



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS**  
**CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PORTO NACIONAL**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**KÁRITA CRISTINE RODRIGUES DOS SANTOS**

**USO DE ISOLADOS DO GÊNERO *Trichoderma spp.* CONTRA O FITOPATÓGENO  
*Fusarium solani***

**Porto Nacional, TO**

**2022**

**KÁRITA CRISTINE RODRIGUES DOS SANTOS**

**USO DE ISOLADOS DO GÊNERO *Trichoderma spp.* CONTRA O FITOPATÓGENO  
*Fusarium solani***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Tocantins (UFT), *Campus* Universitário de Porto Nacional para obtenção do título de licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Fabyano Alvares Cardoso Lopes

**Porto Nacional, TO**

**2022**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

S237u Santos, Kárita Cristine Rodrigues dos .  
Uso de isolados do fungo do gênero *Trichoderma* spp. contra o  
fitopatógeno *Fusarium solani* . / Kárita Cristine Rodrigues dos Santos. –  
Porto Nacional, TO, 2023.

58 f.

Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus  
Universitário de Porto Nacional - Curso de Ciências Biológicas, 2023.

Orientador: Fabyano Alvares Cardoso Lopes

1. Agroquímicos . 2. Controle biológico. 3. Fitopatógeno. 4. *Trichoderma*.  
I. Título

**CDD 570**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer  
forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte.  
A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184  
do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

**KÁRITA CRISTINE RODRIGUES DOS SANTOS**

**USO DE ISOLADOS DO GÊNERO *Trichoderma* spp. CONTRA O FITOPATÓGENO  
*Fusarium solani*.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à UFT –  
Universidade Federal do Tocantins – *Campus*  
Universitário de Porto Nacional, Curso de Ciências  
Biológicas foi avaliado para a obtenção do título de  
Licenciada e aprovada (o) em sua forma final pelo  
Orientador e pela Banca Examinadora.

Data de aprovação: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Fabyano Alvares Cardoso Lopes, Orientador, UFT

---

MSc. Amanda Rafaela Rodrigues, Examinadora, UFG

---

Eng. Agron. Vanice Conceição do Nascimento, Examinadora, IFTO

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Tocantins, onde foi realizada toda a minha jornada até aqui, graças a universidade pública e de qualidade hoje finalizo uma das mais importantes e intensas caminhadas.

A todos os servidores, em especial a Edileusa por ter me salvado diversas vezes, “Edilinda” você é a melhor.

A todo o corpo docente do curso de Ciências biológicas, vocês foram fundamentais para a minha formação profissional e científica, obrigada por todo conhecimento transmitido.

A todos aqueles que me deram carona no início da graduação durante o meu trajeto Porto/Palmas, aos amigos que pude fazer graças a essas caronas, seu Zé, obrigada por as vezes me levar até literalmente na porta de casa sempre com um sorriso no rosto.

Ao laboratório de microbiologia (LabMic) da Universidade Federal do Tocantins – *campus* Porto Nacional, por ser “minha casa”, aqui vivi dias, noites, madrugadas, onde aquelas bancadas já presenciaram muitos sorrisos e principalmente muitas lagrimas, por todo o espaço e equipamentos necessários para que toda a minha pesquisa pudesse ser desenvolvida.

Ao meu orientador, Dr. Fabyano Alvares Cardoso Lopes, por todo apoio, paciência, companheirismo, confiança, ensinamentos, “puxões de orelha”. Seus conselhos e sua empolgação por ensinar me fizeram despertar uma paixão enorme por tudo que hoje faço, você me mostrou que podemos fazer qualquer coisa desde que tenhamos em mente onde queremos chegar, obrigada por tudo, você foi fundamental para tudo isso.

A toda a minha família, em especial a minha mãe Magda, por todo apoio, amor, carinho, atenção, conselhos, ajuda, tudo isso é pra você e por você mamãe. Obrigada por me ensinar a ser quem sou, por me ensinar a ser sensível e bondosa, a amar, ajudar, ser prestativa e humilde como você, meu maior e mais lindo exemplo de vida sempre será você, eu te amo infinitamente.

Ao meu irmão Fabricio, você sempre foi uma inspiração de pessoa pra mim, por sempre cuidar e me proteger de tudo, amo você, obrigada por ser um pai tão exemplar pra Elóia.

A minha cunhada Mileyde, obrigada por ter entrado para a família e por ter me presenteado com o meu bem mais precioso, nossa Elóazinha.

A minha sobrinha “Elózinha”, você mudou tudo aqui, me fez melhor como pessoa, um dia vou te ensinar a amar a biologia e os animais, sempre te cuidar e proteger, te amando incondicionalmente.

Aos membros do (LabMic), em especial a Kamila Lourrane começamos juntas essa jornada, obrigada por dividir aquelas bancadas comigo, debater resultados, dividir ensinamentos e conquistas.

A Vanice Nascimento, por sempre fazer boas considerações nos meus trabalhos e ser tão prestativa sempre.

A Rafaela Batista, que chegou recentemente, mas conseguiu deixar os dias tensos de trabalho bem melhores, obrigada por sempre me ajudar, compartilhar boas risadas, memes e ser tão gentil.

A Victoria Silva, por ser tão paciente, carinhosa, prestativa, amável, você esteve presente dividindo momentos únicos e importantes para mim, tanto bons quanto ruins, obrigada por tudo, você é inspiradora, inteligente e muito forte, obrigada por acreditar em mim e principalmente por me fazer acreditar em mim mesma. A Paleontologia tem sorte em ter você, você é uma pesquisadora incrível.

Ao Pedro Marinho, obrigada pelos cafezinhos juntos, pelas risadas, pelas dicas e curiosidades que só você traz, você é gigante, inspirador, um grande pesquisador, espero que sempre acredite em você assim como eu acredito, nunca desista, a ictiologia precisa de você!

A Pietra Montanuci, obrigada por ser tão sensível e prestativa, por me levar e buscar nos estágios na escola, por dividir bons momentos, risadas, fofocas e algumas lágrimas também “não chora, senão eu choro também”, obrigada por tornar meus dias melhores e mais alegres, por me ensinar todos os “macetes” pra ordem de insetos, você é uma pesquisadora foda.

A Lia Oliveira, sua paixão pela ciência é linda e inspiradora, obrigada pelo carinho, por ser tão gentil, atenciosa, e me ensinar tanto sobre insetos e principalmente suas preciosas “mutuquinhas”, você tornou meus dias melhores e mais alegres, a taxonomia tem muita sorte de ter alguém tão foda quanto você “Lione”.

A Celine Mascarenhas, obrigada por ceder sua casa, dividir seus conhecimentos em inglês e ser tão prestativa.

A Daniela Bandeira, por estar comigo desde o primeiro período, já dividimos, casa, quarto, laboratório, e boas risadas.

A minha amiga mais linda, Denay Mascarenhas, você faz parte disso, obrigada por todas as vezes em que me segurou para que eu não caísse, por sua amizade, seu carinho, seu cuidado, todas as vezes que me alimentou, me aconselhou, que me abraçou, amo você Deny.

A Maria Laura, minha irmã, minha vizinha, minha parceira de vida, por todo companheirismo, todos os momentos compartilhados, todos os cafés com fofoca, por dividir momentos difíceis, você é luz, a Tia Dica (*in memorian*) de onde estiver vai estar sempre com orgulho de quem estamos nos tornando, obrigada por tudo, amo você nega.

A Rhayane Leite, por todo companheirismo, por ser a melhor dupla na sinuca e me ajudar a carregar o peso de sermos Bicampeãs do inter-atléticas, por ser tão gentil e prestativa.

Ao Valdionys, a Tatiane, por serem os melhores colegas de bloco, e tornarem meus dias na moradia melhores e menos estressantes, obrigada por me receberem tão bem.

Aos “boiológos”, Ana Luiza, José Carlos, Gabriel Samora, Bruna Andrade, Nicole Kavalerski, Lourrane Azevedo, Lucas Borges, obrigada por fazerem parte disso.

A todos que me ajudaram e me acolheram direta ou indiretamente, meu muito obrigada.

A todos que acreditam na educação pública, na ciência e na pesquisa!

*“Eu acho que somos quem somos por várias razões, e talvez nunca conheçamos a maior parte delas, e mesmo que não tenhamos o poder de escolher quem vamos ser, ainda podemos escolher aonde iremos a partir daqui.”*

**As vantagens de ser invisível**



## RESUMO

O fungo do gênero *Trichoderma* vem sendo utilizado com sucesso nos últimos anos como um eficaz Agente de Controle Biológico (ACB) de patógenos fúngicos que atacam culturas de grande interesse econômico, isso se deve a sua alta capacidade de ser encontrado ou cultivado em diversos solos e substratos diferentes, além de possuir um crescimento acelerado e contribuir de forma direta na diminuição do uso de insumos importados como agroquímicos sintéticos. O estudo teve como objetivo avaliar a eficiência de isolados do gênero *Trichoderma* contra o fitopatógeno *Fusarium solani*. Após a realização dos testes de avaliação da inibição por meio de metabólitos voláteis e não voláteis, teste de antagonismo e avaliação da atividade enzimática de (NAGase, quitinase e  $\beta$ -1-3-glicanase) de isolados de *Trichoderma* com o fitopatógeno *F. solani*, foi possível observar que, o isolado *T. harzianum* ALL-42 foi considerado o mais eficiente no método de culturas pareadas. Os isolados *T. harzianum* ALL-42 e *T. asperelloides* TR-356 apresentaram as maiores atividades na presença do micélio macerado do fitopatógeno *F. solani*. Dentre os isolados presentes no trabalho o *Trichoderma* spp.1 e *Trichoderma* spp.2 foram os que apresentaram os menores resultados na maioria dos testes, no entanto isso não exclui suas possíveis potencialidades, como promotores do crescimento de plantas e competição. Os isolados *T. harzianum* ALL-42 e *T. asperelloides* TR-356 se destacaram como potenciais ACBs a serem aplicados em campo no controle de pragas agrícolas, produção enzimática e uso biotecnológico. Conclui-se que as espécies de *Trichoderma* possuem potencial para atuar na inibição e que já se sabe que contribui também no crescimento e produtividade de culturas. No entanto, novos testes necessitam ser realizados, assim como estudos mais aprofundados para investigação desse gênero e de suas contribuições para a pesquisa científica.

**Palavras-chave:** Agroquímicos, Controle biológico, Fitopatógeno, *Trichoderma*.

## ABSTRACT

The fungus of the genus *Trichoderma* has been successfully used in recent years as an effective Biological Control Agent (BCA) for fungal pathogens that attack crops of great economic interest; the effectiveness of BCA is due to 1) its high capacity to be found or cultivated in different soils and different substrates, 2) to own an accelerated growth, and 3) to contribute for the reduction of the use of inputs such as synthetic agrochemicals. The study aimed to evaluate the efficiency of fungi of the genus *Trichoderma* isolated from the Cerrado of Tocantins against the phytopathogen *Fusarium solani*. After performing the tests to evaluate the inhibition by volatile and non-volatile metabolites, antagonism test, and evaluation of the enzymatic activity (NAGase, quitinase  $\beta$ -1-3-glucanase) of *Trichoderma* isolates such as the phytopathogen *F. solani*, it was possible to observe that the isolate *T. harzianum* ALL-42 was considered the most efficient in the paired culture method. The isolates *T. harzianum* ALL-42 and *T. asperelloides* TR-356 showed the highest activities in the presence of macerated mycelium of the phytopathogen *F. solani*. Among the isolates present in the work, *Trichoderma* spp.1 and *Trichoderma* spp.2 were the ones that presented the lowest results in most tests; however, this does not exclude their possible potential as promoters of plant growth and competition. The isolates *T. harzianum* ALL-42 and *T. asperelloides* TR-356 stood out as potential biological control agents to be applied in the field in the control of agricultural pests, enzyme production and biotechnological use. It is concluded that the species of *Trichoderma* have the potential to act in inhibition and that it is already known that it also contributes to the growth and productivity of cultures. However, new tests need to be performed, as well as further studies to investigate this genre and its contributions to scientific research.

**Keywords:** Agrochemicals, Biological control, Phytopathogen, *Trichoderma*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Placas de isolados de <i>Trichoderma</i> crescidos em meio BDA.....	18
Figura 2. Foto de microcultivo de <i>Trichoderma</i> e <i>Rhizoctonia solani</i> .....	19
Figura 3. Visualização macromorfológica do fungo <i>Fusarium solani</i> crescido em meio BDA.....	22
Figura 4. Etapas da indução de crescimento micelial do fitopatógeno.....	27
Figura 5. Etapas para produção de enzimas de isolados de <i>Trichoderma</i> contendo micélio macerado de <i>F. solani</i> .....	28
Figura 6. Fungos crescidos em meio de cultura BDA.....	31
Figura 7. Avaliação da inibição do crescimento de <i>F. solani</i> por isolados de <i>Trichoderma</i> por meio de metabólitos voláteis em placas contendo meio BDA.....	32
Figura 8. Avaliação da inibição do crescimento de <i>F. solani</i> por isolados de <i>Trichoderma</i> por meio de metabólitos não voláteis em placas contendo meio BDA .....	34
Figura 9. Teste de culturas pareadas utilizando isolados de <i>Trichoderma</i> e o fitopatógeno <i>Fusarium solani</i> em meio BDA.....	36
Figura 10. Avaliação do teste de culturas pareadas de isolados de <i>Trichoderma</i> contra o fitopatógeno <i>F. solani</i> .....	36
Figura 11. Atividades específicas de NAGase (U/mg) de isolados <i>Trichoderma</i> na presença de micélio macerado do fitopatógeno <i>F. solani</i> .....	38
Figura 12. Atividades específicas de Quitinase (U/mg) de isolados <i>Trichoderma</i> na presença de micélio macerado do fitopatógeno <i>F. solani</i> .....	39
Figura 13. Atividades específicas de $\beta$ -1,3-Glicanase (U/mg) de isolados <i>Trichoderma</i> na presença de micélio macerado do fitopatógeno <i>F. solani</i> .....	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação do efeito inibitório de metabólitos voláteis de isolados de *Trichoderma* sobre o fitopatógeno *F. solani*..... 33

Tabela 2 - Comparação do efeito inibitório de metabólitos não voláteis de isolados de *Trichoderma* sobre o fitopatógeno *F. solani*..... 34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACB</b>	Agente de Controle Biológico
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>BDA</b>	Batata Dextrose Ágar
<b>GO</b>	Goiás
<b>MIP</b>	Manejo Integrado de Pragas
<b>MYG</b>	Malt Yeast Glucose medium (meio Malte Levedura Glicose)
<b>TLE</b>	<i>Trichoderma</i> Liquid Enzyme Production medium (meio líquido para Produção de enzima para <i>Trichoderma</i> )
<b>TO</b>	Tocantins
<b>UFG</b>	Universidade Federal de Goiás
<b>UFT</b>	Universidade Federal do Tocantins

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>1.1</b>	<b><i>Trichoderma</i>: agente de controle biológico</b> .....	17
<b>1.2</b>	<b><i>Fusarium solani</i></b> .....	21
<b>1.3</b>	<b>Importância da procura de ACBs</b> .....	23
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	24
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	24
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	24
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
<b>3.1</b>	<b>Isolados utilizados</b> .....	25
<b>3.2</b>	<b>Coleta e isolamento de <i>Trichoderma spp.</i></b> .....	25
<b>3.3</b>	<b>Teste de avaliação do efeito de metabólitos voláteis na inibição do crescimento de <i>F. solani</i></b> .....	26
<b>3.4</b>	<b>Teste de avaliação do efeito de metabólitos não voláteis na inibição do crescimento de <i>F. solani</i></b> .....	26
<b>3.5</b>	<b>Teste de Avaliação do antagonismo de <i>Trichoderma</i> contra <i>F. solani</i></b> .....	26
<b>3.6</b>	<b>Indução enzimática de isolados de <i>Trichoderma</i> com micélio macerado de <i>F. solani</i></b> .....	27
<b>3.7</b>	<b>Avaliação da Atividade Enzimática de <i>Trichoderma</i> contra micélio macerado de <i>F. solani</i></b> .....	29
<b>3.7.1</b>	<b><i>NAGase</i></b> .....	29
<b>3.7.2</b>	<b><i>Quitinase</i></b> .....	29
<b>3.7.3</b>	<b><math>\beta</math>-1-3-glicanase</b> .....	29
<b>3.8</b>	<b>Dosagem de Proteínas Totais</b> .....	30
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	31
<b>4.1</b>	<b>Manutenção dos Isolados</b> .....	31

<b>4.2</b>	<b>Avaliação do efeito de metabólitos voláteis na inibição do crescimento de <i>F. solani</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>4.3</b>	<b>Avaliação do efeito de metabólitos não voláteis na inibição do crescimento de <i>F. solani</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>4.4</b>	<b>Avaliação do antagonismo de isolados de <i>Trichoderma</i> contra <i>F. solani</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>4.5</b>	<b>Avaliação das atividades enzimáticas dos isolados de <i>Trichoderma</i> contra o fitopatógeno <i>F. solani</i>.....</b>	<b>37</b>
4.5.1	<i>NAGase</i> .....	38
4.5.2	<i>Quitinase</i> .....	39
4.5.3	<i>β-1-3-glicanase</i> .....	40
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>42</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>43</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O cenário brasileiro é marcado pelo agronegócio em geral, sendo ele uma das suas maiores fontes de economia com produtos agrícolas, tanto em consumo interno, como em exportação, além de assumir a linha de frente de grande parte das gerações de emprego e implementações em tecnologia. De acordo com Pignat *et al.* (2017) para manter esse papel importante frente a economia, esse setor tem utilizado de maneira intensa insumos químicos, sementes transgênicas, fertilizantes e agroquímicos. Segundo a EMBRAPA (2016), o Brasil é o líder mundial no setor do agronegócio, contudo, essa liderança vem impactando diretamente numa dependência crescente de insumos importados, com ênfase em agroquímicos sintéticos, tornando o país um dos líderes mundiais no consumo desses produtos.

