



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

---

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL



**Atividade Antagônica de isolados de *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro**

**MURYEL FURTADO DE BARROS**

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Maria Rita Marques

Co-orientador: Dr. Carlos Alexandre Carollo

Campo Grande - MS

Maio/2014



## MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL



# Atividade Antagônica de isolados de *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro*

**MURYEL FURTADO DE BARROS**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal junto ao colegiado de curso do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Orientação: Dr<sup>a</sup> Maria Rita Marques

Co-orientação: Dr. Carlos Alexandre Carollo

Campo Grande

Maio/2014

## **BANCA EXAMINADORA**

Dr<sup>a</sup> Maria Rita Marques (Orientadora)  
(Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS)

---

Dr. Celso Dornelas Fernandes (Titular)  
(Embrapa Gado de Corte - Mato Grosso do Sul)

---

Dr<sup>a</sup> Yvelise Maria Possiede (Titular)  
(Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS)

---

Dr. Adriano Afonso Spielmann (Suplente)  
(Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS)

---

Barros, Muryel Furtado

Atividade Antagônica de isolados de *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro*.

Muryel Furtado de Barros - UFMS, Campo Grande-MS, 2014. 52f

Orientadora: Maria Rita Marques

Co-orientador: Carlos Alexandre Carollo

**Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Palavras-chave: Antagonistas; Patógeno; Competição; Metabólitos Secundários.

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço à minha mãe Dinamar, pelo incentivo e apoio na escolha em estudar, mesmo após a graduação, não deixando que as necessidades financeiras e situações problemas me desanimassem. Por me mostrar que devo buscar meus sonhos e que sempre terei o apoio dela.*

*À minha orientadora Profª Maria Rita, por confiar e acreditar no meu potencial, por compreender todas as incríveis situações que passei e mesmo assim transmitir todo otimismo que eu precisava, apoiando e orientando para que eu chegue além desta etapa.*

*Agradeço muito à Clarice, uma companheira de trabalho que valorizo muito por me ensinar tudo que aprendi nessa jornada de laboratório, por sempre conversar e ajudar a resolver os problemas nessa etapa. Clarice, você se tornou uma amiga.*

*Ao meu co-orientador Prof. Carlos Alexandre Carollo, por estar sempre à disposição, mesmo a muitos quilômetros de distância, nunca deixando de responder ou atender quaisquer dúvidas que houveram, sempre incentivando a minha independência e autonomia.*

*Agradeço ao Dr. Celso Dornelas Fernandes, por colaborar muito com esse trabalho, fornecendo material e, principalmente, seu ponto de vista e experiência para colocar em prática cada etapa deste trabalho. À Profª Yvelise Possiede, por fornecer um isolado, abrindo caminho para esse tipo de estudo acontecer.*

*Aos amigos Fábio Henrique Fernandes, por acompanhar exatamente todos os passos da minha vida acadêmica, ser um grande irmão e sempre ter uma solução para resolver tudo. Agradeço também à Aline Viana Bednaski, Patrícia de Mello Leal, Michaela Sandim Coelho, Frederico Tormin, Thiago Tesine Molina Taveira e Heriberto Gimenez Júnior, biólogos e grandes amigos. Aos amigos de infância Jacqueline e João Paulo, que compreenderam a minha enorme ausência. Aos amigos do mestrado Rodrigo, Milton, Evaldo, Ivanda, Damião, Danielle, Tiago, Jacqueline, Halisson e, principalmente, à Camila, obrigada pelo companheirismo e apoio sempre.*

*À Ariana, secretaria da pós-graduação e às técnicas da botânica: Flávia, Tamires e Helena; técnica da Bioquímica: Michele; Técnica farmacognosia: Amanda e técnica do laboratório de fitopatologia Embrapa: Margareth.*

*À CAPES pela bolsa de mestrado concedida.*

*À UFMS pela oportunidade de realizar um curso de pós-graduação gratuito e de qualidade.*

*Vocês foram responsáveis por tudo isso. Muito Obrigada!*

## ÍNDICE

RESUMO GERAL.....	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUÇÃO GERAL.....	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
<b>CAPÍTULO 1 - Atividade Antagônica de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> in vitro .....</b>	<b>18</b>
RESUMO .....	19
INTRODUÇÃO .....	19
MATERIAL E METODOS .....	21
Material Biológico.....	21
Cultivo dos <i>Trichoderma</i> spp. em Meio Líquido Curva de Crescimento .....	21
Inibição do Crescimento de <i>S.sclerotiorum</i> por metabólitos voláteis .....	20
Inibição do Crescimento de <i>S.sclerotiorum</i> por confrontação direta .....	22
Inibição do Crescimento de <i>S.sclerotiorum</i> por extratos de micélio de <i>Trichoderma</i> spp. ....	23
Ensaio de Inibição do Crescimento de <i>S.sclerotiorum</i> com Extratos do Isolado BVD00011 ...	24
Perfil cromatográfico de BVD00011 .....	24
Análise de dados .....	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
AGRADECIMENTOS.....	38
REFERÊNCIAS.....	38
NORMAS PARA SUBMISSÃO .....	42

## **RESUMO GERAL**

Os fungos do gênero *Trichoderma* são amplamente estudados como agentes de controlo biológico, com diferentes mecanismos de ação, como a interacção antagônica com outros fungos patogênicos ou contribuindo para o aumento e desenvolvimento da planta que abriga. Bioprospecção de metabólitos produzidos por espécies deste gênero tem sido o foco de muitos estudos por pesquisadores em várias partes do planeta, considerando-se que existem várias vantagens no controle biológico em relação ao produto, pois não polui, não desequilibra o meio ambiente ou deixa resíduos, é barato e fácil de aplicar. Além disso, os organismos endofíticos desenvolveram ao longo do tempo uma co-evolução com os seus hospedeiros, principalmente em vias metabólicas. Assim, nosso objetivo foi avaliar a interação de isolados de *Trichoderma* spp. do Pantanal e Cerrado contra *Sclerotinia sclerotiorum*, através do controle biológico. Ou seja, estes endofíticos foram avaliados quanto à sua capacidade em exercer a ação antagônica contra o fungo fitopatogênico e produção de metabólitos secundários biologicamente ativos.

## **ABSTRACT**

Fungi of the genus *Trichoderma* are widely studied as biological control agents, with different mechanisms of action, as in antagonistic interaction with other pathogenic fungi and enhancing the growth and development of the plant that houses it. Bioprospecting of metabolites produced by species of this genus has been the focus of many studies by researchers in various parts of the planet, considering that there are several advantages in biological control in relation to the chemical because it does not pollute, does not unbalance the environment and or leave residue, and is cheap and easy to apply. In addition, endophytic organisms have developed specific along its co-evolution with their hosts metabolic pathways. Thus, our purpose was to evaluate the interaction of isolates of the Pantanal and Cerrado *Trichoderma* spp. with *Sclerotinia sclerotiorum* through biological control. Ie, these endophytes form evaluated for their capacity to exert antagonistic action with the plant pathogenic fungus and production of biologically active secondary metabolites.

## **INTRODUÇÃO GERAL**

Fungos endofíticos são considerados organismos mutualistas de plantas, ocorrendo nas partes superiores destas, e, ocasionalmente, nas raízes, onde são distinguíveis das micorrizas pela ausência de hifas. Recebem nutrição e proteção da planta hospedeira, fornecendo aumento da resistência da espécie que o abriga, alterando a alocação de recursos, melhorando sua capacidade competitiva, aumentando sua resistência a herbívoros, patógenos e a vários estresses bióticos e abióticos. Efeitos diretos e indiretos, que resultam em benefícios para as plantas hospedeiras diante de fatores de estresse, incluem entre outros, a produção de metabólitos secundários pelos fungos endofíticos (ARNOLD & LUTZONI, 2007; RODRIGUEZ, *et al.*, 2009; YUAN *et al.*, 2010).

Um dos principais métodos de controle de agentes abióticos causadores de pragas e doenças em plantas cultivadas ainda está baseado na pulverização de grandes quantidades de pesticidas sintéticos, o que pode deteriorar severamente a saúde do planeta, principalmente através de efeitos colaterais ao homem, aos animais e ao ambiente (MONTESINOS, 2003). A utilização de processos naturais como antagonismo, simbiose e parasitismo de espécies vegetais economicamente importantes com microrganismos benéficos, certamente dará suporte para o desenvolvimento de alternativas menos agressivas ao meio ambiente (HALL & BARRY, 1995; MCSPADDEN *et al.* 2002)

Estudos recentes têm demonstrado que fungos endofíticos possuem a habilidade de proteger hospedeiros de doenças causadas por fungos fitopatogênicos. Gao e colaboradores (2010) apontam a ocorrência de efeitos diretos (interação entre endofítico e patógeno), efeitos indiretos (aumento da resistência da planta) e efeitos ecológicos (ocupação de nichos ecológicos). No caso de efeitos diretos, os endofíticos suprimem diretamente o patógeno através da produção de antibióticos e/ou secretando enzimas líticas (ARNOLD *et al.*, 2003; GANLEY *et al.*, 2008). Segundo Berg (2009), o antagonismo microbiano inclui (1) a inibição do crescimento do patógeno por antibióticos difusíveis e compostos orgânicos voláteis (VOCs), toxinas, surfactantes e biosurfactantes; (2) competição por sítios de colonização e nutrientes; (3) competição por minerais, como exemplo, por ferro, através da

produção de sideróforos (peptídeos de síntese não-ribossômica); (4) degradação de fatores de patogenicidade, por exemplo toxinas e (5) parasitismo que pode envolver a produção de enzimas líticas. Dentre os efeitos indiretos nas plantas pode-se citar a indução de resistência, estímulo de produção de metabólitos secundários e melhoramento do vigor e fisiologia, enquanto os efeitos ecológicos são a ocupação dos nichos ecológicos, hiperparasitismo e predação (GAO *et al.*, 2010).

### 1.1) Gênero *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* spp. é representado por fungos filamentosos, tropicais, micoparasitas oportunistas, saprófagos e cosmopolitas (HARMAN, *et al.*, 2004; WOO & LORITO, 2007; VINALE *et al.*, 2008). Estão presentes em folhas, raízes e no solo, utilizando diversos substratos, com grande resistência a substâncias de defesa das plantas, sendo comuns em solos agrícolas, pradarias, florestas e solos de deserto, em diferentes zonas climáticas (KUBICEK *et al.*, 2003; DANIEL & FILHO, 2007).

De acordo com Woo e Lorito (2007), espécies de *Trichoderma* são extensivamente estudadas há mais de 70 anos e são comercializadas mundialmente como biofungicidas, bioestimulantes vegetais e agentes de alterações biológicas no solo. Com mais de 100 espécies definidas, tal fungo teve seus primeiros estudos datados por volta de 1794 (SCHUSTER & SCHMOLL, 2010). Mais de 50 diferentes espécies isoladas do gênero *Trichoderma* foram a base de produtos agrícolas com função de proteção e melhoria de rendimento, devido à produção de enzimas, metabólitos com efeito tóxico ou inibitório e forte atividade sobre uma grande variedade de fungos patogênicos, entre os quais estão *Alternaria* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp. e *Colletotrichum* spp., além da produção de mais de 200 antibióticos altamente tóxicos sobre células de diferentes espécies em geral (WOO & LORITO, 2007; VINALE *et al.*, 2008).

Alguns sesquiterpenos foram isolados de caldos de culturas de *Trichoderma* spp. (ZHENG *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2011), e há estudos que comprovam a estimulação à resistência da planta hospedeira por terpenoides extraídos de *Trichoderma virens* (HOWELL *et al.*, 1999). Em estudos de interação *Trichoderma* spp. e hospedeiro, observou-se que este fungo coloniza raízes e induz

deposição de material de parede e compostos fenólicos na planta, limitando o crescimento dos fungos patogênicos no interior do tecido cortical. Além disso, pode ocorrer a liberação de giberelinas que atuam como moduladores de reações de defesa, bem como na produção de  $\beta$ -glicosidases PYK10 (localizadas no retículo endoplasmático) e ácido salicílico neste processo (SCHAFFER *et al.*, 2009). Estudando o biocontrole com *Trichoderma harzianum* em campo, verificou-se a sua eficiência e viabilidade para o controle do mofo-branco da soja em áreas de Cerrado (GÖRGEN, 2009).

Na literatura são relatadas várias classes de compostos liberados por *Trichoderma* spp. nas zonas de interação e que induzem resistência em plantas, como xilanases, celulases e swolenina, envolvidas na indução de necrose e de reações localizadas (BRUNNER *et al.*, 2003), além de endoquitinases que parecem estar relacionadas à indução de proteínas PR (HARMAN, *et al.*, 2004). Outras proteínas e peptídeos são ativados na indução da síntese de fitoalexinas e peroxidases em algodão, dentre elas pequenas proteínas denominadas SM1, produzida por *Trichoderma* spp. (DJONOVIĆ *et al.*, 2006). Além destas, foram identificadas proteínas denominadas hidrofobinas, as quais induzem o desenvolvimento de raiz e resistência às doenças (RUOCCHI *et al.*, 2007), produtos de genes Avr (WOO & LORITO, 2007) e uma classe de peptídeos lineares de cadeia curta, os *peptailbols*, com atividade biológica relacionada aos canais da membrana plasmática (DANIEL & FILHO, 2007; DJONOVIĆ *et al.*, 2006; HARMAN, 2004; LORITO *et al.*, 2010).

