M.; SUN, X.; YU, D.; XU, J.; CHUNG, K.; LI, H. Genomic and Transcriptomic Analysis of the Tangerine Pathotype of *Alternaria alternata* in Response to Oxidative Stress. **Nature – Scientific Reports**, n.6, 2016.

WHO. Fumonisin. Disponível em: <<https://www.who.int/foodsafety/>>. Acessado em: 05/07/2019.

WIKIWAND. *Lasiodiplodia theobromae*. Disponível em: <[https://www.wikiwand.com/en/Lasiodiplodia\\_theobromae](https://www.wikiwand.com/en/Lasiodiplodia_theobromae)>. Acessado em: 01/09/2019.

WRATHER, J.A.; KOENNING, S.R.; ANDERSON, T.R. Effect of Diseases on Soybean Yields in the United States and Ontario (1999 to 2002). **Plant Health Progress**, 2003.

WRATHER, J.A.; STIENSTRA, W.C.; KOENNING, S.R. Soybean Diseases Loss Estimates for the United States from 1996 to 1998. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.23, p.122-131, 2001.

WRATHER, A.; SHANNON, G.; BALARDIN, R.; CARREGAL, L.; ESCOBAR, R.; GUPTA, G.K.; MA, Z.; MOREL, W.; PLOPER, D.; TENUTA, A. Effect of Diseases on Soybean Yield in the Top Eight Producing Countries in 2006. **Plant Health Progress**, 2010.

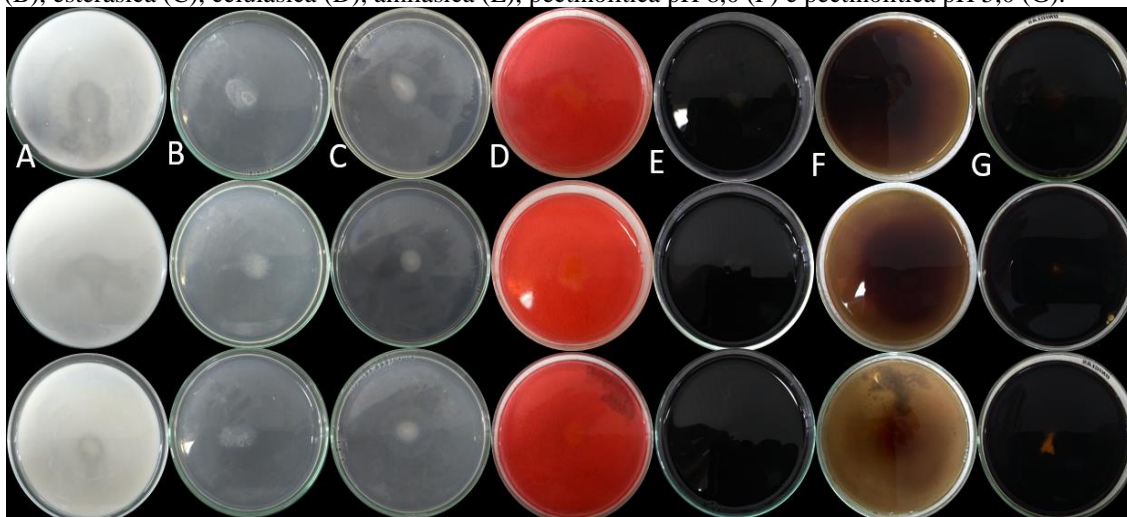
YOU, J.; ZHANG, J.; WU, M.; YANG, L.; CHEN, W.; LI, G. Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. **Biological Control**, v.101, p.31-38, 2016.

ŽIVKOVIĆ, S.; STOJANOVIĆ, S.; IVANOVIĆ, Ž.; GAVRILOVIĆ, V.; POPOVIĆ, T.; BALAŽ, J. Screening of Antagonistic Activity of Microorganisms Against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Archives of Biological Sciences Belgrade**, v. 62, i.3, p.611-623, 2010.

