



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0822486-2 B1



(22) Data do Depósito: 21/03/2008

(45) Data de Concessão: 02/04/2019

(54) Título: TRICHODERMA ATROVIRIDE SC1 PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS FÚNGICAS EM PLANTAS

(51) Int.Cl.: C12N 1/14; A01N 63/04; C12Q 1/68; C12R 1/885.

(73) Titular(es): TRENTINO SVILUPPO S.P.A.; FONDAZIONE EDMUND MACH.

(72) Inventor(es): PERTOT, ILARIA; LONGA, CLAUDIA MARIA; PRODORUTTI, DANIELE; MICHELON, LORENZA; SAVAZZINI, FEDERICA.

(86) Pedido PCT: PCT IT2008000196 de 21/03/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/116106 de 24/09/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 21/09/2010

(57) Resumo: TRICHODERMA ATROVIRIDE SCI PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS FÚNGICAS EM PLANTAS
Uma realização da presente invenção é um Trichoderma atroviride SCI, CBS n°122089, como agente de biocontrole, isto é, para tratar doenças fúngicas de plantas. A segunda realização da presente invenção é uma composição agrícola compreendendo o Trichoderma atroviride SCI como princípio ativo em uma quantidade efetiva. As composições da presente invenção podem compreender adicionalmente um segundo agente de biocontrole e/ou um aditivo, um emulsificante, um nutriente vegetal, um agente umectante, um micro-nutriente vegetal ou um substrato, onde o dito substrato é selecionado do grupo consistindo em: um meio de cultura nutriente, um cereal ou um derivado deste, um modificador, um vegetal ou uma parte deste, turfa, madeira ou pedaço de madeira, argila ou cascas.

**TRICHODERMA ATROVIRIDE SC1 PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE
DOENÇAS FÚNGICAS EM PLANTAS**

Campo da Invenção

5 O campo da presente invenção é o do controle biológico de doenças em plantas causadas por fungos patogênicos por um agente de biocontrole, representado por uma nova cepa de *Trichoderma atroviride*.

10 **Antecedentes da invenção**

 A substituição ou redução do uso de fungicidas químicos tem sido obtida para utilização de fungicidas de base biológica, uma abordagem recaindo na definição de Controle Biológico tal como proposto por Cook e Baker
15 (1983): "Controle Biológico é a redução da quantidade de inoculo ou atividade que produz a doença de um patógeno realizada por um ou através de um ou mais organismos outros que não o homem".

 Esta definição ampla inclui o uso de variantes menos
20 virulentas do patógeno, cultivares mais resistentes do hospedeiro, e antagonistas microbianos "que interferem com a sobrevivência ou atividades produtoras de doença do patógeno".

 Uma avaliação mais complexa das interações ambientais
25 é necessária para o uso de tais Agentes de Biocontrole (BCAs). De fato, as condições ambientais afetam não apenas a sobrevivência dos BCAs, mas também, sua eficácia contra os patógenos (Paulitz, 2000). Os BCAs que são mais flexíveis em termos de adaptação ao meio ambiente podem ser
30 mais facilmente desenvolvidos em produtos comerciais, na medida em que suas aplicações e mercados alvos podem ser maiores que os de BCAs que requerem condições ambientais específicas.

A seleção de cepas de *Trichoderma* antagonistas com tolerância aumentada a condições ambientais desfavoráveis pode aumentar a confiabilidade de programas de biocontrole a base de *Trichoderma* (Kredics et al., 2000). É importante também se observar que BCAs mais efetivos para uso contra patógenos de plantas são aqueles que apresentam melhor tolerância a estresse que seus patógenos alvo (Kredics et al., 2000; 2004).

Trichoderma é um gênero cosmopolita, que pode colonizar solos, rizosferas e filosferas. Espécies de *Trichoderma* são freqüentemente encontradas em madeira e material vegetal em decomposição. Várias cepas de *Trichoderma* são produtoras economicamente importantes de enzimas industriais.

Cepas de *Trichoderma* já foram utilizadas como agentes de biocontrole contra numerosos patógenos de plantas e umas poucas foram desenvolvidas para uso como produtos de biocontrole comerciais (isto é, *Trichoderma harzianum*, conhecida como Trichodex®) para culturas em campo ou estufa (Elad, 2000; Harman, 2000).

Entretanto, existe uma grande variabilidade em termos de atividade de biocontrole, especificidade, mecanismo de ação, produção de metabólitos e sobrevivência em solo ou em planta entre as espécies de *Trichoderma*, o que afeta seu uso como BCAs (Benitez et al., 2004). Além disto, existem ainda várias patologias, tais como as causadas pelo gênero *Armillaria* em videira para o qual agentes de biocontrole totalmente efetivos não foram nem isolados nem caracterizados.

Breve descrição dos desenhos

Figura 1. Crescimento radial de *Trichoderma atroviride* SC1 a diferentes temperaturas. *Trichoderma atroviride* SC1 foi cultivado em dextrose agar de batata

(PDA) e incubado a diferentes temperaturas: 10 (◊), 15 (●), 20 (■), 25 (Δ) e 30°C (×). Nenhum crescimento foi observado a -1, 5, 37 ou 40°C. Os pontos são médias de dez replicatas. Os valores seguidos pela mesma letra não são
 5 significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. O período antes do início do crescimento (fase lag) foi de 1 dia a 20, 25 e 30°C, 2 dias a 15°C e 3 dias a 10°C.

Figura 2. Efeito do pH sobre o crescimento radial de
 10 ***Trichoderma atroviride* SC1.** O crescimento foi conduzido em dextrose agar de batata (PDA) a diferentes níveis de pH. pH 3 (Δ), 4 (□), 5 (▲), 6 (+), 7 (●), 8 (◊), 9 (×) e 10 (■). Os pontos são médias de dez replicatas. Os valores seguidos da mesma letra não são significativamente
 15 diferentes ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Figura 3. Efeito da atividade de água sobre a taxa de crescimento de *Trichoderma atroviride* SC1. *Trichoderma atroviride* SC1 foi crescido em dextrose agar de batata modificado com glicerol nos níveis de atividade de água de
 20 0,998 (▲), 0,990 (■), 0,980 (Δ), 0,960 (×), 0,940 (●) e 0,910 (○). Os pontos são médias de dez replicatas. Os valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. O período antes do início do crescimento (fase lag) foi de 1
 25 dia a 0,998, 0,990 e 0,980, 2 dias a 0,940 e 4 dias a 0,910.

Figura 4. Amplificação múltipla de *ech42* e *tga3*. A amplificação foi conduzida utilizando-se a sonda específica *ech42* (■) e a sonda genérica *tga3* (○) de DNA puro de
 30 *Trichoderma atroviride* SC1. As curvas de suas diluições se sobrepõem e apresentam a mesma eficiência, coeficiente de determinação (R^2) e inclinação.

Figura 5. Recuperação do DNA de *Trichoderma atroviride* SC1 por PCR em tempo real. A quantidade de

ácido nucléico é expressa como número de cópias do genoma aplóide em um grama de solo inoculado com uma quantidade conhecida de conídios. O desvio padrão (%) foi calculado a partir de seis quantificações independentes.

5 **Figura 6. Sobrevivência de *Trichoderma atroviride* SC1 em folha de morango avaliada como unidades formadoras de colônia (CFU).** As folhas foram inoculadas no dia 0 por aspersão de uma suspensão de conídios em água (10^6 CFU·ml⁻¹). Os pontos representam as médias de dez replicatas. Os
10 dados foram transformados por log (x). As barras de erro representam os desvios padrão das médias.

Figura 7. Sobrevivência de *Trichoderma atroviride* SC1 em microcosmos de solo estáticos. O fungo foi aplicado a uma taxa de 10^6 CFU·g⁻¹ solo no dia 0 a três solos estéreis
15 (a) e não estéreis (b) diferentes: Solo 1 (●), Solo 2 (□) e Solo 3 (Δ). Os pontos representam as médias de cinco replicatas e foram transformados por log (x). As letras diferentes para cada dia indicam valores que são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acordo com o
20 teste de Tukey.

Figura 8. Efeito do *Trichoderma atroviride* SC1 sobre a severidade de infecção com oídio. Plantas de pepino (painel A) e abobrinha (painel B) artificialmente inoculadas com conídios de *Podosphaera xanthii* e comparação
25 com padrões não tratados, tratados com enxofre e dois biocontroles (*Trichoderma harzianum* T39 - nome comercial Trichodex® - e *T. atroviride* F122). As avaliações foram feitas duas semanas após a inoculação classificando-se a severidade (percentagem de tecido vegetal infectado).
30 Foram classificadas cinco replicatas (plantas) por tratamento. As colunas com a mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com o HSD de Tukey ($P \leq 0,05$). Para a inoculação artificial, aproximadamente 5 ml de uma suspensão aquosa de conídios

(10^7 conídios ml^{-1}) foram aspergidos em cada planta. As aplicações diárias se iniciaram 12 horas após a inoculação.

Figura 9. Eficácia do *Trichoderma atroviride* SC1 no crescimento dos três principais agentes causadores da doença ESCA. (*Phaeomoniella chlamydospora*: painel A; *Phaeoacremonium aleophilum*, painel B; *Fomitiporia mediterranea*, painel C). A eficácia de controle foi calculada de acordo com a fórmula: $[(C-T)/C] \times 100$, onde C é o crescimento do patógeno sem o tratamento e T é o crescimento com o tratamento com *Trichoderma atroviride* SC1. As inoculações dos agentes causadores de ESCA e *T. atroviride* SC1 foram realizadas em dextrose agar de batata em placas de Petri. Os gráficos representam a média de cinco replicatas (placas de Petri).

Figura 10. Crescimento de micélio de *Armillaria mellea* e *Armillaria gallica* (agentes causadores da podridão da raiz) na presença e na ausência (sem tratamento) de *Trichoderma atroviride* SC1. O experimento do efeito de *Trichoderma harzianum* T39 - Trichodex® - é apresentado aqui como comparação padrão. O crescimento é expresso como média do diâmetro de cinco replicatas crescidas em peças de madeira em PDA em placas de Petri a 20°C.

Figura 11. Percentagem de plantas de morango infectadas (mortas) com *Armillaria mellea* e *A. gallica* (dead) após tratamento do solo. O efeito do *Trichoderma atroviride* SC1 foi comparado com o material não tratado. Foi utilizado *Trichoderma harzianum* T39 - Trichodex® - como comparação para *A. gallica* e o *T. atroviride* F122 é utilizado como comparação para *A. mellea*. Os valores são percentagens calculadas em 10 plantas de replicata.

Sumário da invenção

Uma realização da presente invenção é um *Trichoderma atroviride* SC1, CBS nº122089, como agente de biocontrole, isto é, o tratamento de doenças fúngicas de plantas.

5 A segunda realização da presente invenção uma composição agrícola compreendendo *Trichoderma atroviride* SC1 como o princípio ativo em uma quantidade efetiva. As composições da presente invenção podem compreender adicionalmente um segundo agente de biocontrole e/ou um
10 aditivo, um emulsificante, um nutriente vegetal, um agente umectante, um micro-nutriente vegetal ou um substrato, onde o dito substrato é selecionado do grupo consistindo em: um meio de cultura nutriente, um cereal ou um derivado deste, um modificador, um vegetal ou uma parte deste, turfa,
15 madeira ou um pedaço desta, argila ou casca de árvore.

Uma realização adicional é um método para o tratamento ou prevenção de uma doença de planta causada por um fungo patogênico selecionado do grupo daqueles que causam: doenças em madeira (*Phaeomoniella chlamydospora*,
20 *Phaeoacremonium aleophilum* e *Fomitiporia mediterranea*), doenças foliares (the agente causador de oídio *Podosphaera xanthii*), doenças de frutos e flores (*Botrytis cinerea*) e doenças radiculares causadas pelo gênero *Armillaria* (*Armillaria mellea* e *A. gallica*).

25 O tratamento pode ser conduzido diretamente na planta ou em um aparte da planta, ou indiretamente pela aplicação de substrato enriquecido com *Trichoderma atroviride* SC1, CBS nº122089 no solo ou sobre este, próximo à planta. As plantas que se beneficiam deste tratamento são
30 preferivelmente selecionadas do grupo consistindo em: *Cucurbitaceae*, *Rosaceae*, *Vitaceae*, *Cruciferae*, *Compositae*, *Ubelliferae*, *Solanaceae* e *Liliaceae*.

Realizações adicionais da presente invenção são substratos compreendendo uma quantidade efetiva do

microorganismo *Trichoderma atroviride* SC1 ou tratados com composições compreendendo uma quantidade efetiva da dita cepa. Um substrato preferido é representado por casca de árvore ou arroz cozido.

- 5 Uma realização adicional é representada por um método molecular para a detecção específica de *Trichoderma atroviride* SC1 onde a amplificação paralela do gene da endoquitinase 42 (*ech42*) GenBank n° de acesso AB041753.1 e de uma sub-unidade do gene da proteína G α (*tga3*) GenBank
 10 n° de acesso AF452097.1 é obtida com conjuntos de iniciadores adequados e onde em uma amostra compreendendo o dito *Trichoderma atroviride* SC1 são observados dois nucleotídeos polimórficos nas posições 185 e 196 do gene da endoquitinase 42.

15

Descrição detalhada da invenção

- Um objetivo da presente invenção é o de prover um agente de biocontrole pertencente à espécie *Trichoderma atroviride*, cepa SC1, para a supressão do desenvolvimento
 20 de doenças fúngicas na parte aérea de plantas e em raízes.