Existem limitações para utilização de *Trichoderma* spp. como ferramenta no biocontrole, como a ausência de estudos relativos a doses, aplicação, monitoramento e o desconhecimento da ecologia e da fisiologia do gênero, principalmente para utilização em culturas economicamente importantes no Brasil, como a soja (MELO, 1996).

## 1.2) Doenças Economicamente Importantes em Soja

A soja (*Glycine max* L.) atualmente é a cultura agrícola mais importante no Brasil, com o desenvolvimento de novas cultivares adaptadas às diferentes regiões agroclimáticas. O Brasil é o

segundo maior produtor mundial de soja atrás apenas dos EUA. Na safra 2012/2013, a cultura ocupou uma área de 27,7 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 81,5 milhões de toneladas. A produtividade média da soja brasileira foi de 2.938 kg por hectare (CONAB, 2014).

O ascomiceto *Sclerotinia sclerotiorum* (mofo-branco) é atualmente a doença da soja mais preocupante, ao lado da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*). O fungo produz estruturas de resistência (escleródios) que, uma vez produzidos nas plantas doentes, podem permanecer viáveis no solo por mais de 12 anos. A rotação de cultura, apesar de reduzir a produção de mais escleródios, é dificultada uma vez que o fungo é polífago, atacando 408 espécies de plantas dentro de 278 gêneros e 75 famílias, sendo que a sua disseminação se dá principalmente por sementes infectadas. A doença é mais séria em lavouras com excesso de população de plantas, onde ocorre acamamento e em anos chuvosos, principalmente durante o período da floração (GÖRGEN, 2009).

Atualmente o controle de *S. sclerotiorum* é feito basicamente em um sistema integrado de medidas, como rotação de culturas, espaçamento entre linhas, uso de fungicidas, controle biológico e utilização de sementes isentas do patógeno. Porém o controle é difícil devido à formação dos escleródios (EMBRAPA, 2010). No Brasil, está disseminado em todo o país, com maior incidência principalmente nos estados do Sul, Sudeste e Centro-Oeste, assim como nas regiões que apresentam condições climáticas favoráveis ao patógeno. Em Goiás, a doença em lavouras comerciais levou a perdas de até 33% na safra 2005/06 e sua presença foi observada em quase toda a área de cultivo da leguminosa na safra 2007/08 (GÖRGEN, 2007)

Um estudo utilizando *Clonostachys rosea* comprovou ser uma forma antagônica eficaz sobre *S. sclerotiorum* em experimentos em estufa, onde os principais mecanismos envolvidos foram a produção de metabólitos (N-acetil-β-D-glucosaminidase) e micoparasitismo (RODRIGUEZ *et al.*, 2011). O biocontrole com *Trichoderma harzianum* em campo e uso da palhada de *Brachiaria ruziziensis* foram eficientes e viáveis para o controle do patógeno em áreas de Cerrado (GÖRGEN, 2009), enquanto todos os trabalhos que avaliaram a ação inibitória de *Trichoderma* spp. sobre *S. sclerotiorum* (*in vitro*), apresentaram resultados positivos reafirmando o potencial para estudos de

biocontrole do mofo-branco utilizando *Trichoderma* spp. (WHIPPS, 1987; REMUSKA & PRIA, 2007; ETHUR *et al.*, 2005; LOUZADA *et al.*, 2009; DELGADO *et al.*, 2007; SILVA & MELLO, 2007).

Neste trabalho objetivou-se avaliar a eficiência de isolados de *Trichoderma* spp. obtidos no Mato Grosso do Sul, Pantanal e Cerrado, dando continuidade aos estudos do Grupo de Pesquisa BIOPROSPECTAR, que investiga a atividade biológica de plantas, microrganismos, ou seus produtos, advindos da flora e da micobiofa nativas do Pantanal e Cerrado. O intuito foi observar a ação destes isolados sobre o crescimento de *S. sclerotiorum* e realizar estudos do perfil de metabólitos secundários, visando correlacionar a atividade fungicida dos isolados com os metabólitos majoritários produzidos por eles.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Arnold, A.; Elizabeth & F. Lutzoni. (2007). Diversity and Host Range Of Foliar Fungal Endophytes: Are Tropical Leaves Biodiversity Hotspots? *Ecology* 88, 541–549.
- Arnold, A.E.; Meji'a, L.C.; Kyllo, D.; Rojas, E.I.; Maynard, Z.; Robbins, N. & Herre, E.A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *P Natl Acad Sc* 100, 15649-15654.
- Berg, G. (2009). Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *App Microbiol and Biotech* 84, 11–18.
- Brunner, K.; Peterbauer, C.K.; Mach, R.L.; Lorito, M.; Zeilinger, S. & Kubicek, C.P. (2003). The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Curr Genet* 43, 289–95.
- Companhia Nacional de Abastecimento. (CONAB/DIPLA). Soja- Área, produção e produtividade. Disponível em: <<http://www.cnpsso.embrapa.br/>> acesso em maio. 2014.
- Daniel, J.F.S. & Filho, E.R. (2007). Peptaibols of *Trichoderma*. *Natural Prod Rep* 24, 1128-1141.
- Delgado, G. V.; Martins, I.; Menêzes, J. E.; Macedo, M. A. & Mello, S. C. M. (2007). Inibição do Crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma* spp. *in vitro*. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 214, Embrapa, Brasilia DF, Brasil.
- Djonovic, S.; Vargas, W.A.; Kolomiets, M.V.; Horndeski, M.; Wiest, A. & Kenerley, C.M. (2006). A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiology* 145, 875–89.
- Ethur, L. Z.; Blume, E.; Muniz, M.; Da Silva, A. C. F.; Stefanelo, D. R. & Rocha, E. K. (2005). Fungos Antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em Pepineiro Cultivado em Estufa. *Fitopatol Bras* 30(2).
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2010) . Técnicas de Produção de Soja: Região Central do Brasil 2011. Sistemas de Produção 14, Londrina PR, Brasil.
- Ganley, R.J.; Sniezko, R.A. & Newcombe, G. (2008). Endophyte-mediated resistance against white pine blister rust in *Pinus monticola*. *Forest Ecol Manag* 255, 2751-2760.
- Gao, F.K.; Dai C.C. & Liu, X.Z. (2010). Mechanisms of fungal endophytes in plant protection. *Afr J of Microbiol Res* 4, 1346-1351.
- Görgen, C.A.; Neto, a. N. S.; Cardeiro, L. C.; Ragagnin, V. & Lobo Júnior, M. (2009). Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. *Pesq Agropec. Bras* 44, 1583-1590.
- Görgen, C.A.; Lobo JR., M.; Gontijo, G.H.A.; Pimenta, G. & Carneiro, L.C. (2007). Manejo integrado do mofo branco da soja utilizando *Trichoderma harzianum* e palhada de *Brachiaria ruziziensis*. Universidade Federal de Goiás – Campus Jataí. *Fitopatol Bras* 32, 367. Suplemento.
- Hall, F.R. & Barry, J.W. (1995). Biorational pest control agents: formulations and delivery. American Chemical Society, Washington, D.C. 80-94.

Harman, G.E.; Howell, C.R.; Viterbo, A.; Chet, I. & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature – Reviews/ Microbiol* 2, 43-56.

Howell, C. R.; Hanson, L. E.; Stipanovic, R. D. & Puckhaber, L. S. (1999). Induction of Terpenoid Synthesis in Cotton Roots and Control of *Rhizoctonia solani* by Seed Treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90, 248-252.

Kubicek, C.P.; Bisset, J.; Druzhinina, I.; Kullnig-Gradinger, C. & Szakacs, G. (2003). Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genet and Biol* 38, 310–319.

Li, G. H.; Yang, Z. S.; Pei-Ji, Z.; Zheng, X.; Luo, S. L.; Sun, R.; Niu, X. M. & Zhang, K.Q. (2011). Three new acorane sesquiterpenes from *Trichoderma* sp. YMF1.02647. *Phytochemistry* L 4, 86–88.

Lorito, M.; Woo, S. L.; Harman, G. E. & Monte, E. (2010). Translational Research on *Trichoderma*: From 'Omics to the Field. *Rev of Phytopathology* 48, 395–417.

Louzada, G. A. S.; Carvalho, D. D. C.; Mello, S. C. M.; Lobo Junior, M.; Martins, I. & Braúna, L. M. (2009). Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. *Biota Neotrop* 9.

McSpadden, B.B. (2002). Fravel, D. Biological control of plant pathogens: research, commercialization, and application in the USA. *Plant Health Progress*, Washington, D.C. ([www.plantmanagementnetwork.org/php/](http://www.plantmanagementnetwork.org/php/)).

Melo, I. S. (1996). *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 4, 261-295.

Montesinos, E. (2003). Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *Int Microbiol* 6, 245-252.

Remuska, A.C. & Pria, M. D. (2007). Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no Crescimento de Fungos Fitopatogênicos. *Ci Agr Eng* 13, 31-36.

Rodríguez M. A.; Cabrera G.; Gozzo F. C.; Eberlin M. N. & Godeas A. (2011). *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *J Appl Microbiol* 110, 1177-1186.

Rodriguez R. J.; White Jr, J.F.; Arnold, A. E.; Redman. R.S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol* 182, 314–330.

Ruocco, M.; Lanzuise, S.; Woo, S.L. & Lorito M. (2007). The novel hydrophobin HYTRA1 from *Trichoderma harzianum* T22 plays a role in Trichoderma-plant interactions. *Abstratics, XIII International Congress of Molecular Plant Microbe Interactions* 394.

Schafer, P.; Pfiffi, S.; Voll, L.M. & Zajic, D.; Chandler, P.M. (2009). Manipulation of plant innate immunity and gibberellin as factor of compatibility in the mutualistic association of barley roots with *Piriformospora indica*. *Plant J* 59, 461–74.

Schuster, A.; Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *App Microbiol and Biotech* 87, 787-799.

- Silva, J. B. T. & Mello, S. C. M. (2007). Utilização de *Trichoderma* no Controle de Fungos Fitopatogênicos. Documentos 241, Embrapa. Brasilia DF, Brasil.
- Vinale, F.; Sivasithamparam, K.; Guisalberti, E.L; Marra, R.; Barbetti, M.J.; Li, H.; Woo, S.L. & Lorito, M. (2008). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiol and Mol Plant P* 72, 80-86.
- Whipps, J. M. (1987). Behaviour of Fungi Antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* on Plant Tissue. *Segments J of G Microbiol* 133, 1495-1501.
- Woo, S.L. & Lorito, M. (2007). Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. *Novel Biotech for Biocontrol Agent Enhanc and Manage*, 107-130.
- Yuan, Z.; Zhang, C. & Lin, F. (2010). Role of Diverse Non-Systemic Fungal Endophytes in Plant Performance and Response to Stress: Progress and Approaches. *J Plant Growth Regul* 29, 116-126.
- Zheng, C.J.; Sun, P.X.; Jin, G.L. & Qin, L. P. (2011). Sesquiterpenoids from *Trichoderma atroviride*, an endophytic fungus in *Cephalotaxus fortunei*. *Fitoterapia* 82, 1035–1038.

## **ARTIGO**

### **Atividade Antagônica de isolados de *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro**

\*Muryel Furtado de Barros<sup>1</sup>, Clarice Rossato Marchetti<sup>2</sup>, Carlos Alexandre Carollo<sup>2</sup>, Celso Dornelas

Fernandes<sup>3</sup> e Maria Rita Marques<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Aluna do, Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. CEP 79070-900. Campo Grande, MS, Brasil.

<sup>3</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Gado de Corte. CEP 79106550 - Campo Grande, MS - Brasil

[\\*muryelfbarros@gmail.com](mailto:muryelfbarros@gmail.com)

**\* Artigo será submetido à Revista *Microbiology***

## **RESUMO**

Experimentos utilizando métodos de biocontrole utilizando *Trichoderma* spp. sobre *Sclerotinia sclerotiorum* apresentaram efeitos positivos contra a doença devido sua ampla distribuição geográfica e ação de seus compostos ativos, principalmente os peptabióticos e CDWEs. O objetivo deste trabalho foi testar os ação inibitória de três isolados de *Trichoderma* spp. de diferentes regiões de Mato Grosso do Sul (Brasil) sobre o crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro*, através de testes de metabólitos voláteis, confrontação direta e inibição com meios ricos em extratos. O isolado BVD0001, coletado de folhas de jovens de *Vochysia divergens*, Pantanal da Nhecolândia, apresentou os melhores resultados devido a simbiose com sua hospedeira, enquanto o isolado CRBEP0002, saprofítico do Pantanal de Miranda Abobral, não foi avaliado como um eficiente inibidor/competidor devido a perda de muita área micelial. Necessitando assim de mais estudos para definir quais são as classes de compostos ativos dos testes deste trabalho.