## 7 APÊNDICE

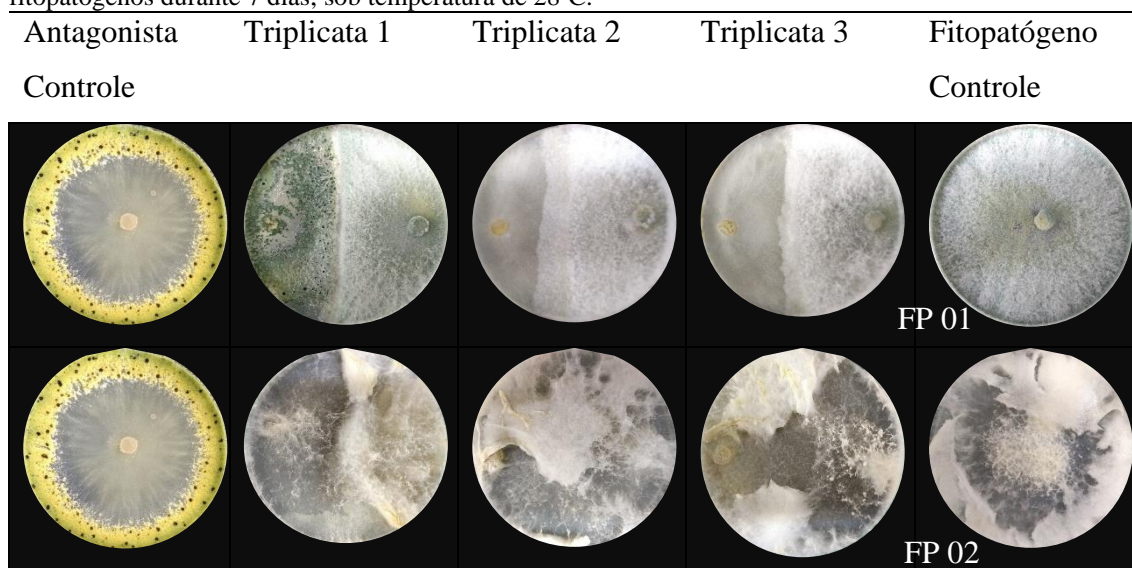
### 7.1 Apêndice A

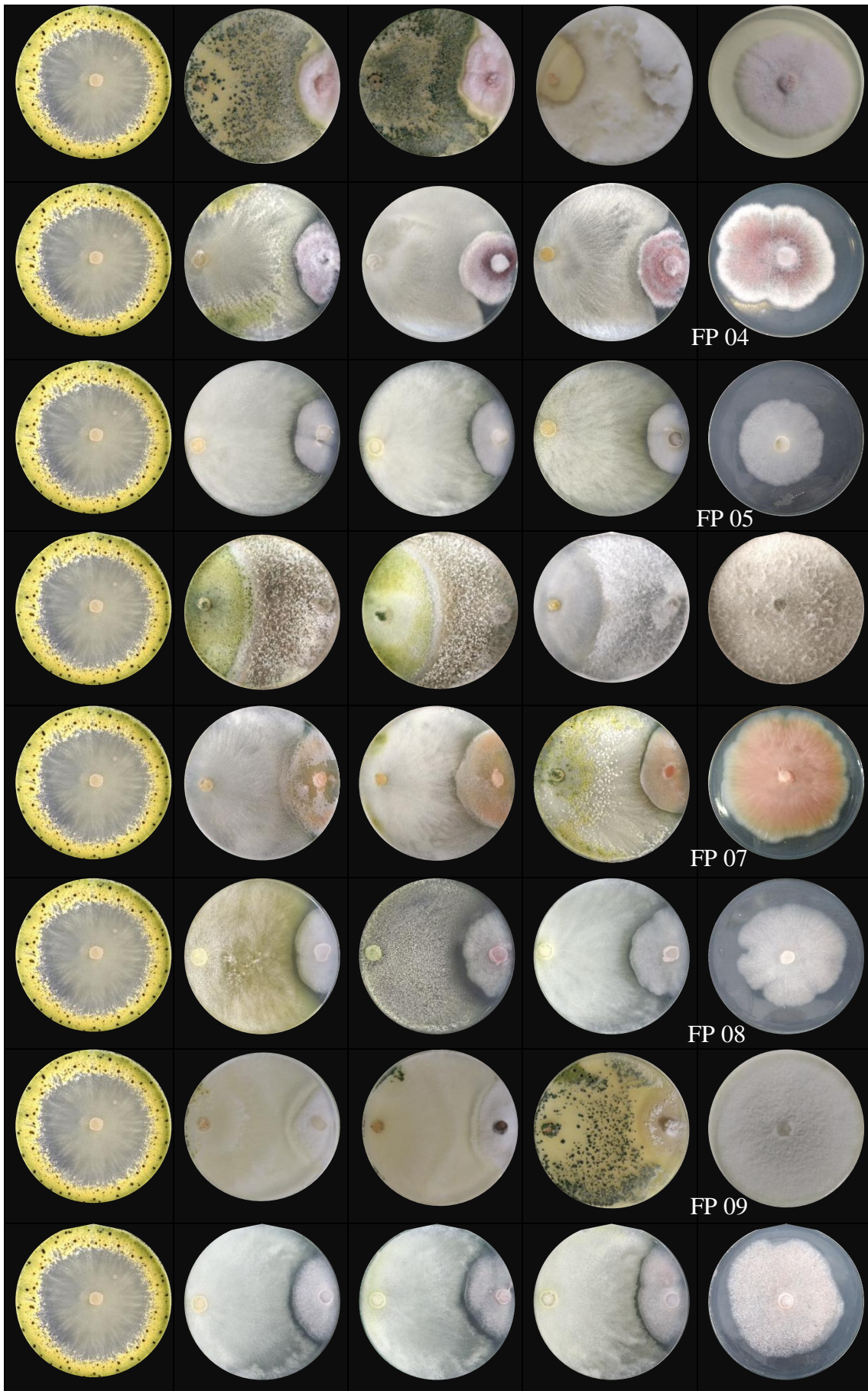
**Figura 19** – Teste enzimático em diferentes meios seletivos para atividade proteolítica (A), lipásica (B), esterásica (C), celulásica (D), amilásica (E), pectinolítica pH 8,0 (F) e pectinolítica pH 5,0 (G).

