



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

**KAMILA LOURRANE CARVALHO ALENCAR**

**ESTUDO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTAGÔNICO DE ISOLADOS DE**  
***Trichoderma* spp. AO FITOPATÓGENO *Fusarium oxysporum***

**Porto Nacional, TO**

**2022**

**Kamila Lourrane Carvalho Alencar**

**Estudo *in vitro* do potencial antagônico de isolados de *Trichoderma* spp. ao fitopatógeno  
*Fusarium oxysporum***

Monografia apresentada à Universidade Federal do Tocantins (UFT), *Campus* Universitário de Porto Nacional para obtenção do título de bacharel 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**

---

A368e Alencar, Kamila Lourane Carvalho.  
Estudo in vitro do potencial antagônico de isolados de *Trichoderma* spp. ao fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. / Kamila Lourane Carvalho Alencar. – Porto Nacional, TO, 2022.  
48 f.  
Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Porto Nacional - Curso de Ciências Biológicas, 2022.  
Orientador: Fabyano Alvares Cardoso Lopes  
1. Controle biológico. 2. Ensaio enzimático. 3. Micoparasitismo. 4. Murcha do fusário. 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).**

**Kamila Lourrane Carvalho Alencar**

**Estudo *in vitro* do potencial antagônico de isolados de *Trichoderma* spp. ao fitopatógeno  
*Fusarium oxysporum***

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

Data de aprovação: 18/11/2021

Banca Examinadora

---

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

---

MSc. Amanda Rafaela Rodrigues, Examinadora, UFG

---

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

A minha mãe Adélia, meu pai Miguel e a minha irmã Kaline que sempre me apoiaram, incentivaram e nunca desistiram de mim durante a minha longa jornada de formação acadêmica.

## RESUMO

O fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, pertencente ao gênero causador da doença conhecida popularmente como fusariose ou murcha do fusário, acomete diversas culturas agrícolas em todo o mundo. Seu alto grau de patogenicidade está associado à sua capacidade de colonização do sistema vascular das plantas, como também, pela produção de estruturas de resistências no solo, os clamidósporos. Considerando a necessidade de métodos que contribuam no desenvolvimento agrícola sem promover danos ao ambiente e a população, os agentes de controle biológico (ACBs) são hoje vistos como um excelente artifício. Fungos do gênero *Trichoderma* podem ser considerados ACBs sagazes por apresentarem inúmeros mecanismos com alto potencial antagonico que prejudicam a germinação de esporos, o crescimento das hifas e o desenvolvimento de clamidósporo de diversos fitopatógenos. O presente trabalho buscou avaliar a eficiência de isolados de *Trichoderma* spp. no biocontrole do fitopatógeno *F. oxysporum* por meio de testes de pareamento, análise enzimática e produção de metabólitos secundários. Todos os isolados tiveram resultados considerados satisfatórios, segundo a escala de Bell, no teste de pareamento. Entretanto, no teste de metabólitos voláteis nenhum isolado alcançou efeito inibitório. Já a análise dos metabólitos não voláteis mostrou que o isolado de *T. asperelloides* TR-356 pode inibir o crescimento micelial do *F. oxysporum* sem a necessidade do contato direto entre as hifas. Os testes enzimáticos indicaram que os isolados de *Trichoderma* spp., quando em presença de micélios macerados do fitopatógeno *F. oxysporum* apresentaram atividades hidrolíticas de importantes compostos presentes na parede celular do hospedeiro, tendo destaque nessa ação os isolados *T. asperelloides* TR-356 e *Trichoderma* spp. 2. Com os resultados obtidos, foi possível concluir que os isolados *T. asperelloides* TR-356 e *Trichoderma* spp. 2 foram os mais eficazes no antagonismo ao fitopatógeno *F. oxysporum*, tornando-os potenciais ACBs.

**Palavras-chaves:** Controle biológico. Ensaio enzimático. Micoparasitismo. Murcha de fusário.

## ABSTRACT

The phytopathogen *Fusarium oxysporum*, belonging to the genus that causes the disease popularly known as fusariosis or *Fusarium* wilt, affects several agricultural crops worldwide. Its high degree of pathogenicity is associated with its ability to colonize the vascular system of plants, as well as the production of resistance structures in the soil, the chlamydospores. Considering the need for methods that contribute to agricultural development without causing damage to the environment and the population, biological control agents (BCAs) are now seen as an excellent artifice. Fungi of the genus *Trichoderma* can be considered cunning BCAs because they have numerous mechanisms with high antagonistic potential that impair spore germination, hyphal growth and chlamydospore development of various phytopathogens. The present work sought to evaluate the efficiency of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of the phytopathogen *F. oxysporum* through pairing tests, enzymatic analysis, and production of secondary metabolites. All isolates had results considered satisfactory, according to the Bell scale, in the pairing test. However, in the volatile metabolites test, none of the isolates achieved an inhibitory effect. The analysis of non-volatile metabolites showed that the isolate of *T. asperelloides* TR-356 can inhibit the mycelial growth of *F. oxysporum* without the need for direct contact between the hyphae. The enzymatic tests indicated that the isolates of *Trichoderma* spp., when in the presence of macerated mycelia of the phytopathogen *F. oxysporum*, showed hydrolytic activities of important compounds present in the cell wall of the host, with emphasis in this action on the isolates *T. asperelloides* TR-356 and *Trichoderma* spp. 2. With the results obtained, it was possible to conclude that the isolates *T. asperelloides* TR-356 and *Trichoderma* spp. 2 were the most effective in antagonizing the phytopathogen *F. oxysporum*, making them potential BCAs.

**Key words:** Biological control. Enzyme assay. Mycoparasitism. *Fusarium* wilt.

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 - Culturas <i>in vitro</i> em meio de cultura BDA dos isolados utilizados.....	18
Figura 2 - Resultado do teste de pareamento <i>in vitro</i> entre os isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e o fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> .....	25
Figura 3 - Resultado do teste <i>in vitro</i> para verificação da inibição do crescimento micelial do fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> por meio da produção de metabólitos voláteis de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	26
Figura 4 - Resultado do teste <i>in vitro</i> para verificação da inibição do crescimento micelial do fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> por meio da produção de metabólitos não voláteis de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	28
Figura 5 - Atividade específica de NAGase de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. frente ao fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> .....	30
Figura 6 - Atividade específica de quitinase de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. frente ao fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> .....	30
Figura 7 - Atividade específica de $\beta$ -1,3-glicanase de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. frente ao fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> .....	31
Figura 8 - Atividade específica de protease de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. frente ao fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> .....	32
Figura 9 - Atividade específica de celulase de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. frente ao fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> .....	33
Figura 10 - <i>Heatmap</i> dos testes em estudos dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. como Agente de Controle Biológico ao fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> .....	35



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Determinação da escala de Bell (1982) em relação à placas de Petri de 13,5cm....	19
Tabela 2 - Análise comparativa da eficácia dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. frente ao fitopatógeno <i>Fusarium oxysporum</i> perante o teste de pareamento com notas baseadas na escala de Bell, Wells e Markham (1982) .....	24
Tabela 3 - Inibição do crescimento micelial do fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> através da produção de metabólitos voláteis de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. ....	27
Tabela 4 - Inibição do crescimento micelial do fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> através da produção de metabólitos não voláteis de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. ....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACBs	Agentes de controle biológico
ADNS	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
BDA	Batata Dextrose Ágar
MYG	<i>Malt extract, yeast extract and glucose</i>
NAGase	N-acetil-glicosaminidase
TCA	Ácido tricloroacético
UFG	Universidade Federal de Goiás
UFT	Universidade Federal do Tocantins

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1</b>	<b>O gênero <i>Trichoderma</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2</b>	<b>O fitopatógeno <i>Fusarium oxysporum</i> e a ação antagônica do <i>Trichoderma</i> .....</b>	<b>15</b>
<b>1.3</b>	<b>Problemática da pesquisa .....</b>	<b>16</b>
1.3.1	Hipótese.....	16
1.3.2	Delimitação de escopo.....	16
1.3.3	Justificativa.....	16
<b>1.4</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>17</b>
1.4.1	Objetivo geral .....	17
1.4.2	Objetivos específicos.....	17
<b>1.5</b>	<b>Metodologia.....</b>	<b>17</b>
1.5.1	Isolados utilizados .....	17
1.5.2	Teste de pareamento .....	19
1.5.3	Teste de produção de metabólitos secundários .....	19
1.5.3.1	<i>Metabólitos voláteis</i> .....	20
1.5.3.2	<i>Metabólitos não voláteis</i> .....	20
1.5.4	Produção de micélios do fitopatógeno <i>Fusarium oxysporum</i> .....	20
1.5.5	Indução da produção de enzimas dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. frente ao fitopatógeno <i>Fusarium oxysporum</i> .....	21
1.5.6	Dosagem de proteínas totais.....	21
1.5.7	Dosagem das atividades enzimáticas .....	21
1.5.7.1	<i>N-acetil-glicosaminidase (NAGase)</i> .....	22
1.5.7.2	<i>Quitinase</i> .....	22
1.5.7.3	<i>β-1,3-glicanase</i> .....	22
1.5.7.4	<i>Protease</i> .....	23
1.5.7.5	<i>Celulase</i> .....	23
<b>2</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1</b>	<b>Teste de pareamento .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2</b>	<b>Teste de produção de metabólitos secundário .....</b>	<b>25</b>
2.2.1	Metabólitos voláteis .....	25
2.2.2	Metabólitos não voláteis.....	27
<b>2.3</b>	<b>Dosagem das atividades enzimáticas .....</b>	<b>28</b>

2.3.1	N-acetil-glicosaminidase (NAGase) e quitinase .....	29
2.3.2	$\beta$ -1,3-glicanase .....	31
2.3.3	Protease .....	32
2.3.4	Celulase .....	33
<b>2.4</b>	<b>Análise comparativa das ações antagônicas dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. ao fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> .....</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>36</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>38</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura do uso de agroquímicos nas lavouras brasileiras é uma prática altamente difundida, principalmente entre os agricultores ligados ao monocultivo. O Ministério da Saúde relata que, desde 2008, o Brasil é considerado o maior consumidor de agroquímicos em todo o mundo e, em 2012, o Tocantins ficou classificado como o segundo estado da região norte brasileira que mais faz uso desses produtos (ALMEIDA, 2014). Segundo Almeida (2014), o aumento do uso desses produtos químicos está associado ao crescimento das monoculturas de soja, milho, algodão e cana-de-açúcar no território tocantinense. Contudo, Amaral *et al.* (2016) evidenciam que os efeitos colaterais causados pelo uso desses produtos, visando a erradicação dos patógenos presentes nas culturas para que não haja perda em sua produtividade, tornam suas vantagens de curto prazo imperceptíveis, visto que a aplicação desses químicos de modo indevido provoca inúmeros malefícios como intoxicação humana e contaminação do solo. Ao perceberem a necessidade de diminuir o uso de agroquímico, os produtores das monoculturas buscaram optar pelo uso de outros mecanismos de defesa contra os patógenos que agridem as culturas agrícolas que não ocasionasse contaminação ao ambiente e nem prejuízos a saúde pública e que, além disso, não trouxesse desvantagens econômicas ao produtor, dando ao controle biológico relevância para as plantações.

O controle biológico envolve a aplicação de organismos ou microrganismos vivos que agem como antagonistas aos patógenos de plantas, reduzindo-os ou eliminando-os de modo não danoso para o vegetal (ALABOUVETTE e STEINBERG, 2006; COOK w BAKER, 1983; OWNLEY *et al.*, 2010;). Os agentes de controle biológicos (ACBs) dispõem de diversos artifícios antagônicos como: micoparasitismo, que se resume à secreção de enzimas hidrolíticas que decompõem a parede celular do fungo antagonista; competição por espaço e/ou nutrientes; e a produção de metabólitos que perturbam o progresso do patógeno (BETTIOL, 2001). O manejo dos ACBs pode advir da inserção do antagonista vivo, modo direto, ou somente pela inclusão dos metabólitos produzidos pelo ACB, modo indireto (DI PIERO e GARDA, 2008; GRIGOLETTI JÚNIOR *et al.*, 2000; LAZZARETTI e BETTIOL, 1997; MORANDI e BETTIOL, 2009). Benítez *et al.* (2004) apontam os fungos do gênero *Trichoderma* entre os ACBs mais comercializados e estudados para aplicação em campo.

## 1.1 O gênero *Trichoderma*

Com traços fenotípicos de nítida percepção, o gênero *Trichoderma* abrange fungos de crescimento colonial rápido, com micélios brancos, conídios verdes e habitats diversificados, da rizosfera a parasita de fungos macroscópicos (DE ABREU e PFENNING, 2019). Pertencentes ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes e família Hypocreaceae, os isolados do gênero *Trichoderma* são fungos mesófilos, apesar de estarem distribuídos em todo globo terrestre (MACHADO *et al.*, 2012; DE ABREU e PFENNING, 2019). A absorção de nutrientes, desse gênero, dá-se por intermédio das suas hifas ao secretarem enzimas hidrolíticas que viabilizam sua entrada na parede celular do hospedeiro para assim desfrutarem dos substratos de alto peso molecular, logo que suceda a hidrólise (MONTE *et al.*, 2019).

