

EFEITO DE METABÓLITOS PRODUZIDOS POR *Trichoderma* spp. SOBRE O ÍNDICE MITÓTICO EM CÉLULAS DAS PONTAS DE RAÍZES DE *Allium cepa*

EFFECT OF METABOLITES PRODUCED BY *Trichoderma* spp. ON MITOTIC INDEX IN CELLS OF *Allium cepa* ROOT TIPS

Anderson Rossi de AGUIAR¹; Daniele AGUIAR²; Solange Bosio TEDESCO³; Antonio Carlos Ferreira da SILVA³

1. Mestre, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.; 2. Graduanda em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. 3. Professor(a), Doutor(a), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. acfsilva2@uol.com.br

RESUMO: Microrganismos do solo produzem metabólitos importantes para a produção de compostos biologicamente ativos. Dentre estes microrganismos, as espécies de trichoderma (*Trichoderma* spp.) possuem a capacidade de produzir metabólitos. A promoção do desenvolvimento de plantas por trichoderma pode estar relacionada, entre outros fatores, ao estímulo à multiplicação celular, através da produção de hormônios, entre outros. O método de avaliação do índice mitótico em raízes de *Allium cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ*. O objetivo do estudo foi selecionar cepas e produtos biológicos comerciais de trichoderma, utilizados no controle biológico de fitopatógenos que promovam o aumento do índice mitótico em células de pontas de raízes pelo sistema teste de *A. cepa*. Foram utilizadas cepas de *Trichoderma harzianum* (2B2, 2B22, 2B12); *Trichoderma viride* (TSM1, TSM2, C1) e os produtos biológicos comerciais de trichoderma, Agrotich® e Trichodermil®. Os bulbos de *Allium cepa* foram arranjados em dez tratamentos (quatro repetições por tratamento), oito com metabólitos de cepas de *Trichoderma* spp. e dois controles na ausência de metabólitos. A contagem das células ocorreu na região meristemática, onde foram contadas 500 células por bulbo em cada uma das lâminas. Foram observadas as células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase, com auxílio de microscópio ótico com a objetiva de 40X. Foram contadas as células de cada uma das fases do ciclo celular estudadas, após calculou-se os índices mitóticos. A análise estatística dos dados foi realizada pelo teste χ^2 (Qui-quadrado), com probabilidade de 5%, pelo programa estatístico BioEstat 4.0. Os tratamentos T1, T3 e T4 (metabólitos das cepas 2B2, 2B12 e C1 de trichoderma, respectivamente) apresentaram os maiores números de células para as fases prófase, metáfase, anáfase e telófase e alcançaram os maiores IM ($\chi^2 = 5.45 \alpha = 0.05$), ($\chi^2 = 5.0 \alpha = 0.05$) e ($\chi^2 = 3.92 \alpha = 0.05$), respectivamente. O tratamento controle T10 (meio líquido BD), apresentou o maior número de células em interfase, e o menor nas fases da divisão celular. O teste com raízes de *Allium cepa* possibilita selecionar cepas de trichoderma que induzem o aumento do índice mitótico em pontas de raízes pela ação de metabólitos e apresenta variabilidade entre as cepas estudadas.

PALAVRAS CHAVES: *Allium cepa*. Divisão celular. Microrganismos. Teste vegetal. *Trichoderma* spp.

INTRODUÇÃO

Os metabólitos produzidos por microrganismos do solo representam um importante grupo para a produção de compostos biologicamente ativos (DONADIO et al., 2002), podendo ser sintetizados via ribossomal e não ribossomal (KLEINKAUF, VON DOHREN, 1996). Entre estes metabólitos se encontram os antibióticos, pigmentos, toxinas, indutores de competição ecológica, simbiose, e promotores de crescimento de plantas (DEMAIN, 1992).

Fungos do gênero *Trichoderma* encontram-se na rizosfera, são promotores do crescimento em espécies vegetais (MACHADO et al., 2012), e uma rica fonte de metabólitos secundários, apresentando um vasto repertório de genes supostamente envolvidos na biossíntese de peptídeos não

ribossômicos, policetídeos, terpenóides e pironas (MUKHERJEE et al., 2012).