De acordo com uma realização preferida, o *Trichoderma atroviride*, cepa SC1 foi depositada em 27 de novembro de 2007, sob o Tratado de Budapeste no CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) sob o n° CBS 122089.

- 25 De acordo com o aspecto principal da presente invenção, o *Trichoderma atroviride*, cepa SC1 é proposto para suprimir e para prevenir o desenvolvimento de patógenos vegetais, em particular: apodrecimento de frutos e raiz, tais como aqueles causados por *Botrytis cinerea* e
 30 *Armillaria spp.*, oídio, doenças de madeira (doença ESCA),

De acordo com uma realização preferida, a invenção provê um método para suprimir ou prevenir o desenvolvimento de doenças fúngicas em plantas caracterizado pela utilização de composições compreendendo uma quantidade

efetiva de *Trichoderma atroviride* SC1, em uma quantidade de pelo menos 10^2 - 10^3 conídios ml^{-1} ou g^{-1} quando são utilizadas composições sólidas.

O *Trichoderma atroviride* SC1 é um fungo mesófilo como a maioria da *Trichoderma* spp. (Klein e Eveleigh, 1998). É capaz de utilizar uma ampla variedade de compostos como únicas fontes de carbono e nitrogênio. O crescimento fúngico em meio de cultura é superior com algumas fontes de nitrogênio tais como extrato de levedura, nitrito, triptona, peptona, glutamina e asparagina ou algumas fontes de carbono tais como manose, galactose, sacarose, extrato de malte, celobiose, glicose e trealose.

O *T. atroviride* SC1 sobrevive em uma faixa de temperatura compreendida entre -1 e 35°C e cresce em uma faixa de temperatura compreendida entre 5 e 30°C . A temperatura ótima para o crescimento é de $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, embora o crescimento radial do fungo a 20°C não seja significativamente diferente do crescimento observado a 25°C . A temperatura máxima para a sobrevivência do *T. atroviride* SC1 (30°C) é mais baixa que a temperatura do corpo humano, o que é uma boa indicação de que este fungo não é patogênico a humanos.

Os níveis de tolerância a pH do *T. atroviride* SC1 recaem na faixa comum para cepas de *Trichoderma*, isto é, uma faixa de pH compreendida entre 3 e 10. O limite mínimo de tolerância de atividade de água (a_w) do *T. atroviride* SC1 é de 0,910. O valor preferido da atividade de água é 0,998, o que corresponde aos valores das condições de umidade relativa alta preferidas pela maioria dos fungos patogênicos de plantas (90-100%).

O *Trichoderma atroviride* SC1 é caracterizado pelas seguintes propriedades:

- é particularmente ativo contra doenças causadas por *Armillaria* spp. e contra gentes causadores de "doença

- ESCA" para a qual nenhum pesticida químico efetivo é conhecido. De acordo com a invenção, o termo *Armillaria* spp. cobre em particular *Armillaria mellea* e *Armillaria gallica*, o termo "doença ESCA" cobre os
- 5 patógenos mais importantes causadoras da doença ESCA, em particular *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* e *Fomitiporia mediterranea*. A *Armillaria* spp. Afeta mais de 400 espécies vegetais (culturas e árvores florestais). Os
- 10 patógenos da "doença ESCA" afetam videiras.
- é mais efetivo contra oídio (causado por *Podosphaera xanthii*) que outras cepas de *Trichoderma* conhecidas, tais como *Trichoderma harzianum* T39 (nome comercial Trichodex®) ou *T. atroviride* F122 (Longa, 2007).
- 15 Oídios são doenças fúngicas causadas por muitas espécies diferentes de fungos da ordem Erysiphales (Spencer, 1978) e causam danos economicamente importantes em particular em uva, maçã, morango, horticultura e floricultura;
- 20 - persiste no solo em níveis efetivos por longos períodos (mais de um ano)
 - pode ser facilmente dispersado em partes de vegetais ou de madeiras, onde sobrevive como um agente antifúngico por mais de um ano.
- 25 Vários testes conduzidos com *T. atroviride* SC1, os quais serão mais detalhados na parte experimental, permitem que este seja proposto como um agente de biocontrole ótimo para a supressão de doenças fúngicas em plantas.
- De acordo com uma realização preferida, a preparação
- 30 de composições agrícolas de *T. atroviride* SC1 é conduzida pela inoculação de *T. atroviride* SC1 (alguns esporos lavados de placas de cultura são usualmente suficientes) em um substrato nutriente comum em suspensão líquida ou em

substrato sólido para se obter pelo menos 10^2 - 10^3 conídios/ml⁻¹ ou g⁻¹ de substrato (concentração ativa).

O meio líquido ou semi-sólido mais comumente utilizado compreende: caldo nutriente, dextrose agar de batata (PDA) agar nutriente, agar extrato de malte, malte agar, caldo LB e similares conhecidos do especialista no assunto, onde os fungos são crescidos sob agitação contínua por pelo menos 48, preferivelmente 72 horas ou até que conídios são produzidos, a uma temperatura ótima de crescimento compreendida entre 20 e 30°C ou preferivelmente de 22 a 26°C ou a cerca de 25°C $\pm$ 1°C, por pelo menos 48 h. Nestas condições, os primeiros conídios são produzidos após pelo menos 48 horas.

Um substrato sólido preferido compreende um cereal esterilizado (tal como arroz ou trigo cozido), cereais moídos ou farinha de cereais, ou um substrato rico em carboidrato similar, onde *T. atroviride* SC1 é inoculado e incubado por pelo menos uma semana a de 20 a 30°C ou preferivelmente de 22 a 26°C ou cerca de 25°C $\pm$ 1°C. Derivados de cereal tais como farinha ou cereais moídos são também adequados.

O tratamento e/ou prevenção da planta é conduzido utilizando-se culturas de *T. atroviride* SC1 crescidas em meio líquido ou semi-sólido ou em um substrato sólido e aplicando-se tal suspensão de *T. atroviride* SC1 em partes da planta ou aplicando-se o substrato enriquecido com SC1 no solo próximo à planta necessitando de tal tratamento.

O tratamento pode ser conduzido pela aplicação de composições agrícolas às plantas, sobre folhas das plantas, em ferimentos provocados durante o corte ou poda, ou ao solo de maneira a suprimir o desenvolvimento de doenças fúngicas nas raízes. Os tratamentos são aplicados por aspersão sobre as plantas como um fungicida comum, em um momento que deve ser adaptado à doença específica (isto é,

antes da infecção, em um estágio fenológico específico das plantas tais como transplante, floração, pós-colheita). Os tratamentos podem ser também por aspersão ou injeção no solo, misturados com o solo em vários substratos e
5 diferentes formulações (isto é, grânulos, misturados com argila ou produtos similares, casca de árvore, vegetais ou outra matéria orgânica ou similar ou derivados). Os tratamentos podem ser aplicados durante o período vegetativo da planta ou durante a dormência. O tratamento
10 pode ser por aspersão após a poda ou aplicado diretamente aos ferimentos da poda de maneira a prevenir infecções. Os tratamentos podem ser aplicados semanalmente ou mais freqüentemente, bem como uma vez por ano. O tratamento pode ser aplicado uma vez (isto é, no plantio no solo) o
15 repetido conforme necessário.

Uma alta persistência no solo e a facilidade de dispersão em suportes sólidos tais como casca de árvore torna o presente microorganismo particularmente adequado para tratar plantas e/ou áreas compreendendo plantas,
20 minimizando o número de tratamentos.

Substrato de cultura significa um suporte de cultura orgânico que pode ser líquido, sólido ou semi-sólido (gel) e que pode ser orgânico tal como arroz, casca de árvore ou pedaços de madeira ou substitutos vegetais tais como turfa,
25 ou inorgânico (isto é, mineral) tal como argila. Os substratos podem conter um nutriente ou uma função de matriz, ou ambos. Pedaços de madeira, casca de árvore ou substratos inorgânicos são preferivelmente pré-tratados com um nutriente antes da inoculação com SC1.

30 Cabe observar que o crescimento em pedaços de casca de árvore não é possível com outras cepas de *T. atroviride*, tais como a cepa 122F. Por esta razão, esta realização representa uma característica distintiva adicional da cepa SC1 de acordo com a presente invenção.

Conídios de *T. atroviride* SC1 podem ser também coletados (isto é, por um fluxo de ar ou por lavagem de um substrato de cultura) e dispersados em um líquido ou nutriente líquido. Tal suspensão ou composição agrícola, é aplicada diretamente à planta ou ao solo próximo à planta. É preferivelmente aplicada em combinação com nutrientes tais como uma fonte de carbono (isto é, um açúcar) e uma fonte de nitrogênio, tal como aminoácidos, peptídeos, fatores nutrientes ou micro-nutrientes vegetais para uma manutenção melhor do microorganismo *in situ*.

A composição pode compreender adicionalmente emulsificantes, tais como, lecitina, saponinas, agentes umectantes, tais como Tween 80, ou similar, protetores de UV, antioxidantes com emulsificantes, diluentes, agentes umectantes, adjuvantes de aspersão. Para os propósitos da presente invenção qualquer substrato de cultura seja sólido ou líquido, compreendendo uma quantidade efetiva de 10^2 - 10^3 conídios ml^{-1} ou g^{-1} do *T. atroviride* SC1 é considerado uma composição agrícola.

Suspensões ou composições compreendendo pelo menos 10^2 - 10^3 ml^{-1} ou g^{-1} de conídios são aplicadas diretamente na planta ou partes da planta, tais como raízes, folhas, sementes ou fruto, ou indiretamente no solo, preferivelmente nos suportes sólidos acima.

Nas composições agrícolas acima, a cepa SC1 pode ser opcionalmente misturada com um segundo agente de biocontrole adicional, suplementos, fertilizantes, minerais, hormônios vegetais, modificadores de crescimento vegetal, pesticidas químicos não tóxicos ao *T. atroviride* SC1 ou ceras para proteger os ferimentos de poda da água de irrigação.

Um dos métodos mais preferidos para tratar o solo com *T. atroviride* SC1 é permitir que esta cepa cresça em um substrato tal como um cereal, (isto é, arroz cozido), ou

pedaços de casca de árvore ou de madeira ou modificadores vegetais tais como turfa e distribuindo os ditos suportes no solo nas vizinhanças da planta/plantas a serem tratadas.

O crescimento de uma quantidade efetiva de cultura de
 5 *T. atroviride* SC1 (10^2 - 10^3 conídios ml⁻¹ ou g⁻¹) em tal substrato sólido (isto é, pedaços de casca de árvore) é preferivelmente conduzido pelo pré-tratamento deste com um meio microbiológico media (tal como caldo de dextrose de batata, extrato de malte, caldo nutriente ou similar) ou
 10 qualquer substância nutriente contendo uma fonte de carbono e uma fonte de nitrogênio (tal como extrato de carne, peptona, cereais moídos, extrato de levedura, sacarose ou similar), inoculando-se tal substrato com *T. atroviride* SC1 e incubando-se na condição descrita acima por pelo menos
 15 uma semana ou até a obtenção de colonização.

As composições podem ser também preparadas por retirada de conídios por lavagem das placas infectadas ou substratos de cultura e aspergindo tais suspensões nas partes aéreas da planta antes da infecção com o patógeno,
 20 semanalmente, em algum estágio fenológico específico da planta ou após algumas práticas agrícolas tais como poda, corte ou plantio.

Plantas às quais a composição é aplicada com sucesso, são preferivelmente selecionadas do grupo consistindo em:
 25 *Cucurbitaceae*, *Rosaceae*, *Vitaceae*, *Crucifereae*, *Compositae*, *Ubelliferae*, *Solanaceae* e *Liliaceae*. Plantas particularmente preferidas são *Cucurbitaceae*, *Rosaceae*, *Vitaceae*.

O tratamento, seja por um substrato sólido inoculado
 30 (isto é, casca de árvore ou modificadores vegetais) ou por outros meios tais como aspersão, é conduzido a qualquer tempo do cultivo da planta de maneira a prover controle dos patógenos presentes no solo ou de maneira a prevenir novas infecções.

Um método preferido para o tratamento de rizosfera com o agente de biocontrole da presente invenção é realizado fazendo-se crescer *T. atroviride* SC1 em arroz cozido esterilizado (ou um outro cereal) por alguns dias
5 (no mínimo uma semana, usualmente 15 dias) a uma temperatura compreendida dentro da faixa ótima, preferivelmente a cerca de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, até que seja obtida uma dose de inóculo ótima na faixa de 10^7 - 10^8 de conídios/100g arroz cozido ou 1×10^6 cfu g^{-1} de solo. De
10 acordo com esta realização o agente de biocontrole é aplicado diretamente como uma matriz de arroz enriquecida com o fungo.

De maneira a monitorar o destino e comportamento de um microorganismo liberado no meio ambiente, o que é da
15 maior importância para o controle de BCA, uma abordagem molecular (PCR em tempo real) foi desenvolvida e representa uma realização adicional da presente invenção.

Este método permite o acompanhamento e quantificação do *T. atroviride* SC1 no meio ambiente, especificamente
20 identificando a cepa liberada, a distinguindo da comunidade microbiana nativa e acompanhando sua população dinâmica no tempo.

De fato, o registro de um agente de biocontrole (BCA) específico como pesticida na Europa requer uma análise de
25 risco focalizada na persistência e multiplicação do BCA no meio ambiente, em adição a uma avaliação de qualquer possível contaminação (resíduos viáveis e não viáveis do BCA) de alimentos.