De acordo com Kubicek *et al.* (2011), o micoparasitismo pode ser considerado um caráter ancestral do gênero *Trichoderma* devido o amplo número de genes que codificam enzimas, tais como,  $\beta$ -1,3-glicanase (enzima que atua na degradação das glicanas da parede celular do fungo-alvo), N-acetil-glicosaminidase (NAGase), quitinase (enzimas que atuam na degradação da quitina da parede celular do fungo-alvo), proteases (enzimas que degradam proteínas da parede celular do fungo-alvo) e a fosfatase ácida (enzima que atua em compostos fosfatados monoesteres). Tal mecanismo oportuniza ao *Trichoderma* uma nutrição biotrófica e saprófita, desse modo, as enzimas secretadas por esses fungos inibem a germinação de esporos e o crescimento de hifas de fungos competidores, além de impedir o desenvolvimento de escleródios e clamidósporos dos fungos alvos (DRUZHININA *et al.*, 2018; MONTE *et al.*, 2019).

O antagonismo das espécies do gênero *Trichoderma* é ainda mais amplificado uma vez que esses fungos realizam a produção de metabólitos secundários que exibem propriedades antibióticas a muitas espécies alvos. Os fungos desse gênero exibem, ainda, uma extensa diversidade de metabólitos que potencializam a efetividade do controle biológico ao agirem de modo associado às enzimas hidrolíticas no crescimento populacional da praga-alvo (HERMOSA *et al.* 2014, MONTE *et al.*, 2019). Essas espécies também são capazes de gerar interações mutualistas com os organismos vegetais, como por exemplo, estimular alterações nas raízes das plantas que levam a ampliação da superfície de contato, do número de raízes e dos pelos absorventes, favorecendo o desenvolvimento das plantas (DA SILVA *et al.*, 2019; DE ABREU e PFENNING, 2019).

Por meio das características já descritas sobre as espécies de *Trichoderma*, pode-se perceber que esse gênero mais do que competem por nutrientes e parasitam inúmeros fungos,

são também hábeis para detectar e crescer em direção ao fungo patogênico, ocasionando a anulação do desenvolvimento do fungo alvo. Tal concepção de distância no tocante a outros fungos e a aptidão de secretar enzimas degradantes da parede celular, possibilitam ao gênero *Trichoderma* ser considerado um versátil antagonista (HARMAN *et al.*, 2004; SUASSUNA *et al.*, 2019).

## 1.2 O fitopatógeno *Fusarium oxysporum* e a ação antagônica do *Trichoderma*

Agente responsável pela doença popularmente conhecida como murcha do fusário ou fusariose que acomete culturas de algodão, feijão e hortaliças, o fungo *F. oxysporum* é um patógeno que tem por habitat o solo, tendo potencial para colonizar também o sistema vascular das plantas sendo as raízes a porta de entrada. Por se tratar de uma doença interna, a murcha do fusário é considerada um distúrbio de difícil controle (LOPES e AVILA, 2005; STEILMANN *et al.*, 2019), podendo a contaminação do vegetal ocorrer em qualquer estágio do seu desenvolvimento. Quando infectadas as plantas apresentam características como folhas amareladas e murchas, ramos emurchecidos, caule enegrecido, necrose e, em certos casos, à morte (DAVIS *et al.*, 2006; SUASSUNA, SILVA e BETIOL, 2019). A fusariose afeta, ainda, o desenvolvimento das plantas pois, inibe o crescimento das raízes, caule e ramos ao formar tílozes nos vasos do vegetal devido a obstrução causada pela presença de esporos e micélios do fitopatógeno (SUASSUNA e COUTINHO, 2015). O potencial infeccioso do *F. oxysporum* dar-se, também, pelo sucesso de sobrevivência no solo por muito tempo na condição de clamidósporo (estrutura de resistência), onde diversas pesquisas ressaltam a ineficiência dos fungicidas em combater as estruturas de resistências fúngicas presentes no solo das lavouras contaminadas (SUASSUNA *et al.*, 2019).

O controle de certas patologias vegetais, como a murcha do fusário, pode ocorrer por meio do uso de isolados do gênero *Trichoderma* em razão das suas variadas habilidades em atuar como antagonista de fitopatógenos. As espécies de *Trichoderma* operam contra o fitopatógeno *F. oxysporum* por intermédio da competição e colonização da rizosfera, agindo com o intuito de adquirir nutrientes causando, ao fitopatógeno, prejuízos como dificultar a germinação dos clamidósporos e reduzir seu crescimento micelial (TJAMOS *et al.*, 1992).

### 1.3 Problemática da pesquisa

Fungos do gênero *Trichoderma* são considerados excelentes ACBs devido seu grande potencial como micoparasitas, fazendo-os se sobressaírem aos seus competidores, além de, em alguns casos, serem capazes de inibir o desenvolvimento dos seus antagonistas através dos seus metabólitos secundários.

Visando minimizar os impactos acometidos pelo fitopatógeno *F. oxysporum* nas lavouras, como também o uso de químicos agrícolas, isolados do gênero *Trichoderma* são vistos como uma excelente alternativa pois, além de impossibilitarem o desenvolvimento do fitopatógeno também produzem proventos que auxiliam as plantas no seu desenvolvimento.

#### 1.3.1 Hipótese

I. Isolados do gênero *Trichoderma* provenientes do Cerrado tocantinense possuem potencial para serem aplicados como agentes biocontroladores contra o fitopatógeno *F. oxysporum*.

II. Isolados do gênero *Trichoderma* provenientes do Cerrado tocantinense são considerados antagonistas mais eficazes ao *F. oxysporum* do que os isolados *T. harzianum* ALL-42 e *T. asperelloides* TR-356.

#### 1.3.2 Delimitação de escopo

Neste trabalho foi analisado o potencial antagônico de quatro isolados do gênero *Trichoderma* ao fitopatógeno *F. oxysporum*, por meios de teste de confronto direto (pareamento), análise da ação dos metabólitos secundários voláteis e não voláteis e ensaio enzimático de NAGase, quitinase,  $\beta$ -1,3-glicanase, proteases e celulase.

#### 1.3.3 Justificativa

A agricultura é considerada uma das principais fontes econômicas do estado do Tocantins, sendo as monoculturas à base de algodão e feijão cada vez mais frequentes no cerrado tocantinense. Entretanto, fitopatogenicidades como a murcha do fusário acometida por fungos do gênero *Fusarium*, trazem preocupações aos produtores, visto que tal patógeno pode ser terrivelmente danosa as plantações de algodão e feijão.



Portanto, a procura por novos ACBs e a compreensão dos mecanismos utilizados pelos mesmos no controle do fitopatógeno *F. oxysporum* é fundamental para a obtenção de um cenário mais sustentável no Tocantins, aspirando um menor emprego de agroquímicos e uma utilização mais racional dos recursos naturais.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antagônico de isolados de *Trichoderma* spp. frente ao fitopatógeno *Fusarium oxysporum*.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade antagônica de isolados de *Trichoderma* spp. contra *F. oxysporum* através do teste de pareamento;
- Avaliar o potencial de inibição de crescimento micelial do fitopatógeno *F. oxysporum* por meio de metabólitos voláteis e não voláteis produzidos por isolados de *Trichoderma* spp.;
- Avaliar as atividades enzimáticas (NAGase,  $\beta$ -1,3-glicanase, protease, quitinase e celulase) de isolados de *Trichoderma* spp. em presença do fitopatógeno *F. oxysporum*;

## 1.5 Metodologia

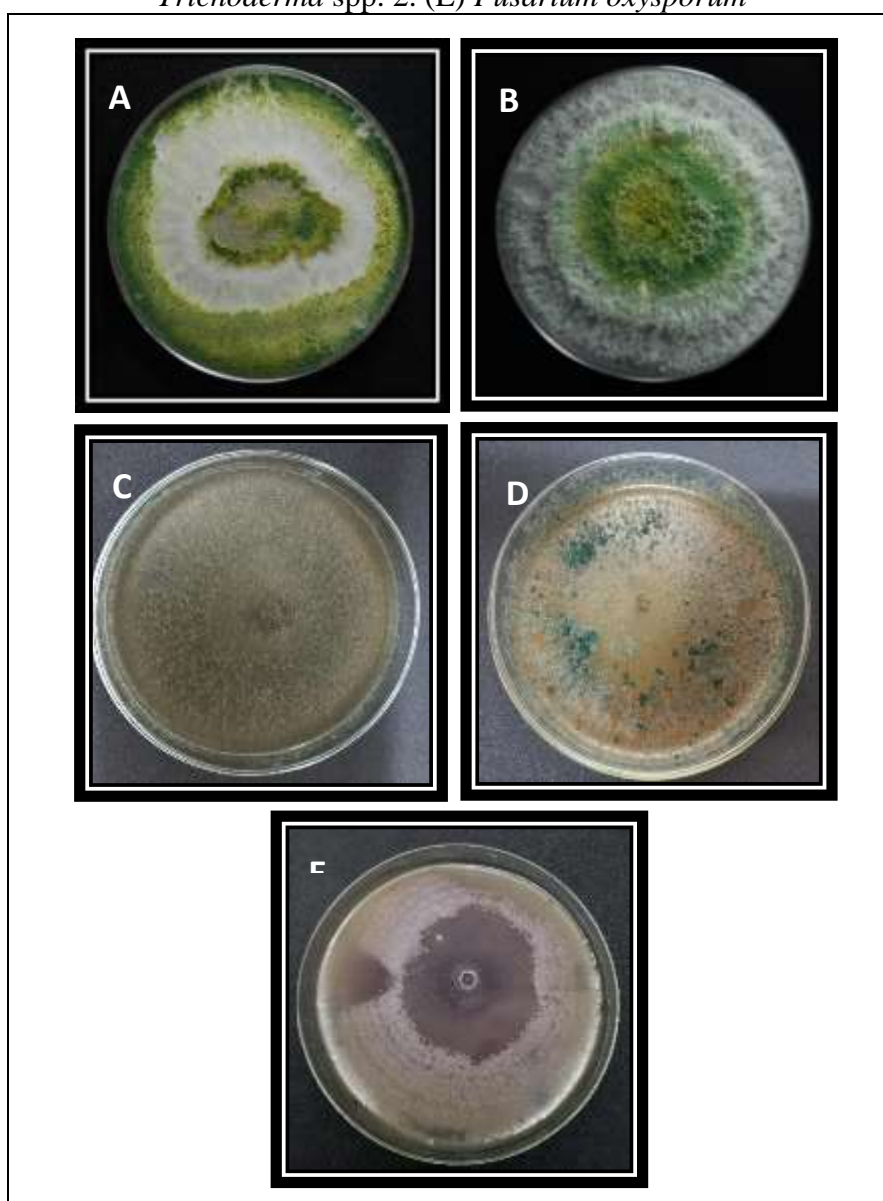
Este trabalho fez uso de metodologias que visaram a manutenção e replicação dos isolados utilizados, como também a aplicação dos testes de pareamento, metabólitos voláteis e não voláteis e a avaliação das atividades enzimáticas, conforme descritas nos tópicos abaixo.

### 1.5.1 Isolados utilizados

Foram utilizados os organismos *Trichoderma harzianum* isolado ALL-42 (Figura 1 – A), *Trichoderma asperelloides* isolado TR-356 (Figura 1 – B) e o fitopatógeno *Fusarium oxysporum* (Figura 1 – E), todos cedidos pelo Laboratório de Enzimologia – UFG, Goiânia

(GO). Além dos isolados citados, outros dois isolados do gênero *Trichoderma* também foram utilizados no estudo, sendo estes oriundos da coleta em áreas do Cerrado tocantinense realizada pelo Laboratório de Microbiologia – UFT, Porto Nacional (TO), e nomeados como *Trichoderma* spp. 1 (Figura 1 – C) e *Trichoderma* spp. 2 (Figura 1 – D). Todos os isolados foram mantidos em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) sólido a 24°C, com a realização de novos repiques quinzenalmente.

Figura 1 - Culturas *in vitro* em meio de cultura BDA dos isolados utilizados. (A) *T. harzianum* ALL-42. (B) *T. asperelloides* TR-356. (C) *Trichoderma* spp. 1. (D) *Trichoderma* spp. 2. (E) *Fusarium oxysporum*



Fotos: Autor (E), Fabyano A. C. Lopes (A e B) e Vanice C. do Nascimento (C e D).

### 1.5.2 Teste de pareamento

Em uma das extremidades da placa de Petri medindo aproximadamente 13,5cm contendo meio BDA sólido, foi inserido um disco de ágar (5mm de diâmetro) contendo micélio do fitopatógeno *F. oxysporum* e incubado até tomar 1/3 (um terço) da placa, cerca de sete dias. Após o crescimento do fitopatógeno foi adicionado o disco de ágar (5mm de diâmetro) do isolado de *Trichoderma* spp., depositados na extremidade oposta e armazenados em temperatura de 25°C por mais sete dias. Todo o teste foi realizado em triplicata (MELLO *et al.*, 2007).