## **1. INTRODUÇÃO**

O mofo-branco, causado pelo ascomiceto *Sclerotinia sclerotiorum* é atualmente a doença da soja mais importante economicamente, devido às grandes perdas causadas na produção. Este fungo produz estruturas de resistência, os escleródios, que podem permanecer viáveis no solo por mais de 12 anos (GÖRGEN, 2009). No Brasil, está disseminado em todo o país, com maior incidência principalmente nos estados do Sul, Sudeste e Centro-Oeste, assim como nas regiões que apresentam condições climáticas favoráveis ao patógeno. Em Goiás, a doença em lavouras comerciais levou a perdas de até 33% na safra 2005/06 e sua presença foi observada em quase toda a área de cultivo da leguminosa na safra 2007/08 (GÖRGEN, 2007)

Experimentos utilizando métodos de biocontrole com *Trichoderma* sp. sobre *S. sclerotiorum* apresentaram efeitos positivos contra a doença, tanto *in vitro* (WHIPPS, 1987; REMUSKA & PRIA, 2007; ETHUR *et al.*, 2005; LOUZADA *et al.*, 2009; DELGADO *et al.*, 2007; SILVA & MELLO, 2007) quanto em campo (GÖRGEN, 2009; RODRIGUEZ *et al.*, 2011), tendo como principais compostos com ação inibitória os peptabióticos e CDWEs, que são enzimas de degradação de parede celular dos *Trichoderma* spp. (HARMAN *et al.*, 2012; GERALDINE *et al.*, 2013).

Os peptabióticos, também chamados de leucinostatinas, são lipopeptídeos de cadeia linear composto por 11 aminoácidos, conhecidos por suas propriedades antibióticas e citotóxicas (ISHIGURO & ARAI, 1976).

Fungos do gênero *Trichoderma* têm sido extensivamente estudados em ensaios de biocontrole. Segundo Louzada *et al.*(2009), *Trichoderma* spp. tem ampla representação geográfica e apresenta resultados positivos em ensaios de antagonismo *in vitro* sobre *S. sclerotiorum*. A literatura apresenta dados que confirmam esse potencial, como o trabalho de Menendez & Godeas (1998), que mostrou que *T. harzianum* reduziu a viabilidade de escleródios em 62,5%. Outros trabalhos incluem estudos com *T. viride* (HANNUSCH & BOLAND, 1996), *T. harzianum* (ILLIPRONTI & MACHADO,1993), *T. virens* (ETHUR *et al.*, 2005), *Trichoderma* sp. (REMUSKA & PRIA, 2007) e *Trichoderma* spp. (LOPES *et al.*, 2012).

*Trichoderma* spp. apresentam mecanismos de biocontrole com efeitos diretos como antibiose, competição, micoparasitismo e inativação das enzimas do fitopatógeno; e efeitos indiretos – como a indução de resistência em plantas hospedeiras (SILVA & MELLO, 2007). De acordo com Bettoli *et al.* (2012), existem 55 Trichodermas comerciais registrados, com base as espécies *T. harzianum*, *T. viride* e *T. virens*, além de outros isolados não identificados pelas empresas.

A Micoteca da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul possui isolados de *Trichoderma* spp. obtidos de folhas de *Vochysia divergens* Pohl (Vochysiaceae), uma espécie nativa do Pantanal (MS), de amostras de solo do Pantanal (MS) e de sementes de *Urochloa bizantha* cv. Piatã, uma forrageira utilizada como pastagem no Mato Grosso do Sul. Assim, o objetivo deste trabalho foi testar a ação inibitória dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento de *S. sclerotiorum* *in vitro*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

As metodologias deste trabalho foram realizadas na Micoteca, Laboratório de Farmacognosia e Laboratório de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas e Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, enquanto as técnicas de germinação dos escleródios e avaliação da *S. sclerotiorum* aconteceram no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande – MS.

### **2.1 Material Biológico**

Neste trabalho foram utilizados três isolados de *Trichoderma* spp.:

a) Isolados de folhas jovens de *Vochysia divergens* Pohl (Vochysiaceae) da sub-região do Pantanal, Pantanal da Nhecolândia (coordenadas S 18° 49' 57,1" e W 55° 49' 35,6"), entre as fazendas Boqueirão e Nhuval. A coleta foi realizada no período de cheia (fevereiro de 2009). O isolado foi registrado na Micoteca do CCBS/UFMS sob o código BVD0001.

b) Isolados de amostras de solo, na sub-região do Pantanal de Miranda Abobral (coordenadas S 19° 34' 37,6" e W 57° 01' 09,4"). A coleta foi realizada no período de seca (maio de 2012). O isolado foi registrado na Micoteca do CCBS/UFMS sob o código CRBEP0002.

c) Isolados de sementes de *Urochloa bizaantha* cv. Piatã (A. Rich.) R.D. Webster, (Poaceae) no município de Água Clara, Mato Grosso do Sul, safra 2010/2011. O isolado foi registrado na Micoteca do CCBS/UFMS sob o número ACBB0003.

Culturas de *Sclerotinia sclerotiorum* foram cedidas pelo Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Gado de Corte – Campo Grande/MS, coletado na Fazenda Grimm – São Gabriel D’Oeste/MS e isolado em janeiro de 2012.



<http://www.guianet.com.br/ms/mapams.htm>

## 2.2 Cultivo dos *Trichodermas* spp. em Meio Líquido e Curva de Crescimento

Os três isolados de *Trichoderma* spp. foram cultivados em meio BDA sólido por sete dias a 30°C.

Foram retirados discos de 6 mm de diâmetro e inoculados, separadamente, em 50 mL de meio líquido Czapek (PIZZIRANI-KLEINER *et al.*, 2010), acondicionados em agitador sob a mesma temperatura por 20 dias, em quatro repetições, totalizando quarenta frascos para cada isolado. Essas amostras foram filtradas à vácuo, em intervalos de 48 horas, lavadas exaustivamente em água destilada e autoclavada, para retirada do excesso de meio, pesadas com auxílio de balança analítica e secas em estufa a 40°C até atingir peso constante. A curva de crescimento foi obtida de três repetições de toda a metodologia para cada isolado. Os filtrados (meio de cultura) e as amostras de massa micelial foram acondicionadas a -18°C.

## 2.3 Inibição do Crescimento de *S. sclerotiorum* por metabólitos voláteis

Estes ensaios foram realizados segundo método descrito por Bharat *et al.*(1980), com modificações. Para esta metodologia foram utilizadas placas de Petri de 60 mm, cujas tampas foram descartadas para o procedimento. Foram vertidos 20 mL de meio BDA na base das placas de Petri e, em seguida, foram inoculadas com um disco central de 6 mm de cultura de meio sólido de

*Trichoderma* spp., vinte placas para cada isolado, testemunha e teste de inibição. Discos de 6 mm de *S. sclerotiorum* foram inoculados em trinta placas para teste de inibição e dez para testemunha. Em seguida, as bases contendo cada isolado de *Trichoderma* foram pareadas com aquelas contendo *S. sclerotiorum*. O conjunto foi vedado lateralmente com filme plástico e incubado à 22°C, por 3 dias e fotoperíodo de 12 horas. A metodologia foi repetida duas vezes para os três isolados. As leituras foram feitas por meio de fotos de cada placa aberta, com uma altura e máquina fotográfica padronizadas. Com o auxílio do programa as áreas, Copyright © 2006-2010 Carl Zeiss MicroImaging GmbH, o crescimento dos micélios foram calculados em mm<sup>2</sup>.

#### **2.4 Inibição do Crescimento de *S. sclerotiorum* por confrontação direta**

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram testados diretamente sobre *S. sclerotiorum*, segundo o método descrito por Martins-Corder & Melo (1998), com modificações. Discos de 6 mm contendo micélios do patógeno foram colocados em placas de Petri de 90 mm, contendo meio de batata-dextrose-ágar (BDA), a uma distância de aproximadamente 1,0 cm da borda. Seguindo a mesma distância, um disco de *Trichoderma* spp. foi colocado no lado oposto ao disco do patógeno, totalizando dez placas *Trichoderma* X *S. sclerotiorum* para cada isolado. As culturas foram incubadas por 5 dias, a 22°C em fotoperíodo de 12 horas. Utilizou-se culturas dos isolados descritos em 2.1, além de placas testemunhas contendo apenas o patógeno ou cada um dos isolados de *Trichoderma*. A metodologia foi repetida três vezes para os três isolados, enquanto as leituras seguiram conforme o item anterior.

#### **2.5. Inibição do Crescimento de *S. sclerotiorum* por extratos de micélio de *Trichoderma* spp.**

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram cultivados em meio líquido Czapek por vinte e oito dias. Em seguida o micélio foi filtrado e lavado abundantemente com água destilada e autoclavada e, posteriormente liofilizado, sendo os filtrados acondicionados a -18°C.

Foram pulverizados 100 mg de micélio liofilizado com nitrogênio líquido, adicionando-se em seguida 1 mL de DMSO e 19 mL de água. Esse extrato foi submetido à ultrassonificação por trinta minutos, para rompimento das paredes e membranas celulares e, posteriormente centrifugado por dois minutos a 3.000 rpm. O sobrenadante foi filtrado em duas folhas de papel filtro analítico N° 589, para impedir a passagem de células. Seguindo o modelo do preparo de meio com os fungicidas comerciais (Menten *et al.*, 1976), o método foi realizado da seguinte maneira: Foram adicionados os extratos de micélio dos isolados de *Trichoderma* spp. ao meio de cultura BDA (a 50°C) na proporção de 1:100. Esse material foi vertido em placas de Petri de 60 mm, e após solidificação do meio, discos de micélio de 6 mm de *S. sclerotiorum* foram inoculados no centro das placas e estas foram incubadas por 3 dias, a 22°C em fotoperíodo de 12 horas. Foram realizadas dez repetições por tratamento e com placas testemunhas do patógeno (*S. sclerotiorum* em meio BDA com DMSO 5% apenas). A metodologia foi repetida quatro vezes, enquanto as leituras seguiram conforme os itens anteriores.

## **2.6 Ensaio de Inibição do Crescimento de *S. sclerotiorum* com Extratos do Isolado BVD0001 de *Trichoderma* sp.**

O micélio de BVD0001 coletado a cada dois dias, no período de vinte dias, para obtenção da curva de crescimento (item 2.2) foi liofilizado e utilizado para preparação de extratos em DMSO a 5%. O preparo do BDA foi conforme o item anterior, enquanto a mistura foi vertida em placas de Petri de 60 mm. Discos do micélio de 6 mm de *S. sclerotiorum* foram inoculados no centro das placas, incubadas por 3 dias, a 22°C em fotoperíodo de 12 horas. Foram feitas 4 repetições por tratamento/coleta e para a testemunha (*S. sclerotiorum* em meio BDA com DMSO 5% apenas). A metodologia não foi repetida, enquanto as leituras seguiram conforme os itens anteriores.

## **2.7 Perfil cromatográfico do isolado BVD0001 de *Trichoderma* sp.**

Uma amostra de 442 mg de micélio do isolado BVD0001 foi preparada com Metanol/Água 1:1 e uma amostra de 40 ml de meio, onde foi cultivado o micélio, foi separada com Acetato de Etila, adicionado-se Sulfato de Sódio Anidro e rotaevaporado. Essas amostras foram analisadas empregando-se um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, detector de arranjo de diodos (DAD), com varredura entre 200-800 nm. A coluna utilizada para a análise foi de fase reversa C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 µm) e pré-coluna (2,5 cm x 3 mm) de mesma fase da coluna (Phenomenex).

## **2.8 Análise de dados**

Os dados da curva de crescimento dos isolados de *Trichoderma* spp. foram relacionados com o período de avaliação, 20 dias, obtendo-se ao seu coeficiente de correlação (*r*).