O teste molecular desenvolvido de acordo com uma
30 realização adicional da presente invenção é baseado no gene da endoquitinase (*ech42*) do *T. atroviride* SC1 (Carsolio et al., 1994). Desta forma, os iniciadores de PCR em tempo real e o conjunto sonda TaqMan específica da cepa (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri) foram projetados com base em

dois nucleotídeos desemparelhados na fita 3' do gene *ech42*, nas posições 185 e 196 de acordo com a numeração da sequência do GenBank nº de acesso AB041753.1. Um segundo conjunto de iniciadores e sonda TaqMan foram projetados para o gene *tga3*, que codifica a sub-unidade α da proteína G (Tabela 1).

PCR utilizando os iniciadores *ech42* e *tga3* resultou em produtos de amplificação específicos de todo o DNA das cepas de *Trichoderma* spp., mas não de outros fungos de amostras de solo (isto é, *Asperigillus* spp. *Penicillium* spp. *Cladosporium* spp.). Os produtos apresentam um pico de fusão único para cada gene, o que indica que os iniciadores amplificaram apenas os produtos de *ech42* e *tga3*.

Ao contrário, quando PCR em tempo real é conduzida na presença de uma sonda *ech42* TaqMan contendo os dois pontos de mutação específicos de SC1 da sequência do gene *ech42* (preferivelmente SEQID NO. 3), apenas o *T. atroviride* SC1 produz um sinal único e não ocorre a hibridização de nenhum produto de amplificação da sonda para o outro fungo (cepa F122 e SB18 incluídos) nas amostras de videira e solo, confirmando a alta especificidade da sonda *ech42*.

Amplificação dupla da sonda *ech42* e *tga3* TaqMan para a série de concentrações de *T. atroviride* SC1 DNA ocorreu no mesmo limite para cada concentração dada. Isto demonstra que é uma cópia única do amplicon *ech42* no genoma e uma cópia única do gene *Tga3*, e que estas duas sequências apresentam curvas padrão similares de tal forma que representam conjuntos de iniciadores de amplificação adequados, como confirmado pelo fato das reações PCR para cada uma destas duas sequências prosseguirem com níveis similares de eficiência (Figura 4).

Este método produz um limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) de 5 cópias do genoma por reação PCR. Para amostras de solo, LOD calculado aumentou

para 35 cópias por mistura reacional, equivalente a $6,2 \times 10^3$ conídios por g de solo, e o LOQ variou de 2×10^4 a 3×10^4 g de solo⁻¹. A precisão do método é muito alta nos cinco níveis de concentração de conídios testados como

5 mostrado na Parte Experimental. O especialista no assunto partindo das variações alélicas no *Ech42* P identificou que no presente método pode facilmente identificar conjuntos de iniciadores alternativos e diferentes sondas ainda compreendendo os dois desemparelhamentos identificados

10 específicos para a cepa SC1. Da mesma forma, diferentes sondas moleculares estão possivelmente ligadas à sonda e/ou ao iniciador.

Os iniciadores e sondas de PCR em tempo real projetados para a detecção e quantificação de *T. atroviride*

15 SC1 são mostrados na tabela abaixo. Os desemparelhamentos base na sonda *ech42* TaqMan estão em negrito.

Iniciadores e sondas	Seqüência (5'-3')	Produto amplificado (bp)
	Gene da Endoquitinase 42 (<i>ech42</i>)	
<i>Ech42</i> Fw	GTTCTGAGGCTGGAAGTTGC SEQ ID NO. 1	112
<i>Ech42</i> Rv	ACGCCGTCTACTTCACCAAC SEQ ID NO. 2	
<i>Ech42</i> P	6FAM-TACCCCTT CAAT CACCAATTGTTAG-TAMRA SEQ ID NO. 3	
	sub-unidade α do gene da proteína G (<i>tga3</i>)	
<i>Tga3</i> Fw	TGTTGAAGCATTGGGTTTGA SEQ ID NO. 4	132
<i>Tga3</i> Rv	TGATTGAGGTGACGTTCTCG SEQ ID NO. 5	
<i>Tga3</i> P	HEX-AAGGAGTGAACGAAAGAAGTGGG-TAMRA SEQ ID NO. 6	

Os exemplos não limitantes a seguir são providos para

20 ilustrar adicionalmente a presente invenção.

PARTE EXPERIMENTAL

Exemplo 1. Isolamento e Crescimento de *Trichoderma atroviride* SC1.

A cepa do fungo *T. atroviride* SC1 foi isolada na
 5 Itália do norte a partir de madeira de avelã abatida em
 cultura pura pelo método do esporo único. Foi mantida em
 placas de dextrose agar de batata (PDA; Oxoid, Cambridge,
 UK) a 4°C na Coleção SafeCrop Microorganism (Istituto
 Agrario di San Michele all'Adige) e depositada na coleção
 10 CBS sob o tratado de Budapeste (CBS 122089). A cepa foi
 identificada morfológicamente como *Trichoderma atroviride*
 P. Karst. e sua identidade foi confirmada pela análise de
 sequência ITS utilizando-se a ferramenta de identificação
TrichoKEY, versão 2.0 (www.isth.info).

15 O *T. atroviride* SC1 é capaz de utilizar uma ampla
 faixa de compostos como única fonte de carbono e de
 nitrogênio. O crescimento do fungo no meio foi
 significativamente superior quando suprido com algumas
 fontes de nitrogênio tais como extrato de levedura,
 20 nitrito, triptona, peptona, glutamina e asparagina ou
 algumas fontes de carbono tais como manose, galactose,
 sacarose, extrato de malte, celobiose, glicose e trealose.

Sorbitol, lactose, maltose frutose, arabinose, xilose
 e NH_4NO_3 , KNO_3 , NH_4Cl , serina, arginina e glutamina não
 25 promoveram o crescimento miscelar.

Foram testados os efeitos das fontes de nitrogênio
 (NS), NH_4NO_3 , NH_4Cl , KNO_3 , NaNO_3 , NaNO_2 , serina, arginina,
 glutamina, asparagina, triptona e peptona (Sigma, St.
 Louis, MO, EUA), e fontes de carbono (CS), sorbitol,
 30 lactose, maltose, frutose, arabinose, xilose, trealose,
 glicose, celobiose, extrato de malte, sacarose, galactose e
 manose (Sigma), no peso de micélio seco de *T. atroviride*
 SC1. As NS e CS foram esterilizadas por filtração e
 adicionadas, a uma taxa de $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (NS) e $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (CS), a

meio líquido de Czapek Dox (Oxoid) autoclavado modificado com glicose ($10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) (Sigma) ou glicina ($1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) (Sigma), quando do teste para NS e CS, respectivamente. Frascos contendo 100 ml de cada meio nutriente foram inoculados com um plugue de agar de uma cultura de sete dias de *T. atroviride* SC1. Após uma incubação de 13 dias, os micélios foram colhidos através de papel de filtro e secados, e seus pesos secos foram determinados utilizando-se uma balança de umidade AMB110 (Adam Equipment, UK). Foram inoculadas cinco replicatas para cada tratamento e fator estudado. O experimento foi repetido duas vezes.

O *T. atroviride* SC1 foi capaz de crescer a temperaturas entre 10°C e 30°C . A temperatura ótima para crescimento foi de 25°C . Nesta temperatura, a taxa de crescimento foi significativamente maior ($P \leq 0,05$) que nas outras temperaturas (Figura 1). Desta forma, o crescimento ótimo foi obtido a 25°C . Os primeiros conídios foram produzidos no terceiro dia após a inoculação. O crescimento radial do fungo a 20°C não foi significativamente diferente do crescimento observado a 25°C . O *T. atroviride* SC1 não cresceu a temperaturas de 35°C ou acima. Após trinta dias de incubação a 35°C , o fungo foi considerado morto, porque não era capaz de crescer, mesmo após a temperatura ter sido reduzida para a temperatura ótima de 25°C . Temperaturas de -1°C e 5°C também inibiram o crescimento de micélio. Entretanto, após 30 dias a -1°C e 5°C , o fungo foi ainda capaz de crescer quando incubado novamente a 25°C . A fase lag, com pouco ou nenhum crescimento observável, foi maior a 10°C (2 dias) e 15°C (3 dias).

O *T. atroviride* SC1 é tolerante a uma ampla faixa de níveis de pH (Figura 2), com crescimento ótimo observado em meio ácido (pH 4-6). O crescimento de micélio do *T. atroviride* SC1 foi significativamente reduzido ($P \leq 0,05$)

em meio alcalino ($\text{pH} \geq 8$) e a esporulação foi reduzida em pH 3, bem como a valores de pH de 8 e acima. A fase lag foi a mesma (1 dia) para todos os níveis testados de pH.

As taxas de crescimento foram também influenciadas por alterações na atividade de água (a_w) que é uma medida da condição de energia da água no sistema, a saber, a pressão de vapor da água dividido pelo da água pura na mesma temperatura (Figura 3). O nível de a_w mais alto testado (0,998) foi o nível ótimo para o crescimento do fungo. Quando este parâmetro foi reduzido para abaixo de 0,990, a taxa de crescimento foi significativamente reduzida ($P \leq 0,05$) quando em comparação com a do meio PDA não modificado ($a_w = 0,998$). Crescimento limitado foi observado a 0,910. A fase lag foi mais prolongada quando a_w foi reduzida para abaixo de 0,940 (2 dias) e 0,910 (4 dias).

Condições Experimentais

Os efeitos da temperatura, pH e atividade de água (a_w) no *T. atroviride* SC1 foram testados em culturas crescidas em placas de Petri de 90 mm contendo PDA. Cada placa foi inoculada com um plugue de agar (5 mm de diâmetro) coletado da margem de uma cultura de sete dias. O inóculo foi colocado no centro de cada placa. O crescimento de micélio foi avaliado diariamente. Foram inoculadas dez placas de replicata para cada nível dos parâmetros estudados.

Na temperatura de ensaio, as placas foram incubadas no escuro a -1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 37 e 40°C, com um pH do meio de 5. No ensaio de pH, os níveis de pH dos meios foram ajustados para 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 após autoclavagem por adição de soluções estéreis de HCl 1N ou NaOH 2N. Para testar o efeito da a_w , os meios foram modificados pela adição de quantidades crescentes de

glicerol de maneira a se obter níveis de a_w de 0,990, 0,980, 0,960, 0,940 e 0,910. O pH dos meios foi ajustado para 4,5 com HCl 1N ou NaOH 2N antes da autoclavagem. Os valores de a_w de todos os meios foram determinados com um
 5 instrumento AquaLab série 3 (Decagon, Pullman, Washington EUA). Para os ensaios de pH e a_w , as placas foram incubadas no escuro a 25°C.

O crescimento radial foi avaliado no terceiro dia de incubação, que é aproximadamente o tempo que o fungo
 10 necessita para colonizar completamente uma placa de Petri deste tamanho sob condições ótimas.

Exemplo 2. Detecção e quantificação de *T. atroviride* SC1.

15 PCR em tempo real utilizando os iniciadores *ech42* e *tga3* resultou em produtos de amplificação de todo o DNA das cepas de *Trichoderma* spp., outros fungos e amostras de solo. Os produtos produziram um pico de fusão único para cada gene, o que indica que os iniciadores amplificaram
 20 apenas os produtos *ech42* e *tga3*. Ao contrário, na presença da sonda *ech42* TaqMan contendo os dois pontos de mutação específicos de SC1 da sequência do gene *ech42*, apenas o *T. atroviride* SC1 produziu um sinal único e não ocorreu hibridização do produto de amplificação da sonda para os
 25 outros fungos (cepa F122 e SB18 incluídas), videira e amostras de solo, confirmando a alta especificidade da sonda *ech42* sonda. Um controle interno (reação dupla), consistindo na sonda *tga3*, confirmou a precisão do processo pela produção de um sinal nos exames com PCR em tempo real
 30 de todas as amostras de *Trichoderma* spp.

A amplificação dupla das sondas *ech42* e *tga3* TaqMan para a série de concentrações de DNA de *T. atroviride* SC1 ocorreu no mesmo limite para cada dada concentração. Isto demonstrou que há uma única cópia do amplicon *ech42* no

genoma e uma única cópia do gene *Tga3*, e que estas duas seqüências apresentam curvas padrão similares. Nossos resultados mostraram também que as reações PCR para cada uma destas duas seqüências prosseguiram com níveis
5 similares de eficiência (Figura 4).

Este método produz um LOD de 5 cópias do genoma por reação PCR. Para as amostras de solo, o LOD calculado aumentou para 35 cópias por mistura reacional, equivalente a $6,2 \times 10^3$ conídios por g de solo, e LOQ variando de 2×10^4 a 3×10^4 g de solo⁻¹, o último delineado na série de
10 solos inoculados diferentemente (Tabela 2). O LOD absoluto varia de $8,5 \times 10^3$ a $1,2 \times 10^4$ cópias por reação PCR (Tabela 2).

A precisão do método é muito alta nos cinco níveis de
15 concentração de conídio testados (Figura 5) resultando na quantificação de *T. atroviride* SC1 pelo método molecular em quantidades compreendidas entre 10^2 e 10^7 conídios g⁻¹.

