

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

MAIRA CRISTINA SCHUSTER RUSSIANO

**PROSPECÇÃO DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. COM POTENCIAL DE
BIOCONTROLE, BIOESTIMULO, INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E
SOLUBILIZAÇÃO DE NUTRIENTES PARA CULTURA DA SOJA**

TESE

PATO BRANCO

2024

MAIRA CRISTINA SCHUSTER RUSSIANO

**PROSPECÇÃO DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. COM POTENCIAL DE
BIOCONTROLE, BIOESTIMULO, INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E
SOLUBILIZAÇÃO DE NUTRIENTES PARA CULTURA DA SOJA**

Prospecting for isolates of *Trichoderma* spp. with potential for biocontrol, biostimulation,
resistance induction and nutrient solubilization for soybean crops

Tese apresentada como requisito para
obtenção do título de Doutor em Agronomia -
Área de Concentração: Produção Vegetal da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Orientador: Sérgio Miguel Mazaro

Coorientadora: Lilian de Souza Vismara

PATO BRANCO

2024



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



MAIRA CRISTINA SCHUSTER RUSSIANO

PROSPECÇÃO DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. COM POTENCIAL DE BIOCONTROLE, BIOESTIMULO, INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E SOLUBILIZAÇÃO DE NUTRIENTES PARA CULTURA DA SOJA.

Trabalho de pesquisa de doutorado apresentado como requisito para obtenção do título de Doutor Em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Produção Vegetal.

Data de aprovação: 26 de Fevereiro de 2024

Dr. Sergio Miguel Mazaro - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Edson Bertoldo - União de Ensino do Sudoeste do Paraná (Unisep)

Dr. Laercio Ricardo Sartor - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Lucas Da Silva Domingues - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Mauricio Conrado Meyer - Pesquisador - Embrapa Soja

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 26/02/2024.

AGRADECIMENTOS

Expresso minha gratidão a Deus, por me sustentar e abençoar no decorrer de todo o período de formação acadêmica. Até aqui me ajudou o Senhor (1 Samuel 7:12). Agradeço aos meus pais Ilço (*in memoriam*) e Edemilde Schuster por me apoiarem e acreditarem em mim, depositando toda a confiança e esforços desde a infância, me incentivando em todos os paços e decisões tomadas, sou grata a Deus por eles. Ao meu marido Carlos Guilherme, o qual sempre pensou mais em mim do que em si próprio, esteve ao meu lado dando forças em todos os momentos dessa formação, obrigada por ser essa pessoa. Agradeço ao meu orientador Sérgio Mazaro, meu mentor, por ter me apresentado ao mundo do controle biológico de doenças, por compartilhar seu extenso conhecimento sobre o assunto, e ter despendido do seu tempo em minha formação. Agradeço aos demais colegas que compartilharam sua amizade e seu tempo, me auxiliando nos experimentos envolvidos neste trabalho, em especial, Camila e Joeliton.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”.

RESUMO

SCHUSTER-RUSSIANO, Maira Cristina. Prospecção de isolados de *Trichoderma* spp. com potencial de biocontrole, bioestímulo, indução de resistência e solubilização de nutrientes para a cultura da soja. 123 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Pato Branco, 2024.