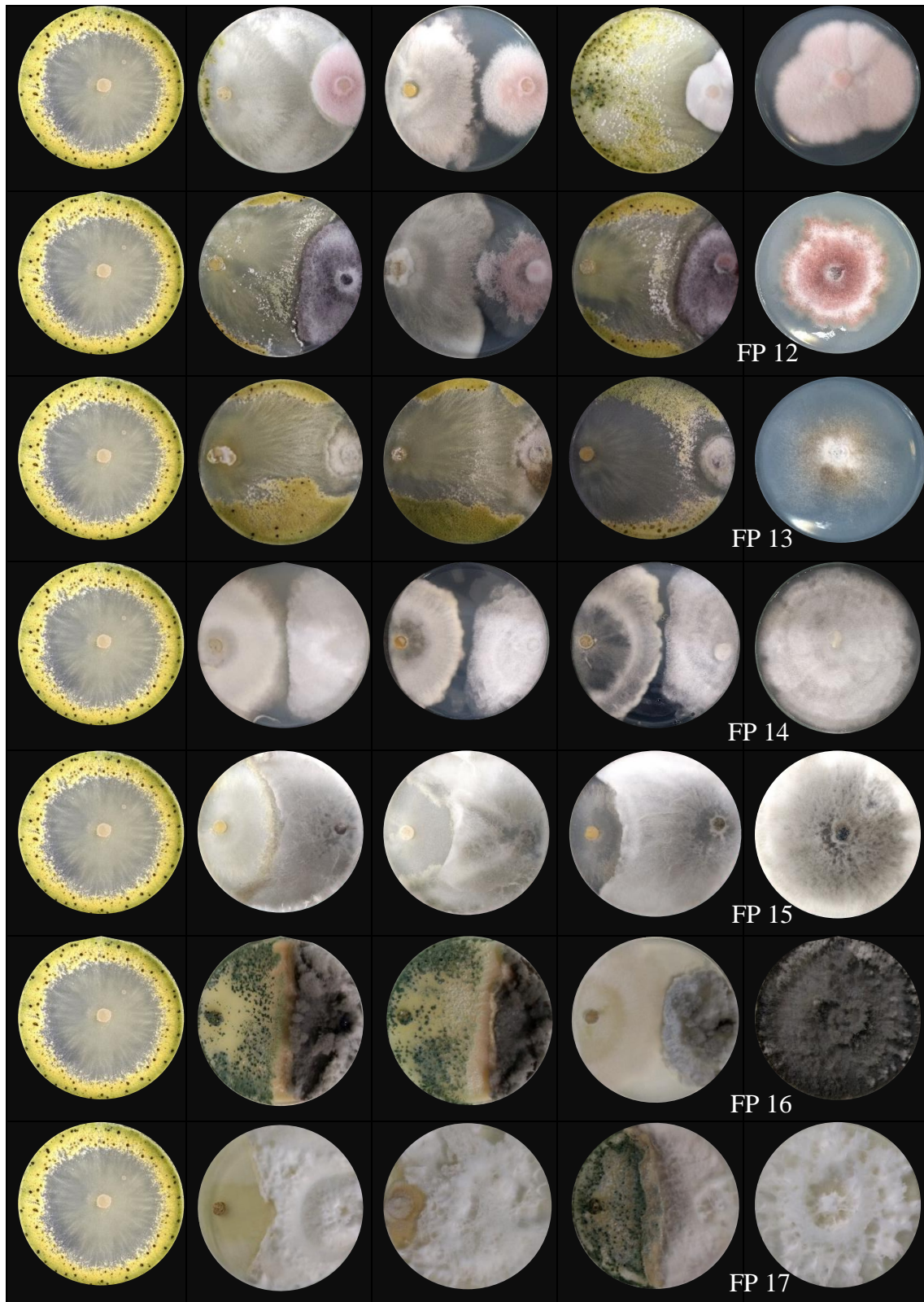


### 7.2 Apêndice B

**Figura 20** – Teste de Antagonismo em meio BDA por *Trichodemra harzianum* cepa P49P11 sobre fitopatógenos durante 7 dias, sob temperatura de 28°C.