Segundo Melo (1998) muitas espécies de trichoderma (*Trichoderma* spp.) estudadas possuem a capacidade de produzir metabólitos tóxicos, tais como antibióticos e enzimas líticas degradadoras da parede celular de fungos fitopatogênicos. Conforme Claydon et al. (1987), são consideradas eficientes tanto pela produção de metabólitos voláteis como de não voláteis, esta capacidade também foi evidenciada por outros autores como Bell et al. (1982), Reis et al. (1995) e Durman et al. (1999). Assim, fungos do gênero *Trichoderma* incluem espécies economicamente importantes por sua atuação no controle biológico, por apresentarem capacidade de produzir antibióticos e enzimas, e pela produção metabólica com atividades análogas aos hormônios vegetais (CARVAJAL et al, 2009). A promoção do desenvolvimento de plantas por

trichoderma pode estar relacionada, entre outros fatores, ao estímulo a multiplicação celular, através do aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes pela planta, à produção de hormônios e ao aumento da superfície total do sistema radicular (LUCON, 2009; MACHADO et al., 2012).

O método de avaliação do índice mitótico (IM) em raízes de *Allium cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999). Este sistema teste vegetal de *Allium cepa* é utilizado com regularidade para estudos dos efeitos de extratos vegetais (FACHINETTO et al., 2007), utilizando o índice mitótico como indicador de proliferação adequada das células, os resultados podem ser relacionados a culturas de linfócitos (GADANO et al., 2002). Pesquisadores realizam de forma conjunta teste animal *in vitro* e os resultados obtidos são similares aos testes utilizando sistema teste vegetal *in vivo* (TEIXEIRA et al., 2003), propiciando informações de grande importância. Desta forma, o presente estudo objetivou a seleção de cepas do agente biológico trichoderma que promovam, através de seus metabólitos, o aumento do índice mitótico em células de pontas de raízes pelo sistema teste de *Allium cepa*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade e no Laboratório de Interação Planta-Microrganismos, Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS (UFSM).

Cepas de *Trichoderma* spp.

Foram utilizadas cepas de trichoderma, pertencentes ao Laboratório Planta Microrganismos, de *Trichoderma harzianum* (2B2, 2B22, 2B12); *Trichoderma viride* (TSM1, TSM2, C1) e os produtos comerciais Agrotich® (cepas de *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride*, 1.10^6 UFC.g⁻¹, Agri Haus do Brasil) e Trichodermil® WP Organic (cepa especial de *Trichoderma harzianum*, 500. 10^6 conídios viáveis.g⁻¹, Itaforte Bioprodutos.).

Bulbos de Cebola

Foram utilizados 40 bulbos de cebola (*Allium cepa*) orgânicos livres de agentes genotóxicos.

Preparo dos metabólitos das cepas de *trichoderma* spp.

Para o preparo dos metabólitos das cepas de trichoderma foram colocados para cada isolado um disco de meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), contendo micélio e esporos, em recipientes plásticos de 1.000 mL esterilizados contendo meio líquido BD (batata-dextrose) e incubados por 10 dias sob agitação em mesa orbital (Modelo TE-141, Marca TECNAL) em temperatura ambiente (25°C) e fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, posteriormente, os meios de cultura foram filtrados, para separar os metabólitos da massa micelial e esporos, sendo que imediatamente os bulbos de *Allium cepa* (quatro repetições por tratamento) foram dispostos nos recipientes contendo meios de culturas BD filtrados com e sem metabólitos das cepas de *Trichoderma* spp. para enraizar. Os bulbos foram mantidos nos meios de cultura, entre 5 a 7 dias, até a germinação das radículas.

Os 40 bulbos colocados para enraizar formaram os seguintes tratamentos: T1- metabólitos da cepa 2B2; T2- metabólitos da cepa 2B22; T3- metabólitos da cepa 2B12; T4- metabólitos da cepa C1; T5- metabólitos da cepa TSM1; T6- metabólitos da cepa TMS2; T7- metabólitos do produto Trichodermil®; T8- metabólitos do produto Agrotich®; T9- controle 1 - somente água; T10- controle 2 - somente meio líquido BD (batata-dextrose).

Os bulbos foram submetidos aos tratamentos para o enraizamento, e após, as radículas foram coletadas e fixadas em etanol: ácido acético (3:1) e a seguir conservadas em álcool 70% sob refrigeração a 10 °C.