O Brasil é o maior produtor de soja, com uma área plantada de 44 milhões de hectares, sendo a *commoditie* mais exportada pelo país. Dentre os fatores que limitam o rendimento da cultura, destacam-se algumas doenças que causam podridões nas raízes, hastes e grãos, ocasionadas por fitopatógenos que sobrevivem em restos culturais, sendo alguns dos principais agentes causais os fungos: *Macrophomina phaseolina*, complexo de *Fusarium* spp., *Sclerotinia sclerotiorum* e complexo de *Diaporthe* spp. Tendo em vista a preocupação com a saúde humana e ambiental, o uso do controle biológico como forma de supressão destes fitopatógenos vem ganhando força nos últimos anos, tendo o gênero *Trichoderma* como destaque, devido ao amplo modo de ação do antagonista, que incluem competição, antibiose, micoparasitismo e indução de resistência. Desta forma, o objetivo do trabalho foi prospectar isolados de *Trichoderma* spp. presentes no solo, avaliar seus potenciais mecanismos de ação, para serem empregados no controle biológico de doenças de solo que afetam a soja. Os experimentos foram realizados na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos. Para a busca de isolados nativos de *Trichoderma* spp., foram utilizados saquinhos de nylon contendo em seu interior escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, as quais foram distribuídas em 28 pontos da fazenda experimental da universidade, acondicionados entre o solo e restos culturais. Os saquinhos foram recolhidos após 20 dias, e os escleródios com aspecto visual de colonização por agente biológico, foram transferidos para placas de Petri® a fim de isolar os microrganismos; obtendo-se quatro isolados de *Trichoderma koningiopsis*. Com os quatro isolados, estudou-se a morfologia das hifas, teste de antagonismo com *M. phaseolina*, *F. tucumaniae*, *S. sclerotiorum* e *D. longicolla*; teste de antibiose dos metabólitos filtrados; e antibiose por compostos orgânicos voláteis. Também foi avaliada a capacidade de solubilização de fósforo em meio NBRIP, potássio em meio Pikovskara, e análise nutricional da seiva pelo equipamento Nir. Em casa de vegetação, realizou-se a aplicação dos quatro isolados de *Trichoderma* spp. em soja, para execução das análises de indução de resistência em plantas de soja, que incluem: determinação da quitinase, β 1,3 glucanase, proteínas totais, fenilalanina amonialiase e compostos fenólicos. Também foi conduzido em vasos o ensaio de promoção de crescimento, avaliando parte aérea e sistema radicular das plantas. O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, a ANOVA seguido da análise de regressão no software Rbio. Com os resultados obtidos pode-se observar que a faixa ideal de crescimento dos quatro de *Trichoderma koningiopsis* ficam entre 25 e 30 °C. Foram eficientes no controle *in vitro* dos fitopatógenos em estudo, obtendo ação na competição, micoparasitismo e antibiose de compostos orgânicos voláteis; porém não demonstraram eficiência com a metodologia MIC utilizando os metabólitos filtrados. Mostraram-se eficientes na solubilização de fósforo e potássio, e na indução de resistência, aumentando o acúmulo de gliceolina em cotilédones, e ativando quitinase, e β 1,3 glucanase. Ainda foi observada capacidade de promoção de crescimento em plantas de soja tratadas com os isolados.

Palavras-chave: Biológicos, antagonista, fitopatógenos, indução e antibiose.

ABSTRACT

SCHUSTER-RUSSIANO, Maira Cristina. Prospecting for isolates of *Trichoderma* spp. with potential for biocontrol, biostimulation, resistance induction and nutrient solubilization for soybean crops. 123 f. Doctoral thesis - Graduate Program in Agronomy (Concentration Area: Crop), Federal University of Technology Paraná (UTFPR). Pato Branco, 2024.