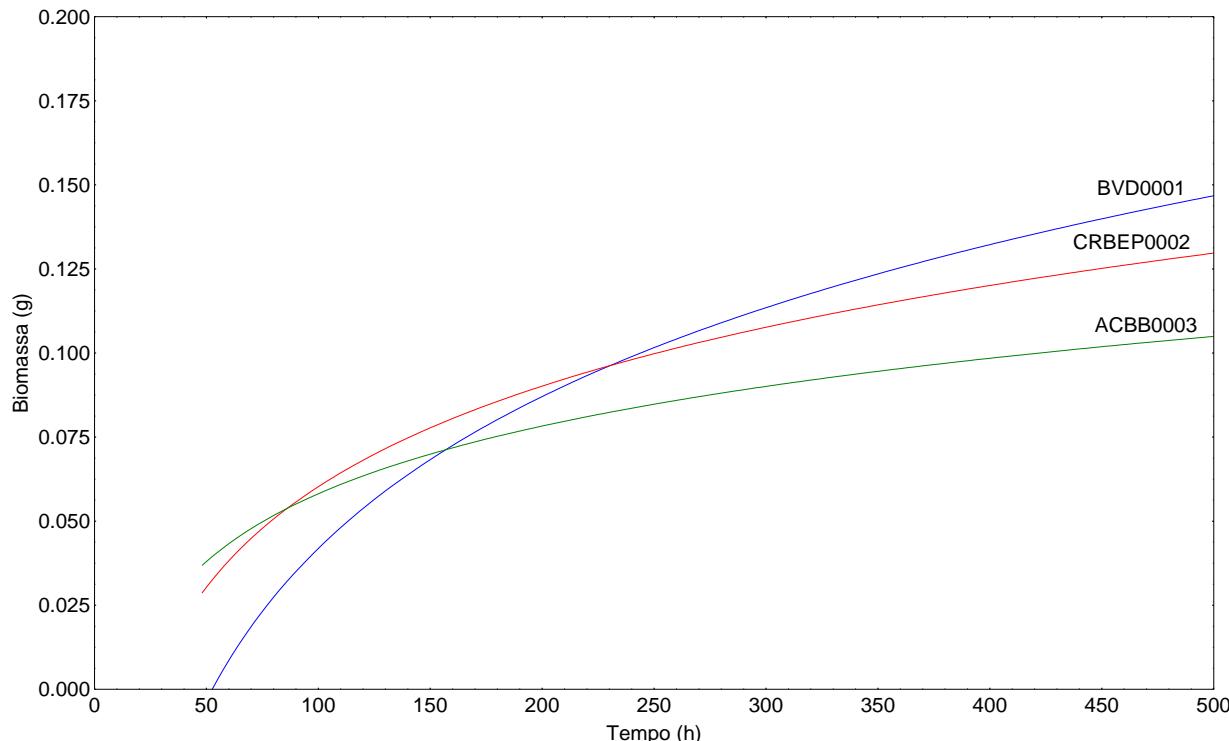
Para os ensaios de atividade fungicida, antagonismo de confrontação direta e ensaios de inibição do crescimento do fungo *S. sclerotiorum*, realizou-se análises de variância (one-way e fatorial ANOVA) a 5% de probabilidade e teste de comparação de médias (Tukey).

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Cultivo dos *Trichoderma* spp. em Meio Líquido - Curva de Crescimento**

O resultado da massa dos micélios dos isolados BVD0001, CRBEP0002 e ACBB0003 de *Trichoderma* spp. foram cultivados em meio líquido por um período de 20 dias e apresentados na Figural1. Os resultados da análise de regressão logarítmica dos três isolados compararam um perfil de crescimento semelhante e que o período de 20 dias não foi suficiente, aparentemente, para que as culturas entrassem na fase estacionária. Observa-se também que a produção de biomassa foi maior no isolado BVD0001. O meio utilizado foi composto por carboidratos, fosfatos, nitratos e sais (Sacarose, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaNO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, KCL e FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O). Segundo Whipps (1987), fontes de carbono, a

relação carbono/nitrogênio e o tempo de incubação dos fungos filamentosos são os principais fatores que influenciam a esporulação, principalmente para *Trichoderma harzianum*, enquanto a disponibilidade de nitrogênio influencia a produção de conídios.



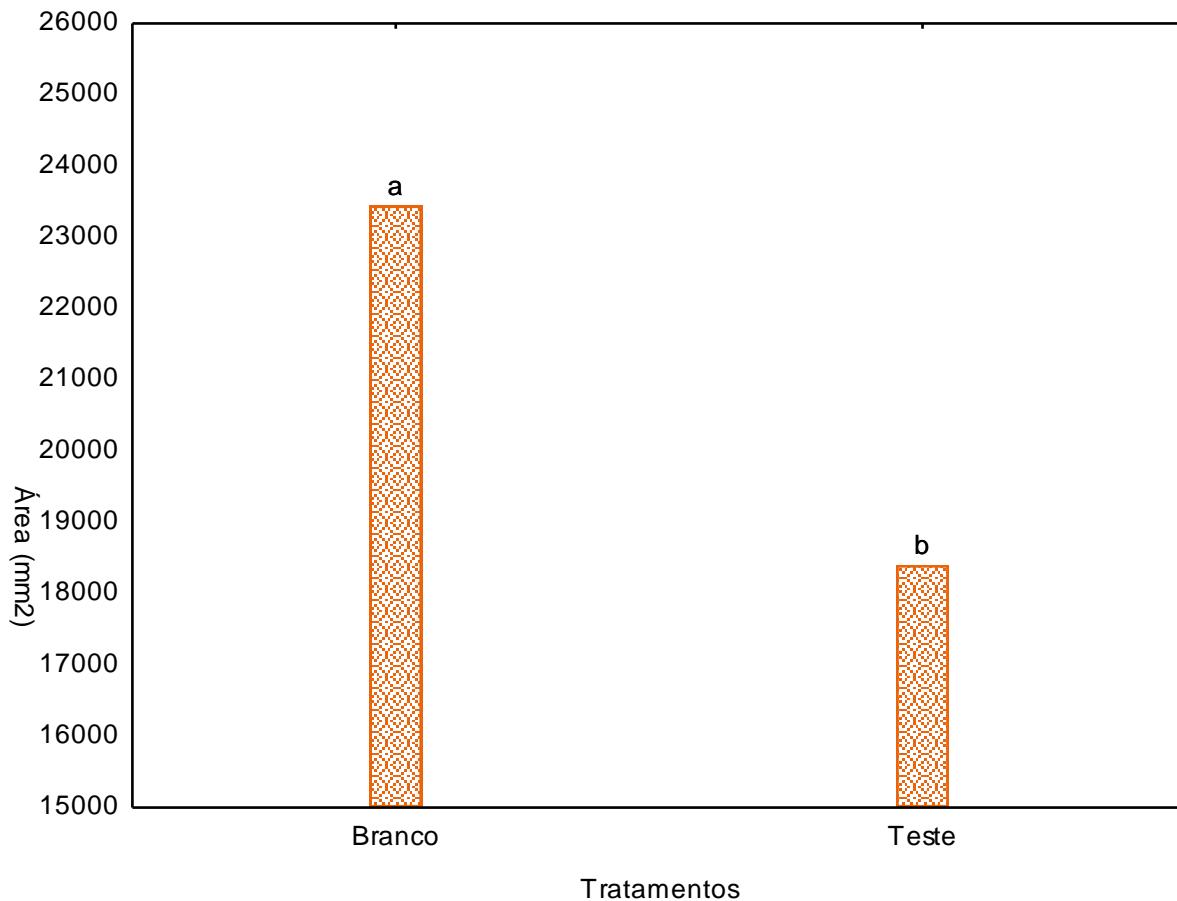
**Figura 1** – Curva de crescimento dos isolados de *Trichoderma* spp. durante o período de 20 dias, obtida através da análise de regressão logarítmica relacionando biomassa com tempo em horas.

Valores de r para cada isolado: (BVD0001:  $r = 0,9240$ ;  $p = 0,00000$ ;  $y = 0,0019 + 0,0003*x$ ; CRBEP0002:  $r = 0,5070$ ;  $p = 0,0004$ ;  $y = 0,0286 + 0,0002*x$ ; ACBB0003:  $r = 0,3931$ ;  $p = 0,0083$ ;  $y = 0,0306 + 0,0002*x$ ).

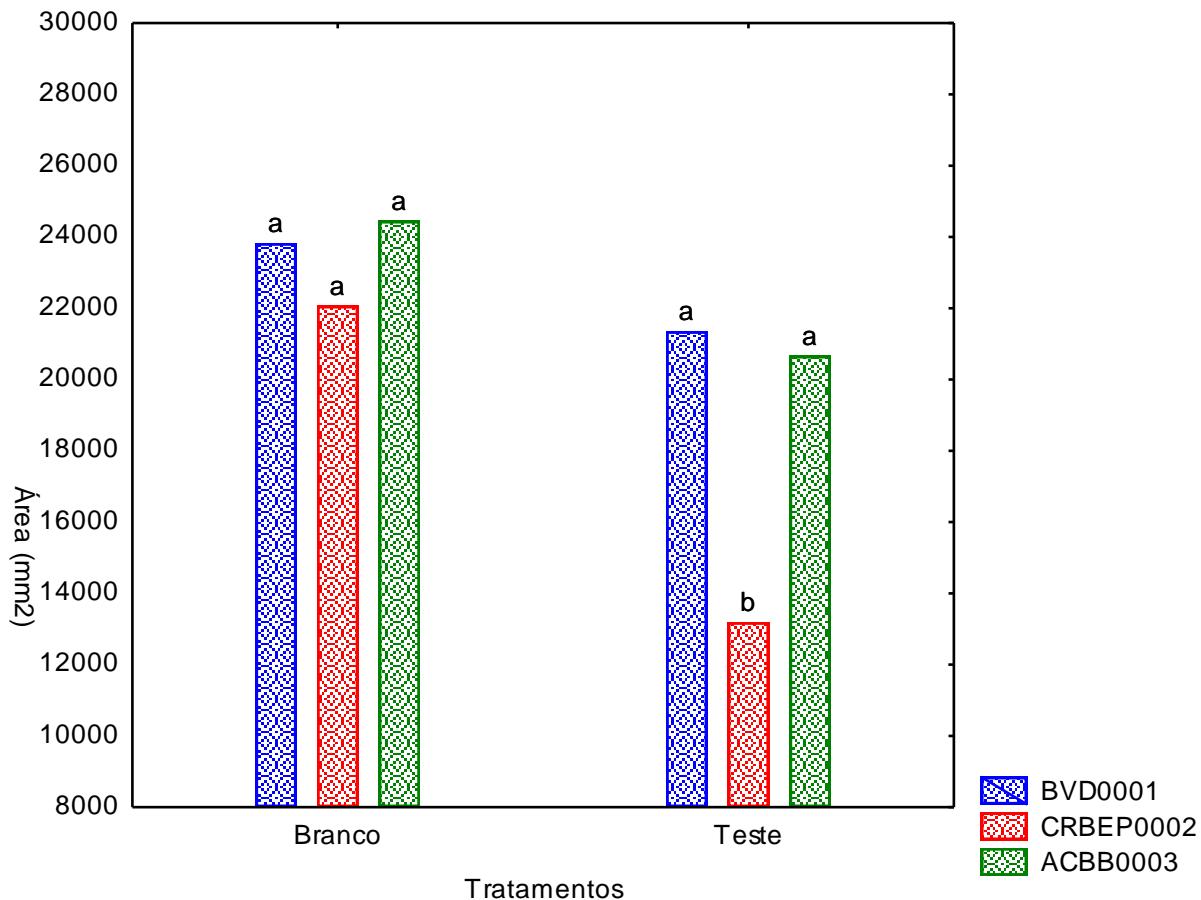
### **3.2 Inibição do Crescimento de *S. sclerotiorum* por metabólitos voláteis e Inibição do Crescimento de *S.sclerotiorum* por confrontação direta**

Foram analisadas as áreas miceliais do patógeno (*S. sclerotiorum*) e dos antagonistas (*Trichoderma* spp.) no teste de metabólitos voláteis, como ilustra as Figuras 2 e 3 respectivamente. Houve diferenças significativas entre área micelial do patógeno no tratamento branco (testemunha) e nos testes com os três isolados de *Trichoderma* spp. ( $F(2,57) = 8,85$  e  $p < 0,05$ ), o que mostra que os isolados produziram metabólitos voláteis que inibiram o crescimento do patógeno. No trabalho de

Rodríguez *et al.* (2011) que avaliaram também a ação de metabólitos voláteis contra *S. sclerotiorum*, porém com o antagonista *Clonostachys rosea*, anteriormente classificado como *Gliocadium roseum*, que registrando a inibição completa do patógeno.



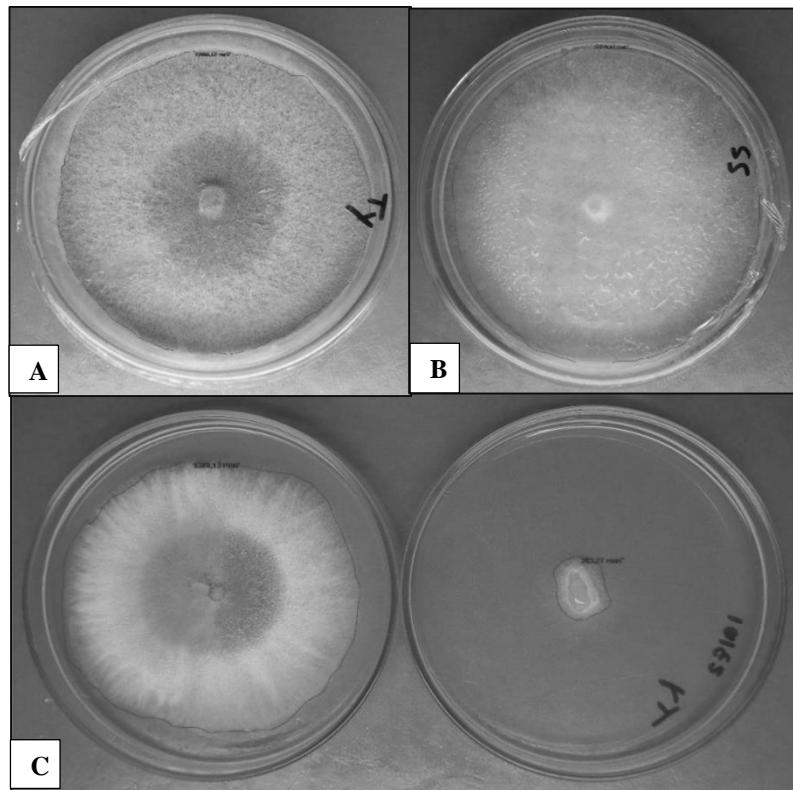
**Figura 2** – Área micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* no teste de Metabólitos Voláteis, na presença (Teste) e na ausência dos três isolados de *Trichoderma* spp. (Branco). Para cada isolado de *Trichoderma* spp., médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).