De acordo com o Art. 2º da Lei Federal 7.802, de 11 de Julho de 1989, os agroquímicos podem ser definidos como produtos ou agentes de processos físicos, químicos ou biológicos utilizados na produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagem e proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas, assim como, de ambientes urbanos, hídricos e industriais, com a finalidade de alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (BRASIL, 1989).

De acordo com o trabalho Nascimento (2022) o Tocantins esteve durante várias décadas envolvido com a consolidação das atividades agrícolas no domínio Cerrado, principalmente na criação e cultivo de soja, além de outras culturas de interesse econômico como (ex: milho, sorgo, feijão, etc.). Contudo essa expansão na agricultura por parte do estado, levou o mesmo a consumir uma quantidade considerável de produtos químicos afim de manter em alta a produtividade em seus cultivos.

Apesar dos efeitos benéficos nas culturas agrícolas os agroquímicos quando aplicados de forma inadequada ou exagerada podem vir a causar danos severos ao solo e aos organismos presentes no mesmo aumentando a resistência de patógenos do cultivo atual e dos demais que estão por vir (LOPES & ALBUQUERQUE, 2018). Além de causar problemas ambientais abrangentes, os agroquímicos são nocivos à saúde humana, tanto aos que residem nas proximidades, quanto aqueles que futuramente venham a consumir tais produtos (PUNJA & UTKHEDE, 2003). Esses fungicidas químicos possuem uma especificidade bem definida, ou seja, atacam os fungos no solo no qual foi aplicado, no entanto, podem vir a eliminar até mesmo aqueles fungos que são benéficos às plantas deixando-as suscetíveis a patógenos de solo (PIRES *et al.* 2003).



Por volta da década de 1950, surgiu uma nova alternativa bem menos nociva no controle de patógenos agrícolas no geral, mais conhecida como “controle biológico”. A primeira publicação relacionada ao controle biológico foi com Foster, onde ele realizou o uso do fungo *Trichoderma* contra o vírus do mosaico do fumo, conseguindo êxito no controle da determinada praga (BETTIOL & MORANDI, 2009). O controle biológico busca a eliminação destes patógenos de forma natural utilizando-se de organismos vivos chamados de Agentes de Controle Biológico (ACB) podendo ser fungos, bactérias, insetos, entre outros. Segundo dados da EMBRAPA (2019) cerca de 80% das pragas podem ser controladas a partir da ação de inimigos naturais quando são adotadas estratégias preconizadas pelo manejo integrado de pragas (MIP). Outro indicador importante tem sido o aumento no número de registro de novos produtos contendo ACBs pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) tendo atualmente no Brasil 337 produtos de biocontrole registrados (EMBRAPA, 2021).

Os ACBs podem contribuir de forma positiva nas culturas produção e economia, visto que o crescimento no mercado de defensivos biológicos segue a tendência mundial de redução no uso de agroquímicos (RODRIGUES *et al.* 1998). Segundo MAPA (2020) a produção de insumos biológicos para controle de pragas e doenças agrícolas cresceu mais de 70% resultando em um faturamento de R\$ 464,5 milhões em vendas. Os ACBs são inofensivos a saúde humana e ao meio ambiente (são naturais da microbiota do solo) assim, devido a essas características estes vêm causando uma redução do uso de agroquímicos e propiciando um cultivo em equilíbrio nos ecossistemas.

Do ponto de visto econômico o inimigo natural efetivo é capaz de regular a densidade populacional de uma determinada praga mantendo-a em níveis abaixo do dano estabelecido para um determinado cultivo, devendo apresentar algumas características como: adaptabilidade as condições físicas do meio ambiente, especificidade a um determinado hospedeiro e alta capacidade de crescimento e desenvolvimento (BUENO *et al.* 2015). Atualmente, entre os organismos mais usados no controle biológico de pragas estão os fungos do gênero *Trichoderma*. De acordo com Benítez *et al.* (2004) 90% dos microrganismos utilizados no controle de patógenos são compostos por isolados desse gênero.

### **1.1 *Trichoderma*: agente de controle biológico**

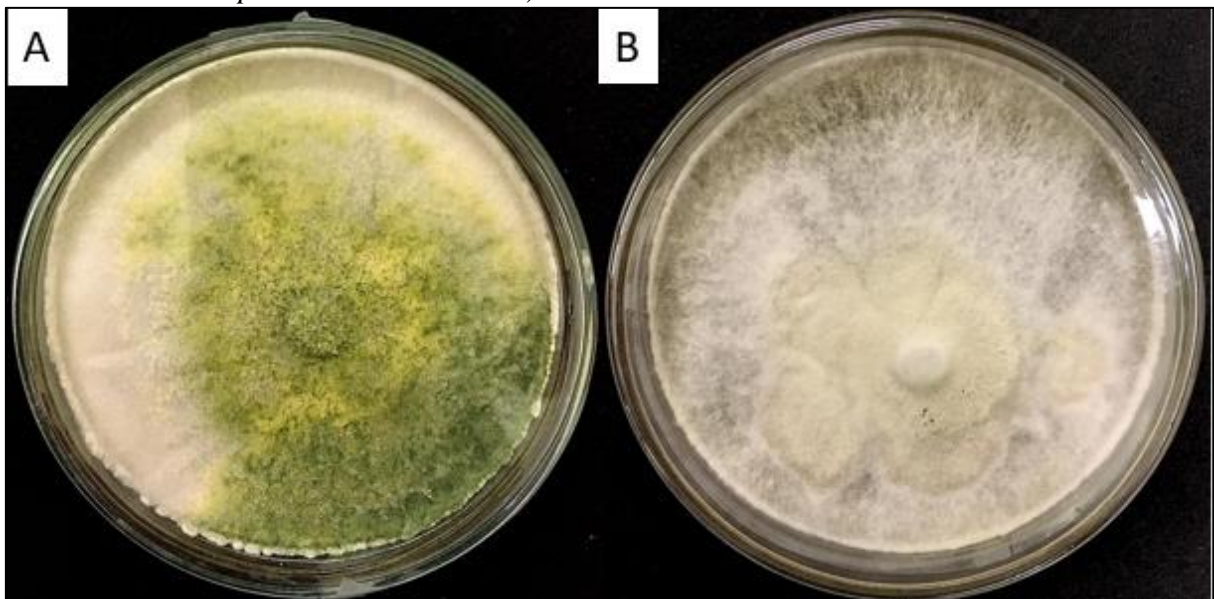
O fungo do gênero *Trichoderma* spp. é natural do solo e pode ser facilmente encontrado nos mais diversos locais, sendo que, possuem na literatura poucos relatos acerca desse gênero ser causador de doenças em plantas, no entanto, sua utilização no controle biológico tem sido cada vez mais cogitada por pesquisadores (KUBICEK *et al.* 2001; HARMAN, 2004). Esse

fungo é conhecido por sua alta capacidade de se disseminar pelo ambiente utilizando-se das mais diversas fontes de carbono, nitrogênio e substratos para produção de suas enzimas e metabólitos. Além de serem adaptados a diferentes condições climáticas ajustando assim seus mecanismos de sobrevivência (SCHUSTER & SCHMOOL, 2010). São conhecidos como agentes de biocontrole devido a suas atividades antagonistas e sua alta capacidade metabólica e sua natureza agressiva e competitiva contra diversos hospedeiros (KESWANI *et al.* 2014; SILVA *et al.* 2019).

De acordo com o banco de dados virtual GenBank (NCBI), que utiliza o *Index Fungorum* (<http://www.indexfungorum.org/>) como fonte de referência, sugere-se a classificação a seguir para ser utilizada como base para o acesso às espécies ou resultados de pesquisas submetidas: Domínio Eucaryota, “Grupo” Fungi/Metazoa, Reino Fungi, Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Sordariomycetes, Subclasse Hypocreomycetidae, Ordem Hypocreales, “Família” Hypocreales mitospóricos, Gênero *Trichoderma* (ou Família Hypocreacea, Gênero *Hypocrea* na forma teleomórfica). Esse *Index* constitui uma fonte de referência bastante confiável para fins acadêmicos devido a ser constantemente revisado e atualizado.

As cepas de *Trichoderma* podem ser facilmente observadas e identificadas através de caracteres morfológicos comuns de serem atribuídas e diferenciadas, como um pigmento de conídios verdes brilhantes, por apresentarem um crescimento rápido e se ramificarem bem, como observado na Figura 1.

Figura 1. Placas de isolados de *Trichoderma* crescidos em meio BDA. A) Placa contendo isolado *T. asperelloides* TR-356. B) Placa contendo isolado *T. harzianum* ALL-42.



Fonte: Santos, K. C. R (2022).

Estudos feitos por Corabi-Adell (2004) relataram que os isolados de *Trichoderma* spp. geralmente apresentam características morfológicas distintas facilmente reconhecíveis as quais incluem crescimento rápido em meio de cultura, rede micelial aérea hialina, septada, bastante ramificada e esparsa como visto na (Figura 2) além da produção de pústulas conidiógenas em sua maioria verde brilhante podendo ser soltos ou muito compactados em tufos.

Figura 2. Foto de microcultivo de *Trichoderma* e *Rhizoctonia solani*. Hifa mais delgada sendo do fungo *Trichoderma* com seus conidióforos evidentes, hifa maior sendo do fungo *R. solani*, coloração realizada com periódico de Schiff.



Fonte: Lopes, F. A. C (2012).

A esporulação assexuada é um processo reprodutivo comum em muitas espécies de fungos de importância médica, industrial e agrícola. Os esporos assexuados (conídios) têm uma função de dispersão ou dormência e também são usados como inóculo. Nesse sentido, os conídios são utilizados na preparação comercial de fungos benéficos, como os utilizados como agentes de biocontrole de fitopatógenos e os utilizados em processos industriais. É neste campo que *Trichoderma* é um gênero de particular interesse econômico (CARRERAS-VILLASEÑOR *et al.* 2012).

Ramada (2010) relata que espécies de *Trichoderma* podem apresentar efeitos diretos e indiretos, como competição por espaço e/ou nutrientes, produção de metabólitos voláteis e não

voláteis, produção de enzimas líticas, inativação de enzimas de patógenos e parasitismo. Já os efeitos indiretos podem ser tudo aquilo que produz na planta hospedeira tanto mudanças morfológicas quanto químicas, induzindo a mesma a aumentar a tolerância ao stress, roubo de nutrientes e resistência a doenças, no entanto esses mecanismos podem também ocorrer simultaneamente (VITERBO *et al.* 2002). Quando os microrganismos competem por espaço e nutrientes geralmente os mais fortes e resistentes tendem a sobreviver, com isso, espécies de *Trichoderma* costumam possuir essa capacidade superior frente a outros microrganismos, sobrevivendo as mais desfavoráveis e extremas condições, além de possuir a habilidade de obter ATP metabolizando diferentes açúcares presentes em ambientes fúngicos como celulose, glicanas e quitinas (CHET *et al.* 1997).

A influência de microrganismos no desenvolvimento de plantas é amplamente investigado e será possivelmente uma das táticas mais importantes para um aumento na produtividade no mundo. Os fungos do gênero *Trichoderma* se apresentam como um dos principais antagonistas para o desenvolvimento e rendimento da produção agrícola (CHAGAS *et al.* 2017). Ao colonizar raízes de plantas, alguns isolados de *Trichoderma*, conseguem promover mudanças na rizosfera, impedindo assim a colonização da mesma por fitopatógenos, como crescimento das raízes, e a estimulação da expressão de genes de defesa em plantas (HARMAN *et al.* 2004; VINALE *et al.* 2004). Essa associação entre o *Trichoderma*/ Planta hospedeira gera mudanças como aumento na produção de compostos terpenóides que estão ligados a defesa da planta, além da produção de giberelinas e auxinas promovendo o crescimento da mesma (WOO *et al.* 2006).

A produção de metabólitos secundários por *Trichoderma* spp., é um mecanismo de ação conhecido como antibiose, que depende da capacidade do agente de biocontrole produzir certos compostos, voláteis ou não voláteis, tóxicos a outros patógenos. Tais compostos são originados de rotas secundárias do metabolismo do antagonista e alguns exemplos são os peptaibols, terpenóides, pironas e policetídeos (RAMADA; LOPES; ULHOA, 2019).

Entre os mecanismos de atuação de *Trichoderma* spp. mais conhecidos e relatados na literatura o micoparasitismo é caracterizado pela beneficiação de um fungo parasita a partir de danos causados a outro fungo o hospedeiro, consistindo em ataques diretos levando a destruição de algumas das estruturas do hospedeiro (por exemplo, micélio, esporos e escleródios) utilizando seus componentes como fonte de nutrientes (BHAT, 2017). Esse mecanismo pode responder efetivamente ao biocontrole diante de algumas condições como (cepa que foi utilizada, patógeno alvo, cultura na qual foi aplicado, bem como condições ambientais

favoráveis de pH, temperatura, salinidade e nutrientes disponíveis) (ZIN & BADALUDDIN, 2020).

O micoparasitismo é um dos mais efetivos mecanismos de espécies desse fungo, o mesmo inicia o processo crescendo em direção a hifa do hospedeiro fixando-se ou não nela, a partir disso enzimas de degradação da parede de fungos são secretadas pela indução a presença do hospedeiro promovendo a ruptura da parede do fungo hospedeiro e dando acesso ao seu conteúdo intracelular, onde o fungo micoparasita alimenta-se do conteúdo citosólico do fungo hospedeiro levando a destruição da sua hifa (SABA *et al.* 2012) isso é possível devido a carboidratos presentes na parede celular do parasita que se ligam a lectinas presentes na parede celular do hospedeiro dando origem a uma estrutura chamada de apressório que permite que o *Trichoderma* tenha acesso ao conteúdo intracelular do hospedeiro (MUKHERJEE *et al.* 2012; GUSMÁN-GUSMÁN *et al.* 2019). A parede celular de fungos patógenos que são hospedeiros do antagonista *Trichoderma* durante o micoparasitismo, determina qual será a produção de enzimas hidrolíticas pelo agente de controle biológico, ou seja, diversas espécies de fungos com paredes celulares de constituições diferentes podem vir a determinar a secreção de enzimas em quantidades e qualidades diferentes (QUALHATO *et al.* 2013; NAUOM *et al.* 2018).

De acordo com estudos de Cai *et al.* (2015) outro mecanismo procedente do *Trichoderma* é liberação de compostos semelhantes a hormônios ou fitohormônios que melhoram o crescimento de plantas e auxilia no desenvolvimento das raízes. Carvalhais *et al.* (2015) relata em seu trabalho que o bom e rápido desempenho no crescimento das plantas influencia os microrganismos presentes naquele determinado solo através da emissão de exsudatos radiculares, que disponibiliza mais nutrientes para o consumo microbiano. O sucesso desse gênero nos ecossistemas naturais é bem relatado devido a sua atuação como decompositor, atuando também no desenvolvimento de plantas através da absorção de nutrientes, alterando assim, a rizosfera. Esse fungo possui uma incrível capacidade de resistir a ambientes pouco propícios a sua sobrevivência, além de possuir uma imensa força destrutiva contra patógenos (BENÍTEZ *et al.* 2004; HARMAN, 2006).