Brazil is the largest producer of soybeans, with a planted area of 44 million hectares, making it the country's most exported commodity. Among the factors that limit crop yield, some diseases that cause rot in roots, stems and grains stand out, caused by phytopathogens that survive in crop remains, with some of the main causal agents being fungi: *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium* spp. complex, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Diaporthe* spp. complex. Given the concern for human and environmental health, the use of biological control as a means of suppressing these phytopathogens has been gaining strength in recent years, with the genus *Trichoderma* as a highlight, due to the antagonist's broad mode of action, which includes competition, antibiosis, mycoparasitism and resistance induction. Therefore, the objective of the work was to prospect isolates of *Trichoderma* spp. present in the soil, evaluate their potential mechanisms of action, to be used in the biological control of soil diseases that affect soybeans. The experiments were carried out at the Federal Technological University of Paraná, Campus Dois Vizinhos. To search for native isolates of *Trichoderma* spp., nylon bags containing sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* were used, which were distributed in 28 points on the university's experimental farm, placed among the soil and crop residues. The bags were collected after 20 days, and the sclerotia with a visual appearance of colonization by a biological agent were transferred to Petri dishes in order to isolate the microorganisms; obtaining four isolates of *Trichoderma koningiopsis*. With the four isolates, the morphology of the hyphae was studied, antagonism test with *M. phaseolina*, *F. tucumaniae*, *S. sclerotiorum* and *D. longicolla*; antibiosis test of filtered metabolites; and antibiosis by volatile organic compounds. The solubilization capacity of phosphorus in NBRIP medium, potassium in Pikovskara medium, and nutritional analysis of the sap using the Nir equipment were also evaluated. In a greenhouse, the four isolates of *Trichoderma* spp. were applied. in soybeans, to carry out resistance induction analyzes in soybean plants, which include: determination of chitinase, β 1,3 glucanase, total proteins, phenylalanine ammonialyase and phenolic compounds. The growth promotion test was also conducted in pots, evaluating the aerial part and root system of the plants. The design adopted was completely randomized with four replications. The data obtained were subjected to the Shapiro-Wilk normality test, ANOVA followed by regression analysis in the Rbio software. With the results obtained, it can be seen that the ideal growth range for *Trichoderma koningiopsis* is between 25 and 30 °C. They were efficient in in vitro control of the phytopathogens under study, obtaining action in competition, mycoparasitism and antibiosis of volatile organic compounds; however, they did not demonstrate efficiency with the MIC methodology using filtered metabolites. They proved to be efficient in solubilizing phosphorus and potassium, and in inducing resistance, increasing the accumulation of glyceolin in cotyledons, and activating chitinase and β 1,3 glucanase. Growth promotion capacity was also observed in soybean plants treated with the isolates.

Keywords: Biological, antagonist, phytopathogens, induction and antibiosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - a) Aspecto de <i>Trichoderma</i> spp. em cultivo <i>in vitro</i> ; b) Colonização de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> ; c) Estruturas de hifas e conídios vista em microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 500 vezes.....	31
Figura 02 - Placas de Petri® contendo escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> , com 15 dias de crescimento. Campus Pato Branco, 2024.	39
Figura 03 - Saquinhos de nylon contendo escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> . Campus Pato Branco, 2024.....	39
Figura 04 - Implantação das iscas à campo. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	41
Figura 05 - Coleta das iscas de escleródios 20 dias após instalação. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	42
Figura 06 - Placas de Petri® com dez dias de crescimento contendo os isolados de <i>Trichoderma</i> spp. prospectadas: MS09, MS27, MS04 e MS28. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	43
Figura 07 – Utilização da placa de Petri® com a colônia no primeiro dia de avaliação em microscópio óptico na objetiva de 400x. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	44
Figura 08 – Morfologia das hifas e aspecto de crescimento da colônia de <i>T. koningiopsis</i> isolado MS04 em quatro dias de avaliação. Dia 01 e 02 objetiva de 400x; dia 03 e 04 objetiva de 100x. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	46
Figura 09 – Morfologia das hifas e aspecto de crescimento da colônia de <i>T. koningiopsis</i> isolado MS09 em quatro dias de avaliação. Dia 01 e 02 objetiva de 400x; dia 03 e 04 objetiva de 100x. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.	46
Figura 10 – Morfologia das hifas e aspecto de crescimento da colônia de <i>T. koningiopsis</i> isolado MS27 em quatro dias de avaliação. Dia 01 e 02 objetiva de 400x; dia 03 e 04 objetiva de 100x. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.	46
Figura 11 – Morfologia das hifas e aspecto de crescimento da colônia de <i>T. koningiopsis</i> isolado MS28 em quatro dias de avaliação. Dia 01 e 02 objetiva de 400x; dia 03 e 04 objetiva de 100x. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.	46
Figura 12 – Hifas de <i>T. koningiopsis</i> MS28, seguido por conídios dispersos, no terceiro dia de crescimento vegetativo. Leitura em microscópio óptico; observação de 100x e 400x. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	48
Figura 13 – Hifas de <i>T. koningiopsis</i> MS09 no sétimo dia de crescimento vegetativo. Leitura em microscópio eletrônico de varredura; observação de 600x. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	48
Figura 14 – Escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> colonizados por <i>T. koningiopsis</i> . UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	49
Figura 15 – Crescimento micelial (cm) de <i>T. koningiopsis</i> isolado MS04, MS09, MS27 e MS28 ao longo de quatro dias de incubação à 25 °C. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	50