Condições experimentais

20 Iniciadores e sonda de PCR em tempo real: gene da endoquitinase de *T. atroviride* SC1 (*ech42*) (Carsolio et al., 1994) foi amplificado utilizando-se iniciadores consenso baseados em seqüências já presentes no NCBI GenBank. A seqüência completa obtida foi comparada e
25 alinhada com 34 seqüências da mesma base de dados utilizando-se o programa BLAST (Altschul et al., 1997) e o programa ClustalW (adisonível no European Bioinformatics Institute, European Molecular Biology Laboratory [<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>]), respectivamente. Várias
30 diferenças nas seqüências de nucleotídeo foram observadas (em particular, foram observados dois desemparelhamentos de nucleotídeo no primeiro intron de um certo gene) e apenas uma seqüência na base de dados (NCBI GenBank número de acesso AB041753.1 referente a *T. harzianum* SK-55 isolado no

Japão) foi idêntica ao nosso isolado. Desta forma, os iniciadores de PCR em tempo real e o conjunto de sondas TaqMan específico da cepa (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri) foram desenhados com base nestes dois
 5 desemparelhamentos de nucleotídeos na fira 3' do gene *ech42*, utilizando-se o programa de computador Express v2.0 (PE Applied Biosystems, Foster City, Califórnia) (Tabela 1). Um segundo conjunto de iniciadores e a sonda TaqMan foram projetados para o gene *tga3* gene, que codifica a sub-
 10 unidade α da proteína G (Tabela 1).

PCR em tempo real: As reações foram realizadas em um volume final de 20 μ l contendo: tampão IQ Multiplex Power Mix (Bio-Rad, Hercules, Califórnia), 0,3 μ M de cada um dos iniciadores *ech42* e a sonda, 0,4 μ M da sonda *tga3* e 0,6 μ M
 15 de cada um dos iniciadores *tga3*. A PCR em tempo real foi conduzida em um termociclador MJ Chromo4 (MJ Research, Waltham, Massachusetts) utilizando o seguinte programa padrão: 2 min 30 s a 95°C para desnaturação inicial, 40 ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 61°C para uma etapa de
 20 extensão na qual o sinal de fluorescência foi medido e analisado pelo programa de computador Opticon2 (MJ Research, Waltham, Massachusetts). Quando as amostras foram analisadas por SYBR Green I Chemistry, foi utilizado o SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, Foster
 25 City, Califórnia), juntamente com 0,3 μ M do conjunto de iniciador *ech42* e 0,3 μ M do conjunto de iniciador *tga3*. As condições de amplificação foram então alteradas para: uma partida a quente de 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 61°C para extensão, com uma curva de fusão final
 30 de 40° a 90°C, durante a qual as amostras foram lentamente aquecidas (0,5°C a cada 10 segundos).

A quantificação das amostras de DNA foi realizada pela interpolação dos valores do ciclo limite (Ct) da amostra com os valores Ct de uma curva de regressão padrão

de concentrações conhecidas de DNA genômico de *T. atroviride* SC1 purificado previamente quantificado utilizando-se o fluorímetro Qubit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California). A curva padrão foi baseada em oito diluições em série 1:3 do DNA genômico de SC1 e incluídas em cada corrida de PCR. As curvas resultantes apresentaram inclinações variando de 3,0 a 3,5, coeficientes de determinação acima de 0,9 e 100% de eficiência de PCR. A quantificação de SC1 foi expressa como número de cópias haplóide do genoma, considerando-se que o tamanho do genoma de cópia única de *Trichoderma* é de 0,034 pg.

Especificidade: a especificidade do método foi testada em 50 isolados de *Trichoderma* spp. de coleções de cultura (26 isolados da CBS, um da ATCC, 13 da Universidade de Pavia e dois da SafeCrop, a saber, F122 e SB18), dois isolados utilizados como biofungicidas comerciais (*T. harzianum* T39 e *T. harzianum* T22) e seis isolados de *Trichoderma* de solo coletado em um vinhedo comercial na Itália do norte (coordenadas GIS: N46° 10,897' e OE11° 06,983'). Sete dos isolados examinados foram identificados como *T. atroviride*. A especificidade foi testada também em gêneros de fungos comumente presentes em solos: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aureobasidium*, *Mucor*, *Gliocladium*, *Rhizopus*, *Acremonium*, *Coelomycetes*, *Geotricum*, *Plasmopara* e *Armillaria* das coleções SafeCrop (21) ou CBS (1), ou isolados (7) de solos.

Todos os isolados de fungo foram crescidos em dextrose agar de batata (PDA, Oxoid, Basingstoke, United Kingdom). O DNA foi extraído diretamente de 50-100 mg de micélio utilizando-se o kit DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha). A especificidade do método para *T. atroviride* SC1 foi testada por comparação dos produtos de

amplificação e curvas de fusão obtidos com os testes SYBR Green I com os obtidos utilizando-se as sondas TaqMan específicas para *ech42* e *tga3*.

Dez amostras de solo, quatro de Trentino e seis de
5 outras regiões da Itália (Marche, Valle d'Aosta, Emilia-Romagna e Calabria), foram também incluídas no teste de especificidade. O DNA, se não indicado de outra forma, foi sempre extraído de amostras de solo de 200 mg secadas durante a noite, de acordo com o protocolo prescrito para o
10 kit de isolamento de DNA PowerSoil (Mo Bio, Carlsbad, California).

DNA de *Vitis vinifera* cv. Cabernet foi incluído no teste de especificidade de maneira a controlar a amplificação do DNA de material de raiz presente em solos
15 tratados com *T. atroviride* SC1. O DNA vegetal foi extraído utilizando-se o DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Itália). Na análise de RT-PCR do DNA genômico de *T. atroviride* SC1, os DNAs de outros fungos e de videira utilizados como controles foram carregados a aproximadamente 0,2-1 ng,
20 enquanto que 1-5 ng de DNA (a quantidade total extraída de cada 4 mg de amostra de solo) foram carregados em cada reação PCR.

Repetibilidade, precisão e sensibilidade: A repetibilidade do procedimento de PCR em tempo real foi
25 estimada para uma suspensão de DNA puro de *T. atroviride* SC1 e DNA total extraído de 7,5 g de solo previamente inoculado com o fungo (10^7 conídios g^{-1}) e eluído em 4 ml, seguindo as instruções do fabricante do kit de isolamento de DNA PowerSolo Mega Prep (Mo Bio, Carlsbad, California).
30 A precisão do método foi estimada utilizando-se solos contendo diferentes concentrações de *T. atroviride* SC1. Para esta estimativa, bateladas de b 50 g de solo arenoso peneirado estéril foram misturados com 10 ml de suspensões de conídios de *T. atroviride* SC1 para se obter

concentrações finais de 10^7 , 10^6 , 10^4 e 10^2 conídios g^{-1} de solo. O DNA foi extraído de três amostras independentes para cada concentração de tratamento, após os solos terem sido secados durante uma noite a $60^\circ C$ (200 mg) e suas
5 respectivas concentrações de conídios terem sido quantificadas em duas corridas de PCR em tempo real independentes.

A precisão do método de quantificação foi calculada por comparação das cópias de genoma estimadas com a
10 concentração de conídios esperada.

Sensibilidade: A sensibilidade do método PCR em tempo real foi definida pelo limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ). O LOD corresponde ao número de cópias mais baixo na amostra para o qual o desvio padrão sob
15 condições de repetibilidade é 33% ou menor. O LOQ corresponde ao número de cópias mais baixo na amostra para o qual o desvio padrão sob condições de repetibilidade é 25% ou menor. O LOD absoluto do método foi calculado como o número de cópias mais baixo que deve estar presente na
20 amostra para assegurar pelo menos 95% de precisão.

Tabela 1. Iniciadores e sondas de PCR em tempo real projetados para a detecção e quantificação de *Trichoderma atroviride* SC1. Os desemparelhamentos de base na sonda *ech42* TaqMan estão em negrito.

5

Iniciadores e sondas	Seqüência (5'-3')	Produto de amplificação (bp)
	Gene da endoquitinase 42 (<i>ech42</i>)	
<i>Ech42</i> Fw	GTTCTGAGGCTGGAAGTTGC SEQ ID NO. :1	
<i>Ech42</i> Rv	ACGCCGTCTACTTCACCAAC SEQ ID NO. :2	112
<i>Ech42</i> P	6FAM-TACCCCTT CAAT CACCAATTGTTAG-TAMRA SEQ ID NO. :3	
	Sub-unidade α do gene da proteína G (<i>tga3</i>)	
<i>Tga3</i> Fw	TGTTGAAGCATTGGGTTTGA SEQ ID NO. :4	
<i>Tga3</i> Rv	TGATTGAGGTGACGTTCTCG SEQ ID NO. :5	132
<i>Tga3</i> P	HEX-AAGGAGTGAACGAAAGAAGTGGA-TAMRA SEQ ID NO. :6	

Tabela 2. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) determinados utilizando-se o desvio padrão relativo (RSDr) do número de cópias do genoma (CN) determinado a partir de duas séries de diluição de DNA puro de *T. atroviride* SC1 DNA, duas séries de diluição de DNA total extraído de uma amostra de solo inoculada com $\log_{10}^7$ conídios g de solo⁻¹ e análise do DNA total extraído a partir de uma série de solos inoculados com quantidades decrescentes de conídios. Os LOD e LOQ foram ajustados a 33% e 25% do desvio padrão relativo (RSDr), respectivamente. O LOD absoluto corresponde a um nível de detecção de DNA de 95%.

10

15

DNA	Curva de regressão RSDr		LOD - LOQ		LOD absoluto	
	Equação	Coefic. de deter.	CN PCR ⁻¹	CN g de solo ⁻¹	CN PCR ⁻¹	CN g de solo ⁻¹
SC1 1	$Y=0,4304x^{-0,1579}$	0,9874	5 - 31	-	8	nd
SC1 2	$Y=0,369x^{-0,1359}$	0,9475	3 - 17	-	15	nd
SC1+solo 1	$Y=0,8811x^{-0,2696}$	0,9711	38 - 106	$0,7 \times 10^4$ - $1,9 \times 10^4$	60	$1,1 \times 10^4$
SC1+solo 2	$Y=0,6821x^{-0,2089}$	0,9459	32 - 122	$0,6 \times 10^4$ - $2,2 \times 10^4$	35	$0,6 \times 10^4$
SC1 em séries de solo ^z	$Y=313,01x^{-1,677}$	0,9929	26 - 130	$0,7 \times 10^4$ - $3,4 \times 10^4$	48	$1,2 \times 10^4$

^z Curva de regressão RSDr calculada com base em quatro concentrações de conídios.

5 Exemplo 3. Métodos para a produção e para tratamento.

T. atroviride SC1 foi crescido com sucesso em vários meios comuns de laboratório tais como dextrose agar de batata, caldo nutriente, extrato de malte agar.

10 Foi aplicado com um dos três seguintes métodos conhecidos: crescido em caldo de cultura, em arroz ou em casca de árvore/turfa.

Os três métodos produziram 99% de propágulos viáveis de *T. atroviride* SC1.

15 O *T. atroviride* SC1 produzido em arroz ou crescido em casca de árvore sobrevive por pelo menos um ano a 15°C a 98% de UR. *T. atroviride* SC1 crescido em modificadores vegetais ou casca de árvore

20 Foram observadas diferenças com outras cepas de *T. atroviride*, em particular *T. atroviride* F122 não sobreviveu em casca de árvore ou turfa nas condições mencionadas acima.

Condições experimentais

A preparação da composição agrícola foi conduzida de acordo com um dos seguintes métodos:

- 5 a) Inoculação com micélio ou conídios de *T. atroviride* SC1 (pelo menos 10^2 conídios/L) de caldo de cultura (caldo nutriente ou caldo de extrato de malte) e incubação sob agitação contínua, foram conduzidas a uma temperatura entre 20 e 25°C, por pelo menos 48 h. O caldo de cultura filtrado ou não filtrado foi
 - 10 aspergido nas plantas ou incorporado ao solo.
- b) Arroz cozido esterilizado (ou cereal equivalente) foi inoculado com conídios ou micélio de *T. atroviride* SC1 (pelo menos 10^2 conídios/100 g) e incubado por 21 dias a 25°C. Para os tratamentos de solo *T. atroviride* SC1 e arroz foram misturados ao solo para
 - 15 se obter uma dose de inóculo de 1×10^6 cfu g⁻¹ de solo nos primeiros 3 cm de solo. Para tratamento foliar conídios de *T. atroviride* SC1 foram coletados do arroz por lavagem com água r e aplicados com ou
 - 20 sem a adição de adjuvantes de aspersão (agentes umectantes, emulsificantes, etc.);
- c) *T. atroviride* SC1 foi crescido em pedaços de casca de árvore previamente tratados ou não com um meio de crescimento microbiológico (caldo nutriente) ou
 - 25 substâncias nutrientes contendo fontes de carbono e de nitrogênio (arroz moído). As casca de árvore foram inoculadas com *T. atroviride* SC1 (pelo menos 10^2 conídios/100 g), incubadas por pelo menos dois dias ou até colonização a 20-25°C. As casca de
 - 30 árvore inoculadas podem ser utilizadas como modificadores a qualquer tempo do cultivo das plantas provendo controle dos patógenos naturais existentes no solo ou para prevenir novas infecções. Modificadores vegetais (turva) foram inoculados sem

substâncias nutrientes como feito para as casca de árvore.

d)

**Exemplo 4. Sobrevivência de *T. atroviride* SC1 no
5 filoplano de morango.**

As densidades populacionais de conídios viáveis de *T. atroviride* SC1 no filoplano de morango se reduziram rapidamente durante a primeira semana após a inoculação. A população fúngica mostrou um declínio contínuo até o 15º
10 dia após a aplicação, após o que uma concentração baixa de CFU foi mantida até o 45º dia quando o experimento foi concluído (Figura 6). O *T. atroviride* SC1 não causou fitotoxicidade nem é patogênico às folhas, flores ou frutos de morango, e sobreviveu por mais de um mês nas folhas de
15 morango.