Esse ACB é eficaz a diferentes fitopatógenos, isso se deve a sua alta capacidade de ser encontrado ou cultivado em diversos solos e substratos diferentes, além de possuir um crescimento acelerado. Os organismos do gênero *Trichoderma* são antagonistas de vida livre e presentes, em sua maioria, em regiões de clima tropical e temperado (ABREU & PFENNING, 2019). Além dessa capacidade antagonica, esses ACBs promovem o crescimento vegetal e indução a resistência das plantas (MACHADO *et al.* 2012). Diversos estudos comprovam a eficácia de isolados de *Trichoderma* frente à fitopatógenos encontrados no solo, responsáveis

pela infecção de raízes e incidência de podridões nas mesmas, como os fungos do gênero *Fusarium*, *Rhizoctonia* e *Sclerotinia* (LUCON, 2014).

Além dessa versatilidade de *Trichoderma*, outro fator que o faz importante agente de controle biológico, principalmente contra patógenos habitantes de solo, é sua capacidade de se estabelecer no solo e atacar diretamente as estruturas de sobrevivência, como escleródios e microescleródios, diferentemente dos fungicidas químicos. Assim, *Trichoderma* pode ser um grande aliado no manejo de doenças causadas por patógenos como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina*, entre outros (BOTELHO, 2022).

## 1.2 *Fusarium solani*

O gênero *Fusarium* spp. de acordo com a classificação taxonômica, constitui um estado anamorfo da ordem Hypocreales, filo Ascomycota, classe Sordariomycetes e família Nectriaceae (WALKER *et al.* 2016), possui ampla distribuição, tendo a maioria das espécies fungos patógenos de diversas culturas de interesse econômico (ex: cereais, milho, trigo, cevada e aveia). São fungos filamentosos e bem distribuídos tanto em solos como em plantas, possuindo a capacidade de se desenvolver a 37 °C eles são considerados oportunistas podendo causar diversas doenças, sendo as espécies mais famosas consideradas patogênicas (*F. solani*, *F. oxysporum* e *F. verticilloides*) (TAPIA & AMARO, 2014). A infecção causada por fungos desse gênero acomete diversos problemas no produto final, como baixa qualidade, isso se deve ao fato de produzirem as chamadas micotoxinas, que são responsáveis por doenças tanto em humanos quanto animais (NICOLAISEN *et al.* 2009).

Espécies desse gênero são conhecidas por serem oportunistas altamente bem sucedidos, caracterizados por se dispersarem rapidamente, contaminando as mais diversas culturas, sendo as sementes dessas o alvo da maioria de suas doenças (MACIEL, 2016). Algumas culturas de grande interesse econômico têm sofrido inúmeras perdas em sua produção devido a ataques de doenças patogênicas que afetam sua produtividade, além de reduzir drasticamente o seu valor comercial (RAMADA, 2010). A maioria dessas perdas de ataques a lavouras tanto no Brasil como em todo mundo são atribuídas a fitopatógenos, forçando os produtores a utilizarem altíssimos capitais para realizar seu controle (OARD *et al.* 2004). Fitopatógenos como (*F. solani*, *F. oxysporum*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*) tem acarretado as mais diversas infecções em lavouras brasileiras, promovendo perdas graves de até 100% de sua produção, em especial em culturas de batata e feijão, que são comuns de serem cultivadas nos Cerrados, ficando assim,



caracterizadas como sendo um dos maiores problemas a ser superado pela agricultura brasileira (HALL & NASSER, 1996; CAFÉ FILHO & LOBO Jr, 2000; LOBO Jr, 2002).

Dentre o gênero *Fusarium*, a espécie *Fusarium solani* (Figura 3) é a mais complexa e capaz de infectar diversas culturas (ex. soja, milho, feijão e trigo) e em diferentes estágios de desenvolvimento, sendo que a complexidade do solo e a variabilidade genética existentes no *F. solani* tornam as doenças causadas por ele de difícil controle, permanecendo presentes no solo por várias estações (MILANESI *et al.* 2013). Entre os sintomas que essa espécie pode causar em plantas se pode citar o amarelecimento das folhas, descoloração do sistema vascular, murcha da planta e podridão radicular (ROCHA *et al.* 2016). A doença causada por *Fusarium solani* ataca desde plantas jovens até as adultas causando nestas sintomas como, murcha, desfolhamento e podridão das raízes e podem ser encontradas muitas vezes em solos pobres e secos (DA SILVA & TEIXEIRA, 2012).

Figura 3. Visualização macromorfológica do fungo *Fusarium solani* crescido em meio BDA.



Fonte: Santos, K. C. R (2022).

De acordo com Lopes (2012) esse fungo utiliza-se de estratégias como, produção de uma vasta variedade de metabólitos secundários tóxicos e bioativos para colonização do hospedeiro. Durante períodos de seca os sintomas provocados pelo patógeno tende a se intensificar devido à baixa utilização de água e nutrientes pela planta, implicando assim em uma limitação no desenvolvimento da mesma. Outros patógenos como os fungos *Pythium* spp.

e *Rhizoctonia* spp. e nematoides podem afetar em conjunto as raízes da planta intensificando ainda mais os sintomas da cultura (TEIXEIRA *et al.* 2009).

Apesar de serem conhecidos mundialmente como fungos patogênicos que atacam plantas, estudos demonstram que também podem causar infecções em humanos, as chamadas fusarioses. Após um estudo realizado no Hospital Geral de Massachusetts, composto por 26 casos de fusariose, sendo a cutânea a que mais ocorreu, foi identificado que a fusariose é mais comum de ocorrer em pacientes que já estejam imunocomprometidos (MUHAMMED *et al.* 2013; NUCCI & ANAISSIE, 2007; NUCCI & ANAISSIE, 2019).

Esse patógeno ocorre, especialmente, em locais de climas tropicais e subtropicais e é capaz de sobreviver por longos períodos no solo pela formação de estruturas chamadas clamidósporos. O fungo pode colonizar ramos, folhas, inflorescências e frutos através de seus conídios, que são disseminados pelo ar, pela água, equipamentos agrícolas, pela complexidade do sistema solo e pela diversidade de espécies existentes nesse ambiente (MILANESI, 2009).

### **1.3 Importância da procura de ACBs**

Conhecer as comunidades da fauna edáfica é um requisito essencial na busca por um adequado e sustentável manejo do solo que, além de conservar a biodiversidade, também possibilita ações importantes desses organismos no ecossistema. Apesar de estarem, na sua maioria ocultos, pelo fato de se localizarem dentro do solo ou da serapilheira, este grupo gera importantes serviços ambientais, que são, infelizmente, pouco reconhecidos e valorizados (BROWN *et al.* 2015). O solo é um sistema vivo e heterogêneo, composto de muitas associações microbianas, sendo estas bastante sensíveis a modificações físicas e químicas tais como alterações no modo de cultivo, uso de agroquímicos ou de substâncias biologicamente ativas que podem afetar o equilíbrio microbiano (DOMINGOS, 2020).

De acordo com Poletto *et al.* (2006) os fungos patogênicos oportunistas não-especializados, em geral são polívoros (atacam um grande número de espécies vegetais), além de utilizarem matéria orgânica como substrato, são também colonizadores de resíduos vegetais altamente sucedidos, com poder de contaminar diferentes tipos de culturas agrícolas. O mecanismo mais utilizado para o controle desses fitopatógenos são os agroquímicos sintéticos e mesmo que sejam eficientes, sua utilização de maneira contínua faz com que esses patógenos de solo venham a se tornar resistentes ao seu uso, bem como propiciar o surgimento de patógenos secundários (PIRES *et al.* 2003). O *Trichoderma* vem sendo considerado um fungo singular do ponto de vista de seu potencial de aplicabilidade na produção sustentável, visto que a principal característica das espécies é que são dotadas de grande oportunismo, apresentando alta capacidade de colonizar a rizosfera das plantas e muitos substratos com diferentes



características, em ambientes bastante distintos. Muito além do biocontrole de doenças de plantas, o *Trichoderma* também tem demonstrado seu potencial como promotor de crescimento em diversas culturas e um indutor de defesas das plantas (SOUZA; BRITO; REGO, 2021).

Diante disso, é de suma importância, a procura de ACBs eficazes contra o crescimento desses patógenos agrícolas, visto que o combate desses tem se tornado mais difícil devido à resistência adquirida aos agroquímicos, além de estarem associados à busca por inovações na biotecnologia, melhorias no cultivo e qualidade do produto final (sem o uso de agroquímico ou com um volume reduzido). Com a finalidade de aproximar a forma de produção convencional da sustentabilidade, muitas ações de pesquisa são necessárias para o entendimento dos mecanismos de ação envolvidos nas interações entre os agentes de biocontrole, os patógenos, as plantas e o ambiente (DOLINSKI, 2022).

A necessidade de cultivos de maior qualidade e baixa nocividade, tanto a saúde humana quanto ao meio ambiente, são fundamentais. Portanto, a procura de novos ACBs, como os fungos do gênero *Trichoderma*, contribui diretamente na construção de um cenário mais sustentável, partindo da ideia de que esses fungos são antagonistas dos principais fitopatógenos de grande impacto agroeconômico e aumentam a produtividade das culturas em que são aplicados, além de existir um grande mercado para esse ser comercializado.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a eficiência de fungos do gênero *Trichoderma* isolados do Cerrado do Tocantins contra os fitopatógeno *Fusarium solani*, utilizando dois isolados ALL-42 e TR-356 como controle para comparação da eficiência dos novos isolados.

### 2.2. Objetivos específicos

- Realizar a coleta, isolamento e microcultivo de organismos provenientes de solo, folhas de árvores e serapilheira em área do Cerrado tocantinense, para visualização de estruturas como conídios, clamidósporos e fiálides, características específicas do gênero *Trichoderma*;
- Avaliar a atividade das enzimas N-acetil-glicosaminidase (NAGase),  $\beta$ -1,3-glicanase e quitinase, dos isolados *Trichoderma* em presença de *F. solani*;
- Comparar o potencial de inibição de crescimento micelial dos isolados de *Trichoderma* contra o fungo *F. solani*, por meio da produção de metabolitos voláteis e metabolitos não voláteis;
- Avaliar da capacidade antagônica de isolados de *Trichoderma* contra o fitopatógeno *F. solani*, através do teste de pareamento;
- Aplicar/efetuar o treinamento em técnicas de enzimologia e bioquímica de microrganismos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Isolados utilizados

Foram utilizados o fitopatógeno *Fusarium solani* e os antagonistas *Trichoderma harzianum* ALL-42 e *Trichoderma asperelloides* TR-356 cedidos pelo laboratório de Enzimologia – UFG (Goiânia -GO), sendo que os isolados ALL-42 e TR-356 foram utilizados como controle para comparação da eficiência dos dois novos isolados *Trichoderma* spp.1 e *Trichoderma* spp.2 ambos obtidos através de coleta e isolamento no Cerrado tocantinense descrita a seguir.

#### 3.2 Coleta e Isolamento de *Trichoderma* spp.

As amostras de solo para o isolamento do *Trichoderma* spp. foram coletadas na fazenda de cultivo de açaí - Natyrë Agrícola, localizada à 20km da cidade de Lagoa da Confusão – TO (Latitude: -10.792104524669709, Longitude: -49.7834063455589). Essas amostras de solo foram coletadas com auxílio de uma pá nos seguintes pontos: solo, rizosfera e raiz, onde todas as amostras foram constituídas de seis sub-amostras para os três pontos de coleta, em seguida foram homogeneizadas, sendo que os pontos do solo e rizosfera foram ainda peneiradas com auxílio de uma peneira de malha 2 mm. Após a coleta o solo foi acondicionado em sacos plásticos zipados sendo dispostos em caixa térmica sob temperatura de 4°C visando manter a viabilidade das amostras e posteriormente levados ao laboratório de Microbiologia – UFT/Porto Nacional - TO para a realização do isolamento de *Trichoderma*.

A técnica adotada para obtenção de colônias de *Trichoderma* foi a lavagem de solo proposta por Gams & Bissett, (1998) com modificações devido ao rápido crescimento e colonização da matéria orgânica do gênero *Trichoderma*, além de sua considerável esporulação. Para isso, 10g de solo foram transferidos para um Becker com capacidade de 200 ml contendo 60 ml de água destilada e submetida ao agitador magnético durante 5 minutos. Foram realizadas diluições seriadas de forma asséptica em capela de fluxo laminar, onde foi retirada de 0,1 ml da amostra original para 0,9 ml de água autoclavada, agitando-as a cada transferência. Após as diluições, 0,1 ml das suspensões  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  foram distribuídas e espalhadas nas placas de Petri, contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) com adição de 0,1 % de Triton X-100 e Ceftriaxona 200 ppm. As placas foram levadas para a estufa a 28 °C durante cinco dias, sendo que as colônias características do gênero *Trichoderma* foram transferidas para novas placas de Petri contendo meio de cultura BDA para posterior identificação baseada em métodos de microcultura e moleculares.

### **3.3 Teste de avaliação do efeito de metabólitos voláteis na inibição do crescimento de *F. solani***

O teste consistiu em posicionar fundos de placas de Petri umas sobre as outras, após ter vertido meio BDA solidificado em cada uma delas. Na extremidade inferior da placa, foram posicionados os isolados de *Trichoderma*, de forma individual, e na superior, foi posicionado o patógeno *Fusarium solani*, ambos em disco de ágar (10 mm) contendo micélio, mantidos em temperatura de 25°C, utilizando-se do crescimento do controle como referência (BHARAT *et al.* 1980). Os dados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de T ( $\alpha = 0,05$ ), no programa estatístico Sisvar®.

### **3.4 Teste de avaliação do efeito de metabolitos não voláteis na inibição do crescimento de *F. solani***

Para a produção dos metabólitos não voláteis foi utilizado o método descrito por Miranda (2020), onde foram utilizados frascos de Erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml de meio BDA (líquido), micélio macerado de *F. solani* (0,5 %), acrescido de 0,25 g/L de glicose e  $10^7$  esporos dos isolados de *Trichoderma*. O controle foi realizado contendo apenas glicose como fonte de carbono. Os frascos de Erlenmeyers foram incubados por 120 h, 150 rpm a 28 °C, sendo que o sobrenadante de cada frasco foi coletado e utilizado como fonte de metabólitos não voláteis. Alíquotas de 10 ml de sobrenadante foram submetidos à filtração e adicionados a 60 ml de meio BDA (líquido), acrescido de 2,0 g/L de glicose e 2,0 g/L de ágar previamente autoclavado (20 minutos, 121 °C e 1 atm) e vertidos em placas de Petri. Após a solidificação dos meios, um disco de 5 mm de diâmetro obtido de colônias ativas do fitopatógeno foi transferido para o centro de cada placa de Petri contendo o meio BDA solidificado contendo as alíquotas. As placas de Petri foram incubadas a 27 °C por 7 dias. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparadas pelo teste de T ( $\alpha = 0,05$ ), no programa estatístico Sisvar®.

### **3.5 Teste de Avaliação do antagonismo de *Trichoderma* contra *F. solani***

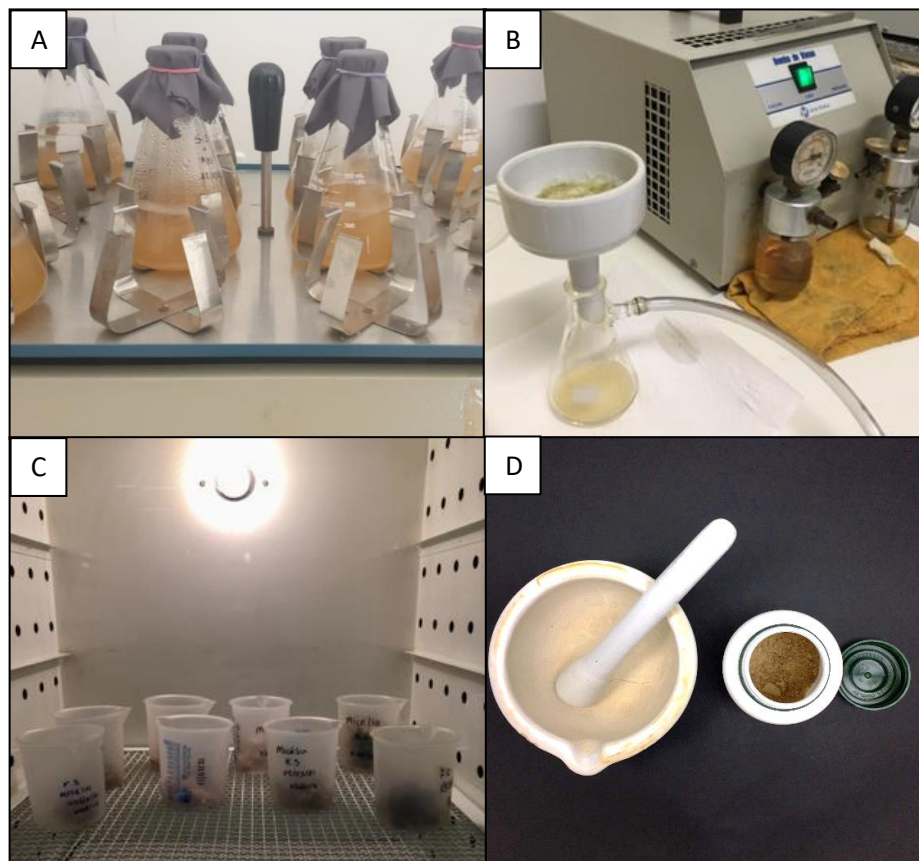
Foram avaliados os isolados de *Trichoderma* contra o fitopatógeno *Fusarium solani*. Discos de ágar (10 mm de diâmetro) contendo micélio do fitopatógeno e dos isolados de *Trichoderma* de colônias de três dias de cultivo foram depositados em extremidades opostas (1 cm da borda) das placas de Petri contendo meio BDA solidificado. A inoculação foi realizada em intervalos de tempos diferentes, sendo baseadas na velocidade de crescimento micelial dos

isolados de *Trichoderma* quanto ao do patógeno, sendo que os isolados de *Trichoderma* foram adicionados após o fitopatógeno atingir 1/3 da placa de Petri. Após a inoculação dos isolados, as placas foram armazenadas em temperatura de 25 °C, conforme descrito por Mello *et al.* (2007). Para realizar o controle foram feitas placas contendo apenas o fitopatógeno, sendo todo o teste realizado em triplicatas. Os dados coletados foram analisados segundo a escala de notas proposta por Bell *et al.* (1982).