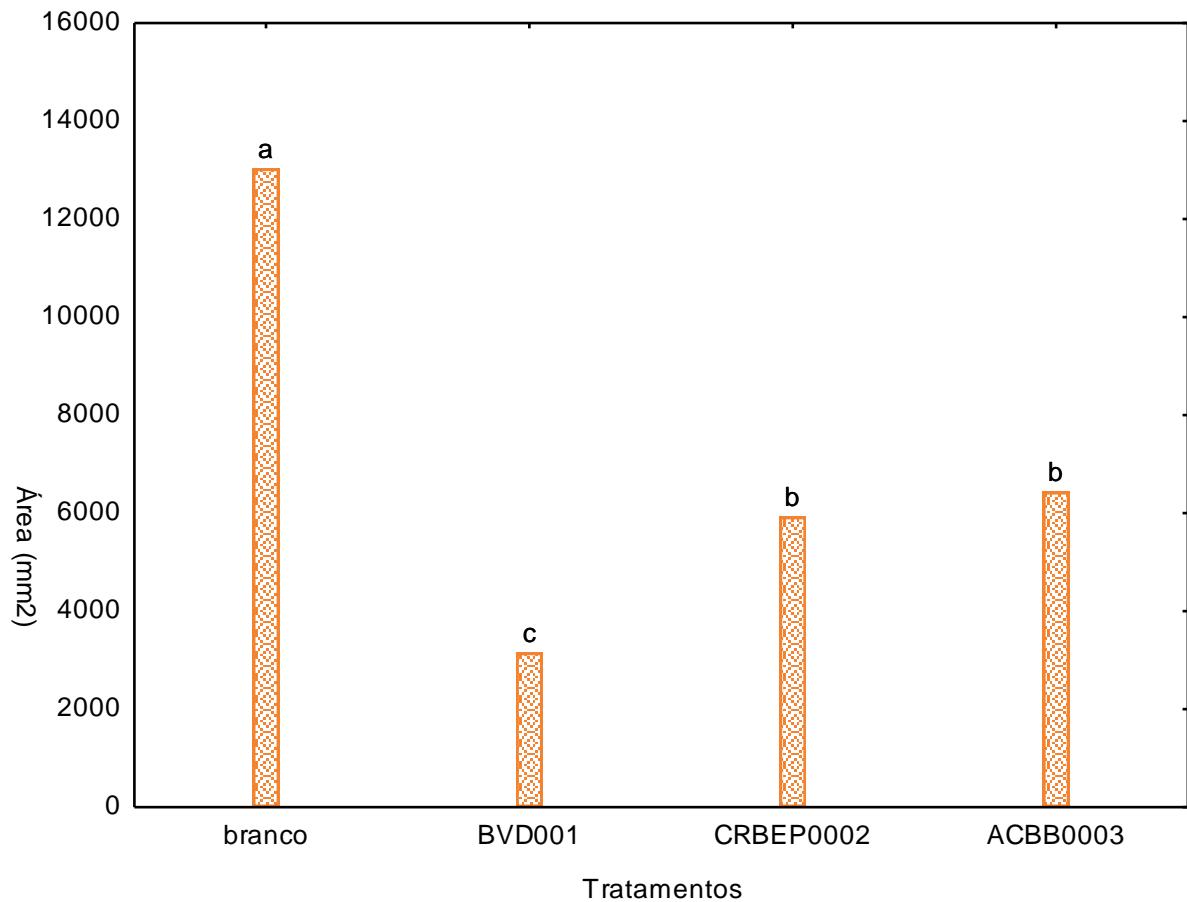
**Figura 3** - Área micelial dos três isolados de *Trichoderma* spp. no Teste de Metabólitos Voláteis, tratamento testemunha (Branco) na ausência de *S.scererotiorum* e tratamento na presença de *S.scererotiorum* (Teste). Para cada isolado de *Trichoderma* spp., médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Nos testes de confrontação direta observou-se que não houve diferenças significativas entre a área micelial dos antagonistas no branco, com exceção de CRBEP0002 que perdeu muita área micelial, como ilustra a Figura 4. No entanto, quando o patógeno foi cultivado com os antagonistas, o mesmo sofreu redução significativa no crescimento ( $F(3, 36)=105,17$  e  $p < 0,05$ ) (Figura 5), mostrando o poder de inibição do crescimento dos três isolados, sobretudo de BVD0001.

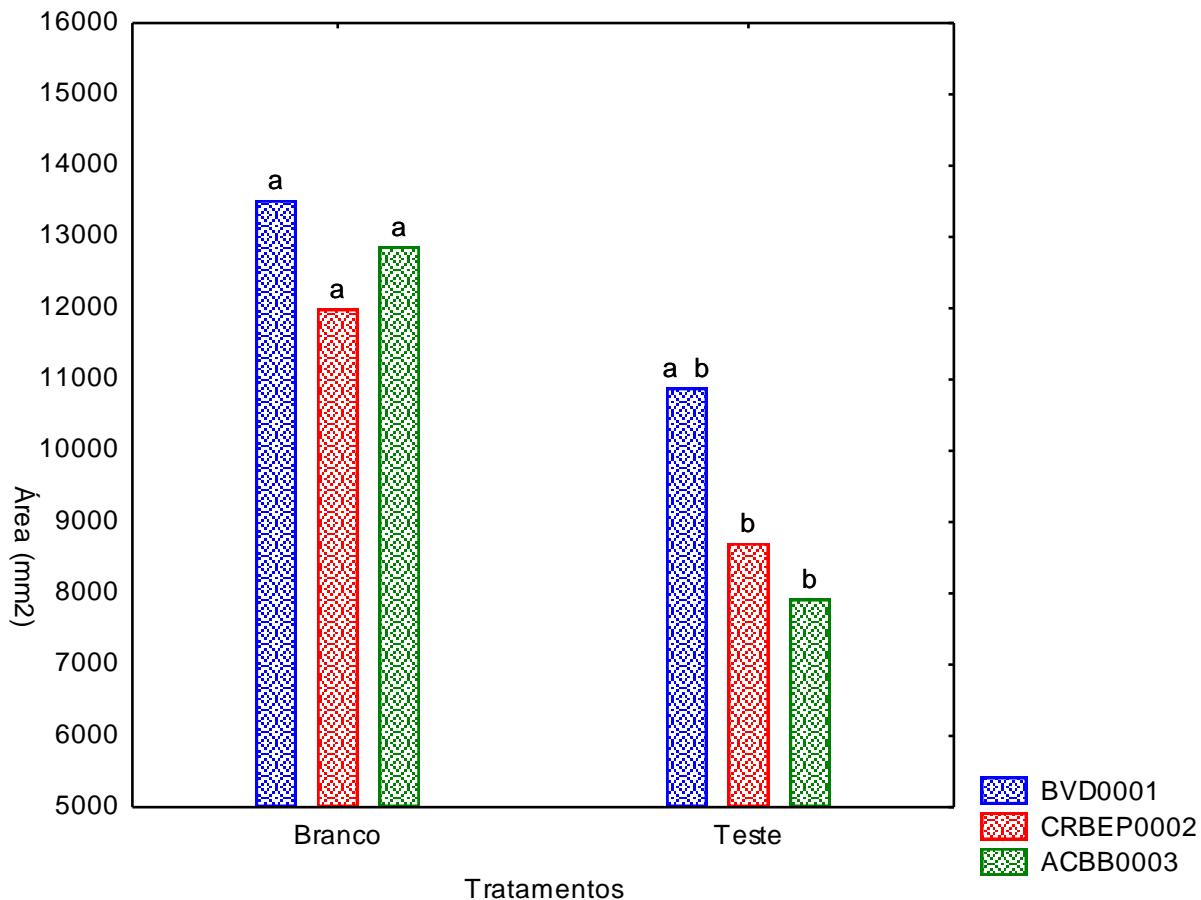
Nas Figuras 6 e 7 observa-se que as áreas miceliais dos antagonistas apresentaram resultados parecidos com o teste anterior, sem diferenças significativas, com exceção também de CRBEP0002 que perdeu muita área micelial durante o teste.



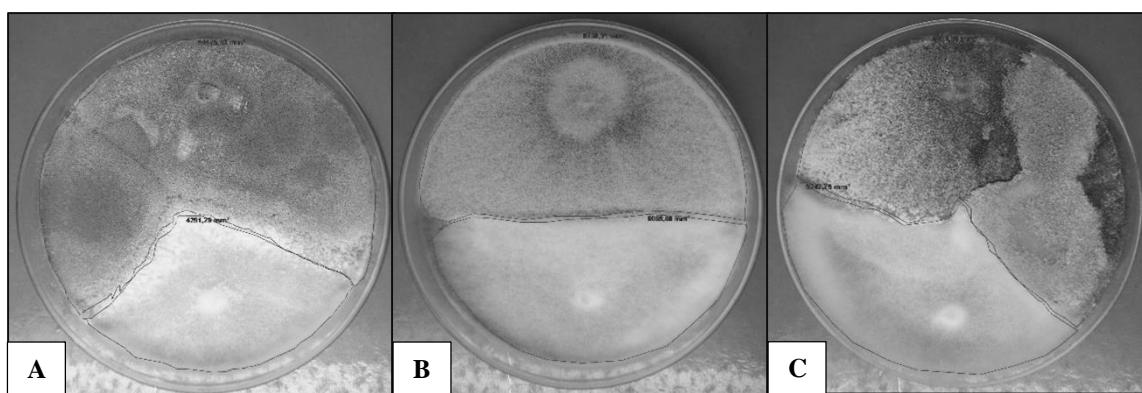
**Figura 4** – Fotos dos testes de metabólitos voláteis com CRBEP0002: A) Área micelial de CRBEP0002 no teste Branco; B) Área micelial de *S. sclerotiorum* no teste Branco; C) Área micelial de CRBEP0002 (esquerda) e de *S. sclerotiorum* (direita), ambos inibidos durante o testes.



**Figura 5** – Área micelial do patógeno (*Sclerotinia sclerotiorum*) no teste de Confrontação Direta, na ausência (Branco) e presença dos isolados de *Trichoderma* spp. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).



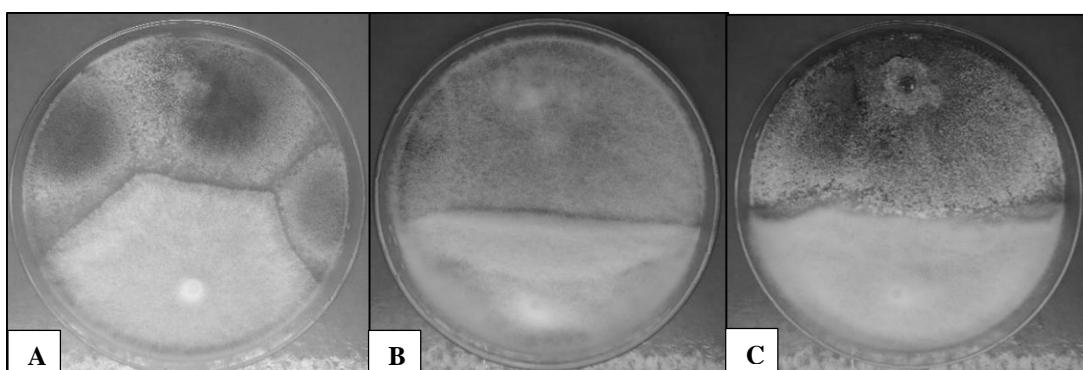
**Figura 6** - Área micelial dos três isolados de *Trichoderma* spp. no Teste de Confrontação Direta, tratamento testemunha (Branco) na ausência de *S.scerotiorum* e tratamento na presença de *S.scerotiorum* (Teste). Para cada isolado de *Trichoderma* spp., médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).



**Figura 7** – Testes de Confrontação Direta dos três isolados de *Trichoderma* spp. versus *S.scerotiorum*: A) BVD0001; B) CRBEP0002; C) ACBB0003.