Condições experimentais

Suspensões de conídios de *T. atroviride* SC1 foram obtidas por lavagem de culturas de 21 dias crescidas em
20 arroz cozido com Tween 80 0,01% (Sigma) em água destilada estéril (ADE). A suspensão de conídios foi filtrada através de três camadas de tecido estéril de maneira a remover os fragmentos de micélio. A concentração de conídios foi determinada utilizando-se um hemocitômetro Thomas
25 e ajustada para uma concentração de 10^6 conídios·ml⁻¹. A concentração de conídios viáveis no inoculo foi determinada por contagem de unidades formadoras de colônia (CFUs) em uma diluição em série em PDA modificado com 2 ml·l⁻¹ de Triton X-100 (Sigma). As colônias foram contadas após
30 incubação das culturas a 25°C por sete dias.

Folhas de 10 plantas de morango mantidas sob condições controladas em estufa (25 ± 2°C, UR = 60 ± 10%) foram aspergidas uniformemente com o inoculo de *T. atroviride* SC1 utilizando-se um aspersor manual. Uma folha

randomicamente selecionada foi removida de cada planta a 0, 1, 3, 7, 15, 30 e 45 dias após a inoculação. Um disco de folha (25 mm de diâmetro) foi cortado de cada folha utilizando-se um furador de cortiça estéril. Os discos
5 foram transferidos para tubos Falcon contendo 5 ml de Tween 80 (0,01%), agitados por 4 min e então deixados em repouso por 1 min. Uma série de diluições em SDW foi plaqueada em um meio semi seletivo consistindo em PDA modificado com rosa bengala (100 ppm), estreptomicina (100 ppm) e
10 cloramfenicol (50 ppm) para minimizar a presença de bactérias. As CFUs foram contadas nas diluições apropriadas e os resultados foram expressos como CFU·mm⁻² de folha. As contagens de CFU das placas de diluição foram convertidas para CFU por mm⁻² de folha. Este experimento
15 foi realizado duas vezes e nenhuma diferença significativa entre os dois experimentos foi observada.

Exemplo 5. Sobrevivência de *T. atroviride* SC1 em solo

T. atroviride SC1 foi capaz de sobreviver em pelo
20 menos três tipos diferentes de solos. Após sua introdução nos solos, o *T. atroviride* SC1 sobreviveu até o final do experimento (45 dias), como indicado por sua recuperação em placas de diluição a partir de solos estéreis e não estéreis como mostrado na Figura 7. As diferentes
25 características do solo também influenciaram a sobrevivência do fungo. Os resultados obtidos para os solos argilo arenosos (2 e 3) com altos níveis de matéria orgânica foram similares entre si, mas diferentes dos resultados obtidos para argila (Solo 1), que também
30 continha menos matéria orgânica.

A esterilização do solo por autoclave foi associada com a sobrevivência mais prolongada do *T. atroviride* SC1. Nos solos estéreis, a concentração de fungo aumentou em quase uma ordem de magnitude no terceiro dia, alcançando

uma concentração máxima de 10^7 CFU·g⁻¹ de solo seco no Solo 1 estéril, e um pouco menos nos Solos 2 e 3. Após isto, a concentração de *T. atroviride* se manteve entre 10^6 e 10^7 CFU·g⁻¹ de solo seco até 45 dias após a inoculação (Figura 7a) em todos os tipos de solo. As concentrações finais de fungo nos solo esterilizados foram significativamente mais altas ($P \leq 0,05$) para os Solos 2 e 3 que para o Solo 1.

Ocorreram diferenças significativas entre os valores de CFU para os tratamentos estéril e não estéril para cada tipo de solo em cada data de avaliação, exceto para o Solo 1 a 30 dias após a inoculação. Os valores de CFU para *T. atroviride* SC1 aumentaram no solo esterilizado. Os valores de CFU no Solo 2 não estéril foram similares aos do Solo 3 não estéril. No Solo 1 não tratado, ocorreu um pequeno aumento no número de CFUs a um dia após a inoculação, no entanto a concentração de conídios ao final do experimento em todos os tipos de solo foi mais baixa que a do inoculo inicial. A concentração final de conídios (CFU) nos solos não tratados foi significativamente mais alta ($P \leq 0,05$) para o Solo 1 que para os Solos 2 e 3. O efeito da esterilização do solo sobre a sobrevivência de *T. atroviride* SC1 foi mais pronunciado nos Solos 2 e 3 que no Solo 1.

No microcosmo não tratado (não inoculado) utilizado como controle, um nível muito baixo de *Trichoderma* spp. nativo (1 a $3 \cdot 10^2$ CFU g⁻¹) foi detectado, no entanto nenhuma das CFUs foi identificada como *T. atroviride*.

Condições experimentais

O ensaio de sobrevivência no solo foi baseado no método descrito por Bennett et al. (2003), com algumas modificações. Três tipos de solo do norte da Itália (região de Trentino) com diferentes características físicas e químicas (Tabela 1) foram utilizados. O solo foi secado

à temperatura ambiente e peneirado (mesh < 2 mm). O solo peneirado (100 g) foi colocado em garrafas de polipropileno de 500 ml e as amostras foram deixadas não tratadas (não estéreis) à temperatura ambiente ou autoclavadas (121°C por 5 30 min) duas vezes em dias consecutivos (estéril).

O inóculo foi preparado como descrito acima. O experimento foi realizado sob condições estéreis. Os conídios foram adicionados ao solo de maneira a se obter uma concentração final de 10^6 conídios·g⁻¹ de solo e 10 misturados com uma espátula estéril. As garrafas foram incubadas à temperatura ambiente. Cinco replicatas foram estabelecidas para cada combinação tipo de solo X tratamento do solo (não estéril e estéril).

Uma sub-amostra de solo (1 g) foi removida 15 assepticamente de cada garrafa utilizando-se uma colher de amostragem estéril (PBI International, Whitstable, UK) e colocada em 10 ml de Tween 80 0,01%, posta sob agitação por 4 min e deixada em repouso por 1 min. Uma série de diluições foi estabelecida e plaqueada no meio semi 20 seletivo como descrito acima. As CFUs foram contadas nas placas de diluição apropriadas após sete dias de incubação a 25°C e expressas como CFU·g⁻¹ de solo seco. As avaliações de CFU nas amostras de solo foram conduzidas imediatamente após a inoculação e nos dias 1, 5, 10, 20, 30, e 45 após a 25 inoculação. As contagens de CFU das placas de diluição foram expressas como CFU por grama de solo seco (CFU·g⁻¹).

Exemplo 6. Sobrevivência de *T. atroviride* SC1 em um solo de vinhedo

30 A sobrevivência em solo foi verificada também em um vinhedo comercial durante um ano inteiro. O experimento foi repetido duas vezes.

O *T. atroviride* SC1 foi capaz de sobreviver em concentração alta de conídios (10^8 CFU.g de solo seco⁻¹) na

primeira camada de solo (superfície do solo) por um período longo (pelo menos 18 semanas após o tratamento) em ambos os anos. O *T. atroviride* SC1 migra verticalmente no solo muito rapidamente após o tratamento (uma semana) alcançando

5 uma profundidade de 0,4 m. Então a concentração de CFU manteve valores estáveis durante dois anos até a avaliação na 18ª semana. Um gradiente nas densidades populacionais estava presente em ambos os anos a partir da superfície para as camadas profundas de solo. O número mais alto de

10 CFU detectado foi de 10^5 CFU g de solo seco⁻¹ a 0,1 m de profundidade do solo, cerca de 10^4 a 0,2 m e 10^3 CFU g de solo seco⁻¹ a 0,3 e 0,4 m. Diferenças significativas na dinâmica populacional entre os dois anos estavam presentes apenas na concentração de CFU na superfície do solo cinco e

15 nove semanas após o tratamento (teste de Tukey; $\alpha = 0,05$). Em particular após 9 semanas a CFU de *T. atroviride* SC1 na superfície do solo aumentou ainda mais que a concentração inicial do inoculo (10^9 CFU g de solo seco⁻¹), após um decréscimo inicial na 5ª semana. Um ano após a inoculação

20 do solo com *T. atroviride* SC1 foi detectada a uma concentração de 10^2 - 10^3 CFU g de solo seco⁻¹ para ambos os experimentos a uma concentração comparável à natural de *Trichoderma* spp. em área não tratada. O método de PCR em tempo real confirmou a ausência da cepa antes de sua

25 introdução no solo e a persistência da cepa nas camadas de solo.

A relação linear ($y = 0,8472x + 0,1105$, $R^2 = 0,6794$) entre os resultados obtidos com os dois métodos (contagem de CFU e método molecular) confirma a eficiência da

30 detecção molecular de *T. atroviride* SC1.

Após 9 semanas de sua liberação no solo, o *T. atroviride* SC1 foi encontrado a uma distância de 0,5 e 2 m dos buracos tratados na superfície do solo, a 0,1 m e 0,3 m de profundidade no solo. A CFU foi significativamente mais

alta (teste de Tukey; $\alpha = 0,05$) que a população natural de *Trichoderma* spp. isolada na área não tratada, na superfície do solo, a 0,5 e 2 m dos buracos tratados e a 10 cm de profundidade no solo a 0,5 m de distância dos buracos

5 tratados. A concentração de conídios de SC1 nas outras camadas do solo a 0,5 e 2 m de distância dos buracos tratados não foi significativamente mais alta (teste de Tukey; $\alpha = 0,05$) que a população natural de *Trichoderma* spp. isolada na área não tratada. A frequência de ocorrência de

10 *T. atroviride* SC1 foi alta (respectivamente 100% a 0,5 m dos buracos tratados a todas as profundidades do solo) e se reduziu para 90, 70 e 30% a 2 m de distância dos buracos tratados respectivamente na superfície do solo, a 0,1 e 0,3 m de profundidade do solo.

15 Dezoito semanas após sua introdução no solo, ainda foi possível recuperar *T. atroviride* SC1 na superfície do solo tanto a 2 quanto a 4 m de distância dos buracos tratados. Estas concentrações de CFU não foram significativamente diferentes (teste de Tukey; $\alpha = 0,05$)

20 quando em comparação com a concentração de conídios de *Trichoderma* spp. natural obtido da área não tratada. Mesmo se baixas concentrações foram detectadas após 18 semanas, a frequência de ocorrência de *T. atroviride* SC1 foi alta (respectivamente 80 e 70% a 2 e 4 m dos buracos tratados).

25 *T. atroviride* SC1 foi encontrado em folhas de vinhas plantadas no solo tratado. O número de CFU de *T. atroviride* SC1 por mm² de folha foi significativamente mais alto (teste de Tukey; $\alpha = 0,05$) na folhas de plantas no solo tratado que o de *Trichoderma* spp. natural isolado em

30 plantas nas áreas não tratadas. Ocorreu uma diferença significativa (teste de Tukey; $\alpha = 0,05$) na CFU de *T. atroviride* SC1 por unidade de superfície (mm²) entre as folhas de cima e de baixo das plantas nas áreas tratadas.

Dezoito semanas após o plantio nos buracos tratados a concentração de *T. atroviride* SC1 na rizosfera de videira foi de 10^7 CFU g de solo seco.

O número de folhas, números de brotações, peso seco
5 de raízes, comprimento de galho e comprimento total das plantas de videira, não demonstraram diferenças significativas entre as videiras plantadas no solo não tratado ou tratado com o *T. atroviride* SC1 (teste de Tukey; $\alpha = 0,05$, dados não mostrados), indicando que o fungo não é
10 patogênico à cultura de videiras.

O isolamento de *T. atroviride* SC1 um ano após a inoculação indica que pode tolerar as baixas temperaturas inverniais e flutuações de umidade no solo. A concentração de *T. atroviride* SC1 no solo um ano após a inoculação
15 similar ao *Trichoderma* spp. natural indica que pode se estabelecer no solo.

Os mesmos testes foram conduzidos em 2006 com uma cepa diferente, *T. atroviride* F122,. Esta cepa foi detectada apenas até 18 semanas após a inoculação e não foi
20 detectada um ano após a inoculação. A incapacidade de sobreviver do *T. atroviride* F122 em condições de crescimento comparáveis um ano após a inoculações demonstra a superioridade do *T. atroviride* SC1 em relação às outras cepas.

25

Condições experimentais

Em todos os experimentos, a concentração de *T. atroviride* SC1 viável foi estimada pela coleta de amostras de 1 g de solo de cada ponto, colocando cada amostra em 10
30 ml de água estéril e então plaqueando 1 ml desta suspensão, após diluições em série de 10 vezes, em meio semi seletivo. As colônias de fungo foram contadas após sete dias de incubação e os números populacionais foram apresentados em termos de log de CFU g de solo seco⁻¹. O peso seco de solo

foi estimado após a incubação da amostra (ou sub-amostra) a 60°C por 48 h. Os conídios no arroz utilizados como inóculo sempre apresentaram uma viabilidade média próxima a 100%. As colônias de *T. atroviride* SC1 eram distintas de
5 outras espécies de *Trichoderma* por sua característica de micélio aéreo (branco no início, então rapidamente se tornando verde amarelado a verde oliva). Para a identificação inequívoca de nosso isolado, a identidade de quase 10% das colônias de cada placa foi morfolologicamente
10 identificada como sendo *T. atroviride* foi confirmada por análise PCR utilizando-se um conjunto de iniciadores e uma sonda Taq-Man baseados em uma mutação de base do gene da endoquitinase (*Ech42*) que é específica para *T. atroviride* SC1 (como no exemplo 2).