Análise da divisão celular das raízes dos bulbos de cebola

Para o preparo das lâminas utilizou-se radículas previamente conservadas em etanol 70%, as quais foram hidrolisadas em HCl 1N por 5 minutos, e em seguida foram lavadas em água destilada e coradas comorceína acética 2% pela técnica de esmagamento (adaptada de GUERRA e SOUZA, 2002). Foi realizada a contagem das células, onde foram contadas 500 células por bulbo em cada uma das lâminas, quatro lâminas por bulbo. Foram examinadas observando-se as células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase, com auxílio de microscópio ótico com a objetiva de 40X. Foram contadas as células de cada uma das fases do ciclo celular estudadas: interfase e divisão (prófase, metáfase, anáfase e telófase), após calculou-se os índices mitóticos. Fez-se análise estatística dos

dados pelo teste χ^2 (Qui-quadrado), com probabilidade de 5%, pelo programa estatístico BioEstat 4.0.

Após a análise, algumas lâminas foram seladas com cimento galvanizante VIPAL® e foram armazenadas em geladeira por um dia e então foi realizada a montagem de lâminas permanentes com o uso de meio de inclusão rápida (ENTELLAN®).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir da análise de células de *Allium cepa* são apresentados nas Tabelas 1 e 2. O número total de células analisadas (2000 células) e o número de células nas diferentes fases do ciclo celular: interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase, obtidas a partir de pontas de raízes de cebola tratadas com metabólitos produzidos por cepas de *Trichoderma* sp. podem ser observados na Tabela 1.

Os tratamentos T1, T3 e T4 (metabólitos das cepas 2B2, 2B12 e C1 de trichoderma, respectivamente) apresentaram os menores números de células em interfase e os maiores para as fases prófase, metáfase, anáfase e telófase (Tabela 1). O tratamento controle T10 (meio líquido BD), apresentou o maior número de células em interfase (1962 células), e o menor nas fases da divisão celular. Um maior número de células em interfase (1958 de células) também foi observado para o tratamento controle T9 (água). Os tratamentos-controle T10 e T9 (meio líquido BD batata-dextrose e água, respectivamente) apresentaram pouca diferença em relação aos tratamentos com metabólitos T8 (Agrotrich®), T7 (Trichodermil®), T6 (isolado TSM2), T5 (isolado TSM1) e T2 (isolado 2B22) que apresentaram 1940, 1961, 1959, 1947 e 1947 células em interfase, respectivamente, portanto esses tratamentos apresentaram os menores números de células em divisão (Tabela 1) em prófase, metáfase, anáfase e telófase.

Tabela 1. Número de células no ciclo celular (interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase) em pontas de raízes de cebola tratadas com metabólitos produzidos por cepas de *Trichoderma* spp.

Número de células nas fases do ciclo celular					
Tratamentos	Interfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase
T1	1891	46	35	12	16
T2	1947	21	15	9	8
T3	1892	48	32	13	15
T4	1921	33	25	9	12
T5	1947	23	17	6	7
T6	1959	19	11	5	6
T7	1961	18	11	4	6
T8	1940	15	26	9	10
T9	1958	9	15	6	12
T10	1962	25	3	5	5

T1- metabólitos do isolado 2B2; T2- metabólitos do isolado 2B22; T3- metabólitos do isolado 2B12; T4- metabólitos do isolado C1; T5- metabólitos do isolado TSM1; T6- metabólitos do isolado TSM2; T7- metabólitos do produto Trichodermil®; T8- metabólitos do produto Agrotrich®; T9- controle 1 - somente água; T10- controle 2 - somente meio BD (batata-dextrose).

A Tabela 2 apresenta o total médio do índice mitótico (IM), o número total de células analisadas, e o número total de células em divisão celular, tanto para os bulbos controle como para os bulbos tratados com os metabólitos de trichoderma. Conforme esperado, os tratamentos T1, T3 e T4 (metabólitos das cepas 2B22, 2B12 e C1, respectivamente) alcançaram os maiores IM ($\chi^2=5.45$ $\alpha=0.05$), ($\chi^2=5.4$ $\alpha=0.05$) e ($\chi^2=3.92$ $\alpha=0.05$), respectivamente, diferindo estatisticamente dos tratamentos controles na ausência de metabólitos de diferentes cepas (2,07 e 1,87% para