Figura 16 – Crescimento micelial de <i>T. koningiopsis</i> isolado MS04, MS09, MS27 e MS28 expresso em dias, sob quatro temperaturas 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	51
Figura 17 – Interações diretas exercidas por <i>Trichoderma</i> spp. frente a fitopatógenos. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	54
Figura 18 - Placas de Petri® com sete dias de crescimento contendo: <i>F. tucumaniae</i> , <i>M. phaseolina</i> , <i>D. longicolla</i> e <i>S. sclerotiorum</i> , respectivamente. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	55
Figura 19 - Placa de Petri® em cultura pareada/confronto direto. Do lado esquerdo o disco de micélio de <i>Trichoderma</i> spp. e do lado oposto o disco de micélio do patógeno. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	56
Figura 20 - Placa de Elisa com 96 poços, simulando a microdiluição dos tratamentos. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	58
Figura 21 – Ensaio prévio da antibiose promovida por compostos orgânicos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>F. tucumaniae</i> e <i>M. phaseolina</i> : a) Placa contendo MS09 com dez dias de crescimento; b) Disco de micélio do fitopatógeno; c) Fechamento de ambas as placas a e b; d) Testemunha de <i>F. tucumaniae</i> após 15 dias de crescimento; e) Crescimento de <i>F. tucumaniae</i> após 15 dias em placa invertida com MS09; f) Testemunha de <i>M. phaseolina</i> após 15 dias de crescimento; e) Crescimento de <i>M. phaseolina</i> após 15 dias em placa invertida com MS09, nesta placa já há a presença de micélio do antagonista. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	60
Figura 22 – Efeito antagonista de <i>T. koningiopsis</i> isolado MS04, MS09, MS27 e MS28 sobre o crescimento micelial (cm) <i>M. phaseolina</i> , <i>F. tucumaniae</i> , <i>D. longicolla</i> e <i>S. sclerotiorum</i> respectivamente, ao longo de quatro dias. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	62
Figura 23 - Micoparasitismo de <i>T. koningiopsis</i> em: a) <i>M. phaseolina</i> , b) <i>F. tucumaniae</i> , c) <i>D. longicolla</i> e d) <i>S. sclerotiorum</i> . UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	65
Figura 24 - Frente e verso das placas de a) <i>M. phaseolina</i> e b) <i>D. longicolla</i> . UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	65
Figura 25 - a) Testemunha de <i>M. phaseolina</i> , b) e c) <i>M. phaseolina</i> pareada com <i>T. koningiopsis</i> . UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	65
Figura 26 – Efeito dos metabólitos voláteis de <i>T. koningiopsis</i> isolado MS04, MS09, MS27 e MS28 sobre o crescimento micelial (cm) <i>M. phaseolina</i> , <i>F. tucumaniae</i> , <i>D. longicolla</i> e <i>S. sclerotiorum</i> respectivamente, ao longo de quatro dias. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	67
Figura 27 - Placas aos 15 dias de avaliação: a) <i>Macrophomina phaseolina</i> em placa selada com a estipe MS28; b) Testemunha de <i>M. phaseolina</i> ; c) <i>Fusarium tucumaniae</i> em placa selada; d) Testemunha <i>F. tucumaniae</i> ; e) <i>Diaporthe longicolla</i> em placa selada; f) Testemunha de <i>D. longicolla</i> ; g) <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em placa selada; h) Testemunha de <i>S. sclerotiorum</i> . UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	68