A eficiência dos isolados perante o teste de pareamento foi baseada na escala de Bell, Wells e Markham (1982), que varia de um a cinco, onde o isolado que obtém nota inferior ou igual a 3,0 é classificado como eficiente. As notas da escala de Bell, Wells e Markham (1982) foram dadas de acordo com a análise do crescimento final do isolado de *Trichoderma*, sendo a mesma classificada conforme demonstra a Tabela 1. Por fim, as notas obtidas dos isolados foram comparadas por Teste T ( $\alpha = 0,05$ ) no programa estatístico Sisvar®

Tabela 1 - Determinação da escala de Bell (1982) em relação à placa de Petri de 13,5cm

Escala	Crescimento micelial em cm do isolado de <i>Trichoderma</i>
1	13,5 – 10,8
2	10,7 – 8,1
3	8,0 – 5,4
4	5,3 – 2,7
5	2,6 – 0

Fonte: Autor.

### 1.5.3 Teste de produção de metabólitos secundários

Os metabólitos secundários podem ser divididos, para melhor estudo e compreensão em dois grupos, metabólitos secundários voláteis e metabólitos secundários não voláteis. Sendo assim, o estudo da ação inibitória do crescimento micelial dos fitopatógenos por meio desses elementos possibilita compreender, de forma mais ampla, as ações antagônicas dos isolados do gênero *Trichoderma* e como melhor aplicá-los no controle biológico.

#### 1.5.3.1 Metabólitos voláteis

Baseado no método descrito por Bharat, Singh e Singh (1980), com modificações no tempo de incubação, o teste para análise da inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *F. oxysporum* por meio da produção de metabólitos voláteis de isolados de *Trichoderma* spp. consistiu na disposição frontal de dois fundos de placa de Petri de aproximadamente 13cm contendo meio BDA sólido, onde na placa inferior foi inserido o disco de ágar (5mm) do isolado de *Trichoderma* e na placa superior foi inserido o disco de ágar (5mm) do fitopatógeno *F. oxysporum*. Foi produzida, também, uma placa contendo apenas o disco de ágar do fitopatógeno servindo de controle para o teste. Por fim, as placas que foram acondicionadas por sete dias à 25°C. O teste foi realizado em triplicata e os dados obtidos foram comparados por análise de variância e Teste Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) no programa estatístico Sisvar®.

#### 1.5.3.2 Metabólitos não voláteis

Consistiu na preparação de 50mL de meio BDA líquido, em frascos de Erlenmeyer de 250mL, acrescido de 0,25g de glicose e, em alguns frascos, 0,5% de micélio macerado de *F. oxysporum*. O meio de cultura foi autoclavado e após resfriado inoculou-se a solução de  $10^7$  de esporos de isolados de *Trichoderma* spp., em todos os frascos de Erlenmeyer. Os frascos foram mantidos em agitação constante de 150rpm por 120 horas em temperatura de 28°C e, em seguida, recolheu-se o sobrenadante por meio de filtragem a vácuo. Foi adicionado 10mL do sobrenadante a 60mL de meio BDA sólido, contendo 1,2g de glicose, em frasco de Erlenmeyer de 150mL que foi autoclavado e vertido em três placas de Petri. Discos de 5mm foram coletados de colônias ativas do fitopatógeno e inseridos às placas de Petri, que foram incubados a 27°C por sete dias (FRIGHETTO e MELO, 1995). O crescimento controle foi usado como referência. Todo o teste foi realizado em três repetições e após finalizados os dados foram comparados por análise de variância e Teste Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) no programa estatístico Sisvar®.

#### 1.5.4 Produção de micélios do fitopatógeno *Fusarium oxysporum*

Em frascos de Erlenmeyer de 500mL contendo 300mL de meio MYG [Extrato de malte 0,5%, extrato de levedura 0,25%, glicose 1,0%] foram inseridos discos de ágar (5mm de diâmetro) contendo micélio do fitopatógeno *F. oxysporum* para induzir a produção de massa micelial do mesmo. Os frascos de Erlenmeyer foram incubados em rotação constante de

180rpm, a 24°C por 6 dias. Os micélios foram filtrados a vácuo, lavados, secados em estufa (a 65°C overnight), macerados e armazenados a -4°C.

#### 1.5.5 Indução da produção de enzimas dos isolados de *Trichoderma* spp. frente ao fitopatógeno *Fusarium oxysporum*

Realizou-se o método descrito por Lopes *et al.* (2012), no qual 20mL de meio TLE (Bactopeptona 1,0g/L, Ureia 0,3g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,4g/L, MgSO<sub>4</sub> 0,3g/L, CaCl<sub>2</sub> 0,3g/L, glicose 3g/L, solução elementos traços 1mL/L) foi colocado em frasco de Erlenmeyer de 125mL juntamente com 0,5% de micélio macerado do fitopatógeno *F. oxysporum* e levado para esterilização em autoclave (em temperatura de 121°C, pressão 110kPa durante 20 minutos). Após o resfriamento do meio, foi adicionado à solução de 10<sup>7</sup> esporos dos isolados de *Trichoderma*. O recipiente foi conservado em agitação constante de 120rpm por 48h à 28°C. Em seguida a solução foi filtrada a vácuo para a extração do sobrenadante, que foi armazenado em tubos cônicos do tipo Falcon e congelado para posterior leitura proteica e enzimática. Todo o teste foi realizado em três replicações para cada isolado de *Trichoderma*.

#### 1.5.6 Dosagem de proteínas totais

Aplicou-se a técnica apresentada por Bradford (1976), usando a albumina de soro bovino como padrão para o reagente de Bradford. O teste consistiu na inserção de 100µL do sobrenadante em tubos de ensaio, seguido de 1mL do reagente de Bradford. Após ter permanecido em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro à 595nm.

#### 1.5.7 Dosagem das atividades enzimáticas

Para esse trabalho foram selecionadas cinco enzimas (NAGase, quitinase, β-1,3-glicanase, protease e celulase) para análise das atividades enzimáticas dos isolados de *Trichoderma* frente ao fitopatógeno *F. oxysporum*. Os subtópicos abaixo descrevem as metodologias utilizadas na análise específica para cada enzima.

#### 1.5.7.1 *N*-acetil-glicosaminidase (NAGase)

Procedeu-se com a metodologia descrita por Ulhoa e Peberdy (1992), com alteração, no qual 50 $\mu$ L da amostra foi incorporado à 350 $\mu$ L de solução tampão de acetato de sódio 50mM pH 6,0 e a 100 $\mu$ L de solução pnp-derivado 5mM. Após 15 minutos em repouso a 37°C, foi acrescentado a preparação 1mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M para então, ser realizada a leitura do montante de *p*-nitrofenol em espectrofotômetro à 405nm. Uma unidade enzimática (U) foi estabelecida como quantia básica para gerar 1 $\mu$ mol de *p*-nitrofenol por minuto. Os dados foram comparados por análise de variância e Teste Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) no programa estatístico Sisvar®.

#### 1.5.7.2 Quitinase

Inicialmente foi preparada a quitina coloidal, sua purificação foi realizada por meio da adição de 3g de quitina à 30mL de HCl 37% (v/v) e mantidos sob agitação constante por 50min à 350rpm. Em seguida, 1L de água destilada gelada foi inserido à solução que foi centrifugada por 15 minutos à 7.000rpm para remoção da quitina purificada (*pellet*). O *pellet* foi lavado com água destilada até alcançar pH 5,0 (LIU *et al.*, 2014).

A atividade de quitinase foi realizada seguindo a metodologia de Wirth e Wolf (1992), com adaptações para detecção da atividade enzimática em espectrofotômetro. Em tubos de ensaio, 50 $\mu$ L de amostra foram inseridos juntamente com 150 $\mu$ L de quitina coloidal 1% em tampão acetado de sódio 50mM pH 5,5. A mistura permaneceu em repouso durante 2 horas em banho-maria à 35°C. Foi acrescentado 1mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (ADNS) e fervido por cinco minutos para parar a reação. Após resfriada, a solução foi levada para leitura em espectrofotômetro à 540nm. Uma unidade enzimática (U) foi estabelecida como quantia básica para gerar 1 $\mu$ mol de açúcar redutor por minuto. Os dados foram comparados por análise de variância e Teste Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) no programa estatístico Sisvar®.

#### 1.5.7.3 $\beta$ -1,3-glicanase

A dosagem decorreu de acordo com o procedimento delineado por Bara, Lima e Ulhoa (2003), com alterações, no qual 50 $\mu$ L da amostra foi incorporado a 100 $\mu$ L de laminarina 0,25% em solução tampão de acetato de sódio 50mM pH 5,0 e aquecidos a 40°C por 30 minutos. Seguidamente ao período de incubação, foi incluído 1mL de ADNS, a combinação foi fervida

por cinco minutos e analisada em espectrofotômetro à 540nm. Uma unidade enzimática (U) foi estabelecida como quantia básica para gerar 1 $\mu$ mol de açúcar redutor por minuto. Os dados foram comparados por análise de variância e Teste Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) no programa estatístico Sisvar®.

#### 1.5.7.4 Protease

Para aferir a atividade da enzima protease seguiu-se a metodologia descrita por Cabral *et al.* (2004), com modificações. Foram adicionados 200 $\mu$ L de amostra à 500 $\mu$ L de azocaseína 0,25% em solução tampão Tris-HCl 50mM pH 5,0, em microtubos do tipo *eppendorf* e mantidos em banho-maria por 15 minutos a 37°C. Em seguida, 700 $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) 20% foi incorporado à mistura e levada para centrifugação por 15 minutos à 12.000rpm. Por fim, transferiu-se 1mL da solução para tubos de ensaio acrescidos de 200 $\mu$ L de solução de NaOH 3M para então ser realizada à leitura da absorbância em espectrofotômetro à 440nm. Uma unidade enzimática (U) foi estabelecida como quantia básica para aumentar 1abs por minuto. Os dados foram comparados por análise de variância e Teste Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) no programa estatístico Sisvar®.

#### 1.5.7.5 Celulase

A atividade de celulase foi medida através da inserção de 10mg de papel filtro (discos de 5mm), em tubos de ensaio, seguidos da adição de 100 $\mu$ L da amostra e 100 $\mu$ L da solução tampão acetado de sódio 50mM pH 5,0. A mistura permaneceu em banho-maria por 60 minutos à 50°C. Posteriormente foi inserido 1mL de ADNS e fervida a solução por cinco minutos (MANDELS, ANDREOTTI E ROCHE, 1976). Uma unidade enzimática (U) foi estabelecida como quantia básica para gerar 1 $\mu$ mol de açúcar redutor por minuto. Os dados foram comparados por análise de variância e Teste Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) no programa estatístico Sisvar®.

## 2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização dos testes descritos acima os dados obtidos foram coletados e examinados. Segue abaixo a descrição dos resultados adquiridos para cada teste executado, bem como as discussões para tais resultados.

### 2.1 Teste de pareamento

Conforme explica Ramada *et al.* (2010), o teste de pareamento possibilita a visualização do potencial antagonico das espécies testadas. Após a aplicação do teste de pareamento dos isolados de *Trichoderma* spp. em confronto com o fitopatógeno *F. oxysporum* (Figura 2), foi possível perceber que todos os isolados demonstraram capacidade antagonica ao fitopatógeno. Como demonstrado na Tabela 2, todos os isolados obtiveram nota dois segundo a escala de Bell, Wells e Markham (1982), o que significa que no confronto direto *in vitro* todos os isolados de *Trichoderma* spp. testados tiveram maior crescimento micelial do que o isolado de *F. oxysporum*.

Tabela 2 - Análise comparativa da eficácia dos isolados de *Trichoderma* spp. frente ao fitopatógeno *Fusarium oxysporum* perante o teste de pareamento com notas baseadas na escala de Bell, Wells e Markham (1982). Os dados obtidos foram analisados comparativamente e as notas foram submetidas a comparação através do Teste T de Bonferroni ( $\alpha = 0,05$ ) no programa estatístico Sisvar®

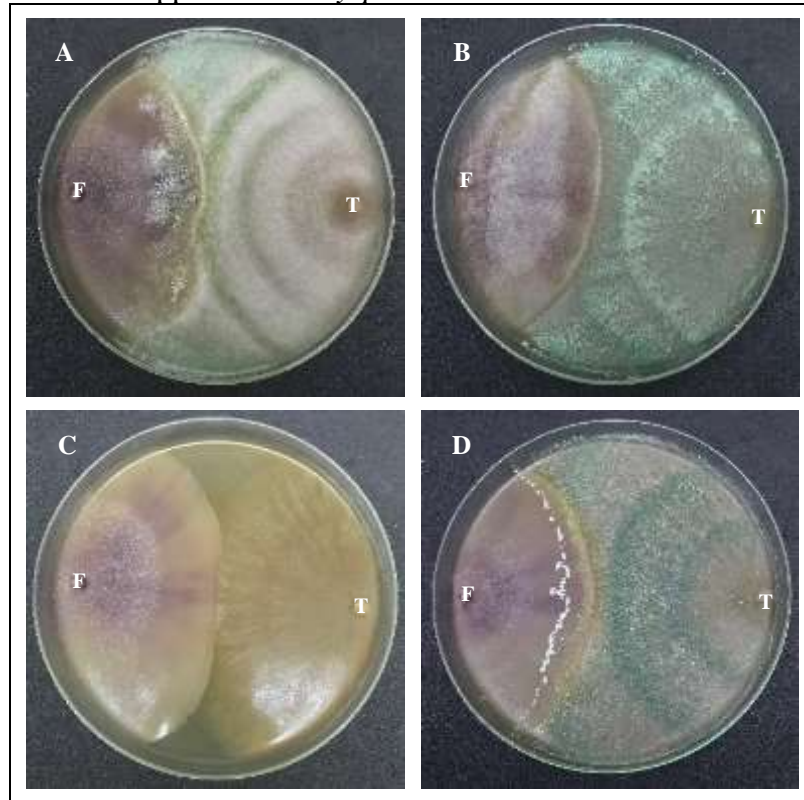
ISOLADOS	EFICIÊNCIA DO ISOLADO SEGUNDO ESCALA DE BELL <i>et al.</i> (1982)
<i>Trichoderma harzianum</i> ALL-42	2,0 ± 0,0 a
<i>Trichoderma asperelloides</i> TR-356	2,0 ± 0,0 a
<i>Trichoderma</i> spp. 1	2,0 ± 1,0 a
<i>Trichoderma</i> spp. 2	2,0 ± 0,0 a

Fonte: Autor.