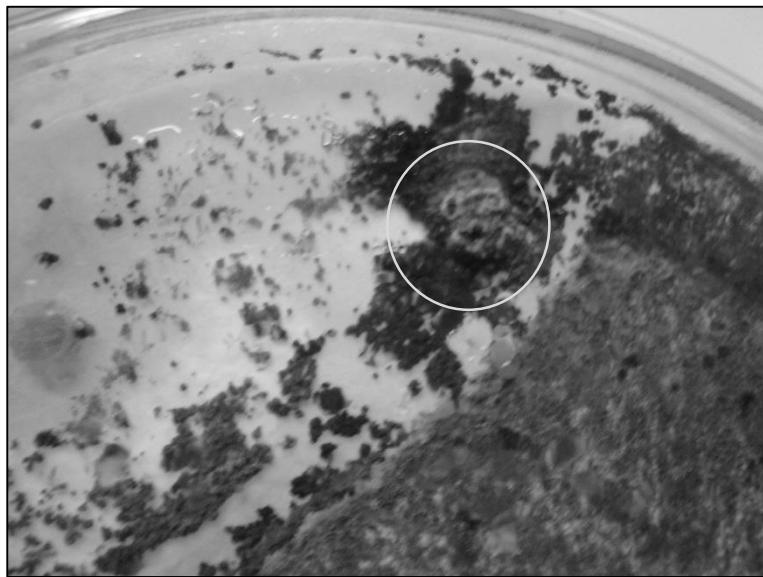
O mecanismo de biocontrole com *Trichoderma* spp. apresenta grande variedade de compostos com ações inibitórias contra patógenos. O estudo de Lopes *et al.* (2012) afirma que isolados de *Trichoderma* spp. têm habilidade para serem utilizados comercialmente como controle biológico de *S. sclerotiorum*, pois identificaram técnicas morfológicas e moleculares de “inibição” associadas com o perfil metabólico, tais como quitinase, NAGase, proteases,  $\beta$ -1, 3 - glucanase, lipase, fosfatase ácida,  $\alpha$ -manosidase, ABFase, e  $\beta$ -glicosidase (CDWEs). Entretanto, de acordo com Vinale *et al.* (2009), a quantidade de metabólitos secundários acumulados por *Trichoderma* spp. em co-culturas com patógenos, depende do equilíbrio entre promover efeito e a taxa de biotransformação exercida para sediar esse patógeno. Neste estudo, os três isolados apresentaram poder inibitório contra *S. sclerotiorum* através dos compostos voláteis, confrontação direta e em meios ricos com extratos dos micélios dos isolados.

A formação de um halo de inibição é observada quando alguns antagonistas limitam o crescimento de um fitopatógeno. Neste estudo, o halo de inibição foi observado antes da leitura, mas como os antagonistas produzem esporos, houve crescimento micelial acima desse halo e da área micelial de *S. sclerotiorum* nos dias de leitura (Figura 8). Resultado semelhante foi observado no trabalho de Delgado *et al.* (2007), que sugerem que os conídios de *Trichoderma* spp. criaram uma barreira para impedir o crescimento de *S. sclerotiorum*.



**Figura 8** – Testes de Confrontação Direta dos três isolados de *Trichoderma* spp. versus *S.sclerotiorum*: A) BVD0001 com formação de halo de inibição; B e C) CRBEP0002 e ACBB0003, respectivamente, com início da formação da barreira de conídios.

Não houve produção de escleródios de *S. sclerotiorum* quando crescidos, por confrontação direta com os antagonistas, 5 dias após o início do experimento, com exceção do isolado BVD0001, que após 10 dias envolveu os escleródios (Figura 9). Os *Trichoderma* spp. atuam através da ação individual ou da associação de vários mecanismos: micoparasitismo, antibiose e competição, tendo o primeiro como modo de ação de maior destaque, pois consiste da utilização do patógeno como alimento, que cresce em direção e se envolve no fungo alvo, ocorrendo uma primeira ação de esmagamento e depois reações de degradação da parede celular por secreção de enzimas líticas, limitando o crescimento e atividade do patógeno (CHET, 1987).



**Figura 9** – Testes de confrontação direta entre o isolado BVD0001 de *Trichoderma* spp. e escleródios de *S. sclerotiorum* aos 10 dias, após o pareamento.

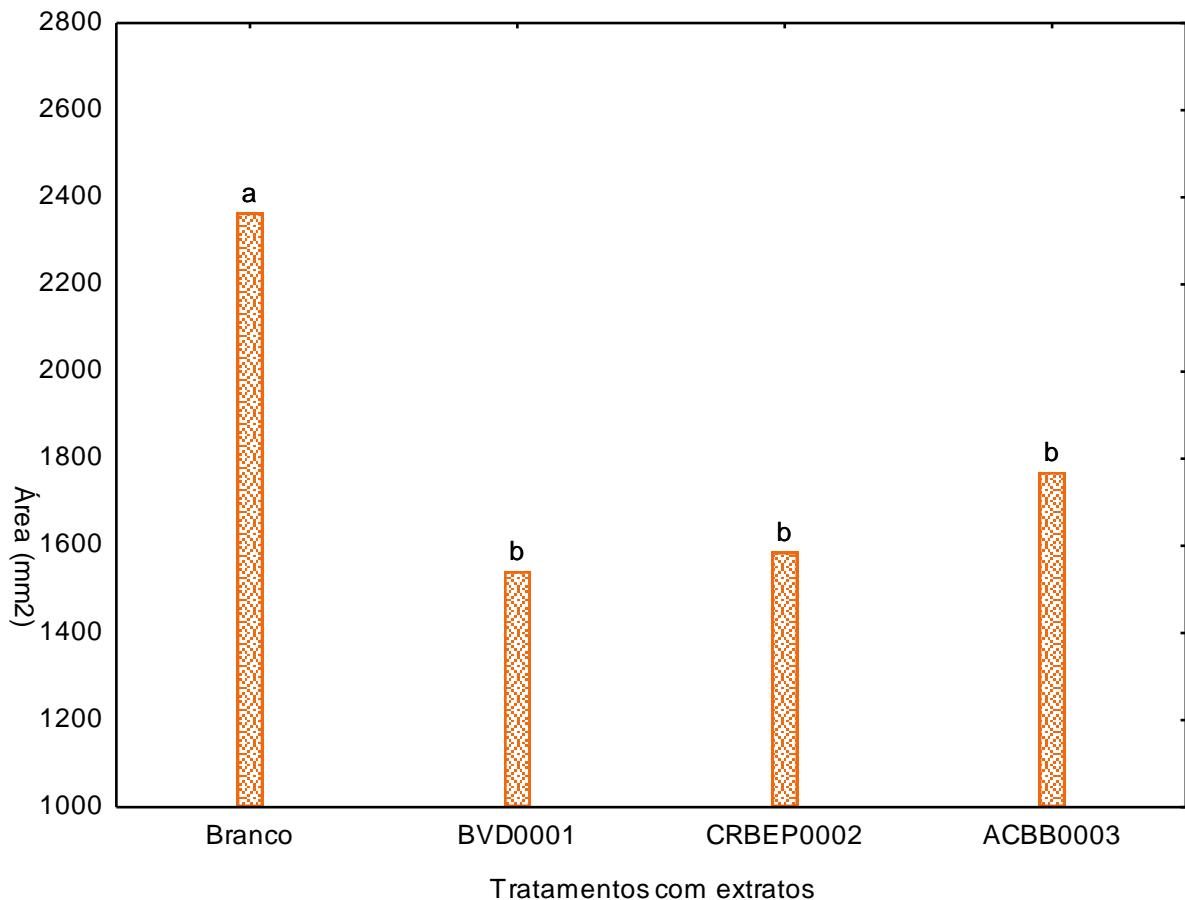
Apesar de registrar a maceração e esmagamento das hifas de *S. sclerotiorum* por *Trichoderma* sp., Delgado *et al.* (2007) observam que houve produção de escleródios para todos os isolados, diferindo apenas a viabilidade delas após o teste de confrontação. Louzada *et al.* (2009) detectaram três tipos de interações entre *Trichoderma* spp. e *S. sclerotiorum*, quais sejam: penetração, envolvimento e desenvolvimento de hifas paralelas, determinando uma interação hiperparasítica.

O fato dos três isolados de antagonistas perderem área micelial indica competição, (Figuras 3 e 6), mas também indica que esse processo não está associado exclusivamente com a atuação dos compostos, e sim com a ação em conjunto do processo de estrangulamento das hifas de *S. sclerotiorum* e a produção dos compostos ativos.

### **3.3 Inibição do Crescimento de *S. sclerotiorum* por extratos de micélio de *Trichodermas* spp.**

Analisando-se a área micelial do patógeno cultivado em meio contendo extratos dos micélios dos três antagonistas (BVD0001, CRBEP0002 e ACBB0003), observa-se que houve diferenças significativas entre os tratamentos,  $F (3, 36) = 8,1370$  e  $p<0,05$  comparados com o branco. Porém, entre apenas os três tratamentos não houve diferença, mas ainda foi possível observar que o antagonista BVD0001 apresentou atividade inibitória (Figura 10).

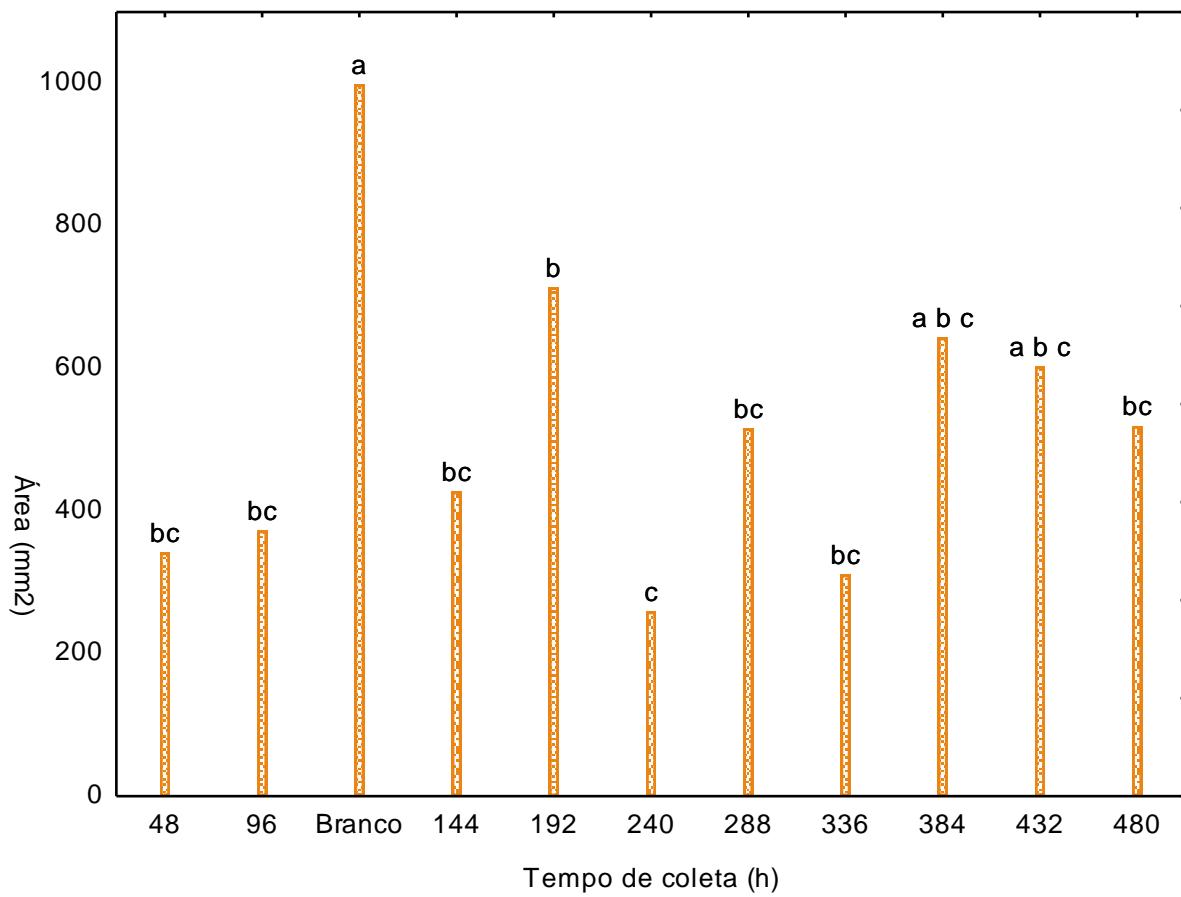
Estudos revelam substâncias produzidas por *Trichodermas* atuantes no biocontrole, elas foram organizadas em uma grande revisão contendo 183 moléculas, dividindo-as em grupos químicos, contabilizando 23 grupos, sendo que em 09 havia a presença de ao menos uma molécula antifúngica. Os grupos detectados foram: antraquinonas, azafilonas, harzialactonas, daucanas, pironas, viridinas, viridifungina, compostos heterocíclicos de nitrogênio, bisorbicilinoides, ergosterol e coningininas (REINO *et al.*, 2008). Entretanto estes compostos promovem apenas uma redução da severidade da doença causada pelo patógeno, como mostra o trabalho de Geraldine *et al.* (2013), que relaciona a redução de apotécios devido a produção de enzimas de degradação de parede (CWDEs),  $\beta$ -1,3-glucanase, quitinases e proteases.



**Figura 10** - Área micelial do patógeno (*Sclerotinia sclerotiorum*) no teste de inibição de crescimento por extratos dos três isolados de *Trichoderma* spp. (Branco) área micelial de *S.sclerotiorum* na ausência dos *Trichodermas*. Para os outros tratamentos são as áreas miceliais de *S.sclerotiorum* na presença de extratos de BVD0001, CRBEP0002 e ACBB0003, respectivamente. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

### 3.4 Ensaio de Inibição do Crescimento de *S. sclerotiorum* com Extratos do Isolado BVD0001

Foi testada massa micelial do isolado BVD0001 obtida da curva de crescimento mostrada na Figura 1. Os extratos de micélios foram adicionados aos meios de cultura de *S. sclerotiorum*, observando-se que todos os extratos testados foram ativos na inibição do crescimento do patógeno, destacando-se os extratos obtidos após 10 dias de cultivo, que se mostrou mais ativo que as demais amostras (Figura 11).