### 3.6 Indução enzimática de isolados de *Trichoderma* com micélio macerado de *F. solani*

Inicialmente, foram realizadas induções de crescimento micelial do fitopatógeno, em frascos de Erlenmeyer de 500 ml contendo 300 mL de meio MYG [Extrato de malte 0,5 %, extrato de levedura 0,25 %, glicose 1,0 %] em temperatura de 24 °C, no Shaker a 180 rpm por 6 dias (Figura 4A) sendo que os micélios obtidos foram lavados e filtrados em uma bomba à vácuo (Figura 4B) e secados em estufa a 65 °C *overnight* (Figura 4C). Os micélios foram macerados com auxílio de um almofariz e um pistilo e armazenados à -20 °C (Figura 4D).

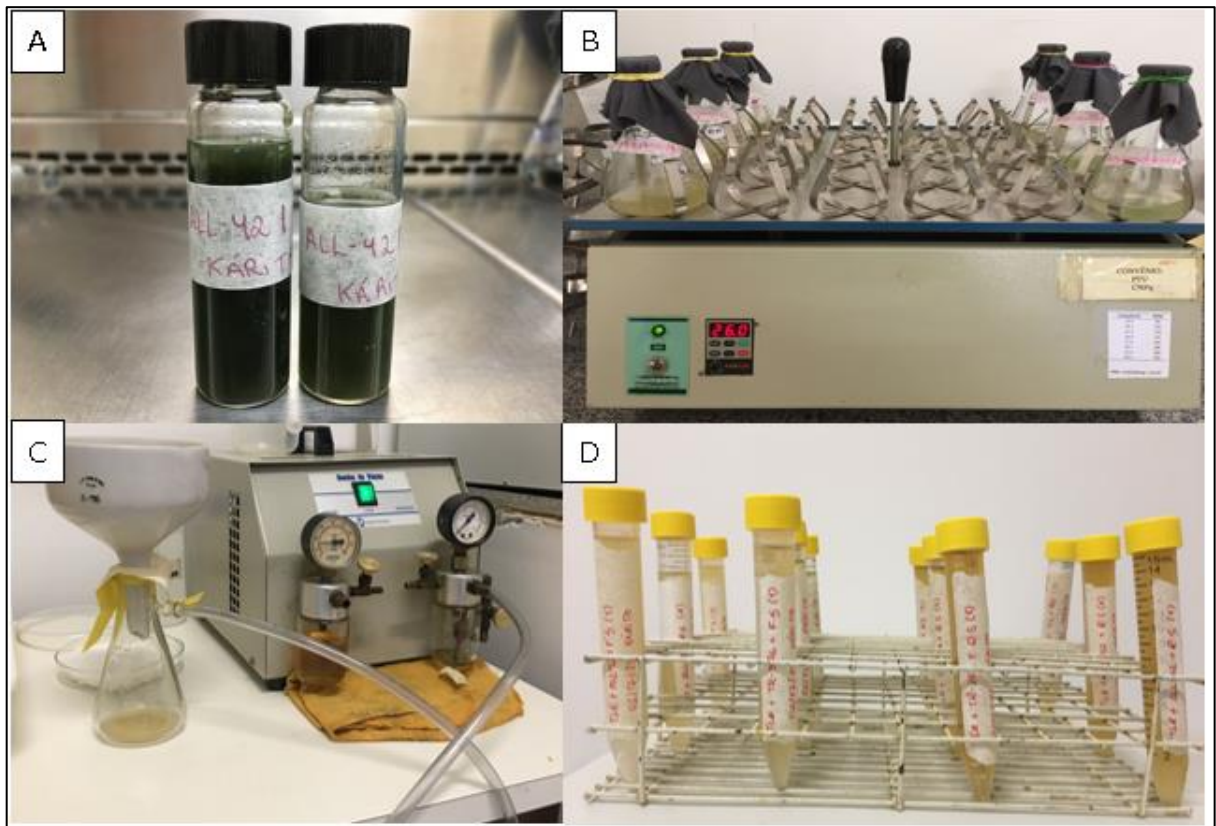
Figura 4. Etapas da indução de crescimento micelial do fitopatógeno. A) Frascos de Erlenmeyer contendo meio MYG no shaker à 180 rpm por 6 dias. B) Filtração dos micélios em bomba à vácuo. C) Micélios secando na estufa a 65 °C *overnight*. D) Micélios macerados com um almofariz e pistilo e armazenados no freezer a -20 °C.



Fonte: Santos, K. C. R (2022).

Para produção de enzimas foi utilizado o meio TLE [Bactopeptona 1,0 g/l, Ureia 0,3 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,4 g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,4 g/l,  $\text{MgSO}_4$  0,3 g/l,  $\text{CaCl}_2$  0,2 g/l, glicose 0,5 g/l, solução elementos traços 1 ml/L e 0,5 % de micélio macerado do fitopatógeno]. A solução  $10^7$  de esporos de isolados de *Trichoderma* foi obtida a partir da raspagem de placas dos isolados utilizando solução salina, após a raspagem foi realizada a contagem dos esporos utilizando a câmara de *New Bawer* e quantificados através da fórmula do número de esporos por ml (Figura 5A) foram transferidos para frascos de Erlenmeyers de 125 ml, contendo 20 mL de meio TLE. Esses frascos foram incubados em um Shaker a 120 rpm em temperatura de 28 °C por 48 h (Figura 5B). Após esse período o meio de cultura foi coletado por filtração a vácuo (Figura 5C) e o sobrenadante obtido foi armazenado a -20 °C, sendo utilizado como fonte de enzimas (Figura 5D).

Figura 5. Etapas para produção de enzimas de isolados de *Trichoderma* contendo micélio macerado de *F. solani*. A) Frascos contendo solução de  $10^7$  esporos de isolados de *Trichoderma*. B) Erlenmeyers com meio TLE e  $10^7$  esporos dos isolados a 120 rpm, por 48 h, a 28 °C. C) Filtração a vácuo do meio para obtenção do sobrenadante. D) Tubos Falcon contendo o sobrenadante obtido após a filtração a vácuo para utilização como fonte de enzimas.



Fonte: Santos, K. C. R (2022).

### 3.7 Avaliação da Atividade Enzimática de *Trichoderma* contra micélio macerado de *F. solani*

#### 3.7.1 NAGase

Esse procedimento foi realizado utilizando-se de 50 µl da amostra, 100 µl de solução pnp-derivado 5 mM e 350 µl de solução tampão de acetato de sódio 50 mM pH 6,0. Após um repouso de 15 minutos em banho-maria à 37 °C, foi acrescentado a preparação 1000 µl de NaOH 0,1 M, para realização da leitura do montante de  $\rho$ -nitrofenol em um espectrofotômetro a 405 nm, seguindo o que foi realizado no trabalho de Lopes *et al.* (2012). Uma unidade enzimática (U) foi estabelecida como quantia básica para gerar 1 µmol de  $\rho$ -nitrofenol por minuto. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparadas pelo teste de T, a 5 % de probabilidade, no programa estatístico Sisvar®.

#### 3.7.2 Quitinase

Para a dosagem de *quitinase* foi realizada a metodologia descrita por Ulhoa & Peberdy (1992), onde foram utilizados 50 µl da amostra, 150 µl de quitina coloidal levados ao banho-maria por 2 horas à 37 °C. Logo após foram adicionados 1000 µl de ácido 3,5-dinitrossalicílico (ADNS). Toda a solução foi fervida por 5 minutos à 95 °C e levada para leitura no espectrofotômetro a 540 nm. Uma unidade enzimática (U) foi estabelecida como quantia básica para gerar 1 µmol de açúcar redutor por minuto. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparadas pelo teste de T, a 5 % de probabilidade, no programa estatístico Sisvar®.

#### 3.7.3 $\beta$ -1-3-glicanase

A dosagem foi realizada a partir do que foi realizado no trabalho de Lopes *et al.* (2012) no qual foram acrescentados 50 µl da amostra a 100 µl de laminarina 0,25% em solução tampão de acetato de sódio 50 mM pH 5,0, que serão aquecidos a 40 °C por 30 minutos em banho-maria, em seguida será incluído 1000 µl de ácido 3,5-dinitrossalicílico (ADNS). Essa combinação será fervida por 5 minutos e analisada com o auxílio de um espectrofotômetro a 540 nm. Uma unidade enzimática (U) foi estabelecida como quantia básica para gerar 1 µmol de açúcar redutor por minuto. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparadas pelo teste de T, a 5 % de probabilidade, no programa estatístico Sisvar®.

### **3.8 Dosagem de Proteínas Totais**

Para realizar a verificação da concentração de proteínas foi adotada a técnica apresentada por BRADFORD (1976), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. Esse teste foi realizado com o auxílio de um espectrofotômetro a 595 nm, que fez a leitura da solução composta por 100 µl do sobrenadante para 1 ml do reagente de BRADFORD, após ter permanecido em repouso por 15 min em temperatura ambiente.

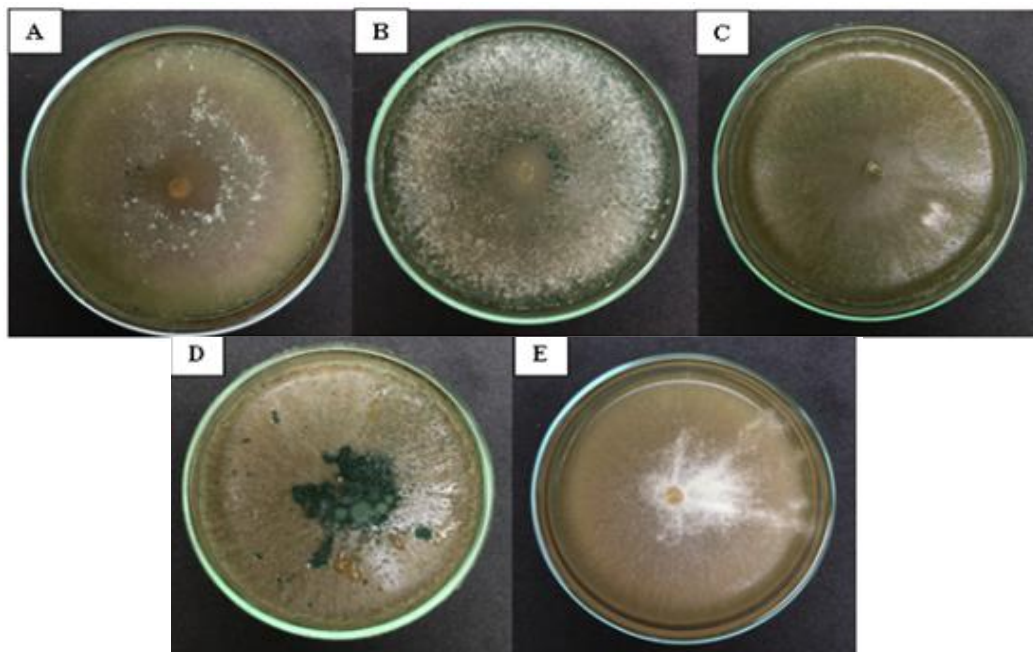


## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Manutenção dos isolados

A manutenção dos isolados dos fungos (Figura 6) *T. harzianum* ALL-42 (Figura 1A), *T. asperelloides* TR-356 (Figura 1B), *Trichoderma* spp.1 (Figura 1C), *Trichoderma* spp.2 (Figura 1D) e do fitopatógeno, *F. solani* (Figura 1E), foram realizadas por meio de repiques quinzenais, para manutenção da viabilidade das cepas.

Figura 6. Fungos crescidos em meio de cultura BDA. A) *T. harzianum* ALL-42. B) *T. asperelloides* TR-356. C) *Trichoderma* spp.1. D) *Trichoderma* spp.2. E) *Fusarium solani*.



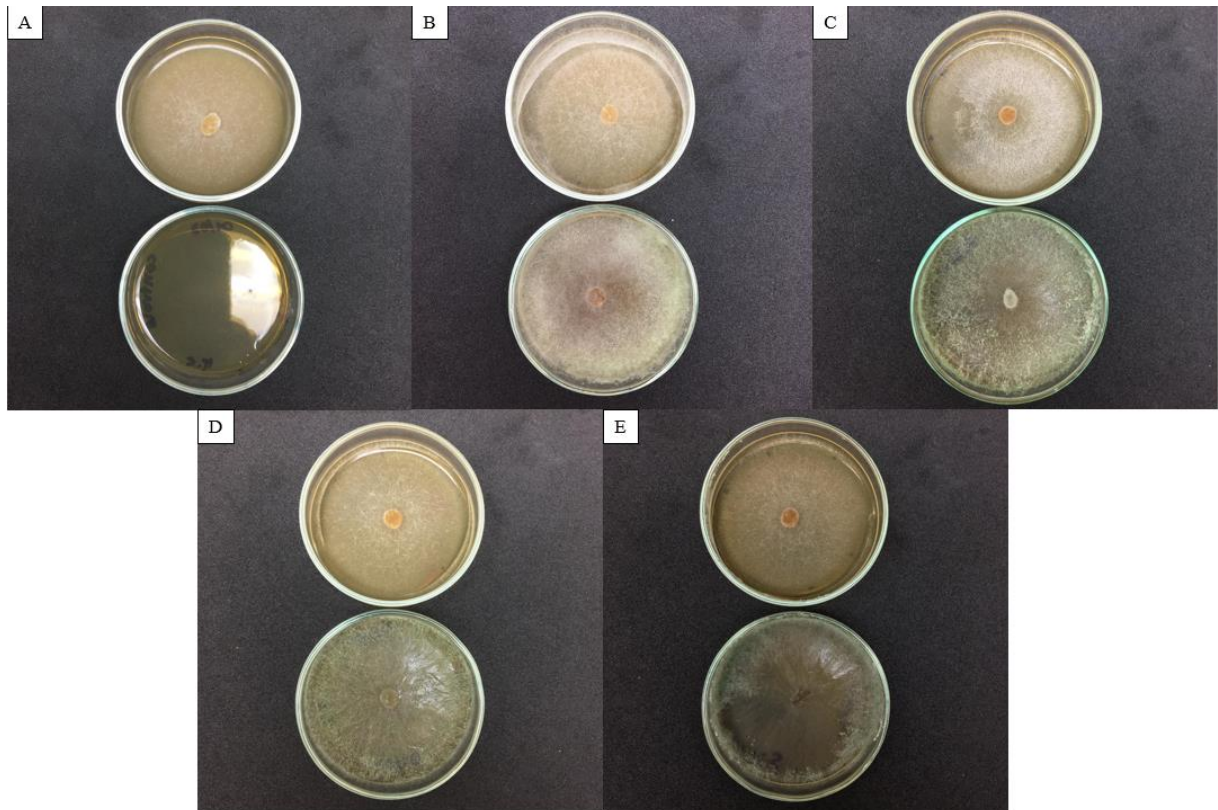
Fonte: Santos, K. C. R (2022).