Tais resultados corroboram com os trabalhos de Qualhato (2013) e Almança *et al.* (2019), eles observaram a capacidade inibitória dos isolados de *Trichoderma* spp. para distintos fitopatógenos por meio do confronto direto. Isso porque após as verificações ecofisiológicas em do gênero *Trichoderma* foi possível notar que as espécies pertencentes ao gênero são hábeis parasitas de oomicetos e de fungos fitopatogênicos (DRUZHININA *et al.*, 2018).



Figura 2 - Resultado do teste de pareamento *in vitro* entre os isolados de *Trichoderma* spp. e o fitopatógeno *F. oxysporum*, após sete dias de incubação em meio de cultura BDA. (A) Confronto entre o fitopatógeno e o isolado *T. harzianum* ALL-42. (B) Confronto entre o fitopatógeno e o isolado *T. asperelloides* TR-356. (C) Confronto entre o fitopatógeno e o isolado *Trichoderma* spp. 1. (D) Confronto entre o fitopatógeno e o isolado *Trichoderma* spp. 2. F=*F. oxysporum* e T=*Trichoderma*



Fotos: Autor.

## 2.2 Teste de produção de metabólitos secundário

Os metabólitos secundários trata-se de inúmeros compostos químicos ligados ao desenvolvimento e interação do *Trichoderma* com outros organismos, entretanto não são primordiais para o desenvolvimento e crescimento do fungo. Contudo, a presença desses metabólitos torna-se preeminente para a colonização e conquista de habitats (RAMADA, LOPES e ULHOA, 2019). Herbert (1989) e Vinale *et al.* (2014) descrevem os metabólitos secundários como elementos de baixo peso molecular, tendo seu emprego biotecnológico muito estimado nas áreas agrícolas e industriais.

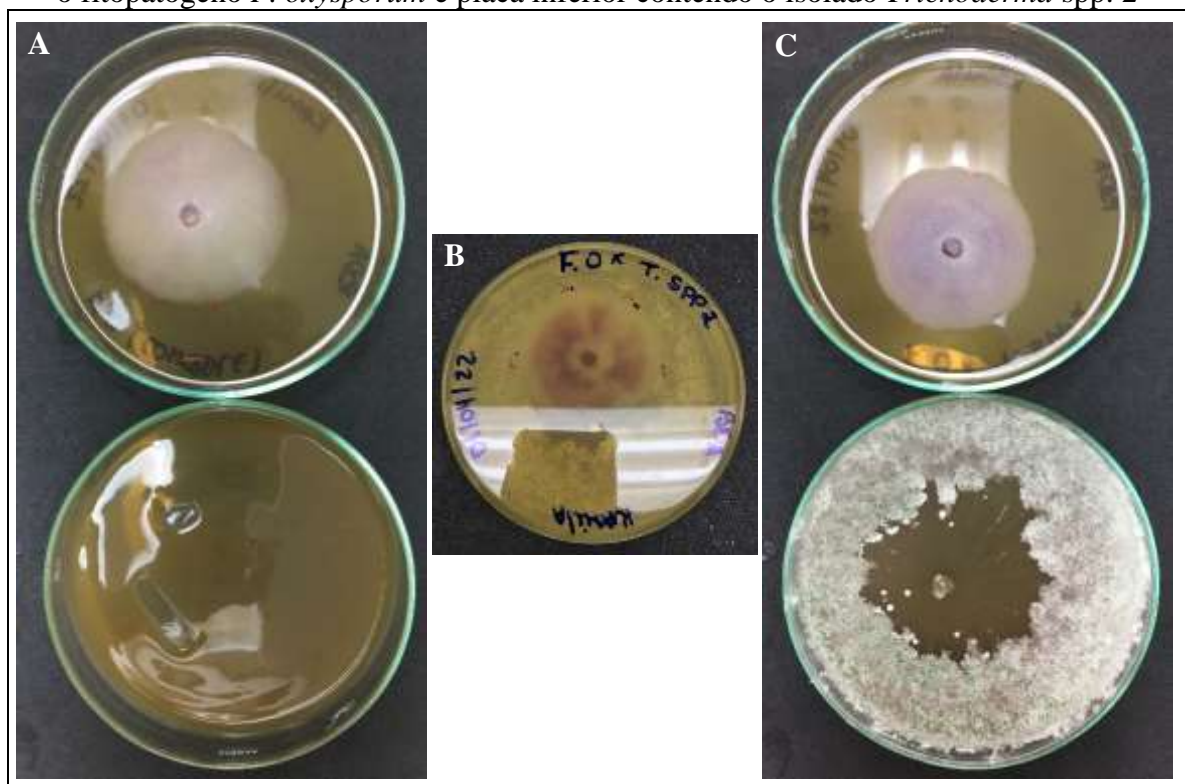
### 2.2.1 Metabólitos voláteis

O efeito antibiótico através da liberação de metabólitos voláteis é uma característica muito comum nos isolados pertencentes ao gênero *Trichoderma* conforme Abreu e Junior

(2000) salientam em seu trabalho, pois trata-se do processo inicial da ação antagônica do *Trichoderma* que reage ao seu competidor antes mesmo de haver um contato direto (micoparasitismo) (Schirmböck et al., 1994; Zeilinger; Omann, 2007). Porém, no presente trabalho essa ação não obteve efeito na inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *F. oxysporum* pois, como observado na Tabela 3, todos os tratamentos obtiveram a mesma classificação estatística.

Os resultados obtidos neste trabalho divergem do apresentado por Saxena, Tewari e Rai (2014), pois em seu trabalho apontaram a inibição do crescimento micelial do *F. oxysporum* através da produção de metabólitos voláteis de isolados de *T. harzianum*, contudo, eles citam que as melhores inibições desse fitopatógeno aconteceram com isolados de *Trichoderma viride* conforme a pesquisa de Amin *et al.* (2010) relatara.

Figura 3 - Resultado do teste *in vitro* para verificação da inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *F. oxysporum* por meio da produção de metabólitos voláteis de isolados de *Trichoderma* spp., após sete dias de incubação em meio de cultura BDA. (A) Controle – placa superior contendo o fitopatógeno e placa inferior contendo apenas meio de cultura. (B) Disposição das placas para o teste de metabólitos voláteis. (C) Placa superior contendo o fitopatógeno *F. oxysporum* e placa inferior contendo o isolado *Trichoderma* spp. 2



Fotos: Kárita Cristine R. dos Santos.

Tabela 3 - Inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *F. oxysporum* através da produção de metabólitos voláteis de isolados de *Trichoderma* spp.. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e a comparação das médias foram analisadas estatística pelo Teste Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) no programa estatístico Sisvar®

TRATAMENTO	CRESCIMENTO MÉDIO DO <i>F. oxysporum</i> (CM)
CONTROLE	5,67 ± 0,05 a
<i>T. harzianum</i> ALL-42	5,48 ± 0,02 a
<i>T. asperelloides</i> TR-356	5,71 ± 0,21 a
<i>Trichoderma</i> spp. 1	5,60 ± 0,14 a
<i>Trichoderma</i> spp. 2	5,35 ± 0,04 a

Fonte: Autor.

### 2.2.2 Metabólitos não voláteis

Os metabólitos secundários não voláteis, trata-se dos compostos químicos que permanecem presente no meio que em um momento anterior havia sido colonizado por isolados de *Trichoderma* (MIRANDA, 2020).

No presente estudo é possível notar por meio da Tabela 4 que apenas o isolado de *T. asperelloides* TR-356 apresentou inibição micelial significativa do fitopatógeno *F. oxysporum* após análise estatística pois, conforme exibe a tabela, a classificação dada ao controle diverge da classificação apresentada para o crescimento com a presença dos metabólitos secundários. Toda via, a literatura aponta que isolados de *T. harzianum* também são capazes de inibir o crescimento micelial do *F. oxysporum* por meio dos metabólitos não voláteis (FARAH e NASREEN, 2013; SAXENA, TEWARI e RAI, 2014).

Tabela 4 - Inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *F. oxysporum* através da produção de metabólitos não voláteis de isolados de *Trichoderma* spp.. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e a comparação das médias foram analisadas estatística pelo Teste Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) no programa estatístico Sisvar®

ISOLADOS DE <i>Trichoderma</i>	CRESCIMENTO MÉDIO DO <i>F. oxysporum</i> CONTROLE	CRESCIMENTO MÉDIO DO <i>F. oxysporum</i> METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS
<i>T. harzianum</i> ALL-42	7,57 ± 0,42 a	7,68 ± 0,20 a
<i>T. asperelloides</i> TR-356	8,53 ± 0,10 a	7,69 ± 0,15 b
<i>Trichoderma</i> spp. 1	6,48 ± 0,54 a	7,36 ± 0,22 a
<i>Trichoderma</i> spp. 2	8,42 ± 0,10 a	8,15 ± 0,16 a

Fonte: Autor.

Figura 4 - Resultado do teste *in vitro* para verificação da inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *F. oxysporum* por meio da produção de metabólitos não voláteis de isolados de *Trichoderma* spp., após sete dias de incubação. À esquerda, placa controle contendo o fitopatógeno *F. oxysporum* em meio de cultura BDA acrescido do sobrenadante do isolado *Trichoderma* spp 1 sem o estímulo para produção de metabólitos não voláteis. À direita, crescimento do fitopatógeno *F. oxysporum* em meio de cultura BDA acrescido do sobrenadante de *Trichoderma* spp. 1 com a presença de micélio macerado do fitopatógeno, ou seja, com estímulo para produção dos metabólitos não voláteis

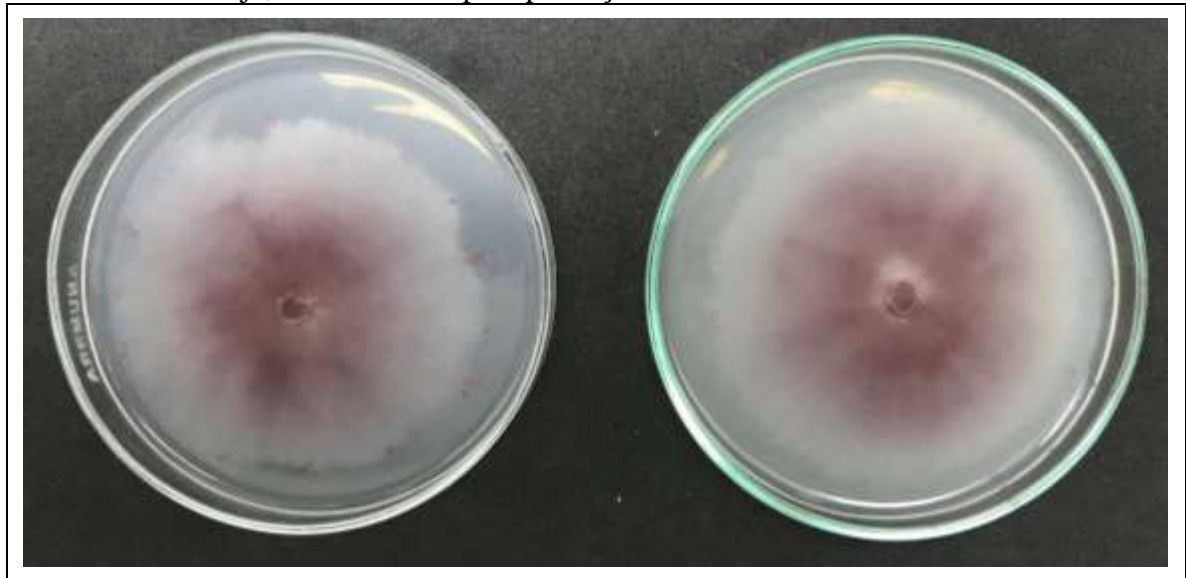


Foto: Autor.