Figura 28 - Microscopia eletrônica das hifas de <i>M. phaseolina</i> aos 15 dias, sendo: a) Testemunha; b) e c) Tratamento com placa selada. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	70
Figura 29 - Procedimento para análise de seiva: a) Coleta dos trifólios da soja; b) Prensagem das folhas para obtenção da seiva; c) Centrifugação; d) Adição do etanol; e) Leitura no Nir; f) Laudo gerado pelo programa. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	75
Figura 30 : Índice de Solubilização (IS) de fósforo de <i>T. koningiopsis</i> isolado MS04, MS09, MS27 e MS28, respectivamente, em meio de cultura NBRIP, no decorrer de sete dias de avaliação. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024. CVs= 9,49%; 14,54%; 10,64%; 11,96%, respectivamente.....	76
Figura 31 : Índice de Solubilização (IS) de potássio de <i>T. koningiopsis</i> isolado MS04, MS09, MS27 e MS28, respectivamente, em meio de cultura Pikovskaya Modificado, no decorrer de quatro dias de avaliação. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024. CVs= 16,3%; 6,02%; 10,99%; 12,77%, respectivamente.....	77
Figura 32 - Halo/gradiente de solubilização de fósforo e potássio do isolado MS04 no quarto dia de avaliação. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	78
Figura 33 - Placa de Petri contendo o meio Pikovskaya Modificado, sendo A) isolado de <i>Trichoderma</i> spp. não solubilizadora de potássio e B) isolado MS09 de <i>T. koningiopsis</i> . UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	78
Figura 34 – Esquematização dos três tipos de resistências encontradas na planta, sendo sistêmica adquirida, sistêmica induzida e resistência induzida. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	82
Figura 35 - Procedimento para quantificação das gliceolinas: a) Cotilédones emergidos na areia, b) Cotilédones dispostos em disco de germitest em placa de Petri; c) Agitador orbital shaker com as amostras. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	84
Figura 36 - Procedimento para obtenção do extrato enzimático, maceração da amostra, extrato vertido em eppendorfs e posterior centrifugação. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	85
Figura 37 – Plantas de soja conduzidas em tubos de PVC de 70 cm para avaliação do crescimento. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	89
Figura 38 – Implantação do teste de germinação de sementes de soja. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	90
Figura 38 - Absorbância (285nm) mg ⁻¹ de cotilédones de soja tratados com quatro isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e testemunha com água destilada. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	91
Figura 39 - Resposta de defesa de plantas de soja inoculadas com <i>T. koningiopsis</i> isolado MS04, MS09, MS27 e MS28, na expressão de Quitinase, β -1,3 Glucanase, compostos fenólicos, proteínas e FAL, respectivamente. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....	92
Figura 40 – Plantas de soja tratadas com a) Testemunha com água destilada e b) <i>T. koningiopsis</i> isolado MS28. UTFPR Campus Pato Branco, 2024.....	96

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01** - Locais de implantação das iscas, número da amostra, UNEP (Unidade de estudo e pesquisa) do Campus e respectivas coordenadas. Campus Pato Branco, 2024.....40
- Tabela 02** – Equação da reta e R^2 ajustado referentes ao crescimento micelial de *M. phaseolina*, *F. tucumaniae*, *D. longicolla* e *S. sclerotiorum*. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....62
- Tabela 03** – Equação da reta e R^2 ajustado referentes ao crescimento micelial de *M. phaseolina*, *F. tucumaniae*, *D. longicolla* e *S. sclerotiorum*. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....67
- Tabela 04** - Concentração de nutrientes (mg.L^{-1}) na seiva de plantas de soja tratadas com *T. koningiopsis* isolados MS04, MS09, MS27 e MS28, em estágio V7 utilizando o equipamento NIR. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....80
- Tabela 05** – Equação da reta e R^2 ajustado referentes à resposta de defesa de plantas de soja inoculadas com *T. koningiopsis* isolado MS04, MS09, MS27 e MS28, na expressão de Quitinase e β -1,3 Glucanase. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.....93
- Tabela 06** – Efeito do tratamento de sementes com *T. koningiopsis* isolado MS04, MS09, MS27 e MS28 sobre a massa verde da parte aérea (MV-PA), massa verde da raiz (MV-RZ), massa seca da parte aérea (MS-PA), massa seca raiz (MS-RZ), comprimento parte aérea (COMP-PA), Comprimento raiz (COMP-RZ), volume da raiz (VOL-RZ) e diâmetro do caule (DIÂM-C) de plantas de soja em estágio V7. UTFPR Campus Pato Branco, 2024.....95
- Tabela 07** – Porcentagem de sementes germinadas (%G), % plântulas normais, comprimento de parte aérea (PA), comprimento de raiz e massa seca total das plântulas de soja tratadas com testemunha e isolado MS04, MS09, MS27 e MS28 de *T. koningiopsis*. UTFPR Campus Pato Branco, 2024.....97