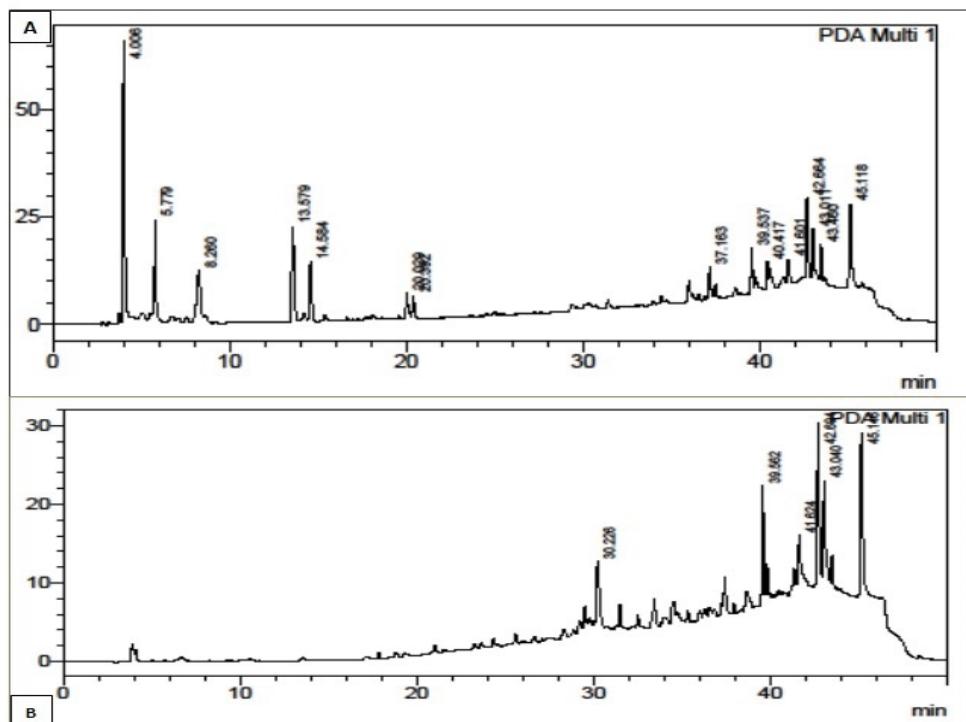
**Figura 11** - Área micelial do patógeno (*Sclerotinia sclerotiorum*) aos três dias após o cultivo do fungo exposto a extratos de micélio de *Trichoderma* sp.BVD000, obtidos em diferentes períodos após a inoculação do mesmo em meio líquido. (Branco) área micelial de *S.sclerotiorum* na ausência de extratos de BVD0001. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O isolado BVD0001 apresentou a maior ação inibitória em todos os testes, considerando o fato de permitir a produção de escleródios, perder menor área micelial durante os testes, maior correlação da sua biomassa com o tempo e apresentar inibição na maioria dos testes com extratos dos micélios extraídos da sua curva de crescimento (Figuras 5, 8 e 9). Esse fato pode estar relacionado com a origem da coleta, pois *Vochysia divergens* é uma planta de utilização popular para o tratamento de doenças infecciosas (HESS *et al.*, 1995). Hess e Monache (1999) verificaram a presença de ácido divergióico, éster glicopiranósil,  $\beta$ -sitosterol, ácidos betulínico e serício na casca do tronco, sendo que o ácido betulínico apresenta atividade antibacteriana. É provável que tais propriedades sejam a causa da grande

utilização desta planta contra febre, tosse, gripe e pneumonia, sendo o cambará considerado uma “Farmácia do mato” (POTT *et al.*, 2004).

### **3.5 Perfil cromatográfico de BVD0001**

Amostras da massa micelial e meio rico em metabólitos secundários do isolado BVD0001 foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência. A Figura 12 ilustra os perfis obtidos. Observa-se, pela grande quantidade de picos de diferentes intensidades, que o referido isolado produz uma grande diversidade de metabólitos secundários.



**Figura 12** – Perfil cromatográfico do isolado BVD0001, de *Trichoderma* sp. A) Extrato obtido através do micélio de BVD0001. B) Extrato obtido através do meio rico em metabólitos secundários de BVD0001.

A ação inibitória dos isolados BVD0001, CRBEP0002 e ACBB0003 de *Trichoderma* spp. apresentaram um grande potencial competitivo (micoparasitismo), dividido em ação mecânica e ação química contra *S. sclerotiorum*. Em especial, o isolado BVD0001 é o melhor inibidor contra esse

patógeno devido a simbiose com sua hospedeira, uma co-evolução, confirmando os inúmeros trabalhos publicados sobre o potencial de *Trichoderma* para controle biológico e o fato da comercialização do gênero como defensivos biológicos ser via esporos.

Estudos sobre o perfil químico de cada fase de vida de BVD0001 são necessários, para elucidar em qual fase de vida os compostos ativos com maior atividade, quais são as classes de compostos ativos dos testes deste trabalho e avaliar seu potencial de inibição contra *S. sclerotiorum* sem a ação mecânica.

#### **4. AGRADECIMENTOS**

Os autores são gratos à e CAPES pela bolsa de pós-graduação concedida, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, e aos pesquisadores que contribuíram para que este trabalho acontecesse: Dr<sup>a</sup> Yvelise Maria Possiede, Dr. Edson dos Anjos dos Santos e Dr<sup>a</sup> Giovana Giannese.

#### **5. REFERENCIAS**

- Bettoli, W.; Morandi, M. A. B.; Pinto, Z. V.; Paula Júnior, T. J.; Corrêa, E. B.; Moura, A. B.; Lucon, C. M. M.; Costa, J. C. B. & Bezerra, J. L. (2012). Produtos Comerciais a Base de Agentes de Biocontrole de Doenças de Plantas. Documentos 88, Embrapa. Jaguariúna SP, Brasil.
- Bharat, R.; Singh, V.N. & Singh, D.B. (1980). *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. *Plant and Soil* 57, 131-135.
- Chet, I. (1987). *Trichoderma* – application, mode of action, and potential as biocontrol agent of soilborne plant pathogen fungi. In: Innovative Approaches to Plant Disease Control (I. Chet, ed.) 137-160. John Wiley, New York.

Delgado, G. V.; Martins, I.; Menêzes, J. E.; Macedo, M. A. & Mello, S. C. M. (2007). Inibição do Crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma* spp. in vitro. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 214, Embrapa, Brasilia DF, Brasil.

Ethur, L. Z.; Blume, E.; Muniz, M.; Da Silva, A. C. F.; Stefanelo, D. R. & Rocha, E. K. (2005). Fungos Antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em Pepineiro Cultivado em Estufa. Fitopatol Bras 30(2).

Geraldine, A. M.; Lopes, F. A. C.; Carvalho, D. D. C.; Barbosa, E. T.; Rodrigues, A. R.; Brandão, R. S.; Ulhoa, C. J. & Junior, M. L. (2013). Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. Biol C 67, 308–316.

Görgen, C.A.; Neto, a. N. S.; Cardeiro, L. C.; Ragagnin, V. & Lobo Júnior, M. (2009). Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. Pesq Agropec. Bras 44, 1583-1590.

Hannusch, D.J. & Boland, G.J. (1996). Influence of air temperature and relative humidity on biological control of White mold of bean (*Sclerotinia sclerotiorum*). Phytopathol 86,156-162.

Harman, G. E.; Herrera-Stella, A. H.; Horwitz, B. A. & Lorito, M. 2012. Special issue: *Trichoderma* – from Basic Biology to Biotechnology. Microbio 158, 1-2.

Hess, S. C. & Monache, F. D. (1999). Divergioic Acid, a Triterpene from *Vochysia divergens*. J of Bra Chem S 10, 104-106.

Hess, S.C.; Brum, R. L.; Honda, N.K.; Cruz, A.B.; Moretto, E.; Cruz, R.B.; Messana, I.; Ferrari, F.; Filho, V.C. & Yunes, R.A. (1995). Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae). J Ethnopharm 47, 97-100.

Illipronti Jr., R.A. & Machado, J.C. (1993). Antagonismo de fungos a *Sclerotinia sclerotiorum* em soja e feijão. Fitopatol Bra 18, 162-166.

Ishiguro, K & Arai, T. (1976). Action of the Peptide Antibiotic Leucinostatin. Antimicrobial Agentes and Chemoterapy. A S Microbio 6, 893-898.

- Lopes, F. A. C.; Steindorff, A. S.; Geraldine, A. M.; Brandão R. S.; Monteiro, V. N.; Junior, M. L.; Coelho, A. S. G.; Ulhoa, C. J. & Silva, R. N. (2012). Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fung Biolog.*
- Louzada, G. A. S.; Carvalho, D. D. C.; Mello, S. C. M.; Lobo Junior, M.; Martins, I. & Braúna, L. M. (2009). Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. *Biota Neotrop* 9.
- Martins-Corder, M. P. & Melo, I. S. (1998). Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* Kleb. *Scientia Agricola* 55, 1-7.
- Menendez, A.B. & Godeas, A. (1998). Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* attacking soybean plants. Degradation of the cell walls of this pathogen by *Trichoderma harzianum* (BAFC742). *Mycopathol* 142, 153-160.
- Menten, J. O. M.; Machado, C.C.; Minussi, E.; Castro, C. & Kimati, H. (1976). Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass) Goid. *in vitro*. *Fitopatol Bra* 1, 57-66.
- Pizzirani-Kleiner, A. A.; Ferreira, A.; Lima, A. O. S.; Andreote, F. D.; Pimentel, I. C.; Azevedo, J. L.; Marcon, J.; Kuklinsky-Sobral, J.; Quecine, M. C.; Martins, M. K.; Lacava, P. T.; Rosseto, P. B.; Stuart, R. M.; Araújo, W. L. 2010. Guia prático: Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos. 1.ed. Piracicaba: Copiadora Luiz de Queiroz.
- Pott, A.; Pott, V.J.; Sobrinho, A.A.B. Plantas úteis à sobrevivência no Pantanal. IN: IV Simpósio sobre recursos naturais e sócios-econômicos do Pantanal. Corumbá/MS. 23-26 de novembro. 2004.
- Reino, J. L.; Guerrero, R. F.; Hernández-Galán, R. & Collado, I. G. (2008) “Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*”. *Phytoch Rev* 7, 89-123.

- Remuska, A.C. & Pria, M. D. (2007). Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no Crescimento de Fungos Fitopatogênicos. Ci Agr Eng 13, 31-36.
- Rodríguez M. A.; Cabrera G.; Gozzo F. C.; Eberlin M. N. & Godeas A. (2011). *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. J Appl Microbiol 110, 1177-1186.
- Silva, J. B. T. & Mello, S. C. M. (2007). Utilização de *Trichoderma* no Controle de Fungos Fitopatogênicos. Documentos 241, Embrapa. Brasilia DF, Brasil.
- Tan, R. X. & Zou, W. X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. Nat. Prod. Rep 18,448–459.
- Vinale, F.; Ghisalberti, E. L.; Sivasithamparam, K; Marra, R.; Rittieni, A.; Ferracane, R; Woo, S. & Lorito, M. (2009). Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. L A Microb 48,705–711.
- Whipps, J. M. (1987). Behaviour of Fungi Antagonistic to *Sclerotiniu sclerotiorum* on Plant Tissue. Segments J of G Microbiol 133, 1495-1501.

## **6. NORMAS PARA PUBLICAÇÃO**

# **Preparing and Submitting a Paper Microbiology Information for Authors**

### **General information**

All papers must be submitted online, via the Bench>Press system. Submissions are not accepted in hard copy or by email. Authors should read these guidelines before going to the Bench>Press site to submit a paper. Further details and help pages are available on the Bench>Press site.

### **Pre-submission checklist**

Authors must:

1. read the Information for Authors and ensure that their paper complies with this before submission;
2. all agree to the submission and agree that the corresponding author may act on their behalf throughout the review and publication process;
3. provide the names and contact details of at least three (and not more than five) potential reviewers;
4. obtain permission for any citations of personal communications or unpublished results; this should be confirmed in a covering message;
5. indicate the Contents Category for the paper on the title page (it should also be entered in the Contents Category field of the online submission form in Bench>Press);
6. include on the title page the word count of both the summary and the main text (including the figure and table legends, in-text citations and any appendices, but not including the title page, acknowledgements, table bodies and footnotes, or reference list) and the number of tables and figures;
7. use continuous line numbering throughout the manuscript, to facilitate online reviewing;
8. ensure that citations of references in the text and references list conform to journal style;
9. upload any supplementary material associated with the paper as a supplementary file(s) for peer review with the paper;

10. upload cited papers that have been accepted for publication but are not yet published as a supplementary file(s);
11. include an accession number from one of the public databases (GenBank, EMBL, DDBJ or PIR) if the paper reports new sequence data; the relevant deposition criteria for the database must be adhered to.