### 2.3 Dosagem das atividades enzimáticas

A síntese de enzimas hidrolíticas é um processo fundamental para o micoparasitismo, pois permite ao antagonista degradar os compostos presentes na parede celular do seu hospedeiro para assim utilizá-lo como fonte de carbono (BENHAMOU e CHET, 1993). Conforme explica Latgé (2007) a parede celular da maioria dos fungos é composta predominantemente (80-85%) por polissacarídeos como quitina e  $\beta$ -glicanas e cerca de 15-20% por glicoproteínas, portanto a efetividade na síntese de enzimas como quitinase, NAGase,  $\beta$ -1,3-glicanase potencializam o antagonismo, sendo então uma característica indispensável para os ACBs. Logo, o processo de dosagem das atividades enzimáticas nos permite compreender, de forma mais específica, a ação micoparasítica de cada isolado em estudo e o seu potencial como antagonista ao fitopatógeno *F. oxysporum*.

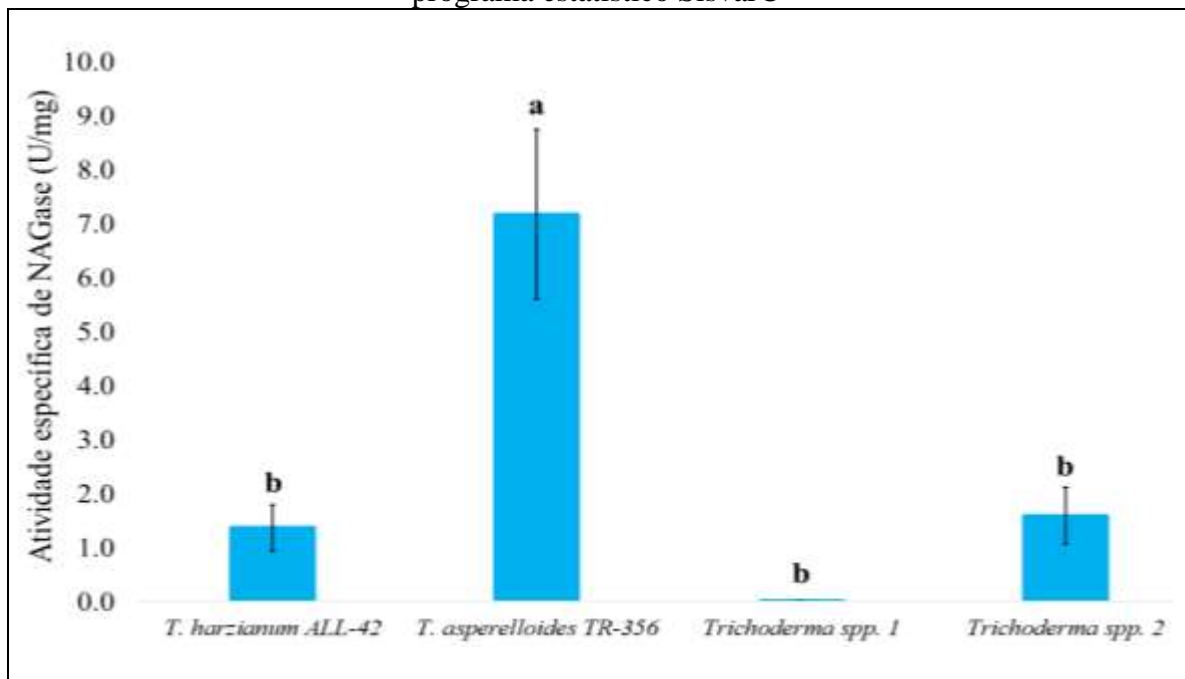
### 2.3.1 N-acetil-glicosaminidase (NAGase) e quitinase

Trataremos dessas duas enzimas em conjunto, pois como explicou Ulhoa e Peberdy (1991), a degradação integral da quitina presente na parede celular do hospedeiro ocorre por meio da ação hidrolíticas da NAGase e da quitinase.

Através das Figuras 5 e 6 é possível observar o nível de atividade específica produzida por cada isolado de *Trichoderma* spp. para as enzimas NAGase e quitinase, respectivamente. Nota-se que todos os isolados em teste foram capazes de produzir atividade para degradação da quitina presente nos micélios do fitopatógeno *F. oxysporum*. Contudo, foi verificado que a maior atividade específicas para NAGase foi observada na indução com o isolado *T. asperelloides* TR-356 (7,18U/mg) e para quitinase as maiores atividade específicas foram vistas nos isolados *Trichoderma* spp. 2 (0,17U/mg) e *T. asperelloides* TR-356 (0,14U/mg).

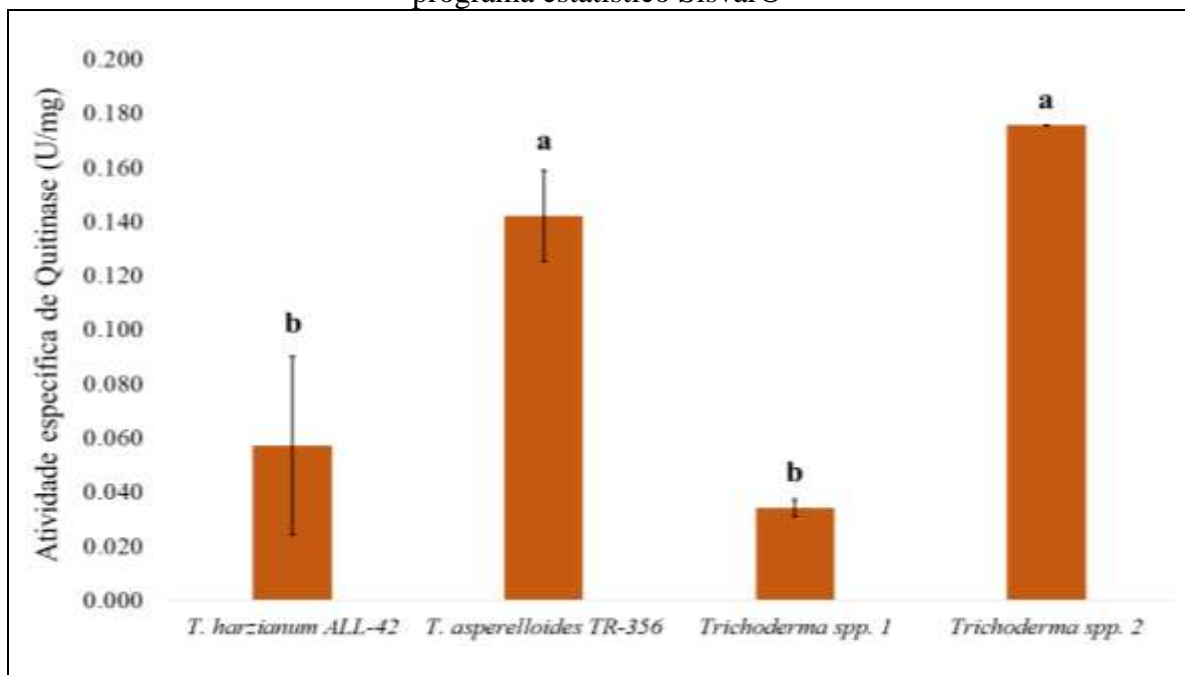
Lopes (2012) descreve em seu trabalho que o isolado *T. asperelloides* TR-356 (anteriormente descrito como *T. asperellum* TR-356) quando induzido com fitopatógeno *F. oxysporum* é o que maior apresenta atividade específica para NAGase em comparação com os demais isolado de *Trichoderma* spp. testados, indo de acordo com o resultado apresentado nessa pesquisa. Em contrapartida, Ferreira (2018) relata que isolados de *T. harzianum* demonstraram maior atividade quitinolítica quando em ação antagônica ao *F. oxysporum* do que isolados de *T. asperellum*, o que contradiz os resultados obtidos nesse trabalho.

Figura 5 - Atividade específica de NAGase de isolados de *Trichoderma* spp. frente ao fitopatógeno *F. oxysporum*. As classificações foram obtidas pelo Teste Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) no programa estatístico Sisvar®



Fonte: Autor.

Figura 6 - Atividade específica de quitinase de isolados de *Trichoderma* spp. frente ao fitopatógeno *F. oxysporum*. As classificações foram obtidas pelo Teste Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) no programa estatístico Sisvar®



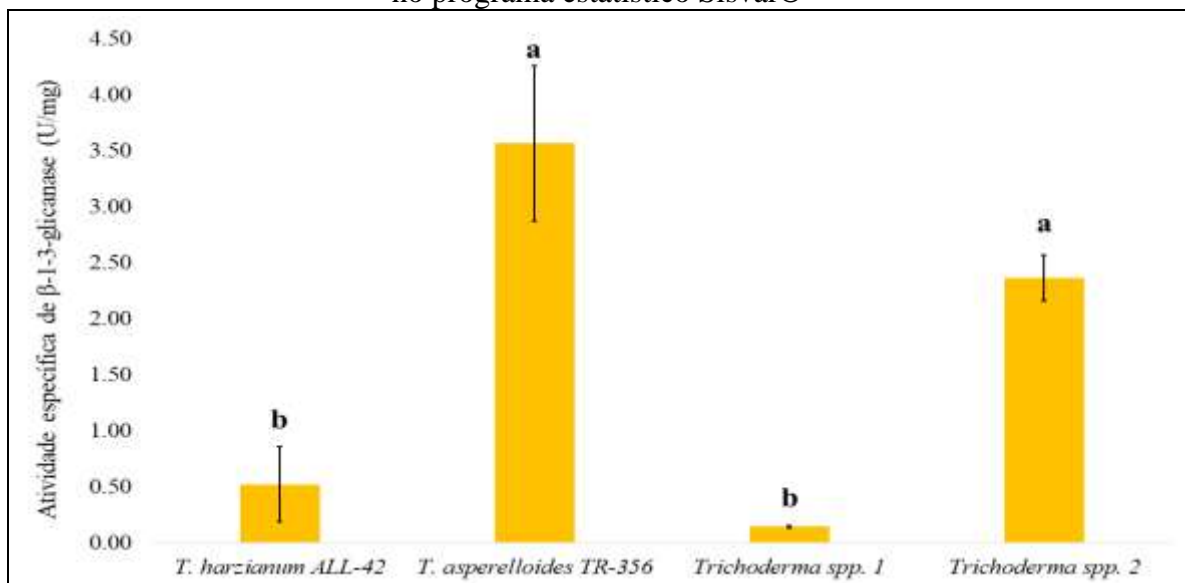
Fonte: Autor.

### 2.3.2 $\beta$ -1,3-glicanase

Foi apontado por Gruber e Seidl-Seiboth (2012) que o segundo composto mais presente na parede celular dos fungos é o polissacarídeo  $\beta$ -1,3-glicano, sendo a hidrólise do mesmo efetuada pela enzima  $\beta$ -1,3-glicanase, deixando como produto a glicose. Portanto, a eficácia do micoparasitismo realizado pelo gênero *Trichoderma* está intimamente relacionado com a sua capacidade de produção dessa enzima, como também das enzimas vista anteriormente. A  $\beta$ -1,3-glicanase desempenha, ainda, função morfológica e também age na ausência de carbono e energia (ADAMS, 2004; PITSON *et al.*, 1993).

Após análise de variância e aplicação do Teste Tukey pelo programa estatístico Sisvar®, nos dados obtidos das leituras da atividade de  $\beta$ -1,3-glicanase, é possível relatar que as maiores atividades específicas para  $\beta$ -1,3-glicanase na presença de micélios do fitopatógeno *F. oxysporum* foram observadas nos isolado *T. asperelloides* TR-356 (3,56U/mg) e *Trichoderma* spp. 2 (2,36U/mg), conforme exemplifica o gráfico abaixo (Figura 7). Diversos autores destacam a produção da atividade específica de  $\beta$ -1,3-glicanase por isolados de *T. asperellum* em contato com parede celular de distintos fitopatógenos (GERALDINE *et al.*, 2013, FERREIRA, 2018; LOPES, 2012; QUALHATO, 2013;). Em similaridade com os resultados averiguados nesse estudo, Lopes (2012) aponta o isolado *T. asperelloides* TR-356 tendo a maior atividade específica de  $\beta$ -1,3-glicanase na presença do *F. oxysporum*.