### 4.2 Avaliação do efeito de metabólitos voláteis na inibição do crescimento de *F. solani*

Os fungos do gênero *Trichoderma* spp. são colonizadores altamente bem-sucedidos de seus habitats, o que se reflete tanto na utilização eficiente do substrato disponível quanto na capacidade de secreção de metabólitos e enzimas de antibióticos (SCHUSTER & SCHMOLL, 2010). Seus mecanismos de defesa compreendem tanto armas enzimáticas quanto químicas, que tornam os isolados do gênero *Trichoderma* micoparasitas eficientes, antagonistas e agentes de biocontrole, características que podem ser exploradas usando o organismo ou os metabólitos por eles secretados (ex. fungicidas biológicos para combater doenças de plantas causadas por fungos patogênicos) (SPIEGEL & CHET, 1998; VINALE *et al.* 2006; NAVAZIO *et al.* 2007; VINALE *et al.* 2009).

Para análise do potencial inibitório do crescimento do fitopatógeno por meio dos isolados de *Trichoderma* foi realizado o teste de avaliação de efeitos de metabólitos voláteis, em triplicatas (Figura 7). Após a leitura do teste observou-se que não houve inibição por meio de metabólitos não voláteis como exposto na (Tabela 1).

Figura 7. Avaliação da inibição do crescimento de *F. solani* por isolados de *Trichoderma* por meio de metabólitos voláteis em placas contendo meio BDA. A) Placa controle contendo somente com *F. solani*. B) Placa contendo isolado ALL-42 e *F. solani*. C) Placa contendo isolado TR-356 e *F. solani*. D) Placa contendo isolado *Trichoderma* spp.1 e *F. solani*. E) Placa contendo isolado *Trichoderma* spp.2 e *F. solani*.



Fonte: Santos, K. C. R (2022).

Tabela 1 - Comparação do efeito inibitório de metabólitos voláteis de isolados de *Trichoderma* sobre o fitopatógeno *F. solani*. Os resultados foram comparados por ANOVA, seguido do teste T (0,05) no programa estatístico Sisvar®.

Isolados de <i>Trichoderma</i>	Diâmetro de crescimento de <i>F. solani</i> contendo meio BDA acrescido de controle (cm)	Diâmetro do crescimento de <i>F. solani</i> contendo meio BDA acrescido de metabólitos voláteis (cm)
<i>Trichoderma harzianum</i> ALL-42	5,0 ± 0,00 a	4,4 ± 0,115 a
<i>Trichoderma asperelloides</i> TR-356	5,0 ± 0,00 a	4,5 ± 0,152 a
<i>Trichoderma</i> spp1	5,0 ± 0,00 a	4,6 ± 0,115 a
<i>Trichoderma</i> spp2	5,0 ± 0,00 a	4,4 ± 0,251 a

Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente. Fonte: Santos, K. C. R (2022).

A importância de antibióticos no biocontrole por espécies de *Trichoderma* foi observada em alguns estudos, mostrando que há um sinergismo de antibióticos e enzimas hidrolíticas, o que contribui significativamente para o antagonismo de *T. harzianum*, como também de outras espécies de *Trichoderma* contra diversos fitopatógenos (SCHIMBOCK; LORITO; WANG, 1994). Entre os efeitos provocados pelos antibióticos podem ser observadas, a redução ou paralisação do crescimento e esporulação, redução na germinação de esporos, além de distorções na hifa e endólise. Os antibióticos são produtos do metabolismo secundário de seus produtores, e podem ser mais importantes na inibição de outros organismos do que a competição por nutrientes (BOMFIM *et al.* 2010).

Mata (2005) realizou um estudo semelhante no qual observou que não houve nenhum isolado de *Trichoderma* capaz de inibir 100% do crescimento das colônias de *F. solani*. Esses antibióticos voláteis atuam sobre fungos suscetíveis através da inibição do crescimento micelial, no entanto, nem todos os isolados que possuem capacidade de produzirem substâncias não voláteis, produzem substâncias voláteis (DILDEY *et al.* 2014). No trabalho de Hoffmann *et al.* (2015) todos os isolados de *Trichoderma* sp. testados pelo método de metabólitos voláteis diminuíram significativamente o crescimento micelial do patógeno, reforçando que a utilização de isolados de *Trichoderma* contra o gênero *Fusarium* sp. pode ser efetivo na inibição dependendo da espécie utilizada.

### 4.3 Teste de avaliação do efeito de metabólitos não voláteis na inibição do crescimento de *F. solani*

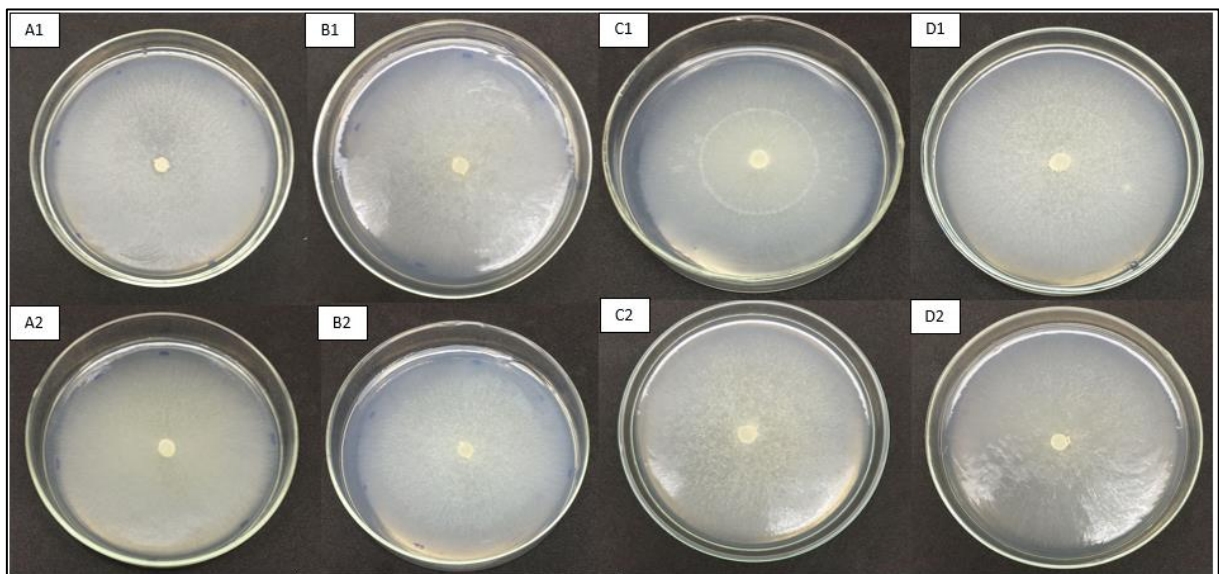
Para análise do potencial inibitório do crescimento do fitopatógeno por meio dos isolados de *Trichoderma* foi realizado o teste de avaliação de efeitos de metabólitos não voláteis, em triplicatas, Figura 8. Após a leitura do teste, observou-se que não houve inibição por meio de metabolitos não voláteis (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação do efeito inibitório de metabólitos não voláteis de isolados de *Trichoderma* sobre o fitopatógeno *F. solani*. Os resultados foram comparados por ANOVA, seguido do teste T (0,05) no programa estatístico Sisvar®.

Isolados de <i>Trichoderma</i>	Diâmetro de crescimento de <i>F. solani</i> contendo meio BDA acrescido de Controle (cm)	Diâmetro do crescimento de <i>F. solani</i> contendo meio BDA acrescido de metabólitos não voláteis (cm)
<i>Trichoderma harzianum</i> ALL-42	9,0 ± 0,401 a	8,8 ± 0,217 a
<i>Trichoderma asperelloides</i> TR-356	9,1 ± 0,337 a	8,5 ± 0,132 a
<i>Trichoderma</i> spp.1	8,3 ± 0,137 a	8,4 ± 0,051 a
<i>Trichoderma</i> spp.2	8,3 ± 0,259 a	8,3 ± 0,142 a

Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente. Fonte: Santos, K. C. R (2022).

Figura 8. Avaliação da inibição do crescimento de *F. solani* por isolados de *Trichoderma* por meio de metabólitos não voláteis em placas contendo meio BDA. A) Placa controle somente *F. solani* (A1), Placa com *F. solani* e isolado ALL-42 (A2). B) Placa controle somente *F. solani* (B1), Placa com *F. solani* e isolado TR-356 (B2). C) Placa controle somente *F. solani* (C1), Placa com *F. solani* e isolado *Trichoderma* spp.1 (C2). D) Placa controle somente *F. solani* (D1), Placa com *F. solani* e isolado *Trichoderma* spp.2 (D2).



Fonte: Santos, K. C. R (2022).

Dennis & Webster (1971) demonstraram que isolados deste gênero foram capazes de produzir metabólitos voláteis e não voláteis, com efeito inibitório sobre o crescimento de vários fungos. Entre os metabólitos voláteis, há gases como: etileno e cianeto de hidrogênio, acetaldeído, acetona, etanol e dióxido de carbono, que afetam o crescimento microbiano (TAMIMI & HUTCHINSON, 1975). Esses gases são ativos a baixas concentrações, mas não são considerados como antibióticos.

A ação micoparasita de *Trichoderma* é bem relatada em função da interação da hifa de espécies de *Trichoderma* sob a hifa de patógenos, sendo efetiva quando ocorre liberação de enzimas hidrolíticas capazes de realizar a degradação da parede da hifa hospedeira. Desse modo há uma ação conjunta para que os eventos de antagonismo (mostrados em placa) e o micoparasitismo (liberação de enzimas hidrolíticas) apresentem condições suficientes para as espécies de *Trichoderma* serem classificadas antagonistas efetivos sobre diversos fitopatógenos (HARMAN *et al.* 2004; BENÍTEZ *et al.* 2004; REMUSKA; DALLA PRIA, 2007).

É de suma importância reconhecer os mecanismos de ação desses isolados, bem como, selecionar os que serão capazes ou não de atuar por mais de um mecanismo, uma vez que isso lhe confere uma vantagem como agente de biocontrole no ambiente, sempre levando em consideração que a produção desses metabólitos tóxicos com efeito fungicida vai ocorrer de maneira associada a outros mecanismos (BOTELHO *et al.* 2013).

#### **4.4 Avaliação do antagonismo de isolados de *Trichoderma* contra *F. solani***

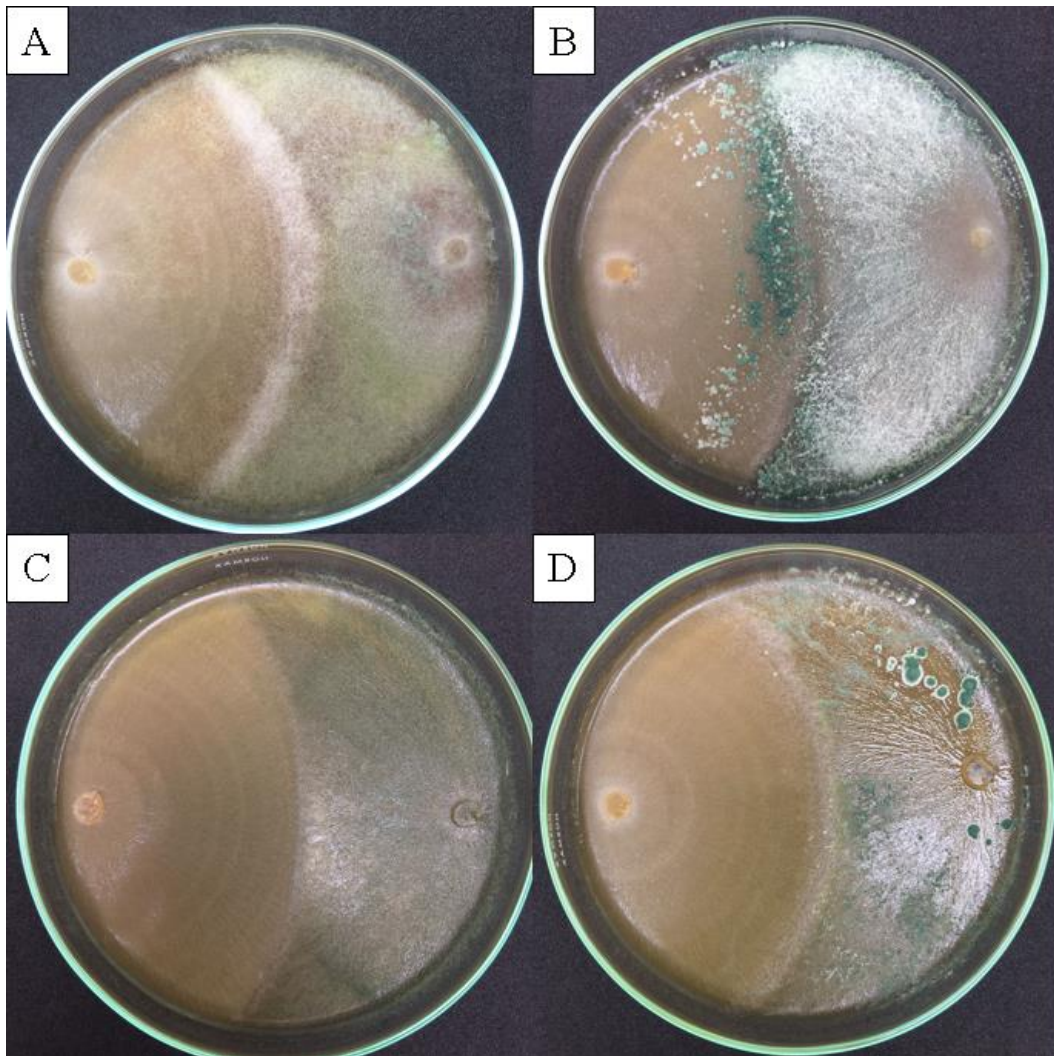
O uso de microrganismos antagonistas como ACB tem demonstrado uma importância considerável para com redução nos danos ao meio ambiente e à saúde humana. Conforme estudos realizados por Monteiro *et al.* (2010) a espécie *T. harzianum* foi utilizada para demonstrar essa capacidade antagônica contra vários fitopatógenos incluindo *R. solani*, *Fusarium* sp. sendo que *Fusarium* foi o que mais sofreu com a inibição. O teste de culturas pareadas *in vitro* é um método útil e confiável para identificar o potencial de biocontrole de *Trichoderma* sp. que dependem do tipo de alvo fúngico e da composição do meio de cultura utilizado (HERMOSA *et al.* 2000).

Para análise do potencial antagônico dos isolados de *Trichoderma* frente ao fitopatógeno *Fusarium solani* foi realizado o teste de pareamento (Figura 9 e 10) em triplicata, utilizando-se 4 isolados de *Trichoderma*. Utilizando-se da escala proposta por BELL *et al.* (1982), onde quanto mais próximo de 1 mais eficiente será o isolado. O isolado ALL-42 (Figura 9A) recebeu



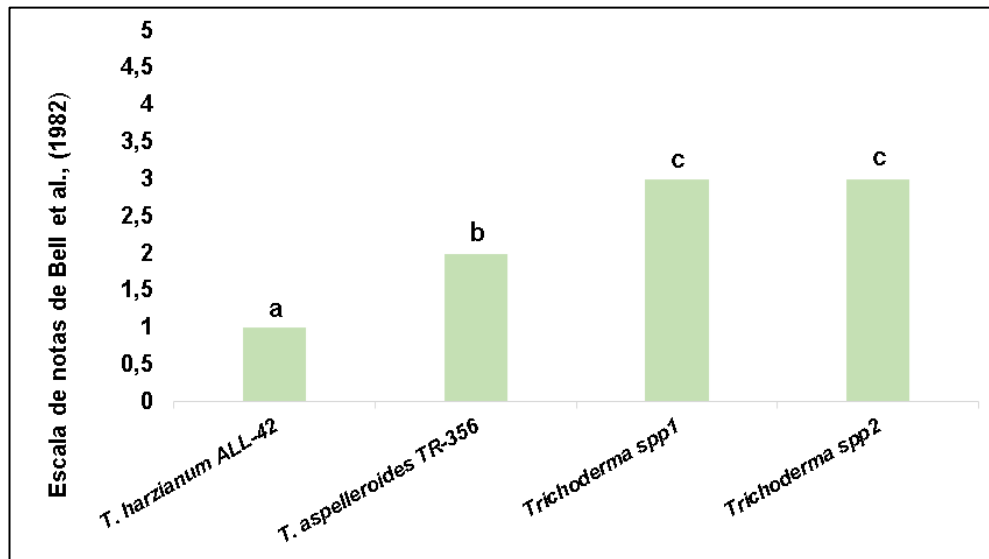
nota 1, enquanto o isolado TR-356 (Figura 9B) recebeu nota 2. Ambos isolados *Trichoderma* spp.1 (Figura 9C) e *Trichoderma* spp.2 (Figura 9D) receberam nota 3 para inibição do crescimento do fitopatógeno.