15 Os experimentos consistiram em seis pontos de 0,6 x 0,6 m cada, os quais foram localizados entre as plantas de videira em uma linha do vinhedo. Três pontos foram inoculados com *T. atroviride* SC1 e cada um recebeu 500 g do meio de arroz cozido com os fungos crescidos neste. O
20 inóculo foi misturado na camada superficial do solo (aproximadamente 30 mm de profundidade). A concentração inicial do inóculo fúngico nesta camada foi estimada como sendo 10^8 CFU g de solo seco⁻¹. Três pontos não inoculados adicionais foram utilizados como controle não tratado. Em
25 cada ponto, o solo foi amostrado por escavação da parte externa de uma lateral do ponto e exposição do perfil do solo. A amostragem foi realizada coletando-se três cones de solo (50 ml, 300 mm de diâmetro) a diferentes profundidades (na superfície e a 0,1, 0,2, 0,3 e 0,4 m) e
30 pontos no tempo (na inoculação e 1, 5, 9 e 18 semanas após a inoculação de *T. atroviride* SC1). Uma amostragem adicional do solo foi realizada um ano após a inoculação do primeiro experimento.

Uma sub-amostra de solo (1 g) foi removida de cada amostra utilizando-se uma colher estéril. A sub-amostra de solo foi colocada em 10 ml de Tween 80 0,01% (Acros Organics, Geel, Bélgica), agitada por 4 min utilizando-se um vórtice (Heidolph Instruments, Schwabach, Alemanha) e deixada em repouso por 1 min. Uma série de diluições em água destilada estéril foi estabelecida e as suspensões diluídas foram plaqueadas em placas de Petri contendo o meio semi seletivo. Estas placas de Petri foram então incubadas a 25°C e foram realizadas contagens de colônia final nas culturas correspondendo às diluições apropriadas (CFU na faixa de 30-300 colônias por placa) após cinco dias de incubação. Foram feitas três replicatas para cada amostra de solo. Os resultados foram expressos como CFU g de solo seco⁻¹. As identidades das colônias de *T. atroviride* SC1 foram confirmadas como descrito no exemplo. PCR em tempo real foi utilizado para determinar os números de cópias do genoma (CN) de *T. atroviride* SC1 em todas as amostras de 2006. Para a análise RT-PCR, duas sub-amostras independentes foram coletadas para cada combinação de profundidade e tempo e a extração do DNA e análise de PCR em tempo real de cada amostra foram realizadas como descrito no exemplo 2.

A dispersão de conídios de *T. atroviride* SC1 foi examinada em 2006. Buracos medindo 0,3 × 0,3 × 0,3 m foram cavados na linha do vinhedo entre as plantas de videira. Dez buracos foram preenchidos com uma mistura do solo cavado e inóculo de *T. atroviride* (400 g buraco⁻¹). A concentração inicial de inóculo fúngico foi de 10⁶ CFU g de solo seco⁻¹. Os outros dez buracos foram preenchidos de volta com o solo cavado não tratado. Uma planta de videira de um ano de idade (Pinot gris on Kober 5BB) foi plantada em cada buraco.

Dois conjuntos de amostras de solo foram coletados. A primeira amostragem foi conduzida nove semanas após a inoculação tanto nos buracos tratados quanto nos não tratados (0 m) e a distâncias horizontais de 0,5 e 2,0 m do buraco. A cada uma destas distâncias, foram coletadas amostras de solo a três profundidades de solo (0, 0,1 e 0,3 m). Uma segunda amostragem foi realizada 18 semanas após a inoculação e, neste momento, foram coletadas amostra de solo apenas na superfície (primeiros 30 mm de solo) dos buracos e nas distâncias horizontais de 2,0 e 4,0 m dos locais de inoculação. Foram coletadas amostras e o número de CFU em cada amostra foi determinado como previamente descrito. A dispersão foi avaliada em termos de concentração de *T. atroviride* SC1 (CFU g de solo seco⁻¹) e a frequência (percentagem de amostras de solo com pelo menos uma CFU).

A migração de *T. atroviride* SC1 do solo para as folhas de videira foi avaliada 10 semanas após a inoculação no solo. Três folhas apicais e três folhas de baixo foram removidas de cada planta (cada planta apresentava uma média de 15 folhas) crescidas nos buracos tratados e não tratados. Cada folha recentemente colhida foi transferida para um tubo Falcon contendo 30 ml de água destilada estéril mais Tween 80 0,01%. Estes tubos foram postos sob agitação por 3 minutos e 1 ml de cada uma das suspensões resultantes foi então transferido para uma placa de Petri contendo o meio semi- seletivo. As CFU foram contadas após sete dias de incubação a 25°C. A área da folha foi calculada utilizando-se um processamento de imagem e programa de análise, Image Tool versão 2.0 (UTHSCSA, San Antonio, TX, EUA). Ao final do experimento, as plantas foram removidas do solo. O solo que não aderiu firmemente às raízes foi cuidadosamente removido com agitação leve e as raízes foram então sacudidas vigorosamente em uma bolsa

de plástico de maneira a desalojar o solo da rizosfera. A amostragem do solo de rizosfera e a contagem de CFU para estas amostras (sub-amostras de 1 g; três replicatas) foram realizadas como descrito previamente.

- 5 De maneira a se avaliar a influência do *T. atroviride* SC1 no crescimento vegetal, foram tomadas medidas do comprimento total, comprimento de galho e número de folhas e brotações para cada planta nas áreas tratadas e não tratadas na 19ª e 18ª semanas após a inoculação do solo. O
- 10 peso seco de raiz foi também determinado para cada planta no final do experimento (18ª semana após a inoculação).

Exemplo 7. Atividade de biocontrole *in vitro*

- No bioensaio de cultura dupla, o *T. atroviride* SC1
- 15 inibiu completamente *B. cinerea* e *A. mellea* com uma eficácia antagonística de 100%.

Condições experimentais

- O antagonismo *in vitro* de *T. atroviride* SC1 a um
- 20 patógeno foliar e de fruto (*Botrytis cinerea*) e um patógeno natural do solo (*Armillaria mellea*) foi testado utilizando-se o método de cultura dupla como se segue: os patógenos (*B. cinerea* ou *A. mellea*) foram inoculados a uma distância de 2 cm (A) de *T. atroviride* SC1 (B) em PDA em placas de
- 25 Petri (90 mm de diâmetro). *B. cinerea*, *A. mellea* e *T. atroviride* SC1 foram crescidos separadamente como controles não tratados. Foram feitas pelo menos três replicatas de cada combinação. A eficácia antagonística foi calculada após uma semana de incubação a 20°C, como $(AD-AC) \times 100/AD$,
- 30 onde AC e AD são os crescimentos radiais do patógeno com e sem *T. atroviride* SC1, respectivamente.

Exemplo 8. Biocontrol de oídio

T. atroviride SC1 controla oídio (*Podosphaera xanthii*) em plantas de horticultura como pepino e abobrinha no mesmo nível de enxofre que é um dos fungicidas químicos mais amplamente utilizados e que, por esta razão, foi incluído como padrão (Figura 8). Em particular é observado que *T. atroviride* SC1 controla a doença no mesmo nível do enxofre e melhor que duas cepas de *Trichoderma* utilizadas como padrões. Também em abobrinha a eficácia de biocontrole estava presente (diferença significativa em relação ao não tratado).

Condições experimentais

Plantas com pelo menos cinco folhas bem expandidas de cultivares susceptíveis foram utilizadas. As cultivares utilizadas foram Afrodite ou Xara para abobrinha i e 807 para pepino. As sementes foram plantadas em turfa: mistura de plantio com cascalho vulcânico (1:1) em potes de um litro e crescidas em estufas livres de CPM mantidas a 20-30°C com um foto-período natural. Foram feitas de cinco a seis replicatas (potes) de cada tratamento e planta. O inóculo de *P. xanthii* foi inicialmente coletado em estufas comerciais em plantas de abobrinha e pepino naturalmente infectadas e posteriormente mantido em plantas de pepino e abobrinha pela infecção de plantas com 3 semanas de idade e mantendo-se as plantas infectadas por até um mês em um compartimento separado da estufa. Os conídios foram obtidos por lavagem das folhas com água contendo novos micélios em formação de conídio e imediatamente aspergidos sobre as plantas. A concentração de inóculo foi de aproximadamente 10^7 conídios ml^{-1} e foi aplicado um volume de 5 ml por planta. Uma vez secas, as plantas foram incubadas durante uma noite a 22°C e umidade relativa alta (UR > 95%). Após inoculação artificial as condições

diurnas foram 20-30°C, com 30-70% de UR e as condições noturnas foram 15-20°C com 85-90% de UR. As plantas foram dispostas em blocos completamente randômicos.

O *T. atroviride* SC1 foi crescido em caldo nutriente (método (a), exemplo 3) e aspergido com um aspersor manual sobre as folhas. Um controle não tratado, enxofre (Thiovit, Syngenta Crop Protection) e um agente de biocontrole comercial (*Trichoderma harzianum* T39, Trichodex®, Intrachem Bio) foram também incluídos no experimento. Para cada tratamento foram aspergidos 5 ml da solução por plant. Os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes. O *T. atroviride* SC1 e o controle foram dispostos em um bloco completamente randômico. Iniciando sete dias após a inoculação, as folhas foram verificadas semanalmente para sintomas de oídio. Quando presente, a severidade da doença foi classificada. A severidade da doença foi determinada como a percentagem de áreas de folha com sintomas em todas as folhas.

Foi utilizada análise de variância (ANOVA) para analisar os dados transformados em arco-seno e normalizados. Esta análise foi realizada utilizando-se o programa Statistica, versão 7 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA). As médias foram separadas de acordo com o teste HSD de Tukey ($\alpha = 0,05$). O teste de Kursal-Wallis não paramétrico foi utilizado quando as condições para a ANOVA não foram preenchidas.

Exemplo 9. Biocontrole de agentes de doenças de madeira (Doença ESCA).

T. atroviride SC1 controla os três principais patógenos da doença ESCA. A eficácia do controle de *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* e *Fomitiporia mediterranea* é muito alta e próxima a 100 % (Figura 9). Os gráficos representam a média de cinco

replicatas (placas de Petri). A eficácia de controle do *T. atroviride* SC1 foi sempre melhor que a do agente de biocontrole utilizado como padrão (*Bacillus subtilis* F77).

5 **Condições experimentais**

Cada um dos três patógenos mencionados acima foi inoculado em PDA em placas de Petri de 3 cm a partir da borda e incubado por uma semana a 25°C. Então o *T. atroviride* SC1 foi inoculado no lado oposto a uma distância
 10 de 3 cm da borda. Foram feitas cinco replicatas para cada patógeno e para o controle não tratado. O crescimento de micélio foi medido nos dias 2, 4, 9, 14, 19, 24 e 29 após o tratamento, em particular C é o crescimento no controle não tratado (mm) e T o crescimento no tratado com *T. atroviride*
 15 SC1 (mm). A eficácia foi calculada com a seguinte fórmula $[(C-T)/C] \times 100$ (Sivakumar et al., 2000).

Exemplo 10. Biocontrole do apodrecimento radicular

Armillaria mellea e *A. gallica* são os principais
 20 agentes causadores de podridão da raiz em várias plantas. O *T. atroviride* SC1 é efetivo contra estes dois patógenos e é também mais efetivo que *T. harzianum* T39 como um agente de biocontrole padrão. Reduziu o crescimento dos patógenos e eventualmente os eliminou. Isto fica evidente em
 25 experimento em condições controladas contra os dois patógenos crescidos em pedaços de madeira mostrado na Figura 10, onde o crescimento de micélio de *Armillaria mellea* e *Armillaria gallica* (agentes causadores de apodrecimento radicular) na presença de *Trichoderma*
 30 *atroviride* SC1 ou em sua ausência foi comparado. O efeito experimental de *Trichoderma harzianum* T39 - nome comercial Trichodex® - é mostrado aqui para comparação. O crescimento é expresso como média do diâmetro do

crescimento de cinco replicatas em pedaços de madeira em PDA em placas de Petri a 20°C.

O *T. atroviride* SC1 é também capaz de prevenir infecções em plantas. De fato, a percentagem de plantas mortas (infectadas) foi avaliada após 6 meses da primeira aplicação, que é quando os sintomas das doenças se tornam visíveis e observou-se que *T. atroviride* SC1 protegeu plantas de morango contra *A. mellea* (60% de proteção) e contra *A. gallica* (100% de proteção). Ao contrário, *T. atroviride* F122 produziu apenas 20% de proteção e *T. harzianum* T39 apenas 13% contra a doença (os valores nas Figuras 10 e 11 são percentagens calculadas em 10 plantas de replicata).

No caso de plantas de morango, reduziu significativamente a doença causada por *A. mellea* e *A. gallica* mesmo após 6 meses da aplicação.

O *T. atroviride* F122 foi utilizado como comparação para *A. mellea* (fig. 11) e foi observado que mostra uma atividade significativamente menor que a cepa SC1.

20

Condições experimentais

A. mellea e *A. gallica* foram inoculados em pedaços de madeira colocadas em PDA em placas de Petri em um lado do pedaço de madeira e incubados por uma semana a 25°C. Então foi inoculado *T. atroviride* SC1 no lado oposto. Cinco replicatas foram feitas para cada patógeno e para o controle não tratado. O crescimento de micélio foi medido semanalmente após o tratamento por 6 semanas.