T9 e T10, respectivamente), demonstrando serem cepas capazes de aumentar o índice mitótico podendo interferir na divisão celular. Por sua vez, os metabólitos das cepas 2B22, TSM1, TSM2, produto Trichodermil® e o produto Agrotrich®, em relação aos tratamentos controle não apresentaram diferenças significativas para os índices mitóticos, não interferindo, portanto, no aumento da divisão celular em pontas de raízes, o que demonstra que a capacidade de aumentar o índice mitótico é uma característica variável entre as cepas estudadas. Os tratamentos com os menores IM alcançaram valores

de ($\chi^2 = 1.92$ $\alpha = 0.05$) e ($\chi^2 = 1.87$ $\alpha = 0.05$), tratamento 7 e 10, respectivamente.

Tabela 2. Índice mitótico de células de pontas de raízes de cebola tratadas com metabólitos produzidos por cepas de *Trichoderma* spp.

Tratamentos	Número Total de Células	Células em Divisão	% Índice Mitótico
T1	2000	109	5,45 a
T2	2000	53	2,62 d
T3	2000	108	5,40 a
T4	2000	79	3,92 bc
T5	2000	53	2,62 d
T6	2000	41	2,02 d
T7	2000	39	1,92 d
T8	2000	60	2,97 cd
T9	2000	42	2,07 d
T10	2000	38	1,87 d

Porcentagens seguidas da mesma letra (a, b, c ou d) não diferem significativamente ao nível de 5%, pelo teste χ^2 .

A análise do ciclo celular de células meristemáticas de raiz de *A. cepa*, com o sistema teste vegetal, serve como indicativo para avaliar o desempenho dos metabólitos produzidos por trichoderma na promoção da divisão celular de pontas de raízes, utilizando o índice mitótico como indicador de proliferação das células. Chauhan et al. (1999) relataram que testes com extratos vegetais têm apresentado efeitos similares em células de plantas e animais.

Fungos do gênero *Trichoderma* encontram-se na rizosfera e podem promover o crescimento radicular em espécies vegetais (MACHADO et al., 2012) possivelmente pela capacidade de produção metabólica (ALTAMORE et al., 1999; FILHO et al., 2008), assim induzindo a multiplicação celular. Carvajal et al. (2009), avaliaram a produção de metabólitos de 101 cepas de trichoderma da Colômbia, 20% das cepas foram capazes de produzir formas solúveis de fosfato de rocha fosfática, 8% das amostras avaliadas mostraram capacidade de produzir sideróforos consistentes para converter ferro a formas solúveis, 60% produziram ácido indol-3-acético (IAA) ou análogos a auxina. A produção destes metabólitos é uma característica de cepas específicas, como foi verificado no presente trabalho, demonstrando haver diferença no comportamento das cepas de trichoderma em relação à síntese metabólica (FILHO et al., 2008).

Em estudos realizados com *Arabidopsis thaliana* investigaram o papel da auxina produzida e isolada de *Trichoderma* spp. na regulação do crescimento e desenvolvimento da planta em resposta à inoculação de *Trichoderma. virens* e

Trichoderma atroviride desenvolvendo um sistema de interação fungo-planta, o qual resultou em características fenotípicas relacionadas com a auxina, como o aumento da produção de biomassa e estimulação do desenvolvimento das raízes laterais (CONTRERAS-CORNEJO, 2009). Diversos trabalhos mostram o efeito benéfico de espécies de *Trichoderma* na promoção do desenvolvimento vegetal. Filho et al. (2008) concluíram que o isolado CEN 262 de *Trichoderma* spp. proporcionou maior índice de desenvolvimento de partes aéreas de mudas de eucalipto.

Reguladores vegetais podem incrementar o crescimento e o desenvolvimento vegetal, estimulando a divisão celular, a diferenciação e o alongamento celular, podendo, também, aumentar a absorção e a utilização de água e nutrientes pelas plantas (Vieira; Castro 2004), espécies de trichoderma produzem metabólitos cujas atividades são análogas a estes reguladores de crescimento (CARVAJAL et al, 2009).

Em estudo realizado por Fortes et al. (2007) foi observado que a sobrevivência de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. aumentou por meio do tratamento com cepas de *Trichoderma* spp. e também promoveu um aumento na porcentagem de enraizamento, comprovando que algumas linhagens aumentam a superfície total do sistema radicular, possibilitando um maior acesso aos elementos minerais (HARMAN, 2004).