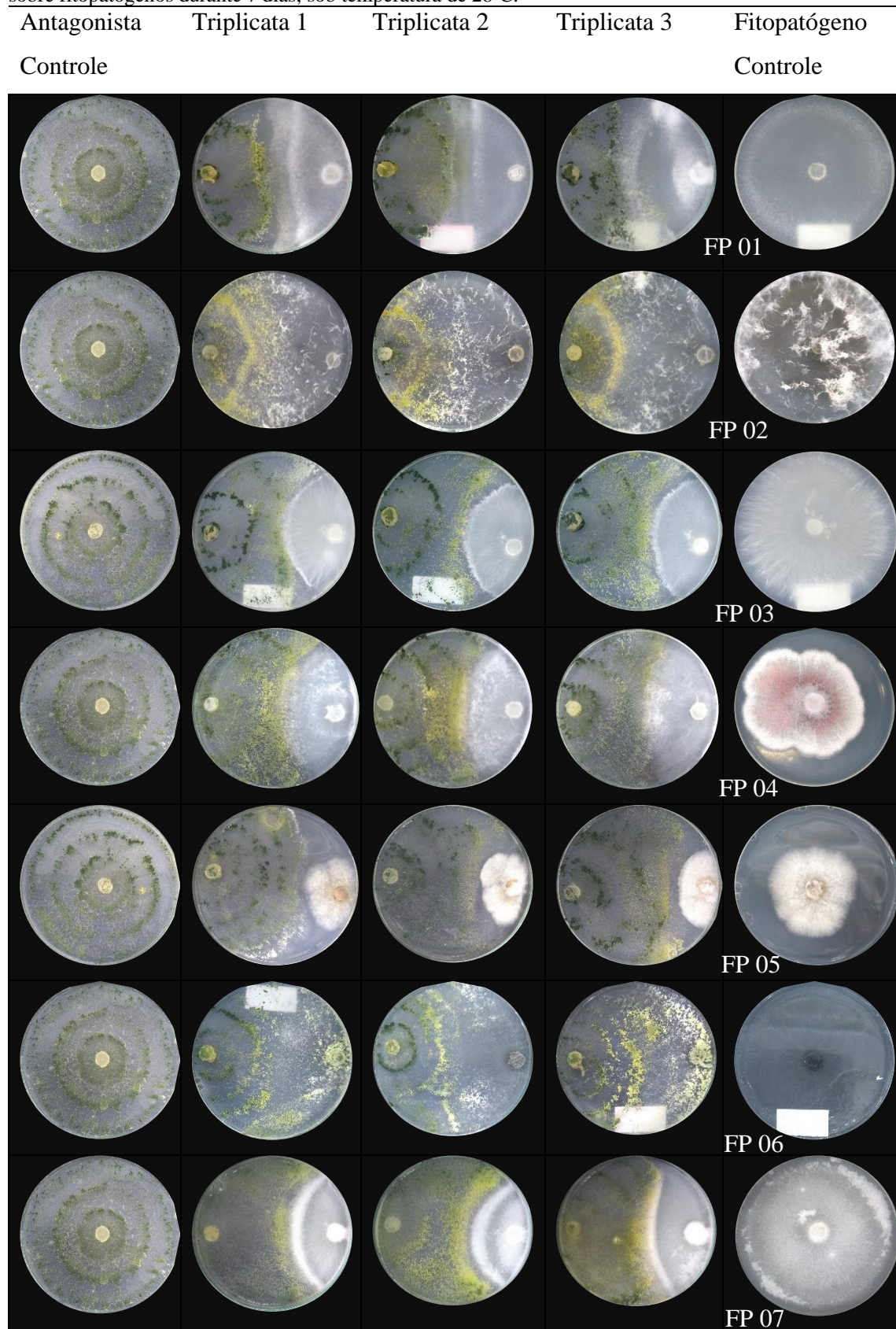




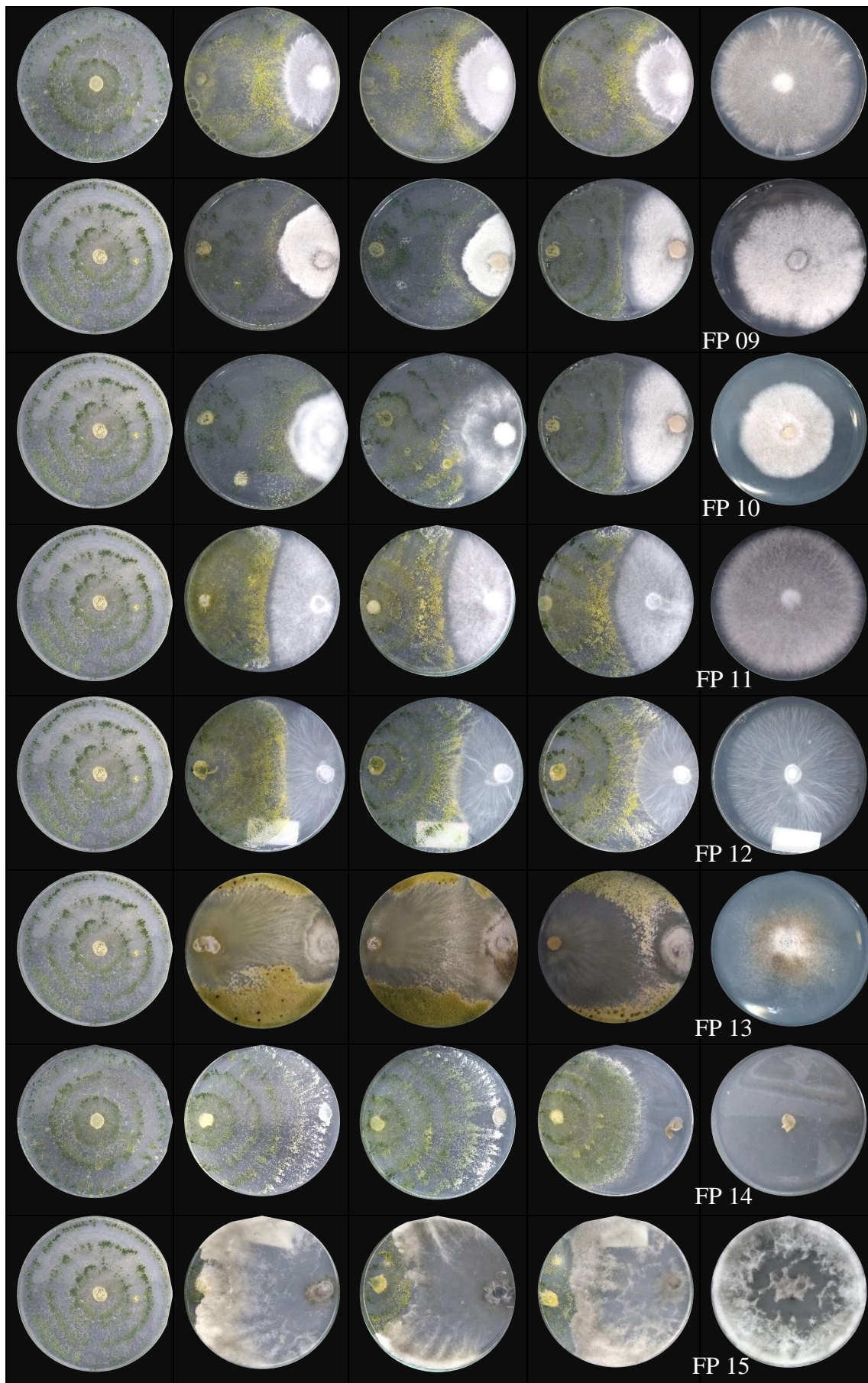


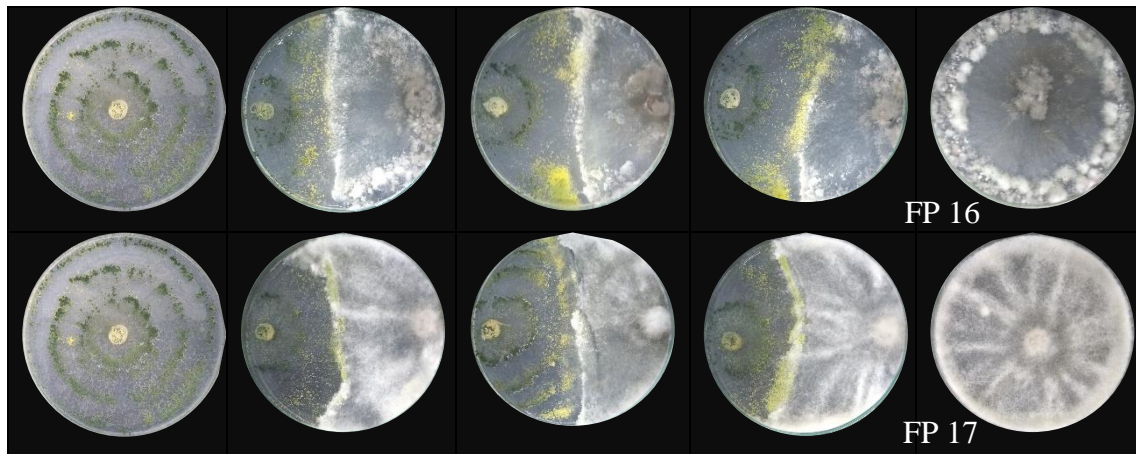
### 7.3 Apêndice C

**Figura 21** – Teste de Antagonismo em meio Czapek por *Trichodemra harzianum* cepa P49P11 sobre fitopatógenos durante 7 dias, sob temperatura de 28°C.









#### 7.4 Apêndice D

**Figura 22** – Teste de Antagonismo com extrato bioativo de *T. harzianum* P49P11. (A) placas teste FP 04; (B) placas teste FP 09; (D) placas teste FP 10; (D) placas teste FP 11; (a) extrato bioativo; (b) controle positivo benlate; (c) controle negativo fitopatogênico.