Figura 7 - Atividade específica de  $\beta$ -1,3-glicanase de isolados de *Trichoderma* spp. frente ao fitopatógeno *F. oxysporum*. As classificações foram obtidas pelo Teste Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) no programa estatístico Sisvar®



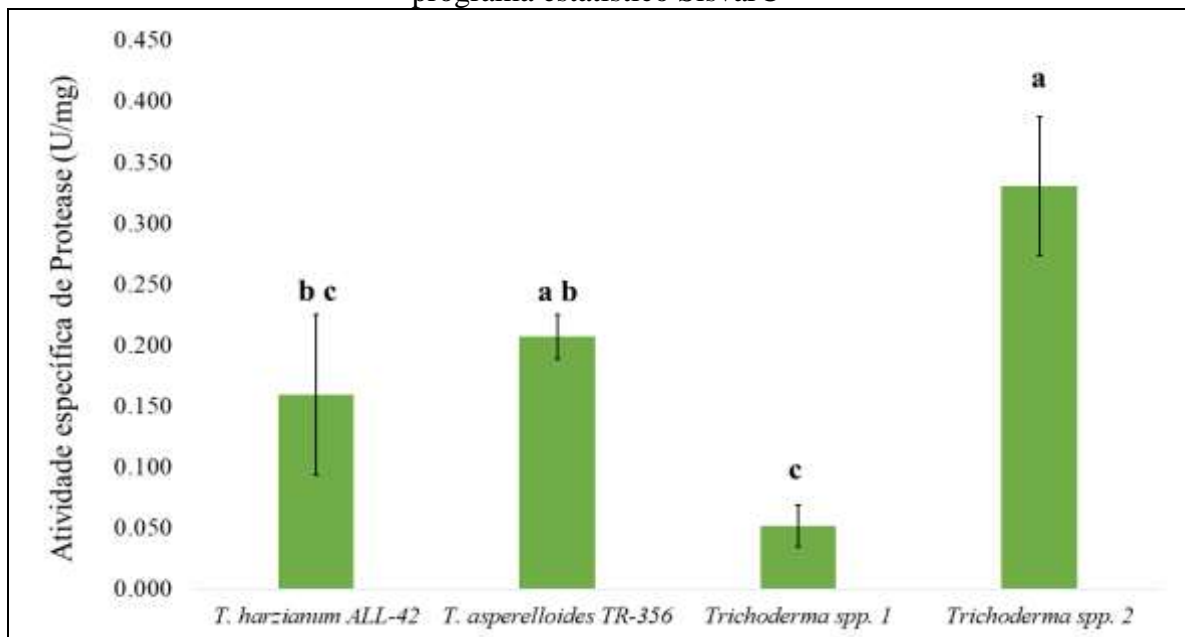
Fonte: Autor.

### 2.3.3 Protease

As proteases são as enzimas responsáveis pela hidrólise das proteínas presentes na parede e na membrana celular do hospedeiro, elas realizam essa ação em conjunto com as enzimas quitinase e  $\beta$ -1,3-glicanase (GRUBER e SEIDL-SEIBOTH, 2012; SUÁRES *et al.*, 2007).

Os testes mostraram que o isolado *Trichoderma* spp. 2 foi o que mais expressou atividade específica para protease (0,33U/mg), no entanto o isolado *T. asperelloides* TR-356 foi também considerado um bom indutor para essa mesma atividade específica tendo produzido 0,21U/mg (Figura 8). Lopes (2012) e Qualhato (2013) denotam que a indução da atividade específica de protease na presença de fitopatógenos do gênero *Fusarium* foi mais evidente nos isolados de *T. asperellum*. Já Geraldine *et al.* (2013) relatam que usando células da parede do fitopatógeno *S. sclerotiorum* como fonte de carbono os isolados *T. asperelloides* TR-356 e *T. harzianum* ALL-42 exibiram atividade específica de protease semelhante, percebemos assim que mesmo tratando-se de fitopatógenos distintos as atividades específicas desses dois isolados para protease se assemelham com também pode ser observado nos resultados desse trabalho.

Figura 8 - Atividade específica de protease de isolados de *Trichoderma* spp. frente ao fitopatógeno *F. oxysporum*. As classificações foram obtidas pelo Teste Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) no programa estatístico Sisvar®



Fonte: Autor.

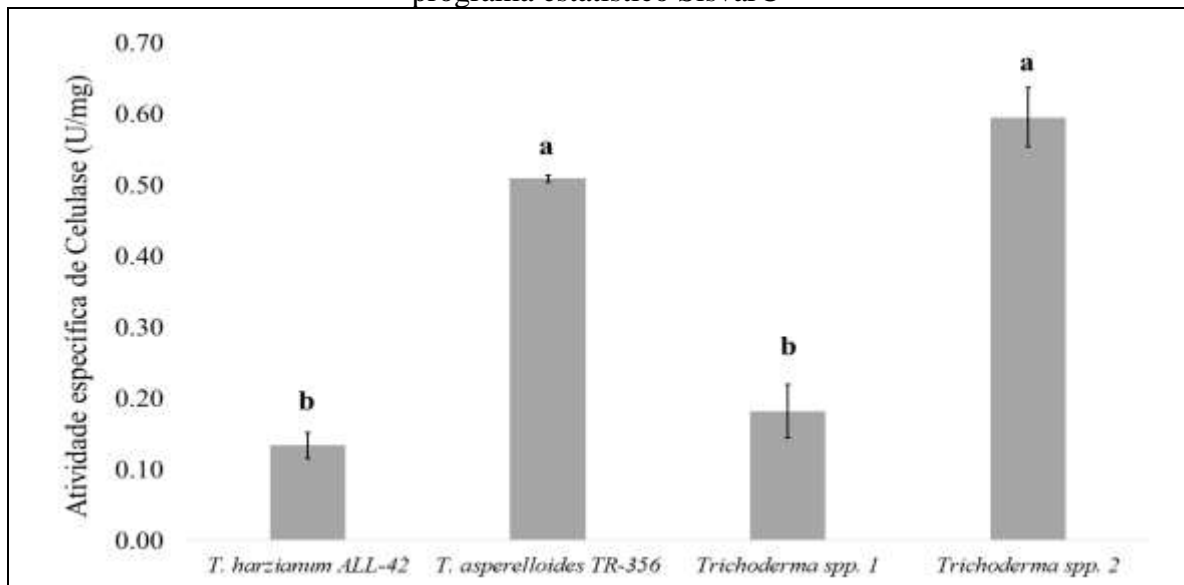


### 2.3.4 Celulase

Mesmo a celulose não sendo um composto presente na parede celular dos fungos, o teste para verificação da atividade específica de celulase, enzima responsável pela degradação da celulose, faz-se importante devido sua aplicação biotecnológica como produção de bioetanol, papel e materiais têxtil, tendo assim grande visibilidade econômica (LYND *et al.*, 2002 e BUCHERT *et al.*, 1998).

Silva *et al.* (2011) e Tiwari, Misra e Sangwan (2013) citam que dentro do gênero *Trichoderma* existem espécies capazes de produzir a enzima celulase. Tal ação pode ser observada nos quatro isolados em estudo pois, de acordo com os resultados do teste para verificação da atividade específica de celulase, todos os isolados expressaram atividade para essa enzima, conforme mostra o gráfico da Figura 9. Todavia a atividade específica para celulase com presença da parede celular do fitopatógeno *F. oxysporum* foi mais evidente nos isolados *Trichoderma* spp. 2 (0,59U/mg) e *T. asperelloides* TR-356 (0,51U/mg).

Figura 9 - Atividade específica de celulase de isolados de *Trichoderma* spp. frente ao fitopatógeno *F. oxysporum*. As classificações foram obtidas pelo Teste Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) no programa estatístico Sisvar®



Fonte: Autor.

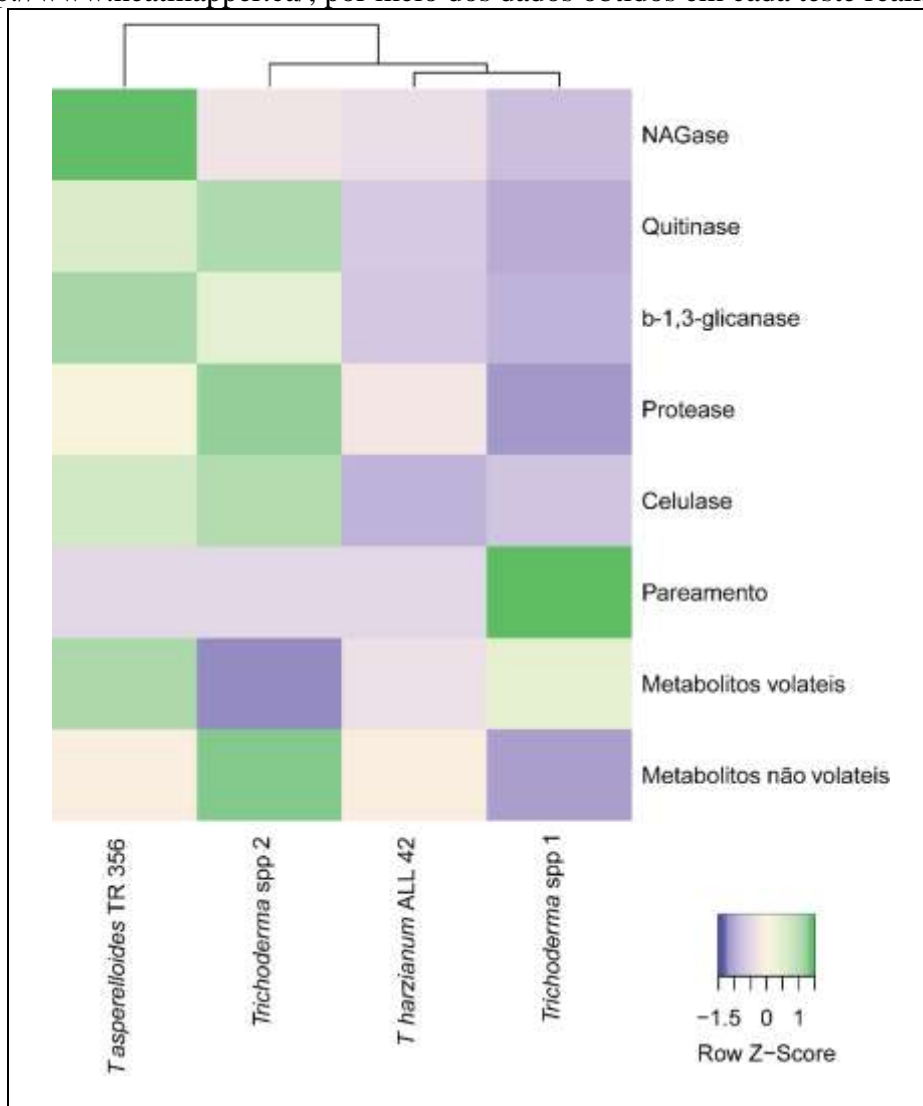
## 2.4 Análise comparativa das ações antagônicas dos isolados de *Trichoderma* spp. ao fitopatógeno *F. oxysporum*

Após analisar todos os testes aplicados nos quatro isolados em estudo, foi possível notar que os isolados *T. harzianum* ALL-42 e *Trichoderma* spp. 1 possuem ações antagônicas ao

fitopatígeno *F. oxysporum* que os tornam semelhantes entre si. Já o isolado *T. asperelloides* TR-356 foi classificado como o mais distinto em similaridades, dentre os quatro isolados em estudo, ao antagonizar o fitopatígeno *F. oxysporum*. Tais seguimentos podem ser visualizados melhor por meio do mapa de calor (*heatmap*) exposto na Figura 10.

Além da possibilidade de se analisar as similaridades das ações antagônicas dos isolados em estudo, o *heatmap* também possibilita visualizar de forma comparativa todos os testes em análise facilitando a caracterização dos isolados mais eficazes no antagonismo ao *F. oxysporum*. Portanto, por meio da Figura 10 é possível observar que as ações antagônicas para inibição do crescimento micelial do fitopatígeno *F. oxysporum* dos isolados *T. asperelloides* TR-356 e *Trichoderma* spp. 2 se sobressaíram aos demais isolados em estudo. Semelhantemente Li *et al.* (2017) descrevem que dentre os isolados do gênero *Trichoderma* selecionados para antagonizar o fitopatígeno *F. oxysporum* o isolado de *T. asperellum* foi o que obteve maior destaque, observando uma redução de 69,5% da doença, enquanto Ethur *et al.* (2008) relataram que o isolado de *T. harzianum* inibiu cerca de 56% da patogenicidade causada pelo *F. oxysporum*. Nota-se com isso que isolados de *T. asperellum* tendem a ter maior ação inibitória ao fitopatígeno *F. oxysporum* do que isolados de *T. harzianum*. Apesar do isolado em destaque tratar-se da espécie *T. asperellum*, podemos considerar que os resultados apontados por esses autores se assemelham ao observado no decorrer deste trabalho pois, conforme explicam Samuels *et al.* (2010) as espécies *T. asperellum* e *T. asperelloides* são consideradas filogeneticamente irmãs e caracterizadas por serem micoparasitas agressivos (SHORESH, YEDIDIA e CHET, 2005).

Figura 10 - Heatmap dos testes em estudos dos isolados de *Trichoderma* spp. como Agente de Controle Biológico ao fitopatógeno *F. oxysporum*. Mapa delineado no site <http://www.heatmapper.ca/>, por meio dos dados obtidos em cada teste realizado



Fonte: Autor.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho consistiu na aplicação de testes laboratoriais que auxiliaram na verificação dos mecanismos antagônicos de quatro isolados do gênero *Trichoderma* como agentes biocontroladores para o fitopatógeno *F. oxysporum*.