Plantas de morango (Elsanta cv) foram inoculadas colocando-se três pedaços de madeira infectados com *A. mellea* ou *A. gallica* próximos à coroa das plantas. As plantas foram tratadas com *T. atroviride* SC1 crescido pelo método (b) (ver Exemplo 3) e método (c) como descrito no Exemplo 3, foi alternativamente utilizado para o mesmo

30

propósito para a proteção destas plantas que necessitam altos níveis de matéria orgânica tal como plantas de mirtilo produzindo os mesmos resultados obtidos com as plantas de morando mostradas na figura 11. As plantas
 5 foram mantidas sob condições controladas de estufa.

Referências

- Altschul SF, Madden TL., Shaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D J. 1997 Gapped BLAST and PSI-BLAST: a
 10 new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.* 25:3389-3402.
- Bennett AJ, Leifert C, Whipps JM. 2003 Survival of biocontrol agents *Coniothyrium minitans* and *Bacillus subtilis* MBI 600 introduced into pasteurised, sterilised
 15 and non-sterile soils. *Soil Biol Biochem*; 35: 1565-1573
- Carsolio C, Gutierrez A, Jimenez B, Van Montagu M, Herrera-Estrella A. 1994. Characterization of ech-42, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *PNAS USA*; 91:10903-10907.
- 20 Elad Y. *Trichoderma harzianum* T39 preparation for biocontrol of plant disease-control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium flavum*. *Biocontrol Sci Techn* 2000; 10: 499-507.
- Harman GE. Myths and dogmas of biocontrol: changes in
 25 perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis* 2000; 84(4): 377-393.
- Klein D, Eveleigh E. 1998 Ecology of *Trichoderma*. In: Harman GE, Kubicek CP, eds. *Trichoderma & Gliocladium*, vol. 1. Taylor & Francis, Padstow, UK: 57-74.
- 30 Kredics L, Anthal Z, Manczinger L. 2000 Influence of water potential on growth, enzyme secretion and in vitro enzyme activities of *Trichoderma harzianum* at different temperatures. *Curr Microbiol*; 40: 310-314.

- Kredics L, Manczinger L, Anthal Z, Péntzes Z, Szekeres A, Kevei F, Nagy E. 2004 In vitro activity and pH dependence of mycelial growth and extracellular enzyme activities of *Trichoderma* strains with biocontrol potential. J Appl Microbiol; 96: 491-498.
- 5 Longa C. 2007 Fungal biocontrol agents: identification and fate of *Trichoderma atroviride* P. Karst.in the environment. PhD thesis.
- Paulitz TC. 2000 Population dynamics of biocontrol agents and pathogens in soil and rhizospheres. Eur J Plant Pathol; 106: 401-413.
- Sivakumar D, Wilson Wijeratnam RS, Wijesundera, RLC, Marikar FMT, Abeyesekere M.. 2000 Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* on postharvest pathogens of rambutan (15 *Nephelium lappaceum*). Phytoparasitica; 28: (3), pp. 240-247.
- Spencer DM 1978 The Powdery Mildews. Academic Press, New York, USA.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição agrícola **caracterizada** por compreender o *Trichoderma atroviride* SC1, CBS n°122089 isolado, como princípio ativo e adicionalmente um emulsificante, nutriente vegetal, um agente umectante, um micro-nutriente vegetal ou um substrato.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por compreender uma quantidade efetiva de 10^2 a 10^3 conídios ml^{-1} ou g^{-1} .

3. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 2, **caracterizada** pelo fato do substrato ser selecionado do grupo consistindo em: um meio de cultura nutriente, um cereal ou um derivado deste, um modificador, um vegetal ou uma parte deste, turfa, madeira ou pedaço desta, argila ou casca de árvores.

4. Método para proteger uma planta de uma doença causada por um fungo patogênico de planta **caracterizado** por tratar pelo menos uma parte da planta ou o solo próximo à dita planta com a composição conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato da dita parte da planta ser uma folha, um fruto, uma semente ou um ferimento.

6. Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato da composição ser preparada inoculando o *Trichoderma atroviride* SC1 CBS n°122089 isolado em ou sobre um substrato e permitindo que este cresça a uma temperatura compreendida entre 1 a 30°C até a obtenção de um número de conídios de pelo menos 10^2 a 10^3 ml^{-1} ou g^{-1} .

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 6, **caracterizado** pelo fato do dito fungo patogênico de planta ser selecionado do grupo consistindo naqueles causadores de doenças da madeira (*Phaeomoniella*

chlamydospora, *Phaeoacremonium aleophilum* e *Fomitiporia mediterranea*), doenças foliares (o agente causador de oídio *Podosphaera xanthii*), doenças do fruto ou flores (*Botrytis cinerea*) e doenças radiculares causadas pelo gênero

5 *Armillaria* genus (*Armillaria mellea* e *A. gallica*).

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato da dita planta ser selecionada do grupo consistindo em: *Cucurbitaceae*, *Rosaceae*, *Vitaceae*, *Crucifereae*, *Compositae*, *Ubelliferae*, *Solanaceae*

10 e *Liliaceae*.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato da dita planta ser selecionada do grupo consistindo em: *Cucurbitaceae*, *Rosaceae* ou *Vitaceae*.