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

US\$	Dólar Americano
IPEA	Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada
PR	Unidade da Federação – Paraná
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
EUA	Estados Unidos da América
Ve	Estádio vegetativo de emergência da soja
Vc	Estádio vegetativo cotiledonar da soja
V1	Estádio vegetativo 1 da soja
R1	Estádio reprodutivo 1 da soja
FBN	Fixação biológica de nitrogênio
spp.	Abreviação de espécies
SMS	Síndrome da Morte Súbita pelo gênero <i>Fusarium</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
BDA	Meio de Cultura Batata Dextrose e Ágar
BD	Caldo Batata Dextrose
PVC	Policloreto de vinila
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
UNEP	Unidade de estudo e pesquisa
ANOVA	Análise de variância estatística
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIC	Concentração inibitória mínima
UFC	Unidade formadora de colônia
DIC	Delineamento inteiramente ao acaso
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
FAL	Fenilalanina amônia-liase
HCL	Ácido Clorídrico
pH	Potencial hidrogeniônico
RPM	Rotações por minuto
MCA	Metanol, clorofórmio, água
NIR	Near Infrared Reflectance
Et al.	Expressão latina "et alii", que significa "e outros"
ed.	Abreviação de edição
Vol.	Abreviação de volume
N.	Abreviatura de número
DOI	Identificador de Objeto Digital
ISSN	Internacional Standard Serial Number
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
USDA	United States Department of Agriculture

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
Mm	Unidade de medida em milímetros
Cm	Unidade de medida em centímetros
M	Unidade de medida em metros
m ²	Unidade destinada a área, metros quadrados
µm	Símbolo da unidade de medida micrômetro
µl	Símbolo da unidade de volume microlitro
B	Letra grega beta
A	Letra grega alfa
G	Unidade de massa em gramas
Mg	Unidade de massa em miligramas
mL	Unidade de volume mililitros
H	Unidade de tempo em horas
nm	Unidade de medida de absorbância, nanômetros
M	Unidade de massa molar
°C	Unidade de temperatura graus celsius
®	Marca Registrada
S	Coordenada geográfica correspondente ao Sul
W	Coordenada geográfica “ <i>West</i> ” determina o Oeste
°	Graus
‘	Minutos
“	Segundos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.2 OBJETIVO GERAL	18
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
2. REVISÃO	20
2.1 A CULTURA DA SOJA	20
2.1.1 Crescimento e desenvolvimento da cultura	21
2.2 PATÓGENOS HABITANTES DE SOLO COM OCORRÊNCIA NA CULTURA DA SOJA	24
2.2.1 <i>Fusarium</i> spp.	24
2.2.2 <i>Macrophomina phaseolina</i>	25
2.2.3 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	26
2.2.4 <i>Diaporthe longicolla</i>	28
2.3 DIFICULDADES NO CONTROLE QUÍMICO DE DOENÇAS	29
2.4 CONTROLE BIOLÓGICO	29
2.5 ASPECTOS GERAIS DE <i>Trichoderma</i> spp.	31
2.5.2 Mecanismos de ação do gênero <i>Trichoderma</i>	33
2.5.1.1 <i>Competição</i>	33
2.5.1.2 <i>Antibiose</i>	34
2.5.1.3 <i>Micoparasitismo</i>	34
2.5.1.4 <i>Indução de resistência vegetal</i>	35
REFERÊNCIAS	37
3. ESTUDO 01: BIOPROSPECÇÃO DE ISOLADOS E ESTUDO <i>IN VITRO</i>	44
3.1 INTRODUÇÃO	44
3.2 PROCEDIMENTO METODOLÓGICO	46
3.2.1 PROSPECÇÃO DE <i>Trichoderma</i> spp.	46
3.2.1.1 <i>Produção de escleródios in vitro</i>	46
3.2.1.2 <i>Implantação dos saquinhos de nylon contendo escleródios (iscas) à campo</i>	48
3.2.1.3 <i>Isolamento de Trichoderma spp.</i>	50
3.2.1.4 <i>Identificação dos fungos selecionados</i>	51
3.3 RESULTADOS E DISSCUSSÕES	53
3.4 CONCLUSÕES	60