Foi possível perceber que dentre os isolados em uso o que melhor exibiu ações antagônicas foi o isolado *T. asperelloides* TR-356 tendo destaque na inibição do crescimento micelial por meio dos metabólitos secundários não voláteis e na produção das enzimas NAGase, quitinase,  $\beta$ -1,3-glicanase e protease, sendo estas enzimas ligadas diretamente à degradação da maioria dos compostos presentes na parede celular fúngica. Tais resultados demonstram que *T. asperelloides* TR-356 pode ser considerado um bom ACB para o fitopatógeno *F. oxysporum*, pois como exibido nos teste o mesmo tem a capacidade de antagonizar esse fitopatógeno tanto de forma direta, por meio do micoparasitismo ao secretar enzimas responsáveis pela degradação da parede celular do patógeno e impedir o progresso do mesmo, como também de maneira indireta através da produção dos metabólitos não voláteis que permanecem no meio mesmo sem a presença do isolado retardando o crescimento micelial do *F. oxysporum*. O isolado *T. asperelloides* TR-356 teve também destaque na produção da enzima celulase o que retrata que além do seu bom uso como agente de biocontrole o isolado pode, ainda, ser empregado de maneira biotecnológica.

Outro isolado que também se destacou nas atividades enzimáticas em estudo foi o isolado *Trichoderma* spp. 2 obtendo classificações semelhantes ao isolado *T. asperelloides* TR-356 na produção das enzimas quitinase,  $\beta$ -1,3-glicanase, protease e celulase, o que nos leva a concluir que ações antagônicas do *Trichoderma* spp. 2 ao fitopatógeno *F. oxysporum* ocorre de maneira mais eficaz através do micoparasitismo e que, além do seu emprego como ACB, pode-se também considerá-lo como um possível degradador da celulose para a indústria comercial.

Já os isolado *T. harzianum* ALL-42 e *Trichoderma* spp. 1 não obtiveram destaque em nenhum dos testes enzimáticos aplicados, ambos obtiveram resultado semelhantes entre si, com ressalva apenas para a atividade específica de protease onde o *T. harzianum* ALL-42 exibiu melhor resultado do que o *Trichoderma* spp. 1.

Em relação ao teste da produção de metabólitos secundários voláteis, acrescentamos que nenhum dos isolados em análise obtiveram resultados significativos na inibição do crescimento micelial do *F. oxysporum* por intermédio desses metabólitos, ao passo que no teste de pareamento todos os isolados foram considerados bons antagonistas para o fitopatógeno de acordo com a escala em que os mesmos foram analisados.

Considerando os resultados obtidos nesse trabalho, pode-se afirmar que a hipótese I é verdadeira, pois dentre os dois isolados em estudos oriundos de áreas do Cerrado tocantinense o isolado *Trichoderma* spp. 2 possui forte potencial antagonico ao fitopatógeno *F. oxysporum*. Já a hipótese II foi rejeitada, visto que o isolado *T. asperelloides* TR-356 demonstrou maior eficácia antagonicas ao *F. oxysporum* do que os isolados provenientes do cerrado, no entanto as ações inibitórias do isolado *Trichoderma* spp. 2 ao fitopatógeno *F. oxysporum* foram notáveis e se sobressaíram ao isolado *T. harzianum* ALL-42.

Dito isto, complementamos que o uso de dois dos quatro isolados em estudo, *T. asperelloides* TR-356 e *Trichoderma* spp. 2, como potenciais ACB ao fitopatógeno *F. oxysporum* deve ser levado em consideração por meio de estudos complementares para uma compreensão mais abrangente de como melhor empregá-los.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, M.S.; JUNIOR, M.L. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. Ciências e agrotecnologia. Lavras, v.24, n.2, p.521-526, 2000.
- ADAMS, D.J., Fungal cell wall chitinases and glicanases. Microbiology, Reading, v. 150, n.7, p.2029-2035, 2004.
- ALABOUVETTE, C.; STEINBERG, C. The soil as a reservoir for antagonists to plant diseases. In: EILENBERG, J.; HOKKANEN, H.M.T., eds. An ecological and societal approach to biological control. Dordrecht, the Netherlands: Springer. p. 123-144, 2006.
- ALMANÇA M.A.K.; TONELLO, J.C.; RUSIN, C.; BOTELHO, R.V. Uso do *Trichoderma* na cultura da uva. In: MEYER, M.C.; MAZARO, S.M; DA SILVA, J.C. *Trichoderma*: uso na agricultura. Embrapa. Brasília, DF. Cap. 26, p. 507-520, 2019.
- ALMEIDA, M.D. Relatório: vigilância em saúde de populações expostas a agrotóxicos no estado do Tocantins. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. Brasília, p. 1-17, 2014. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/08/Relat--rio--Tocantins.pdf>>. Acesso em 29 de maio de 2020.
- AMARAL, L.O.; GUARDA, P.M.; GUALBERTO, L.S.; GUARDA, E.A. Panorama da utilização de agroquímicos em cultura de abacaxi no estado do Tocantins e possíveis problemas de contaminação. Revista Desafio. v. 03, n. Especial, 2016 (Suplemento).
- AMIN, F.; RAZDAN, V.K.; MOHIDDIN, F.A.; BHAT, K.A.; SHEIKH, P.A. Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven fungal plant pathogens in-vitro. Journal of Phytopathology, 2, (10), 34–37, 2010.
- BABICKI, S.; ARNDT, D.; MARCU, A.; LIANG, Y.; GRANT, J.R; MACIEJEWSKI, A.; WISHART, D.S. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. Nucleic Acids Res. 8;44(W1):W147-53. Epub 2016.
- BARA, M.T.F.; LIMA, A.L.; ULHOA, C.J. Purification and characterization of an exo- $\beta$ -1,3 glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. FEMS Microbiology Letters. 219, 81–85, 2003.
- BELL, D.K., WELLS. H.D., MARKHAM, C.R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology, v.72, n.4, p.379-382, 1982.
- BENHAMOU, N.; CHET, I. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process, Phytopathology 83, 1062– 1071, 1993.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CODÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology. 7: 249–260, 2004.

BETTIOL, W. Métodos Alternativos para o Controle de Doenças de Plantas. In: MICHEREFF, S.J.; BARROS, R. Proteção de plantas na agricultura sustentável. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, Imprensa Universitária, p. 123-139, 2001.

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.

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

BUCHERT, J.; OKSANEN, T.; PERE, J.; SIIKA-AHO, M.; SUURNÄKKI, A.; VIKARI, L. Applications of *Trichoderma reesei* enzymes in the pulp and paper industry. In: HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. *Trichoderma and Gliocladium*. v. 2. London: Taylor and Francis, London, p. 343–363, 1998.

CABRAL, C.M.; CHERQUI, A.; PEREIRA, A.; SIMÕES, N. Purification and characterization of two distinct metalloproteases secreted by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus* sp. strain Az29. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3831-3838, 2004.

COOK, R.J.; BAKER, K.F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St Paul: APS. p. 539, 1983.

DA SILVA, G.B.; RÊGO, M.C.F.; DE FANÇA, S.K.S.; DE SOUSA, T.P.; NASCENTE, A.S.; LANNA, A.C.; DE FILIPPI, M.C.C.; DE SOUZA, A.C.A.; ANDRADE, G.B.; Uso do *Trichoderma* na cultura do arroz. In: MEYER, M.C.; MAZARO, S.M; DA SILVA, J.C. *Trichoderma: uso na agricultura*. Embrapa. Brasília, DF. Cap. 14, p. 163-179, 2019.

DAVIS, R.M.; COLYER, P.D.; ROTHROCK, C.S.; KOCHMAN, J.K. *Fusarium* wilt of cotton: diversity and implications for management. *Plant Disease*, v. 90, n. 6, p. 692-703, 2006.

DE ABREU, L.M.; PFENNING, L.H. O gênero *Trichoderma*. In: MEYER, M.C.; MAZARO, S.M; DA SILVA, J.C. *Trichoderma: uso na agricultura*. Embrapa. Brasília, DF. p. 163-179, 2019.

DI PIERO, R.M.; GARDA, M.V. Quitonasa reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 43(9):1121-1128, 2008.

DRUZHININA, I.S.; CHENTHAMARA, K.; ZHANG, J.; ATANASOVA, L.; YANG, D.; MIAO, Y.; RAHIMI, M.J., GRUJIC, M.; CAI, F.; POURMEHDI, S.; SALIM, K.A.; PRETZER, C.; KOPCHINSKLY, A.G.; HENRISSAT, B.; KUO, A.; HUNDLEY, H.; WANG, M.; AERTS, A.; SALAMOV, A.; LIPZEN, A.; LaBUTTI, K.; BARRY, K.; GRIGORIEV, I.V.; SHENG, Q.; KUBICEK, C.P. Massive lateral transfer of genes encoding plant cell wall-degrading enzymes to the mycoparasitic fungus *Trichoderma* from its plant-associated hosts. *PLoS Genetics*. v. 14, n. 4, e1007322, 2018.

ETHUR, L.Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.F.B.; CAMARGO, R.F.; FLORES, M.G.V.; CRUZ, J.L.G.; MENEZES, J.P. *Trichoderma harzianum* no desenvolvimento e na proteção de mudas contra a fusariose do tomateiro. *Ciência e Natura*, v. 30, p. 57-69, 2008.

- FARAH, S.T.; NASREEN, S. *In vitro* assessment of antagonistic activity of *Trichoderma viride* and *Trichoderma harzianum* against pathogenic fungi. Indian J. Appl. Res. 3(5):57-59, 2013.
- FERREIRA, G.A. Análise comparativa de glicanas e quitinas da parede celular de espécies de *Trichoderma* e a relação desses polissacarídeos no pareamento com fitopatógenos. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação Mestrado Acadêmico em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) Campus-Anápolis CET, Universidade Estadual de Goiás, 2018.
- FRIGHETTO, R.T.S.; MELO, I.S. Produção de antibióticos por microrganismos. In: MELO, I.S.; SANHUEZA, R.M.V., coords. Métodos de seleção de microrganismos antagonísticos a fitopatógenos: manual técnico. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, p. 40-46, 1995.
- GERALDINE, A.M.; LOPES, F.A.C; CARVALHO, D.D.C; BARBOSA, E.T; RODRIGUES, A.M.; BRANDÃO, R.S.; ULHO, C.J.; LOBO JUNIO, M. Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. Biological Control, v. 67, issue 3, p. 308-3016, 2013.
- GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SANTOS A.F.; AUER, C.G. Perspectiva do uso do controle biológico contra doenças florestais. Floresta. 30:155-165, 2000.
- GRUBER, S.; SEIDL-SEIBOTH, V. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. Microbiology, v. 158, n. 2, p. 26–34, 2012.
- HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2004.
- HERBERT, R.B. The biosynthesis of secondary metabolites. New York: Springer Science & Business Media, p. 232, 1989.
- HERMOSA, R.; CARDOZA, R.E.; RUBIO, M.B.; GUTIÉRREZ, S.; MONTE, E. Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma*. In: GUPTA, V.K.; SCHMOLL, M.; HERRERA-ESTRELLA, A.; UPADHYAY, R.S.; DRUZHININA, I.; TUOHY, M. (Ed.). Biotechnology and biology of *Trichoderma*. Amsterdam: Elsevier. P. 125-137, 2014.
- KUBICEK, C.P.; HERRERA-ESTRELLA, A.; SEIDL-SEIBOTH, V.; MARTINEZ, D.A.; DRUZHININA, I.S.; THON, M.; ZEILINGER, S.; CASAS-FLORES, S.; HORWITZ, B.A.; MUKHERJEE, P.K.; MUKHERJEE, M.; KREDICS, L.; ALCARAZ, L.D.; AERTS, A.; ANTAL, S.; ATANASOVA, L.; CERVANTES-BADILLO, M.G.; CHALLACOMBE, J.; CHERTKOV, O.; MCCLUSKEY, K.; COULPIER, F.; DESHPANDE, N.; HANS VON DÖHREN, H. von; EBBOLE, D.J.; ESQUIVEL-NARANJO, E.U.; FEKETE, E.; FLIPPHI, M.; GLASER, F.; GÓMEZ-RODRÍGUEZ, E.Y.; GRUBER, S.; HAN, C.; HENRISSAT, B.; HERMOSA, R.; HERNÁNDEZ-OÑATE, M.; KARAFFA, L.; KOSTI, I.; LE CROM, S.; LINDQUIST, E.; LUCAS, S.; LÜBECK, M.; LÜBECK, P.S.; MARGEOT, A.; METZ, B.; MISRA, M.; NEVALAINEN, E.; OMANN, M.; PACKER, N.; PERRONE, G.; URESTI-RIVERA, E.E.; SALAMOV, A.; SCHMOLL, S.; SEIBOTH, B.; SHAPIRO, H.; SUKNO, S.; TAMAYO-RAMOS, J.A.; TISCH, D.; WIEST, A.; WILKINSON, H. H.; ZHANG, M.; COUTINHO, P.M.; KENERLEY, C.M.; MONTE, E.; BAKER, S.E.; GRIGORIEV, I.V.



Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology*. V. 12, n. 4, R40, 2011.

LATGÉ, J. P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*, v.66, n.2, p.279-290, 2007.

LAZZARETTI, E.; BETTIOL, W. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado a base de células e de metabólitos de *Bacillus substilis*. *Scientia Agricola*. 54(1-2): 89-96, 1997.

LI, Y.; HWANG, S.; HUANG, Y.; HUANG, C. Effects of *Trichoderma asperellum* on nutrient uptake and *Fusarium* wilt of tomato. *Crop Protection*, v. 110, p. 275-282, 2017.