Os resultados apresentados nesse trabalho indicam que há diferença no comportamento dos metabólitos das diferentes cepas testadas de trichoderma em relação ao índice mitótico de *Allium*

cepa, e que houve estímulo da divisão celular das raízes de *Allium cepa*.

Em estudo com extrato de plantas medicinais, Comparoto et al (2002), pesquisaram o efeito sobre células de pontas de raízes utilizando o teste de *Allium cepa*, ao contrário do observado para os metabólitos de trichoderma, as infusões causaram declínio do número de células em divisão em relação aos controles.

Os resultados obtidos para o índice mitótico a partir de estudos utilizando o sistema teste de *Allium cepa*, bem como na literatura (FACHINETTO et al., 2007), são considerados satisfatórios como indicativos de potencial proliferativo dos indutores de plantas sobre as células como no caso do presente trabalho, em que observou-se a interferência de metabólitos

produzidos por cepas de *Trichoderma* spp em pontas de raízes.

O teste com raízes de *Allium cepa* utilizado para a observação do aumento do índice mitótico poderá auxiliar outros experimentos de seleção *in vitro* e *ex vitro* com cepas do bioagente trichoderma, promotores de enraizamento e crescimento.

CONCLUSÃO

O teste com raízes de *Allium cepa* possibilita selecionar cepas de *Trichoderma* spp. que induzem o aumento do índice mitótico em pontas de raízes pela ação de metabólitos. A capacidade de aumentar o índice mitótico de células de pontas de raízes de *Allium cepa* apresenta variabilidade entre as cepas de trichoderma estudadas.

ABSTRACT: Soil microorganisms produce metabolites important for the production of biologically active compounds. In relation to these organisms, species of trichoderma (*Trichoderma* spp.) have the ability to produce metabolites. Promoting the development of plants by trichoderma may be related, among other factors, to stimulate cell proliferation through the production of hormones, among others. The method of evaluation of mitotic index in *Allium cepa* roots is validated by the International Programme on Chemical Safety (IPCS, WHO) and United Nations Environment Programme (UNEP) as an effective test for in situ analysis and monitoring. The aim of the study was to select strains and commercial biological products trichoderma used in biological control of plant pathogens that promote increased mitotic index in cells of the root tips of *A. cepa* test system. Strains of *Trichoderma harzianum* (2B2, 2B22, 2B12) and *Trichoderma viride* (TSM1, TSM2, C1) and the biological products commercials Agrotrich® and Trichodermil® of trichoderma were used. The bulbs of *Allium cepa* were arranged in ten treatment (four replicates per treatment), eight with metabolite of *Trichoderma* spp. and two controls in the absence of metabolites. Cell counts occurred on the meristematic region where 500 cells were counted for each bulb on the blades. Cells were observed in interphase, prophase, metaphase, anaphase and telophase, with the aid of an optical microscope with a 40X objective. The cells were counted in each phase of the cell cycle analyzed and after it was calculated mitotic rates. Statistical analysis of data was performed by χ^2 test (chi-square), with a probability of 5%, the statistical program BioEstat 4.0. Treatments T1, T3 and T4 (metabolites of isolates 2B2, 2B12 and C1 of trichoderma, respectively) showed higher cell numbers for the phases prophase, metaphase, anaphase and telophase and reached the highest IM ($\chi^2 = 5.45$ $\alpha = 0.05$), ($\chi^2 = 5.0$ $\alpha = 0.05$) e ($\chi^2 = 3.92$ $\alpha = 0.05$, respectively). The T10 control (liquid medium BD), had the highest number of interphase cells, and the lower phases of cell division. The test with *Allium cepa* roots enables selecting trichoderma isolates that induce increased mitotic index in root tips by the action of metabolites and shows variability among the isolates studied.

KEYWORDS: *Allium cepa*. Cell division. Microorganisms. Test plants. *Trichoderma* spp.

REFERÊNCIAS

- ALTAMORE, C.; NORVELL, W. A.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G. E. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 7, p. 2926- 2933, 1999.
- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, St. Paul, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.
- CABRERA, G. L.; RODRIGUEZ, D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research -Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 426, n. 2, p. 211-214, 1999.