## **Preparing files for submission**

Papers can be submitted initially either as a single PDF file or as separate word-processor and image files, which will be compiled into a PDF by the system. The submission system will also attempt to prepare an HTML version of the reference list with links to papers that it can identify on the PubMed and HighWire databases, for use by the reviewers. This conversion will not work reliably if the reference format is incorrect (see the section on References for the correct style); however, an HTML reference list is not essential for review of the paper to proceed. Supplementary material should be submitted as a separate file(s), rather than being incorporated within the single PDF or word-processor file. When submitting the revised version of a paper, authors should supply the source files for the text and figures, to expedite the publication of the paper if it is accepted.

Submission as a single PDF. Please refer to the Help pages on the submission site for guidelines on preparing PDFs for submission, including advice on reducing the size of image files (the submitted PDF should preferably not be much larger than 1 MB).

Submission as separate word-processor and image files. Most standard word-processor files (including .docx files produced in Word 2007 or 2010) will convert successfully to PDF. Times, Times New Roman, Courier, Helvetica and Arial, and the Symbol font for special characters, are the recommended fonts. Other fonts are not guaranteed to convert successfully to PDF. Tables for the main paper must be prepared as part of the word-processor file; they must not be supplied as images or Excel files. (Excel files are, however, acceptable for supplementary data). Word-processor files including

inserted image files will normally be converted successfully to PDF by the system, but please note that files using OLE (Object Linking and Embedding) technology to display information or embedded files are not supported. If the conversion is not satisfactory, either convert the file to PDF yourself, and submit that, or submit the image files separately.

The file types that are supported for submission as separate image files for conversion to PDF are PDF, GIF, TIFF, EPS, JPEG and PPT. A resolution of 300 d.p.i. at a reasonable size of reproduction is recommended; in other words, an image intended to fit in a single column of the journal should be around 1000 pixels wide and an image intended to fit across two columns should be around 2000 pixels wide. The following file types are not supported at the initial submission stage as they cannot be converted to PDF by the system: bitmap (.bmp), PICT (.pict), Excel (.xls), Photoshop (.psd), Canvas (.cnv), CorelDRAW (.cdr) and locked or encrypted PDFs. Image files will be converted to PDF and added to the end of the manuscript PDF produced by the system. If any of the image files are very large, it is advisable to reduce their size before submission if possible: refer to the Help with Online Submission pages for guidelines on how to do this.

Our requirements for files intended for publication are different from those for files that will be converted to PDF by the Bench>Press system as part of an initial submission, as set out in the Files for Publication section of these instructions. If you are unsure whether your file formats are suitable, please contact the Editorial Office.

### **General style and layout**

The paper must be written in clear and concise English, normally in the past tense, and should normally comprise: (a) Title page; (b) Summary; (c) Introduction; (d) Methods; (e) Results; (f) Discussion, with Conclusions if appropriate; (g) Acknowledgements; (h) References; (i) Tables; (j) Figures, with legends. A Theory section and Appendices may be included. Where appropriate, the Results and Discussion may be combined. Figures and tables should only be used to illustrate points

that cannot easily be described in the text. Please check the length guidelines before submitting your manuscript and check that your paper is an appropriate length. Authors should consult a recent issue of the journal for the layout of headings, tables, etc. Guidance on the presentation of individual sections is given below.

## Title page

This should carry the following information.

The title of the paper. A good title is very important. It will attract readers and facilitate retrieval by online searches, thereby helping to maximize citations. The title should include topical keywords and allude to the interesting conclusions of the paper. A title that emphasizes the main conclusions, or poses a question, has more impact than one that just describes the nature of the study.

A short 'running title', of not more than 55 characters (including spaces), for use as a headline.

The Contents Category.

The names of the authors. The author for correspondence must be clearly indicated.

The name and address of the laboratory or laboratories where the work was done, and present addresses of authors who have since moved.

An e-mail address and telephone and fax numbers for the corresponding author.

The number of words in (i) the summary and (ii) the main text (including the figure and table legends and any appendices, but not the title page, summary, acknowledgements, table bodies and footnotes, or references) and the number of tables and figures.

A footnote 'The GenBank[/EMBL/DDBJ] accession number for the [16S rRNA gene/gyrA, etc.] sequence of XXXXX is XX00000', where a new sequence(s) has been determined.

If appropriate, a footnote defining any non-standard abbreviations. Guidance on abbreviations not requiring definition is given in the Abbreviations section.

## **Summary (Abstract)**

The summary will be read by more people than the full paper. It must therefore be clear and comprehensible in its own right. References should not be cited, and any abbreviations used must be defined. The summary should if possible introduce the subject in the first sentence and present the main conclusion in the last sentence: when someone is skimming a block of text, the first and last sentences receive the most attention. The recommended maximum length for the summary is 250 words.

## **Introduction**

This should state the objectives of the work, but should not contain a detailed summary of the results. Authors should not assume that all readers will know why an area is worth studying; they should briefly make this clear. Previous relevant work should be sufficiently cited but this should not constitute a full review.

## **Methods**

Sufficient detail should be provided to allow the work to be repeated. The suppliers of chemicals and equipment should be indicated if this may affect the results. Suppliers' addresses should not be given unless this is considered essential for a particular reason. A source (name and brief address) or reference should be given for each strain used. Authors are encouraged to deposit important strains in a recognized culture collection and to refer to the collection and strain number in the paper.

## **Results**

There should be sufficient subheadings to make clear how the work was organized, what the key questions being addressed were, how one experiment led to another, and perhaps what conclusions were reached. A reader should gain a clear picture of the work from the subheadings.

Reproducibility of results should be indicated. It should be stated how many times an experiment was repeated and whether means or representative results are shown. Variability should be indicated statistically wherever possible; when error terms are given, the measure of dispersion and the

number of observations should be stated. Statistical techniques used must be specified, and where necessary they should be described fully or a reference given. If results are expressed as percentages, the absolute value corresponding to 100% should be stated.

## **Discussion**

This should not recapitulate the results, and should not be too long. Excessive discussion of few facts often gives an impression of poor science. Subheadings should be used where appropriate, to highlight the points under discussion. It may be helpful to list the main conclusions at the end. A combined Results and Discussion section is encouraged where appropriate.

## **Acknowledgements**

An Acknowledgements section is not compulsory but may be included. If required, please state the names of funding bodies and grant numbers in this section. Authors may also wish to acknowledge individuals who have contributed materials, expertise or time to the study who are not named as authors.

## **References**

References in the text should be cited as follows: two authors, Smith & Jones (1996) or (Smith & Jones, 1996); three or more authors, Smith et al. (1996) or (Smith et al., 1996). References to papers by the same author(s) in the same year should be distinguished in the text and the reference list by the letters a, b, etc. (e.g. 1996a or 1996a, b).

For references with ten or fewer authors, give the names of all authors in the form "Surname, Initials". For references with more than ten authors, list the first nine followed by "& other authors".

Sample journal references:

Cerdà-Cuéllar, M., Rosselló-Mora, R. A., Lalucat, J., Jofre, J. & Blanch, A. (1997). *Vibrio scophthalmi* sp. nov., a new species from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Int J Syst Bacteriol* 47, 58–61.

Pasta, F. & Sicard, M. A. (1996). Exclusion of long heterologous insertions and deletions from the pairing synapsis in pneumococcal transformation. *Microbiology* 142, 695–705.

Sample journal reference for more than ten authors:

Tomb, J.-F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Klenk, H.-P., Gill, S. & other authors (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388, 539–547.

Sample reference to a whole book:

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sample reference to a book chapter or section:

Romano, A. H. & Saier, M. H., Jr (1992). Evolution of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. I. Physiological and organismic considerations. In *The Evolution of Metabolic Function*, pp. 171–204. Edited by R. P. Mortlock. Boca Raton, FL: CRC Press.

## References to websites

It is not practical to provide a generic example of a reference to a website. Essential items that must be provided are:

- \* an author(s) (which may be a company name or organization);
- \* a year of 'publication' (which may be the year that the site was last updated);
- \* the URL (web address) of the page;
- \* a page title (which will hopefully allow the page to be found using a search engine if the URL subsequently changes).

For a website that is frequently updated, it may be useful to provide the date that the site was accessed, particularly if specific information is quoted that may have changed when the article is read.

Authors who use EndNote or Reference Manager can download the style for Microbiology by clicking on the links below: EndNote output style Reference Manager output style.

Please note the following style points:

- \* References in the list must be given in alphabetical order, except for papers with three or more authors, which should be listed in chronological order after any other papers by the first author.
- \* References must include the title of the paper as well as both initial and final page numbers.
- \* Titles of journals should be abbreviated according to the system used by MEDLINE; no stops should be used after abbreviated words.
- \* References to books should include year of publication, title (in full), edition, editor(s) (if any), town of publication and publisher, in that order. When the reference is to a particular part of a book, the inclusive page numbers of the chapter or section and, if appropriate, chapter title must be given.
- \* Only papers accepted for publication but not yet published may be cited as 'in press' in the reference list, and the reference must include the name of the journal. Relevant papers cited as 'in press' should be included as supplementary files with the online submission. References to papers not yet accepted should be cited in the text as unpublished results, giving the surname(s) and initials of all the author(s). Such papers should not appear in the list of references.
- \* Permission must be obtained for any personal communications or citations of other workers' unpublished results.

## **Figures**

This section outlines journal policy on figures. See these links for advice on preparing figures for inclusion as a PDF for submission and on the source files needed for publication.

Figures should not be used to present results that can be described by a brief statement in the text. The points outlined above for tables regarding comprehensibility, relative values and reproducibility also apply to figures and their legends. The inclusion of large amounts of tabular data in

figures is discouraged and authors may be asked to move such data to the text or a separate table. Authors should be aware that after publication, tabulated data within figures are not accessible via online text searching.

Figures must be referred to in the text as Fig. 1(a) not Fig. 1A or Figure 1(A) or as (Fig. 1a) not (Figure 1A). Multipart figures should be labelled (a), (b), etc., not (A), (B), etc.

Line drawings. These should be of a quality suitable for direct reproduction. The maximum printed size, including lettering and legends, is 176 x 235 mm. Line thicknesses and symbol sizes should be sufficient to allow for reduction. The preferred symbols for graphs are filled and open circles, squares, triangles or diamonds. Where possible, the same symbol should be used for the same quantity in different figures.

Bar diagrams. Simple bar diagrams reporting only a few values are usually unnecessary; the data can normally be given in a few lines of text. It is editorial policy not to publish bar diagrams with 'three-dimensional' bars unless there is a specific justification for their use.

Sequence data. Figures showing full gene sequences are not published, but selected sequence data, with appropriate annotation, may be published where there is justification. The layout of sequence figures should be designed to fit either the full width of the page (176 mm) or a single column (84 mm). For adequate legibility, the height of the characters should be not less than 1.5–2 mm (or 6–8 point). For printing at full page width with this size of type, a layout with 80–100 nucleotides per line is appropriate (or 60–70 if there are spaces between the codons). For a single-column layout, 50–60 nucleotides per line is about right. The spacing between the lines of sequence should be as close as is consistent with clarity. Note that sequence data must be submitted to GenBank, EMBL or DDBJ.

Microbiology does not publish figures whose principal function is to present primary sequence data, since the data can be accessed through the databases. To merit publication, sequence figures must be justified by the additional annotation they present; they should normally be limited to regions of

particular interest. Limited sequence alignments of nucleic acids and proteins are acceptable provided they make a significant point. See above for guidance on presentation of sequence figures. Sequence data that are not suitable for print publication can, where appropriate, be published as online-only supplementary data.

Digital photographs (halftones). Authors are advised to supply halftones intended for publication as TIFF or EPS files. The resolution should be at least 300 d.p.i. at final size (approx. 1000 pixels wide for a single-column figure; approx. 2000 pixels wide for a double-column figure). For photomicrographs, the scale should be shown by a scale bar.

### **Colour figures**

These are published at no cost to the author, if the Editors believe that colour is essential to show the results. Colour figures should preferably be supplied as TIFF or EPS files. The resolution should be at least 300 d.p.i. at final size (approx. 1000 pixels wide for a single-column figure; approx. 2000 pixels wide for a double-column figure). The files should preferably be generated as CMYK (4-colour) images, not RGB, as these reproduce better in print.

### **Supplementary material**

Material associated with a paper but not suitable for print publication (e.g. large datasets, sequence alignments, 3D structures, movie files) can be included as online-only supplementary data. Data that are essential for interpretation of the results of the main paper should be included in the main paper. All supplementary data files will be reviewed along with the main paper; these will not be published unless they significantly enhance the paper. The Editors may sometimes suggest that figures or tables that the author has included within a paper should be converted into supplementary data.

Supplementary data files must not include methods for results that are included in the main paper, nor should they introduce different results or new discussion points. Supplementary figures and tables should be named Fig. S1, Table S1, etc., and be cited accordingly in the main paper. A heading

and, if appropriate, a short legend or text description must be supplied for each supplementary data item.

File types and formatting for supplementary data. The contents of the supplementary file should be indicated in the 'File label' field when the file is uploaded. Most file types can be supported but authors should try to avoid files that require unusual software, because these will be of limited use to readers. Very large files should also be avoided where possible because they may be difficult to download. Editorial staff may apply stylistic editing to supplementary files, and will, where possible, convert the files to PDF format for online publication.