DESENHOS

Figura 1

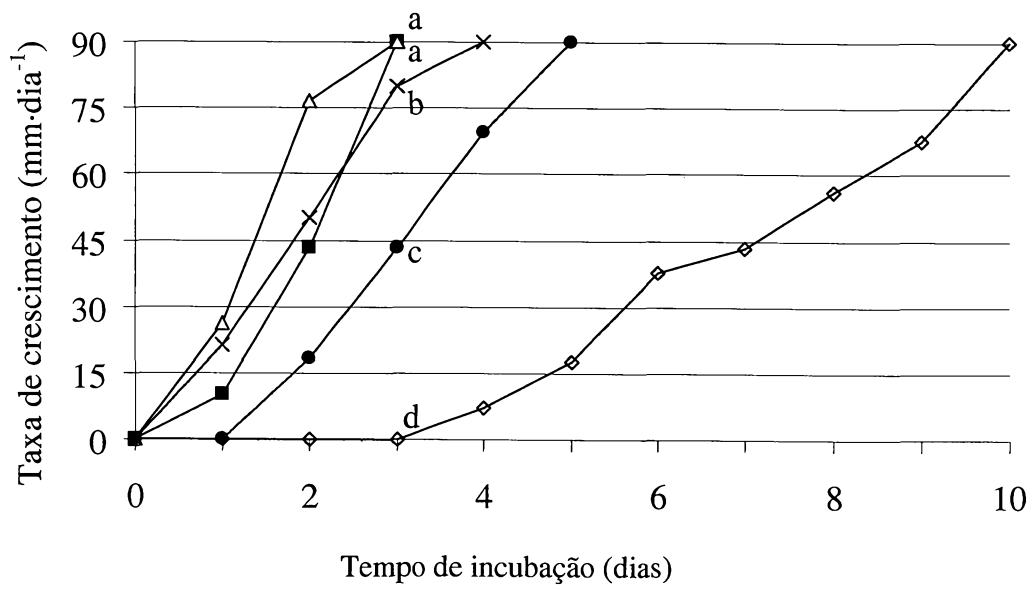


Figura 2

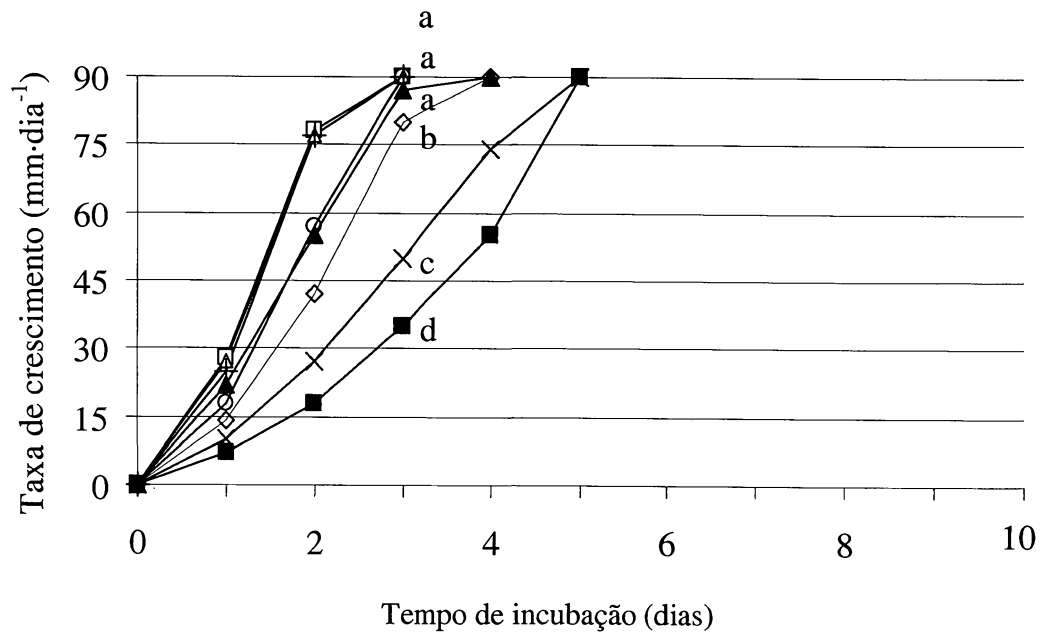


Figura 3

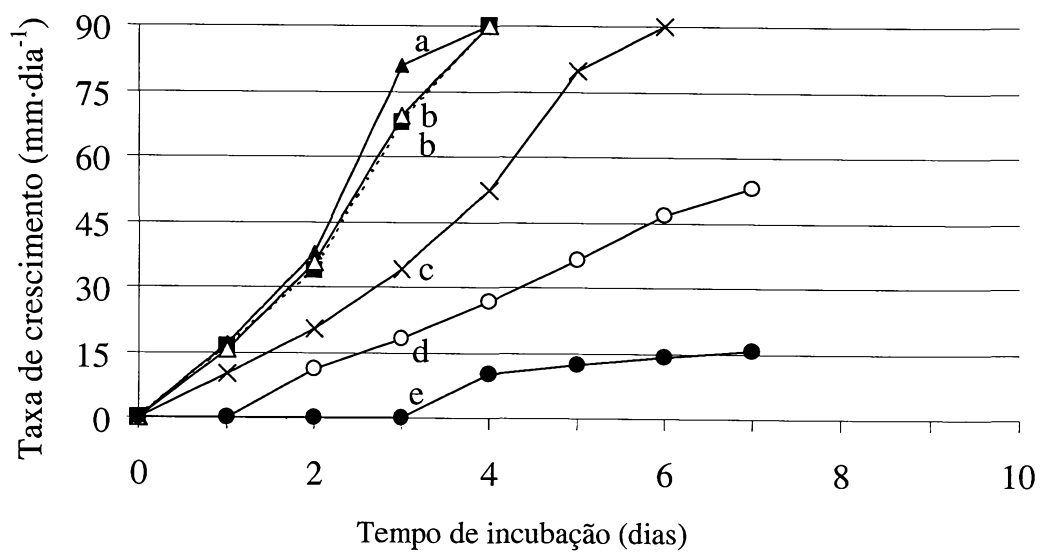


Figura 4

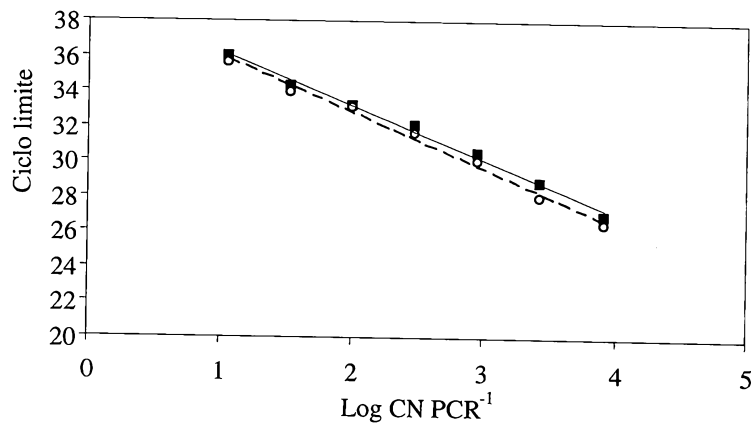


Figura 5

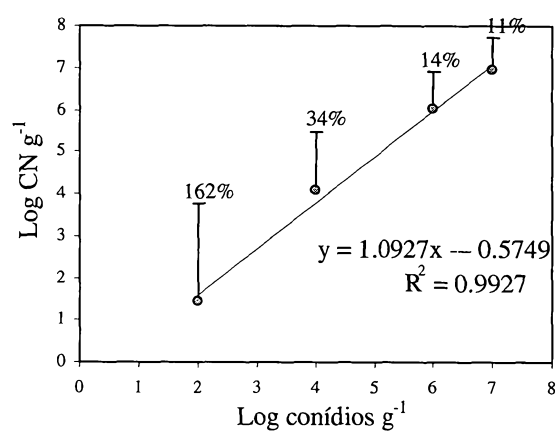


Figura 6

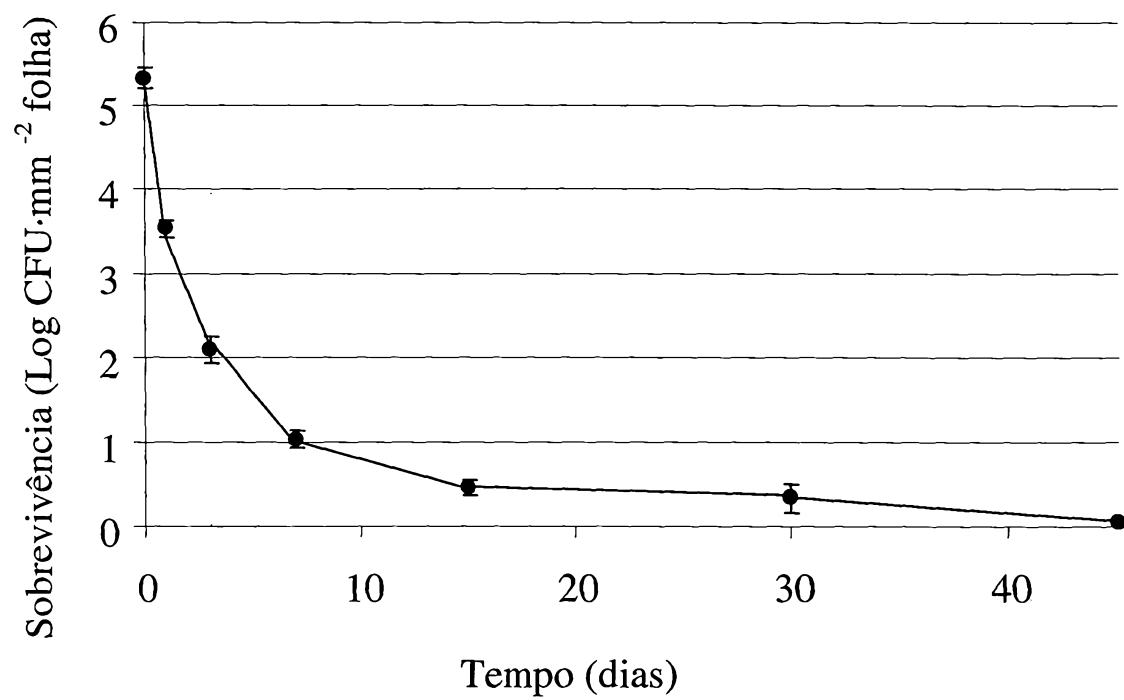


Figura 7 A

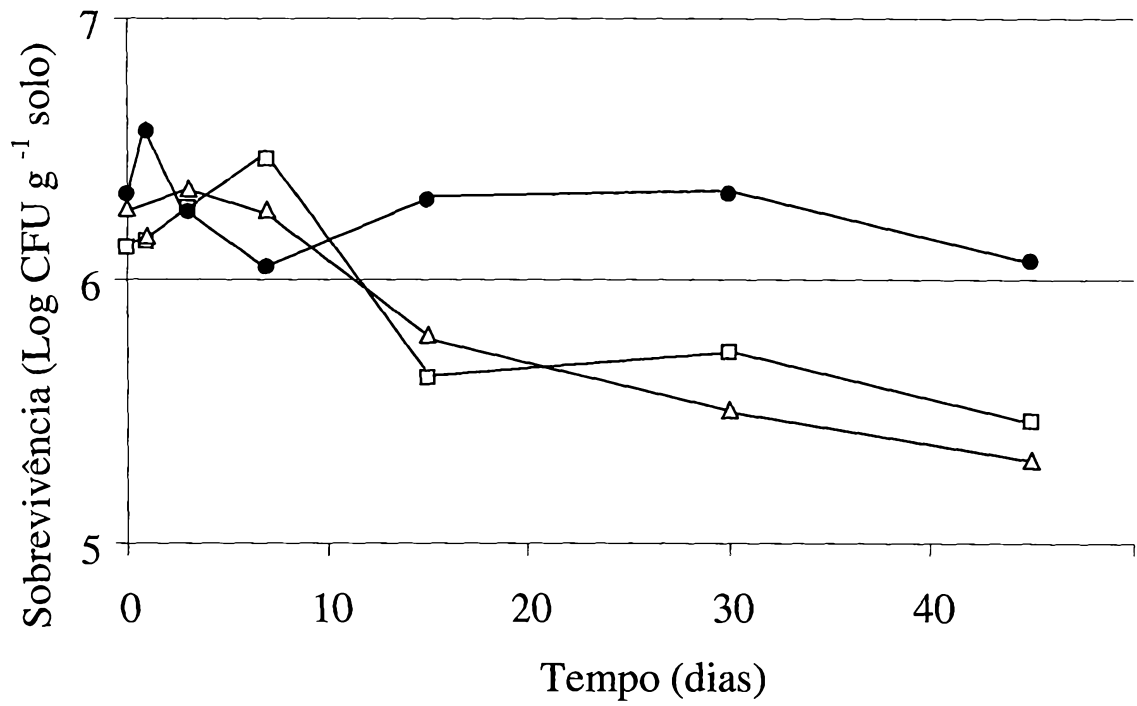
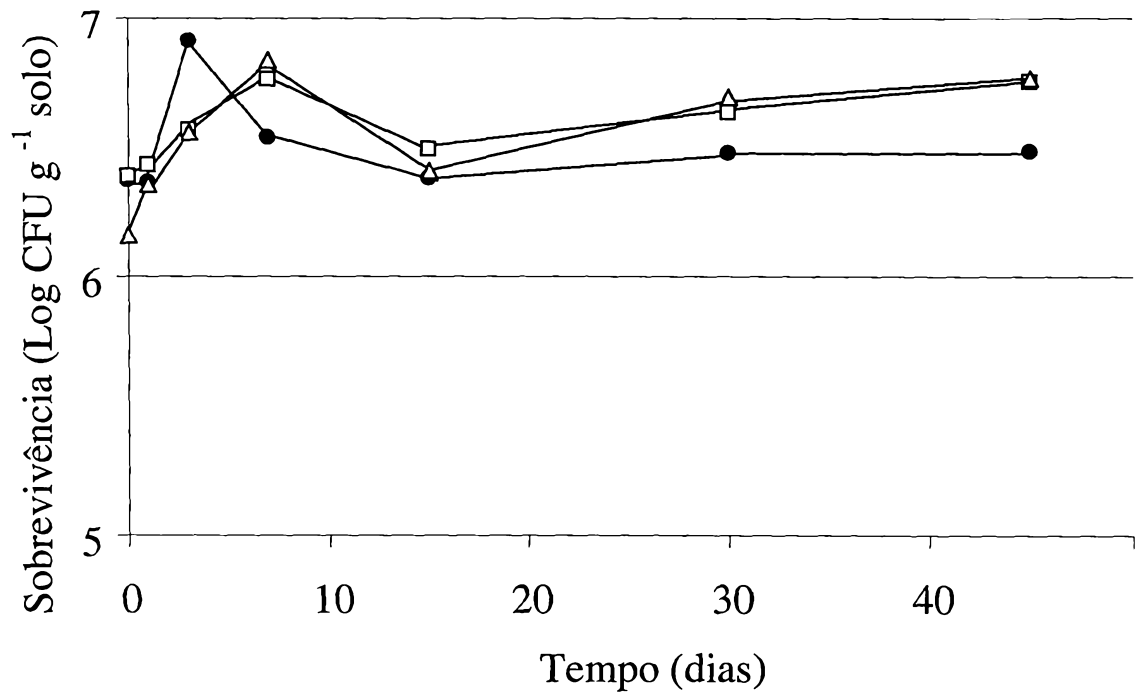


Figura 7 B

Figura 8 A

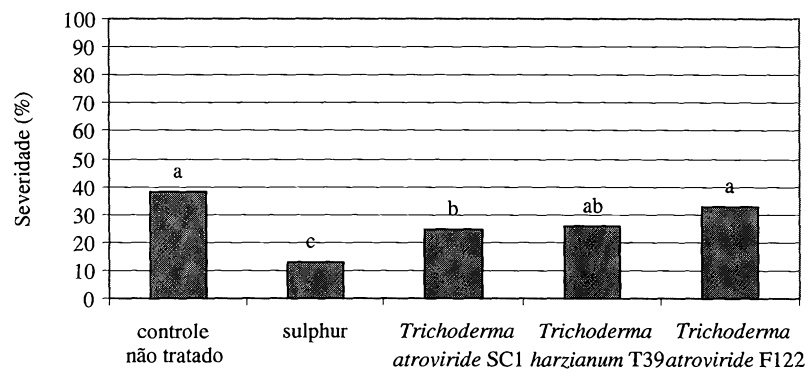
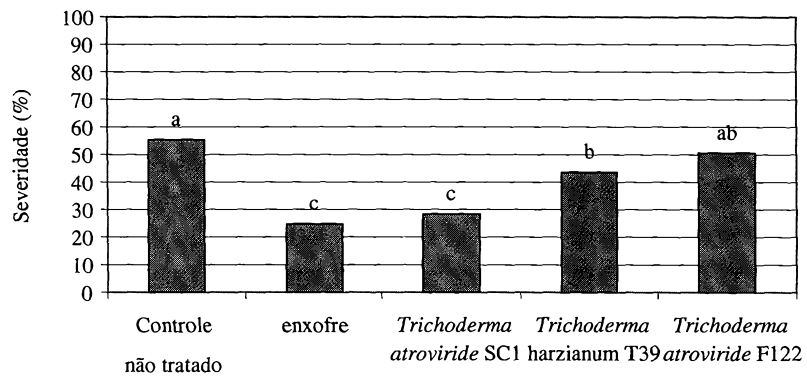


Figura 8 B

Figura 9 A

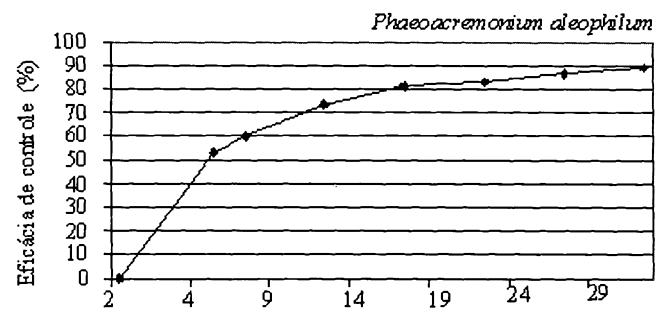
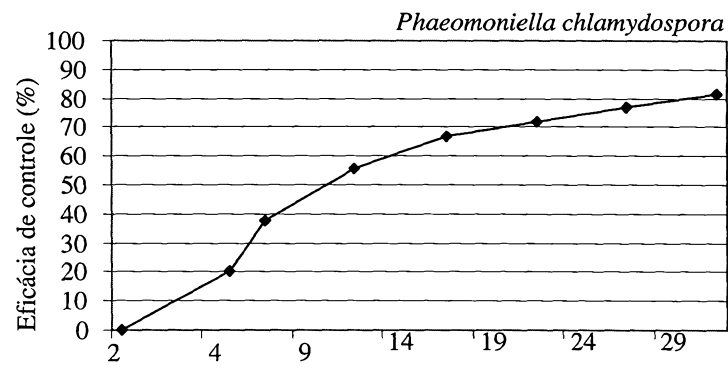


Figura 9 B

Figura 9 C

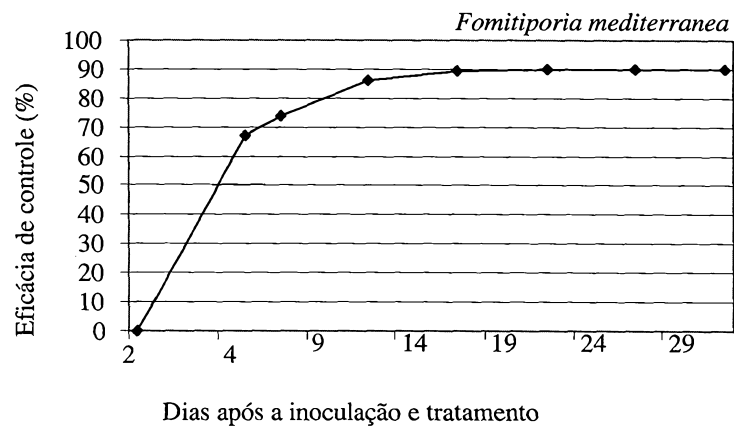


Figura 10

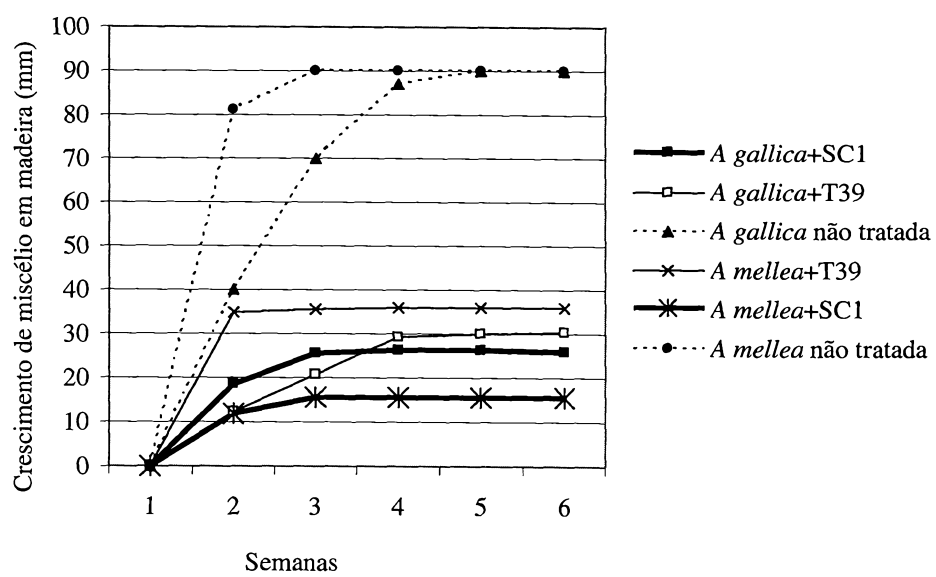


Figura 11