- CAMPAROTO, M. L.; TEIXEIRA, R. O.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 1, n. 25, p. 85-89, 2002.
- CARVAJAL, L. H.; ORDUZ, S.; BISSET, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological Control**, Amsterdam, v. 51, p. 409-416, 2009.
- CHAUHAN, L. K. S.; SAXENA P. N.; GUPTA, S. K. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 42, p. 181-189, 1999.
- CLAYDON, N.; ALLAN, M.; HANSON, J. R. antifungal alkyl- pyrones produced by *trichoderma harzianum*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 88, pt-4, p. 503-513, 1987.
- CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; CORTÉS-PENAGOS, C. E; LÓPEZ-BICIO, J. - *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 149, n. 3, p. 1579-1592, 2009.
- DEMAIN, A. Microbial secondary metabolism: a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry. In: **Secondary metabolites: their function and evolution**. Chichester: J. Wiley, Nova York, 1992. p. 3-23.
- DONADIO, S.; MONCIARDINI, P.; ALDUINA, R.; MAZZA, P.; CHIOCCHINI, C.; CAVALETTI, L.; SOSIO, M.; PUGLIA, A. M. Microbial Technologies for the Discovery of novel bioactive metabolites. **Journal of biotechnology**, Amsterdam, v. 99, p. 187-98, 2002.
- DURMAN, S.; MENENDEZ, A.; GODEAS, A. Evaluación de *Trichoderma* spp. como antagonista de *Rhizoctonia solani* *in vitro* y como biocontrolador del damping-off de plantas de tomate en invernadero. **Revista Argentina de Microbiología**, Buenos Aires, v. 31, p. 13-18, 1999.
- FACHINETTO, J. M.; BAGATINI, M. D.; DURIGON, J.; SILVA, A. C.F.; TEDESCO S. B. Efeito antiproliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 49-54, 2007.
- FILHO, M. R. C. Mello, S. C. M.; Santos, R. P.; Menêzes, J. E. **Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético *in vitro* e colonização endofítica de mudas de eucalipto**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. 16 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 226).
- FORTES, F. O.; SILVA, A. C. F. ; ALMANÇA, M. A. K.; TEDESCO, S. B. Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 2, p. 221-228, 2007.
- GADANO, A.; GURNI A.; LÓPEZ P.; FERRARO, G.; CARBALLO, M. *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 81, n. 1, p. 11-16. 2002.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto, 2002. 132p.
- HARMAN, G. E.; PETZOLDT, R.; COMIS, A. E.; CHEN, J. Interactions between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 94, n. 2, p. 146 -153, 2004.

KLEINKAUF, H.; VON DÖNREN, H. A. nonribosomal sistem of peptide biosynthesis European. **Journal of biochemistry**, Oxford, v. 236, p. 335-351, 1996.

LUCON, C. M. M. (2009) - Promoção de crescimento de plantas com o uso de *Trichoderma* spp. (em linha). Infobibos, Informações Tecnológicas. (Acesso em 2013.05.29). Disponível em: < http://www.infobibos.com/Artigos/2009_1/trichoderma/index.htm >.

MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, R. F.; SILVA, A. C. F.; ANTONIOLLI, Z. I. Trichoderma no Brazil: O Fungo e Bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.

MELO, I. S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (org.) Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. Cap. 9. 388p. (EMBRAPA-CNPDA. Documentos,15). Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. **Controle biológico**. Jaguariúna : EMBRAPA, 1998. v. 1. Cap. 1. 262p.

MUKHERJEE, P. K.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M. Secondary metabolism in *Trichoderma* – a genomic perspective. **Microbiology**, Washington, v. 158, n. 1, p. 35–45, 2012.

REIS, A.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. M.; MARIANO, R. L. R.; OLIVEIRA, S. M. A. Potencial de isolados de *Trichoderma* para biocontrole da murcha de *Fusarium* do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 16-20, 1995.

TEIXEIRA, R. O., CAMPAROTO, M. L., MANTOVANI, M. S., VICENTINI, V. E. P. Assesment of two medicinal plants *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in *in vitro* and *in vivo* assays. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 4, p. 551-555, Brasil. 2003.

VIEIRA, E. L.; CASTRO, P. R. C. **Ação de bioestimulante na cultura da soja (*Glycine max* L. Merrill)**. Cosmópolis: Stoller do Brasil, 2004. 47p.