Figura 9. Teste de culturas pareadas utilizando isolados de *Trichoderma* e o fitopatógeno *Fusarium solani*, em meio BDA. A) Placa contendo isolado ALL-42 e *F. solani*. B) Placa contendo isolado TR-356 e *F. solani*. C) Placa contendo isolado *Trichoderma* spp.1 e *F. solani*. D) Placa contendo isolado *Trichoderma* spp.2 e *F. solani*.



Fonte: Santos, K. C. R (2022).

Figura 10. Avaliação do teste de culturas pareadas de isolados de *Trichoderma* contra o fitopatógeno *F. solani*. Seguindo a escala de notas de Bell *et al.* (1982). Valores seguidos por letras diferentes, na barra, se diferem estatisticamente.



Fonte: Santos, K. C. R (2022).

Todos os isolados demonstraram capacidade de controlar o crescimento do patógeno, sendo que, o isolado ALL-42 foi considerado o mais eficiente no método utilizado mostrando consistência em competição por espaço e nutrientes além de chegar a esporular sobre a colônia do fitopatógeno. Em segundo veio o isolado TR-356 que também se demonstrou eficiente na inibição, já os isolados *Trichoderma* spp.1 e *Trichoderma* spp.2 apresentaram notas intermediárias no teste, no entanto demonstram capacidade de deter o fitopatógeno.

Carvalho *et al.* (2014) relata que quando o espaço e nutrientes são limitados esse seria o momento propício para ação antagonista desses fungos, visto que eles possuem rápido desenvolvimento, além de possuírem diversos mecanismos ocorrendo em conjunto. Monteiro *et al.* (2010) observou que durante a interação micoparasítica de *T. harzianum* ALL-42 com *Fusarium* sp. não houve o enrolamento nas hifas do hospedeiro, apenas um contato, no entanto apesar do não enrolamento o isolado *T. harzianum* ALL-42 foi capaz de colonizar as hifas de *Fusarium* sp. indicando sua eficácia no processo de micoparasitismo para esse gênero.

Estudo recente mostrou que o genoma de *T. harzianum* contém diversos genes responsáveis por liberar metabólitos secundários e enzimas, alguns desses pertencentes ao grupo das glicanases, com potencial de degradar glicana na parede dos fungos, além de ser identificado um gene endo  $\alpha - 1, 3 -$  glicanase em *T. harzianum* que aumenta a resistência contra ataques fúngicos (KUMAR *et al.* 2019).

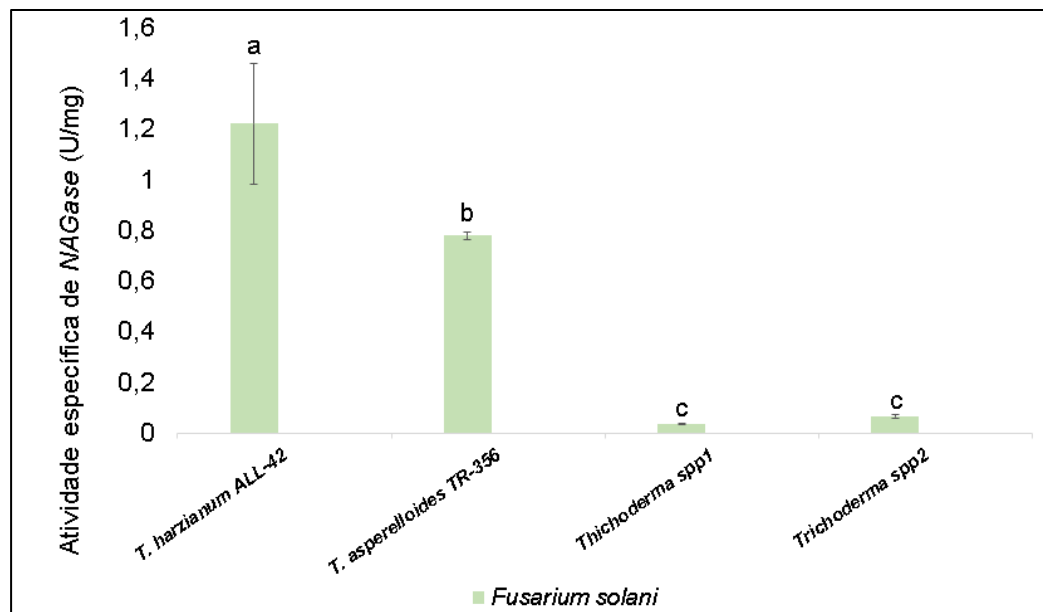
#### 4.5 Avaliação das atividades enzimáticas dos isolados de *Trichoderma* contra o fitopatógeno *F. solani*

De acordo com Lorito *et al.* (1994), a quitina e o  $\beta$ -1,3-glicana são os principais componentes estruturais da maioria das paredes celulares dos fungos. Esse complexo grupo de enzimas extracelulares tem sido relatado como um fator chave na lise da parede celular do patógeno durante o micoparasitismo (VERMA *et al.* 2007), o que tem reforçado estudos que demonstram que as enzimas líticas produzidas por espécies de *Trichoderma*, principalmente quitinases, glicanases e proteases, degradam a parede celular do hospedeiro, desempenhando um papel importante papel na destruição de patógenos de plantas (HARAN *et al.* 1996).

##### 4.8.1 NAGase

As atividades específicas de NAGase por isolados de *Trichoderma* na presença do micélio de *F. solani* estão apresentados na Figura 11. As maiores atividades específicas de NAGase foram observadas nas induções com o isolado *T. harzianum* ALL-42 na presença de *F. solani*, seguido da indução de *T. asperelloides* TR-356 na presença *F. solani*. Já os isolados *Trichoderma* spp.1 e *Trichoderma* spp.2 demonstraram atividades baixas para essa enzima comparados aos outros isolados (Figura 11).

Figura 11. Atividades específicas de NAGase (U/mg) de isolados *Trichoderma* na presença de micélio macerado do fitopatógeno *F. solani*. Valores seguidos por letras diferentes, na barra, se diferem estatisticamente.



Fonte: Santos, K. C. R (2022).



De acordo com o trabalho de Qualhato (2013) os micélios de *F. solani* se apresentaram como bons indutores para a produção de *NAGase*. Nesse trabalho encontramos um resultado que se assemelha encontrado no trabalho de Qualhato, o que reforça que quando são utilizados isolados de *Trichoderma* algumas atividades enzimáticas produzidas tendem a ser mais altas dependendo do isolado e do patógeno utilizado no teste.

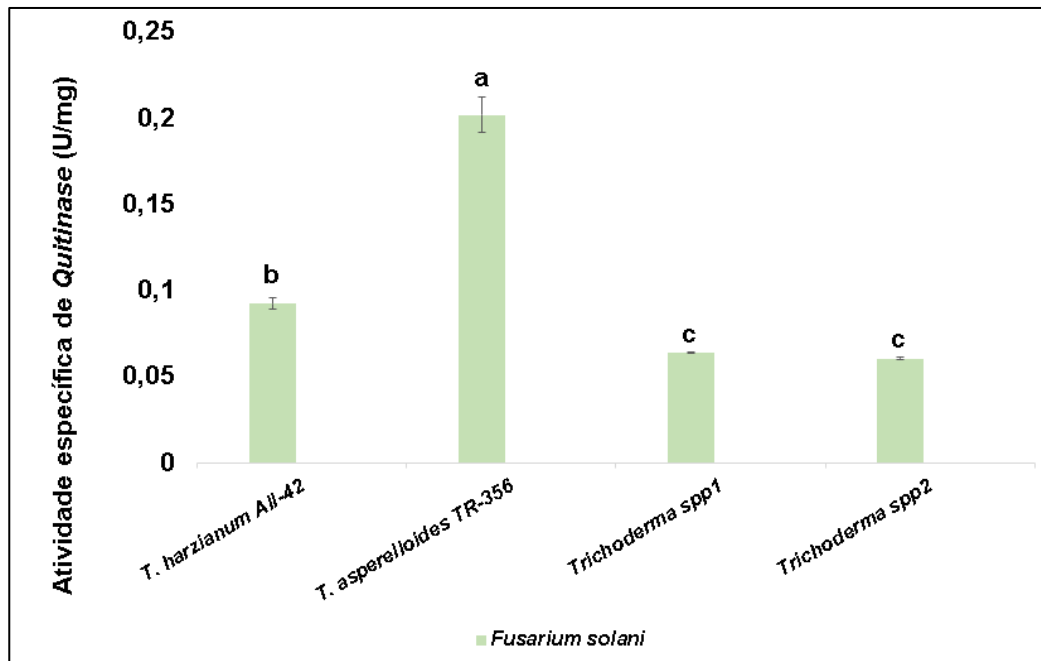
Zin & Badaluddin (2020) demonstram que a espécie *T. harzianum* tem demonstrado sua eficácia na indução de enzimas, sendo vista como fator chave na lise da parede de fungos patógenos, essa espécie é amplamente distribuída, além de ser facilmente encontrada nos mais diversos substratos, devido a essa popularidade tem sido muito utilizada em práticas agrícolas onde são aplicados os fungos do gênero *Trichoderma* spp. para que haja o controle de doenças de plantas de forma natural.

#### 4.8.2 *Quitinase*

Enzimas estão amplamente distribuídas na natureza e foram detectadas em bactérias e fungos (CABIB, 1987). Nos últimos anos, vários pesquisadores sugeriram que fungos produtores de quitinase, por exemplo, espécies de *Trichoderma*, podem ser eficazes como agentes de controle biológico contra patógenos fúngicos (TOKIMOTO, 1982; CHET, 1987). O principal mecanismo envolvido no antagonismo de *Trichoderma* spp. e fungos patogênicos parecem ser a liberação de enzimas líticas, incluindo quitinases (ULHOA; PEBERDY, 1991).

Após a avaliação da atividade específica de quitinase de isolados de *Trichoderma* na presença do micélio de *F. solani*, notou-se que no geral, ambos os isolados de *Trichoderma* apresentaram atividades específicas para a enzima, como representado na Figura 12.

Figura 12. Atividades específicas de Quitinase (U/mg) de isolados *Trichoderma* na presença de micélio macerado do fitopatógeno *F. solani*. Valores seguidos por letras diferentes, na barra, se diferem estatisticamente.



Fonte: Santos, K. C. R (2022).

A maior atividade específica observada foi obtida pelo isolado *T. asperelloides* TR-356 na presença de *F. solani*, seguido do isolado *T. harzianum* ALL-42 sendo que os novos isolados *Trichoderma* spp.1 e *Trichoderma* spp.2 apresentaram atividades mais baixas.

Merivuori *et al.* (1985) relatam que não se sabe se indução da quitinase em *T. harzianum* apresenta o mesmo mecanismo indutor-repressor produzidas por outras cepas de *Trichoderma*, o que explicaria o fato de a maioria dos isolados apresentados nesse trabalho terem apresentado resultados diferentes.

#### 4.8.3 $\beta$ -1,3-Glicanase

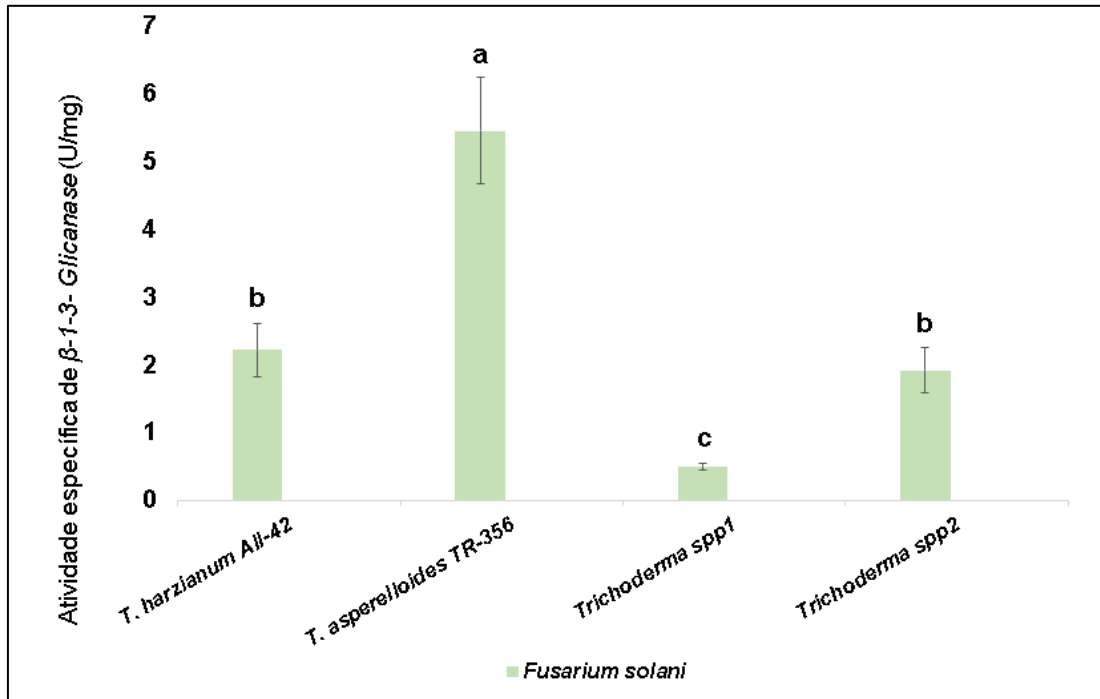
Evidências consideráveis sugerem que as  $\beta$ -1,3-glicanases fúngicas desempenham importantes papéis nutricionais em fungos sapróbios e micoparasitários, onde representam armas ofensivas bioquímicas primárias para a degradação da parede celular de fungos parasitados (STONE & CLARKE, 1992; DE LA CRUZ *et al.* 1995; PITSON *et al.* 1993; AMEY *et al.* 2003).

O crescimento e extensão da parede celular representa um delicado equilíbrio entre a hidrólise da parede celular existente e a síntese da nova parede. Como as  $\beta$ -glucanas são os

principais componentes das paredes celulares dos fungos, parece provável que desempenhem um papel crucial nesse processo sem interromper sua integridade geral (ADAMS, 2004).

Para a atividade dessa enzima, todos os isolados se mostraram competentes, na presença do micélio macerados do fitopatógeno (Figura 13).

Figura 13. Atividades específicas de  $\beta$ -1,3-Glicanase (U/mg) de isolados *Trichoderma* na presença de micélio macerado do fitopatógeno *F. solani*. Valores seguidos por letras diferentes, na barra, se diferem estatisticamente.



Fonte: Santos, K. C. R (2022).

As maiores atividades específicas encontradas para a enzima foram na indução de *T. asperelloides* TR-356 em presença de *F. solani*, *T. harzianum* ALL-42 em presença de *F. solani*, seguido de *Trichoderma* spp.2 em presença de *F. solani*.

Lopes (2012), observou em seu trabalho que a maior atividade específica de  $\beta$ -1,3-glicanase foi encontrada na indução de *T. asperellum* 40T/03 em presença de *F. solani*, seguido da indução de *T. harzianum* 100T/01 em presença de *F. solani*, resultados semelhantes aos encontrados nesse trabalho para o mesmo patógeno.