LIU, C.L.; LAN, C.Y.; FU, C.C.; JUANG, R.S. Production of hexaoligochitin from colloidal chitin using a chitinase from *Aeromonas schubertii*. *Int J Biol Macromol* 69: 59-63, 2014.

LOPES, A.C.; ÁVILA, C.A. Doenças do Tomateiro. 1. Ed. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, p. 151, 2005.

LOPES, F.A.C. Caracterização molecular, filogenética e enzimática de isolados de *Trichoderma* spp. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, 2012.

LOPES, F.A.C.; STEINDORFF, A.S.; GERALDINE, A.M.; BRANDÃO, R.S.; MONTEIRO, V.N.; JÚNIOR, M.L.; COELHO, A.S.G.; ULHOA, C.J.; SILVA, R.N. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biology*, v. 116, p. 815-824, 2012.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN-ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v.66. p. 506 – 577. 2002.

MACHADO, D.F.M.; PARZIANELLO, F.R.; SILVA, A.C.F.; ANTONIOLLI, Z.I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. *Revista de Ciências Agrárias*. v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.

MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol Bioeng Symp*. (6):21-33, 1976.

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.

MIRANDA, R.F. Avaliação do potencial de isolados de *Trichoderma* spp. no controle do *Colletotrichum gloeosporioides*, causador da antracnose no mamoeiro. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande-MS, p. 1-48, 2020.

MONTE, E.; BETTIOL, W.; HERMOSA, R. *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. In: MEYER, M.C.; MAZARO, S.M; DA SILVA, J.C. *Trichoderma: uso na agricultura*. Embrapa. Brasília, DF. Cap. 4, p. 181-199, 2019.

- MORANDI, M.B.A; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.B.A. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectiva. Embrapa Meio Ambiente. p. 341, 2009
- OWNLEY, B.H.; GWINN, K.D.; VEJA, F.E. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl*. 55:113-128, 2010.
- PITSON, S.M., SEVIOUR, R.J., MCDUGALL, B.M., Noncellulolytic fungal  $\beta$ -glucanases: their physiology and regulation. *Enzyme and Microbial Technology*, 15: 178-192. 1993.
- QUALHATO, T.F. Potencial antagonístico de cinco espécies de *Trichoderma* contra os fitopatógenos *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Goiânia: Editora Kelps, 1<sup>a</sup>. ed, v. 25. 56p, 2013.
- RAMADA, M.H.S.; LOPES, F.A.C.; ULHOA, C.J.; SILVA, R.N. Optimized microplate  $\beta$ -1,3-glucanase assay system for *Trichoderma* spp. Screening. *Journal of Microbiological Methods*, 8: 6-10, 2010.
- RAMADA, M.H.S.; LOPES, F.A.C.; ULHOA, C.J.; *Trichoderma*: metabólitos secundários. In: MEYER, M.C.; MAZARO, S.M; DA SILVA, J.C. *Trichoderma*: uso na agricultura. Embrapa. Brasília, DF. Cap. 5, p. 201-218, 2019.
- SAMUELS, G.J.; ISMAIEL, A.; BON, M.C.; DE RESPINIS, S.; PETRINI, O. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia*, v. 102, n. 4, p. 944-966, 2010.
- SAXENA, D.; TEWARI, A.K.; RAI, D. *In vitro* antagonistic assessment of *T. harzianum* PBT 23 against plant pathogenic fungi. *J. Microbiol. Biotechnol. Res.* 4(3):59-65, 2014.
- SCHIRMBÖCK, M.; LORITO, M.; WANG, Y.-L.; HAYES, C. K.; ARISAN-ATAC, I.; SCALA, F.; HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, n. 12, p. 4364-4370, 1994.
- SHORESH, M.; YEDIDIA, I.; CHET, I. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*, v. 95, n. 1, p. 76-84, 2005.
- SILVA, B.D.S.; ULHOA, C.J.; BATISTA, K.A.; YAMASHITA, F.; FERNANDES, K. Potential fungal inhibition by immobilized hydrolytic enzymes from *Trichoderma asperellum*. *Journal of agricultural and food chemistry*, v.59. p.8148-8154, 2011.
- STEILMANN, P.; MAZON, S.; VARGAS, T.O. Uso do *Trichoderma* em hortaliças. In: MEYER, M.C.; MAZARO, S.M; DA SILVA, J.C. *Trichoderma*: uso na agricultura. Embrapa. Brasília, DF. Cap. 22, p. 455-469, 2019.
- SUASSUNA, N. D.; COUTINHO, W. M. Manejo das principais doenças do algodoeiro no cerrado brasileiro. In: FREIRE, E. C. (Ed.). *Algodoeiro no Cerrado do Brasil*. 3 ed. Brasília, DF: Positiva, p. 365-408, 2015.

SUASSUNA, N.D.; DA SILVA, J.C.; BETTIOL, W. Uso do *Trichoderma* na cultura do algodão. In: MEYER, M.C.; MAZARO, S.M; DA SILVA, J.C. *Trichoderma: uso na agricultura*. Embrapa. Brasília, DF. Cap. 15, p. 361-379, 2019.

SUÁREZ, M.B.; VIZCAÍNO, J.A.; LLOBELL, A.; MONTE, E. Characterization of genes encoding novel peptidases in the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413 using the TrichoEST functional genomics approach. *Curr Genet*, 51(5):331-42, 2007.

TIWARI, P.; MISRA, B.N.; SANGWAN, N.S.  $\beta$ -Glucosidases do Fungus *Trichoderma*: An Efficient Cellulase Machinery in Biotechnological Applications", *BioMed Research International*, vol. 2013, Artigo ID 203735, 10 páginas, 2013.

TJAMOS, E.; PAPAVIDAS, G.; COOK, R. Biological control of plant diseases: progress and challenges for the future. New York: Plenum Press, p. 462, 1992.

ULHOA, C. J.; PEBERDY, J. F. Regulation of Chitinase Synthesis in *Trichoderma harzianum*. *Journal of General and Applied Microbiology*, v. 137, p. 2163-2169, 1991.

ULHOA, C.J.; PEBERDY, J.F. Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microbial Technology*. 14(3):236–240, 1992.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; WOO, S.L.; NIGRO, M.; MARRA, R.; LOMBARDI, N.; PASCALE, A.; RUOCCO, M.; LANZUISE, S. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *The Open Mycology Journal*, v. 8, n. 1, p. 127-139, 2014.

WIRTH, S.J.; WOLF, G.A. Micro-plate colourimetric assay for endoacting cellulase, xylanase, chitinase, 1,3- $\beta$ -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. *Soil Biology and Biochemistry*, v.24, p.511-519, 1992.

ZEILINGER, S.; OMANN, M. *Trichoderma* biocontrol: signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. *Gene Regulation and Systems Biology*, v. 1, p. 227-234, 2007.

## ANEXOS

## ANEXO A – Publicação de artigo científico

Figura 11 – Artigo científico publicado em 2022



## ANEXO B – Resumos publicado em anais e congressos

Figura 12 - Resumos apresentados no I Congresso de Engenharia Biotecnológica, 2021



Revista  
**MULTIDISCIPLINAR DE**  
Educação e Meio Ambiente



ISSN: 2675-813X  
FATOR DE IMPACTO: 0.502



[Sobre a Revista](#) [Normas de Submissão](#) [Submissão](#) [Edição Atual](#) [Edição Anteriores](#) [Contato](#) [Buscar](#)

[Início](#) / [Arquivos](#) / v. 2 n. 3 (2021): Edição especial: Anais de eventos / I Congresso de Engenharia de Biotecnologia

### AVALIAÇÃO IN VITRO DA INIBIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DO FITOPATÓGENO SCLEROTINIA SCLEROTIORUM POR ISOLADOS DE TRICHODERMA SPP.

**Kamila Lourrane Carvalho Alencar Rocha**

Kárita Cristine Rodrigues Dos Santos  
Maraiza Castro Bezerra  
Vanice Conceição Do Nascimento  
Fabyano Alvares Cardoso Lopes

DOI: <https://doi.org/10.51189/rema/1347>



Revista  
**MULTIDISCIPLINAR DE**  
Educação e Meio Ambiente





Revista  
**MULTIDISCIPLINAR DE**  
Educação e Meio Ambiente



ISSN: 2675-813X  
FATOR DE IMPACTO: 0.502



[Sobre a Revista](#) [Normas de Submissão](#) [Submissão](#) [Edição Atual](#) [Edição Anteriores](#) [Contato](#) [Buscar](#)

[Início](#) / [Arquivos](#) / v. 2 n. 3 (2021): Edição especial: Anais de eventos / I Congresso de Engenharia de Biotecnologia

### EFEITO INIBITÓRIO SOBRE O CRESCIMENTO DO FITOPATÓGENO FUSARIUM SOLANI POR MEIO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS DE ISOLADOS DO GÊNERO TRICHODERMA SPP.

Kárita Cristine Rodrigues dos Santos

**Kamila Lourrane Carvalho De Alencar Rocha**

Maraiza Castro Bezerra  
Vanice Conceição Do Nascimento  
Fabyano Alvares Cardoso Lopes

DOI: <https://doi.org/10.51189/rema/1358>



Revista  
**MULTIDISCIPLINAR DE**  
Educação e Meio Ambiente



Figura 13 - Resumos apresentados no I Seminário de Biodiversidade do Tocantins, 2021

**RESUMOS**

**USO IN VITRO DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO AO FITOPATÓGENO *Fusarium oxysporum***

Kamila Lourrane Carvalho de Alencar Rocha<sup>1</sup>, Kárita Cristine Rodrigues dos Santos<sup>1</sup>, Vanice Conceição do Nascimento<sup>2</sup>, Maraiza Bezerra Castro<sup>2</sup>, Fabyano Alvares Cardoso Lopes<sup>3,4</sup>

1. Graduanda, Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Tocantins. kamilalourrane@uft.edu.br, karita.cristine@uft.edu.br
2. Mestranda, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Tocantins. vanice.nascimento@uft.edu.br, maraiza.castro@uft.edu.br

**RESUMOS**

**AVALIAÇÃO DO ANTAGONISMO DE ISOLADOS DO GÊNERO *Trichoderma* spp. SOBRE O FITOPATÓGENO *Fusarium solani* POR MEIO DO TESTE DE PAREAMENTO**

Kárita Cristine Rodrigues dos Santos<sup>1</sup>, Kamila Lourrane Carvalho de Alencar Rocha<sup>1</sup>, Maraiza Castro Bezerra<sup>2</sup>, Vanice Conceição do Nascimento<sup>2</sup>, Fabyano Alvares Cardoso Lopes<sup>3,4</sup>

1. Graduanda, Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Tocantins. karita.cristine@uft.edu.br, kamilalourrane@uft.edu.br
2. Mestranda, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Tocantins. maraiza.castro@uft.edu.br, vanice.nascimento@uft.edu.br

**RESUMOS**

**CRESCIMENTO MICELIAL DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. EM PRESENÇA DE CELULOSE COMO FONTE DE CARBONO**

Vanice Conceição do Nascimento<sup>1</sup>, Maraiza Bezerra Castro<sup>1</sup>, Kárita Cristine Rodrigues dos Santos<sup>2</sup>, Kamila Lourrane Carvalho de Alencar Rocha<sup>2</sup>, Fabyano Alvares Cardoso Lopes<sup>3,4</sup>

1. Mestranda, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Tocantins. vanice.nascimento@uft.edu.br, maraiza.castro@uft.edu.br
2. Graduanda, Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Tocantins. karita.cristine@uft.edu.br, kamilalourrane@uft.edu.br

Figura 14 - Certificado da publicação de resumo no VIII Workshop Internacional sobre Planejamento e Desenvolvimento Sustentável de Bacias Hidrográficas, 2021.



## ANEXO C – Trabalho de Iniciação Científica realizado em 2020/2021

Figura 15 - Publicação do trabalho de iniciação científica

<p><b>Título do Trabalho</b></p> <p>ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE TRICHODERMA SPP. DO CERRADO TOCANTINENSE E APLICAÇÃO COMO AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO CONTRA O FITOPATÓGENO SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</p> <p><b>Autores</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <span style="border: 1px solid orange; padding: 2px;">Kamila Lourrane Carvalho Alencar</span></li> <li>• Fabyano Alvares Cardoso Lopes</li> </ul> <p><b>Modalidade</b></p> <p>Alunos 2020/2021</p> <p><b>Área temática</b></p> <p>Biologia Geral</p> <p><b>Data de Publicação</b></p> <p>21/06/2022</p>	<p><b>Título do Evento</b></p> <p>XVII Seminário de Iniciação Científica da UFT</p> <p><b>Título dos Anais do Evento</b></p> <p>Anais do XVII Seminário de Iniciação Científica da UFT</p> <p><b>Nome da Editora</b></p> <p>Event3</p> <p><b>Meio de Divulgação</b></p> <p>Meio Digital</p> <p><b>DOI</b></p> <p style="text-align: right;"><a href="#">Obter o DOI</a></p>
--	---



**ANEXO D – Premiação do trabalho de Iniciação Científica realizado em 2021/2022**

Figura 16 - Certificado do Prêmio Jovem Pesquisador para o trabalho de iniciação científica realizado em 2021/2022