Monteiro (2008) observou uma atividade específica alta para parede celular tratada de *F. solani* para o isolado *T. harzianum* ALL-42 em seu trabalho, resultados similares a este trabalho. A atividade enzimática alta da  $\beta$ -1,3-glicanase em todos os isolados de *Trichoderma* reforça a importância da mesma no processo de micoparasitismo visto que a enzima se apresenta como uma arma bioquímica ofensiva na degradação da parede de fungos (KUBICEK et al. 2001).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de nenhum dos isolados conseguirem inibir o crescimento dos fitopatógenos por meio de metabólitos voláteis e não voláteis, isso não exclui a possibilidade de que sejam melhor explorados. O isolado *T. harzianum* ALL-42 foi considerado o mais eficiente no método de culturas pareadas mostrando consistência em competição por espaço e nutrientes. Os isolados *T. harzianum* ALL-42 e *T. asperelloides* TR-356 apresentaram as maiores atividades na presença do micélio macerado do fitopatógeno *F. solani*. Os isolados *Trichoderma* spp.1 e *Trichoderma* spp.2 foram os que apresentaram os menores resultados na maioria dos testes quando utilizado o patógeno *Fusarium solani*, no entanto, não exclui suas possíveis potencialidades, como promotores do crescimento de plantas e competição, bem como, ser utilizado em testes contra outros fitopatógenos. Os isolados ALL-42 e TR-356 reforçam sua utilidade como agentes de controle biológico a serem aplicados em campo contra patógenos agrícolas, produção enzimática e uso biotecnológico.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, L. M.; PFENNING, L. H. O gênero *Trichoderma*. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. (org.). ***Trichoderma: Uso na agricultura***. 1.ed. Brasília, DF. Embrapa, 2019. p. 163-180.
- ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. ***Microbiology***, v. 150, n. 7, p. 2029–2035, 2004.
- AMEY, R. C. et al. Investigating the role of a *Verticillium fungicola*  $\beta$ -1, 6-glucanase during infection of *Agaricus bisporus* using targeted gene disruption. ***Fungal Genetics and Biology***, v. 39, n. 3, p. 264–275, 2003.
- BELL, DK; POÇOS, HD; MARKHAM, CR Antagonismo in vitro de espécies de *Trichoderma* contra seis fitopatógenos fúngicos [Controle biológico de doenças]. ***Fitopatologia (EUA)***, 1982.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: Usos e perspectivas**. 1.ed. Jaguariúna, São Paulo, 2009. 341p.
- BENÍTEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. ***International microbiology***, v. 7, n. 4, p. 249–260, 2004.
- BHARAT, R.; SINGH, V.N.; SINGH, D.B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp.. ***Plant and Soil***, v.57, p.131-135, 1980.
- BHAT, K. A. A New Agar plate assisted slide culture technique to study mycoparasitism of *Trichoderma* sp. on *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporium*. ***International journal of current microbiology and applied sciences***, v. 6, n. 8, p. 3176-3180, 2017.
- BOMFIM, M. P. et al. Avaliação antagônica in vitro e in vivo de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. ***Summa phytopathologica***, v. 36, p. 61–67, 2010.
- BOTELHO, Amanda Silva. **Compatibilidade de *Trichoderma* spp. com agrotóxicos e inibição de patógenos do solo por cepas comerciais e não comerciais**. 2022. 90 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Universidade de Brasília – DF. 2022.
- BOTELHO, Luana da Silva et al. Desempenho de sementes de feijão infectadas pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. ***Journal of Seed Science***, v. 35, p. 153-160, 2013.

BRADFORD, M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254, 1976.

BRASIL. Lei nº 7.802 Art. 2º, de 11 de julho de 1989. Brasília, 11 de julho de 1989. **Portal da Legislação.** Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L7802.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm). Acesso em: 22 de maio. 2020.

BROWN, G. G. et al. **Biodiversidade da fauna do solo e sua contribuição para os serviços ambientais.** In: PARRON, L. M.; GARCIA, J. R.; OLIVEIRA, E. B. de; BROWN, G. G.; PRADO, R. B. (Ed.). *Serviços ambientais em sistemas agrícolas e florestais do Bioma Mata Atlântica.* Brasília, DF: Embrapa, p. 121-154. 2015.

BUENO, V. H. P. et al. Controle biológico e manejo de pragas na agricultura sustentável. **Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras.** Retirado de: <http://www.den.ufla.br/attachments/article/75/ApostilaCB>, v. 20, 2015.

CABIB, E. The synthesis and degradation of chitin. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol**, v. 59, p. 59–101, 1987.

CAFÉ FILHO, A. C.; LOBO JÚNIOR, M. Manejo de fatores físicos e culturais para controle de patógenos de solo. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, p. 267-301, 2000.

CAI, FENG et al. Colonização de *Trichoderma harzianum* cepa SQR-T037 em raízes de tomateiro e sua relação com o crescimento da planta, disponibilidade de nutrientes e microflora do solo. **Plant and Soil**, v. 388, n. 1, pág. 337-350, 2015.

CARRERAS-VILLASEÑOR et al. *Trichoderma*: sentindo o ambiente para sobrevivência e dispersão. **Microbiologia**, v. 158, n. 1, pág. 3-16, 2012.

CARVALHO, D. D. et al. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, p. 384–391, 2014.

CARVALHAIS, LILIA C. et al. Linking jasmonic acid signaling, root exudates, and rhizosphere microbiomes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 28, n. 9, p. 1049-1058, 2015.

- CHAGAS, LILIAN F. B. et al. Trichoderma na promoção do crescimento vegetal. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 4, n. 3, p. 97-102, 2017.
- CHET, I. Trichoderma: application, mode of action, and potential as biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. **Innovative approaches to plant disease control**, p. 137–160, 1987.
- CHET, I.; INBAR, J.; HADAR, I. Fungal Antagonists and Mycoparasites In: **The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships**. (Eds.): Wicklow, DT and Soderstrom, B. 1997.
- CORABI-ADELL, CARLO. **Biodiversidade do gênero Trichoderma (Hypocreales-Fungi) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica**. 202p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro – São Paulo. 2005.
- DA SILVA, J. L.; TEIXEIRA, R. N. V. Esporulação e crescimento micelial de *Fusarium solani* em diferentes meios de cultura e regimes de luminosidade. **Revista Agro@mbiente on-line**, v. 6, n. 1, pág. 47-52, 2012.
- DE LA CRUZ, J. et al. A novel endo-beta-1, 3-glucanase, BGN13. 1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. **Journal of bacteriology**, v. 177, n. 23, p. 6937–6945, 1995.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* 3-Hiphal Interaction. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.57, p.363-369, dec. 1971.
- DILDEY, Omari Dangelo Forlin et al. Inibição do crescimento in vitro de *Sclerotinia sclerotiorum*, causador de mofo branco, por isolados de *Trichoderma* spp. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 12, n. 3, 2014.
- DOLINSKI, Diego Pascoal et al. **Revisão bibliográfica: Trichoderma no controle de doenças de plantas**. 2022.
- DOMINGOS, Mariana Moreira. **Influência de extratos vegetais aquosos em microrganismos de importância agrícola e ambiental**. 2020. 85 f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Itajubá – MG, 2020.
- EMBRAPA. Controle biológico: ciência a serviço da sustentabilidade. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/16154268/controlado-biologico-ciencia-a-servico-da-sustentabilidade>. 2016. Acesso em: 29 de novembro. 2022.

EMBRAPA. Controle biológico no Brasil tem potencial de crescer 20% ao ano. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/45574867/controle-biologico-no-brasil-tem-potencial-de-crescer-20-ao-ano>. 2019. Acesso em: 29 de novembro. 2022.

EMBRAPA. Live aborda importância do controle biológico de doenças. Disponível em: [https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/59815421/live-aborda-importancia-do-controle-biologico-de-doencas?p\\_auth=AgrwxXI7](https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/59815421/live-aborda-importancia-do-controle-biologico-de-doencas?p_auth=AgrwxXI7). 2021. Acesso em: 29 de novembro. 2022.

GAMS, W.; BISSETT, J. Morphology and Identification of Trichoderma In: Kubicek, CP and Harman, GE, Eds. Trichoderma and Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics. **London: Taylor& Francis Led**, v. 1, p. 3–34, 1998.

HALL, ROBERT; NASSER, LUIZ CB. Practice and precept in cultural management of bean diseases. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 18, n. 2, p. 176-185, 1996.

HARAN, S. et al. Differential expression of Trichoderma harzianum chitinases during mycoparasitism. **Phytopathology**, v. 86, n. 9, p. 980–985, 1996.

HARMAN, GARY E. et al. Espécies de Trichoderma – simbioses de plantas oportunistas e avirulentas. **Nature revisa microbiologia**, v. 2, n. 1, pág. 43-56, 2004.

HERMOSA, M. R. et al. Caracterização molecular e identificação de isolados de biocontrole de Trichoderma spp. **Microbiologia Aplicada e Ambiental**, v. 66, n. 5, pág. 1890-1898, 2000.

HOFFMANN, Charles Anthony et al. Potencial de antagonismo de isolados de Trichoderma sp. contra o isolados de Fusarium sp., in vitro. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 1, p. 37, 2015.

KESWANI, Chetan e cols. Desvendando as aplicações eficientes de metabólitos secundários de vários Trichoderma spp. **Microbiologia aplicada e biotecnologia**, v. 98, n. 2, pág. 533-544, 2014.

KUBICEK, C. P. et al. Trichoderma: from genes to biocontrol. **Journal of Plant Pathology**, p. 11–23, 2001.

KUMAR, R., KUMARI, K., HEMBRAM, KC *et al.* A expressão de um gene *endo  $\alpha$  - 1, 3 - Glucanase de Trichoderma harzianum* em arroz induz resistência contra cretamento da bainha. **J. Plant Biochem. Biotecnologia**. 28, 84-90. 2019.



- LEAL, JULIANA CARDOSO. **Análise proteômica dos secretomas dos fungos *Trichoderma harzianum* e *Fusarium solani***. Tese (Doutorado). Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz, Instituto Leônidas E Maria Deane – ILMD, Manaus – AM. 2019.
- LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. **Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática**. Rio de Janeiro, v.42, n. 117, p 518-534, 2018.
- LOPES, F. A. C. **Caracterização Molecular, Filogenética e Enzimática de Isolados de *Trichoderma* spp.** 2012. 104 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, 2012.
- LOPES, F.A.C. et al. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Biology** 116, 815-824, 2012.
- LORITO, M. et al. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1, 3-beta-glucosidase and an N-acetyl-beta-glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology (USA)**, 1994.
- LOBO, JÚNIOR et al. Patógenos de plantas exóticas no Brasil. **Invasões biológicas: custos econômicos e ambientais de espécies exóticas de plantas, animais e micróbios**, p. 69-88, 2002.
- LUCON, C. M. M. ***Trichoderma*: o que é, para que serve e como usar corretamente na lavoura**. 1.ed. São Paulo, 2014. 24p.
- PIGNATI, W. A. *et al.* Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 22, n. 10, 2017.
- PIRES, C. S. S.; FONTES, E. M. G.; SUJII, E. R. **Impacto ecológico de plantas geneticamente modificadas: o algodão resistente a insetos como estudo de caso**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: CNPq, 2003.
- POLETTI, IGOR et al. Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causadores de podridão de raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) na região do vale do Taquarí, RS. **Ciência Florestal**, v. 16, p. 1-10, 2006.
- PUNJA, ZAMIR K.; UTKHEDE, Raj S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **TRENDS in Biotechnology**, v. 21, n. 9, p. 400-407, 2003.

- MACIEL, C. G. et al. **Patógenos em sementes de Pinus spp. ênfase em Lasiodiplodia sp. e Fusarium spp.** 2016. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.
- MATA, J.F. **Efeitos bioativos de produtos de fungos do gênero Trichoderma spp. sobre fitopatógenos Fusarium e Sclerotium.** 148f. Tese (Doutorado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2005.
- MACHADO, F. M. et al. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias.** v. 35, n. 1, 2012.
- MELLO, S.C.M. ÁVILA, Z.R. BRAÚNA, L.M. PÁDUA, R.R. GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Fitosanidad.**v.11(1):p.3-9. 2007.
- MERIVUORI, H. et al. **Regulation of cellulase biosynthesis and secretion in fungi.** [s.l.] Portland Press Ltd. 1985.
- MILANESI, P. M. **Caracterização, toxicidade e patogenicidade de Fusarium spp. em genótipos de soja em sistema plantio direto.** 2009. 91 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.
- MILANESI, P. M. et al. Biocontrole de *Fusarium* spp. com *Trichoderma* spp. e promoção de crescimento em plântulas de soja. **Revista de Ciências Agrárias.** v. 36, n. 3, 2013.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Mercado de biodefensivos cresce mais de 70% no Brasil em um ano. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/feffmercado-de-biodefensivos-cresce-em-mais-de-50-no-brasil>. Acesso em: 24 de maio 2020.
- MIRANDA. R. F. **Avaliação do Potencial de Isolados de Trichoderma spp. no Controle Colletotrichum gloeosporioides, Causador da Antracnose no Mamoeiro.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, 2020.
- MONTEIRO, V. N. **Avaliação do perfil de proteínas secretadas pelo isolado de Trichoderma harzianum (ALL42) obtido do solo do Cerrado induzido por fitopatógenos.** [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, 2008.
- MONTEIRO, V. N. et al. New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. **Current microbiology,** v. 61, n. 4, p. 298–305, 2010.
- MUHAMMED, MAGED et al. Infecção por *Fusarium*: relato de 26 casos e revisão de 97 casos da literatura. **Medicina,** v. 92, n. 6, pág. 305, 2013.

- MUKHERJEE, Mala e cols. Interações Trichoderma-planta-patógeno: avanços em genética de controle biológico. **Jornal indiano de microbiologia**, v. 52, n. 4, pág. 522-529, 2012.
- NASCIMENTO, V. C. et al. Trichoderma: biological control efficiency and perspectives for the Brazilian Midwest states and Tocantins. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2022.
- NAUOM, STEPHANIE et al. Estudo bioquímico e molecular de perfis proteicos secretomas enriquecidos com Trichoderma harzianum usando cromatografia de afinidade com lectinas. **Bioquímica aplicada e biotecnologia**, v. 187, n. 1, pág. 1-13, 2019.
- NAVAZIO, L. et al. Calcium-mediated perception and defense responses activated in plant cells by metabolite mixtures secreted by the biocontrol fungus Trichoderma atroviride. **BMC Plant Biology**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2007.
- NICOLAISEN, MOGENS et al. Real-time PCR for quantification of eleven individual Fusarium species in cereals. **Journal of Microbiological Methods**, v. 76, n. 3, p. 234-240, 2009.
- NUCCI, MÁRCIO; ANAISSIE, ELIAS. Infecções por Fusarium em pacientes imunocomprometidos. **Revisões de microbiologia clínica**, v. 20, n. 4, pág. 695-704, 2007.
- NUCCI, MÁRCIO; ANAISSIE, ELIAS. Tratamento e prevenção da infecção por Fusarium. **UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Atualizado**, v. 20, p. 695-704, 2019.
- OARD, S.; RUSH, M. C.; OARD, J. H. Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen Rhizoctonia solani. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 1, p. 169-180, 2004.
- PITSON, S. M.; SEVIOUR, R. 8; MCDOUGALL, B. M. Noncellulolytic fungal  $\beta$ -glucanases: their physiology and regulation. **Enzyme and microbial technology**, v. 15, n. 3, p. 178–192, 1993.
- QUALHATO, T. F. et al. Estudos de micoparasitismo de espécies de Trichoderma contra três fungos fitopatogênicos: avaliação do antagonismo e produção de enzimas hidrolíticas. **Cartas de biotecnologia**, v. 35, n. 9, pág. 1461-1468, 2013.
- QUALHATO, T. F. **Avaliação do perfil enzimático e expressão gênica de cinco espécies de Trichoderma e potencial antagônico contra Fusarium solani, Rhizoctonia solani e Sclerotinia sclerotiorum. Goiânia.** [s.l.] Dissertação [Mestrado em Biologia] -Universidade Federal de Goiás, 2013.

- RAMADA, M. H. S; LOPES, F. A. C; ULHOA, C. J. Trichoderma: metabólitos secundários. **Trichoderma: Uso na Agricultura. Embrapa, Brasília**, p. 201-2018, 2019.
- REMUSKA, A. C.; DALLA PRIA, M. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento de fungos fitopatogênicos. 2007.
- ROCHA, F. S.; *et al.* Caracterização do *Fusarium solani* f. sp. Piperis, produção de fitotoxina e incidência de fusariose no norte de Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**. v. 42, n.1, 2016.
- RODRIGUES, F. A. *et al.* Fatores envolvidos na supressividade a *Rhizoctonia solani* em alguns solos tropicais brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 22, n. 2, 1998.
- SABA, H. *et al.* Trichoderma – um promissor estimulador de crescimento de plantas e agente de biocontrole. **Mycosphere**, v. 3, n. 4, pág. 524-531, 2012.
- SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of Trichoderma. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 787–799, 2010.
- SCHIMBOCK, M.; LORITO, M.; WANG, Y. L. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol*, v. 60, p. 4364–4373, 1994.
- SILVA, Roberto N. *et al.* Interação Trichoderma/patógeno/planta na segurança alimentar pré-colheita. **Biologia fúngica**, v. 123, n. 8, pág. 565-583, 2019.
- SOUSA, J. A. T; BRITO, G. S; REGO, S. S. Controle biológico de Fusariose em mudas de *Pinus taeda* e *Pinus elliottii* com produto comercial a base de *Trichoderma* sp. **Agrária**, v. 14, n. 53, pág. 304-313, 2021.
- SPIEGEL, Y.; CHET, I. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. **Integrated Pest Management Reviews**, v. 3, n. 3, p. 169–175, 1998.
- STONE, B. A.; CLARKE, A. E. **Chemistry and Biology of 1, 3-β-Glucans**. [s.l.] International Specialized Book Service Incorporated, 1992.

- TAMIMI, K. M.; HUTCHINSON, S. A. Differences between the biological effects of culture gases from several species of *Trichoderma*. *Transactions of the British Mycological Society*, v. 64, n. 3, p. 455–463, 1975.
- TAPIA, CECILIA; AMARO, JOSÉ. Género *Fusarium*. **Revista chilena de infectología**, v. 31, n. 1, p. 85-86, 2014.
- TEIXEIRA, HUDSON et al. Manejo da podridão-radicular-seca do feijoeiro. **Circular Técnica n. 63**, p. 1-5. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. 2009.
- TOKIMOTO, K. Lysis of the mycelium of *Lentinus edodes* [edible fungi] caused by mycolytic enzymes of *Trichoderma harzianum* when the two fungi were in an antagonistic state. **Transactions of the Mycological Society of Japan (Japan)**, 1982.
- ULHOA, C. J.; PEBERDY, J. F. Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. **Microbiology**, v. 137, n. 9, p. 2163–2169, 1991.
- ULHOA, CIRANO J.; PEBERDY, JOHN F. Purificação e algumas propriedades da quitinase extracelular produzida por *Trichoderma harzianum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 3, pág. 236-240, 1992.
- VERMA, M. et al. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, n. 1, p. 1–20, 2007.
- VINALE, F. et al. Application of *Trichoderma harzianum* (T22) and *Trichoderma atroviride* (P1) as plant growth promoters, and their compatibility with copper oxychloride. **Journal of Zhejiang. University Science**, v. 30, p. 2-8. 2004.
- VINALE, F. et al. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. **Letters in applied microbiology**, v. 43, n. 2, p. 143–148, 2006.
- VINALE, F. et al. Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. **Letters in applied microbiology**, v. 48, n. 6, p. 705–711, 2009.
- VITERBO, Ada et al. Significado de enzimas líticas de *Trichoderma* spp. no controle biológico de fitopatógenos fúngicos. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 81, n. 1, pág. 549-556, 2002.
- WALKER, CLAIR. et al. Caracterização morfológica, molecular e patogenicidade de *Fusarium acuminatum* e *Fusarium verticillioides* a *Cordia americana*. **Ciência Florestal**, v. 26, p. 463-473, 2016.

WOO, SL et al. A biologia molecular das interações entre *Trichoderma* spp., fungos fitopatogênicos e plantas. **Fitopatologia**, v. 96, n. 2, pág. 181-185, 2006.

ZIN, NUR A.; BADALUDDIN, NOOR A. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 65, n. 2, p. 168-178, 2020.

## ANEXOS

ANEXO A – Artigo publicado durante o desenvolvimento do estágio.

ISSN 1519-6984 (Print)  
ISSN 1678-4375 (Online)

Original Article

## *Trichoderma*: biological control efficiency and perspectives for the Brazilian Midwest states and Tocantins

*Trichoderma*: eficiência no controle biológico e perspectivas para os estados do Centro-Oeste brasileiro e Tocantins

V. C. Nascimento<sup>a</sup> ●, K. C. Rodrigues-Santos<sup>a</sup> ●, K. L. Carvalho-Alencar<sup>a</sup> ●, M. B. Castro<sup>a</sup>, R. H. Kruger<sup>b</sup> ● and F. A. C. Lopes<sup>a</sup> ●

<sup>a</sup>Universidade Federal do Tocantins – UFT, Laboratório de Microbiologia, Porto Nacional, TO, Brasil

<sup>b</sup>Universidade de Brasília – UnB, Laboratório de Enzimologia, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, DF, Brasil

### Abstract

Brazil is one of the world leaders in the agribusiness sector tending to directly influence a growing dependence on imported inputs, specifically synthetic agrochemicals. At the state level, in 2013, Tocantins stood out in first place in the ranking of agrochemical consumers, however, these products can cause several problems, such as poisoning to humans, environmental contamination, and increased resistance to phytopathogens. Biological control is an alternative to the use of agrochemicals towards eliminating pests naturally by using living organisms called Biological Control Agents (BCA). Currently, fungi of the *Trichoderma* genus are some of the most used organisms in biological pest control for their relevant characteristics that favor them in terms of survival in the environment, such as high capacity to adapt to ecological conditions, potential to colonize the rhizosphere of plants, mycoparasitism, production of volatile and non-volatile metabolites. In addition, it works on plant growth and productivity. In general, the use of *Trichoderma* favors the control of soil pathogens, such as *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Sclerotinia*, and nematodes. Thus, this review aims to demonstrate the importance of using *Trichoderma* in biological control, as well as to present an overview and perspectives of research developed by respondents in the Brazilian Midwest region and Tocantins state.

**Keywords:** *Trichoderma*, biocontrol, growth promotion, research overview.

### Resumo

O Brasil é um dos líderes mundiais no setor do agronegócio e essa liderança tende a impactar diretamente numa dependência crescente de insumos importados, especificamente, agroquímicos sintéticos. A nível de estado, em 2013, o Tocantins se destacava em primeiro lugar no ranking de consumidores de agroquímicos, contudo, esses produtos podem causar diversos problemas, como intoxicação ao homem, contaminação do ambiente e aumento da resistência de fitopatógenos. Um método alternativo ao uso de agroquímicos é o controle biológico, o qual busca a eliminação de pragas de forma natural, utilizando-se de organismos vivos chamados de Agentes de Controle Biológico (ACB). Atualmente, entre os organismos mais usados no controle biológico de pragas estão os fungos do gênero *Trichoderma*, isto, por possuir algumas características relevantes que os favorecem em termos de sobrevivência no ambiente, tais como: a alta capacidade de adaptação às condições ecológicas, potencial em colonizar a rizosfera das plantas, micoparasitismo, produção de metabólitos voláteis e não voláteis. Além disso, atua no crescimento e produtividade das plantas. Geralmente, o uso de *Trichoderma* favorece o controle de patógenos do solo, como: *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Sclerotinia* e nematoides. Assim, a presente revisão visa demonstrar a importância da utilização do *Trichoderma* no controle biológico, assim como apresentar um panorama e perspectivas das pesquisas desenvolvidas por pesquisadores da região Centro-Oeste brasileiro e no estado do Tocantins.

**Palavras-chave:** *Trichoderma*, biocontrole, promoção de crescimento, panorama das pesquisas.

\*e-mail: flopes@uft.edu.br

Received: January 18, 2022 – Accepted: July 21, 2022



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ANEXO B – Certificado de projeto de iniciação científica com bolsa, realizado nos anos de 2020/2021.



ANEXO C – Projeto de iniciação científica desenvolvido com bolsa no período de 2021/2022 (Renovação).



**Uso de isolados do fungo do gênero *Trichoderma* spp. do Cerrado do Tocantins contra os fitopatógenos *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani***

Kárita Cristine Rodrigues dos Santos  
Fabyano Alvares Cardoso Lopes

**GRANDE ÁREA DO CONHECIMENTO:** Ciências Biológicas e da Saúde;

**RESUMO**

O fungo do gênero *Trichoderma* vem sendo utilizado com sucesso nos últimos anos como um eficaz Agente de Controle Biológico (ACB) de patógenos fúngicos que atacam culturas de grande interesse econômico, além de contribuir de forma direta na diminuição do uso de insumos importados como, agroquímicos sintéticos. O estudo teve como objetivo avaliar a eficiência de espécies de *Trichoderma* do Cerrado tocantinense contra os fitopatógenos *R. solani* e *F. solani*. Após a realização de testes foi possível observar que o isolado *T. harzianum* ALL-42 foi considerado o mais eficiente no método de culturas pareadas. A parede celular do fitopatógeno *R. solani* se destacou como a maior indutora da expressão de genes relacionados com a codificação de enzimas envolvidas no micoparasitismo. Dentre os isolados presentes no trabalho o *Trichoderma* spp1 e *Trichoderma* spp2 foram os que apresentaram os menores resultados na maioria dos testes, o que não exclui a possibilidade de que sejam melhor estudados para descobrir suas possíveis potencialidades. Os isolados *T. harzianum* ALL-42 e *T. asperelloides* TR-356 se destacaram como potenciais agentes de controle biológico a serem aplicados em campo no controle de pragas agrícolas, produção enzimática e uso biotecnológico. Conclui-se que as espécies de *Trichoderma* possuem potencial para atuar na inibição e que já se sabe que contribui também no crescimento e produtividade de culturas. No entanto, novos testes necessitam ser realizados, assim como os estudos mais aprofundados para investigação desse gênero e de suas contribuições para a pesquisa científica.

**Palavras-chave:** Controle Biológico; Fitopatógenos; *Trichoderma*.



## ANEXO D – Apresentação oral em evento científico.

N. DE CERTIFICAÇÃO: 46F596GTW06E5D63


 República Federativa do Brasil  
 Ministério da Educação  

 Universidade Federal da Bahia  
 Pró-Reitoria de Extensão Universitária

**CERTIFICADO**

Certificamos que **KÁRITA CRISTINE RODRIGUES DOS SANTOS** apresentou a comunicação oral **AVALIAÇÃO DO CONTROLE BIOLÓGICO DO FUNGO TRICHODERMA HARZIANUM ALL-42 FRENTE AO FITOPATÓGENO FUSARIUM SOLANI**, na **XVI Semana de Biologia**, realizada pelo Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, no período de 30 de Agosto a 04 de Setembro de 2021.

Registro SIATEX: 16399  
 Relatório: 9739

  
 Salvador, 05 de Setembro de 2021

  
 Fabiana Dultra Brito  
 Pró-Reitora de Extensão Universitária

  
 Francisco Kelmo  
 Diretor do Instituto de Biologia

## ANEXO E – Apresentação em formato de (Banner) em evento científico.

*Certificado*

  
**CONEB 2021**  
 I Congresso de Engenharia de Biotecnologia

Certificamos que o trabalho intitulado **EFEITO INIBITÓRIO SOBRE O CRESCIMENTO DO FITOPATÓGENO FUSARIUM SOLANI POR MEIO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS DE ISOLADOS DO GÊNERO TRICHODERMA SPP.**, de autoria **KÁRITA CRISTINE RODRIGUES DOS SANTOS**, **KAMILA LOURRANE CARVALHO DE ALENCAR ROCHA**, **MARAIZA CASTRO BEZERRA**, **VANICE CONCEIÇÃO DO NASCIMENTO** E **FABYANO ALVARES CARDOSO LOPES** foi apresentado na modalidade **BANNER DIGITAL** durante o I Congresso de Engenharia de Biotecnologia, realizado no período de 28 de junho a 02 de julho de 2021.

Luís Eduardo Magalhães, 05 de julho de 2021.

  
 Prof. Dr. Felipe da Silva Figueira  
 Coordenador do I CONEB  
 Universidade Federal do Oeste da Bahia

Realização:  **UFOP**  
 UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA

Apoio:  **UNEB**  
 UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA

 **UFET**  
 UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

 **UFVJM**  
 Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Patrocinador:  **CAPES**  
 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CÓDIGO DO CERTIFICADO: FFFQE-G56RK-BUFI1A-8CGW1  
 VERIFIQUE AUTENTICIDADE EM: <https://ine.eventos/certificado/validar/FFFQE-G56RK-BUFI1A-8CGW1>



## ANEXO F – Banner apresentado no evento.




**Efeito inibitório sobre o crescimento do fitopatógeno *Fusarium solani* por meio de metabólitos voláteis de isolados do gênero *Trichoderma* spp..**

Karita Cristine Rodrigues dos Santos<sup>1</sup>, Kamila Lourene Carvalho de Alencar Rocha<sup>1</sup>, Maraina Castro Bezerra<sup>1</sup>, Vanice Conceição do Nascimento<sup>1</sup>, Fabyano Alvares Cardoso Lopes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia – Universidade Federal do Tocantins – Campus Porto Nacional

karita.cristine@uft.edu.br / flopes@uft.edu.br



**CONEB 2021**

1 Congresso de Engenharia de Biotecnologia

**CONEB**

**INTRODUÇÃO**

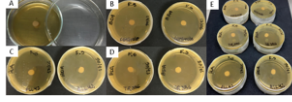
- O agronegócio tem contribuído diretamente na crescente utilização de agroquímicos sintéticos no Brasil (EMBRAPA, 2016).
- O fungo *Fusarium solani* é capaz de infectar diversas culturas de grande interesse econômico como por exemplo: soja, milho, feijão e trigo, em diferentes estágios de desenvolvimento (MILANESI *et al.*, 2013).
- A necessidade de cultivos de maior qualidade e baixa nocividade, tanto a saúde humana, como ao meio ambiente, gerou uma procura por novos agentes de controle biológico.
- Fungos do gênero *Trichoderma*, vieram a contribuir diretamente na construção desse cenário mais sustentável e produtivo.

**OBJETIVO**

- Avaliar a eficiência de isolados *T. harzianum* ALL-42 e *T. asperellum* TR-356 do fungo do gênero *Trichoderma*, contra o fitopatógeno *F. solani*, utilizando-se do teste de avaliação de efeito dos metabólitos voláteis.

**METODOLOGIA**

- O teste de avaliação de efeito de metabólitos voláteis no crescimento do fitopatógeno consistiu em posicionar fundos de placas de Petri umas sobre as outras (Figura 1), após ter vertido em cada uma delas, em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA).

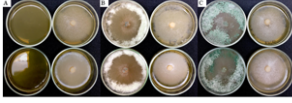


**Figura 1.** Experimento para avaliação do efeito inibitório por metabólitos voláteis. A) Placa contendo meio batata Dextrose Ágar (BDA), com um disco de *F. solani*. B) Placas controle, contendo somente *F. solani*. C) Placa inferior contendo isolado ALL-42 e na superior *F. solani*. D) Placa inferior contendo isolado TR-356 e na superior *F. solani*. E) Placas armazenadas para o teste.

- Discos do isolado de *T. harzianum* ALL-42 e *T. asperellum* TR-356 foram posicionados na parte inferior das placas e na parte superior discos do patógeno *F. solani*, mantidos a 25°C, por 7 dias, utilizando-se do controle como referência para o crescimento.
- Análise de variância, teste de Tukey (0,05) utilizando o software estatístico Sisvar®.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

- Após o período de 7 dias do início do teste, verificou-se que os isolados de *Trichoderma* foram capazes de produzir metabólitos voláteis suficientes, inibindo assim o crescimento do fitopatógeno. (Figura 2 e Tabela 1).



**Figura 2.** Efeito inibitório dos isolados de *Trichoderma* sobre *F. solani*. A) Placas de controle contendo meio (BDA) e disco de agar de *F. solani*. B) Placas contendo disco de agar do isolado ALL-42 e disco de *F. solani*. C) Placas contendo discos de agar do isolado TR-356 e disco de *F. solani*.

**Tabela 1.** Comparação do efeito inibitório dos isolados de *Trichoderma* sobre *F. solani*. Os resultados foram comparados por ANOVA, seguido dos teste de Tukey (0,05) no software Sisvar®.

Tratamento	Diâmetro de crescimento do <i>F. solani</i> (cm)
Controle	5,00 ± 0,00 a
ALL-42	4,08 ± 0,13 b
TR-356	4,27 ± 0,22 b

**CONCLUSÃO**



- Os isolados do fungo *Trichoderma* apresentaram efeito inibitório no crescimento do fitopatógeno *F. solani* por metabólitos voláteis.
- Novos testes para avaliar a capacidade de micoparasitismo dos isolados estudados serão realizados.
- Os fungos ALL-42 e TR-356 possuem um grande potencial no mercado de biocontrole.

**REFERÊNCIAS**

EMBRAPA. Controle biológico: ciência a serviço da sustentabilidade. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1614268/controle-biologico-ciencia-a-servico-da-sustentabilidade>. Acesso em: 18 de Junho, 2021.

MILANESI, P. M., et al. Biocontrole de *Fusarium* spp. com *Trichoderma* spp. e promoção de crescimento em plântulas de soja. *Revista de Ciências Agrárias*. v. 36, n. 3, 2013.

**AGRADECIMENTOS**

## ANEXO G – Apresentação oral em evento científico.

Verifique o código de autenticação: 3300496.3753203.568621.6.2236850724322035415 em <https://www.even3.com.br/documents>



**17º SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

**Certificamos que o trabalho intitulado *Uso de isolados do fungo do gênero Trichoderma spp. do Cerrado do Tocantins contra os fitopatógenos Rhizoctonia solani, Fusarium solani e Colletotrichum gloeosporioides* de autoria de KARITA CRISTINE RODRIGUES DOS SANTOS e Fabyano Alvares Cardoso Lopes, foi apresentado na "modalidade comunicação oral" no evento XVII Seminário de Iniciação Científica da UFT, realizado em 20/10/2021 a 22/10/2021, contabilizando carga horária total de 40 horas.**

Gurupi-To, 20 de outubro de 2021.



Prof. Dr. Raphael Sanzio Pimenta  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - UFT



Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação - PROPEQ