REFERÊNCIAS	61
4. ESTUDO 02: ANTAGONISMO E ANTIBIOSE PROMOVIDOS POR ISOLADOS DE <i>Trichoderma koningiopsis</i>	63
4.1 INTRODUÇÃO	63
4.2 PROCEDIMENTO METODOLÓGICO.....	65
4.2.1 Avaliação de antagonismo por confronto direto.....	65
4.2.2 Avaliação morfológica das hifas	66
4.2.3 Avaliação do potencial de antibiose.....	67
4.2.3.1 Obtenção dos metabólitos filtrados	67
4.2.3.2 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC).....	67
4.2.4 Avaliação da antibiose promovida por compostos orgânicos voláteis	69
4.2.5 Avaliação morfológica das hifas	71
4.3 RESULTADOS E DISSCUSSÕES	71
4.3.1 Resultados - Antagonismo por confronto direto.....	71
4.3.2 Resultados – Concentração Inibitória Mínima	76
4.3.3 Resultados - Antibiose por compostos orgânicos voláteis.....	77
4.4 CONCLUSÕES	81
5. ESTUDO 03: SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO E POTÁSSIO E ANÁLISE NUTRICIONAL DE SEIVA	86
5.1 INTRODUÇÃO	86
5.2 PROCEDIMENTO METODOLÓGICO.....	87
5.2.1 Solubilização de Fósforo	87
5.2.2 Solubilização de Potássio.....	88
5.2.3 Análise de seiva de plantas de soja inoculadas com <i>T. koningiopsis</i>	89
5.3 RESULTADOS E DISSCUSSÕES	91
5.4 CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS	96
6. ESTUDO 04: EFEITO DE <i>T. koningiopsis</i> NA RESPOSTA DE DEFESA E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE SOJA	98
6.1 INTRODUÇÃO	98
6.2 PROCEDIMENTO METODOLÓGICO - ESTUDO 04.....	100
6.2.1 Resposta de defesa de plantas de soja inoculadas com <i>T. koningiopsis</i>	100
6.2.1.1 Determinação de Gliceolina	100
6.3 RESULTADOS E DISSCUSSÕES - ASSUNTO 04	108

6.4 CONCLUSÕES	115
REFERÊNCIAS	116
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	120

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L. Merril) possui mercado estabelecido para grãos e derivados, adquirindo importância mundial, com variáveis usos na agroindústria para produção de ração animal, óleo vegetal, indústria de alimentos, bem como na indústria química (COSTA NETO; ROSSI, 2000).

Além de ser a *commoditie* mais exportada no Brasil. Em janeiro de 2022, o Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA) divulgou que o complexo soja (grão, farelo e óleo) foi responsável por US\$ 1,6 bilhão do valor total de exportação (US\$ 3,2 bilhões), tendo como principal destino a China. Em 2023, foram cultivados 44,080 milhões de hectares, com produção de 154,609 milhões de toneladas, média de produtividade de 3.507 kg/ha (CONAB, 2024). Dados da Conab de janeiro de 2024, mostram uma área de 45,290 milhões de hectares e produção média estimada de 155,269 milhões de toneladas para este ano.

Dentre os fatores que limitam a obtenção destes altos rendimentos pela cultura, destacam-se as doenças de solo, em especial as podridões radiculares ocasionadas por fungos rizosféricos (CORREIA; MICHEREFF, 2018), estando entre os principais agentes fitopatogênicos que afetam a soja, os fungos *Macrophomina phaseolina*, complexo de *Fusarium* spp., *Sclerotinia sclerotiorum* e *Diaporthe longicolla*.

O complexo de *Fusarium* spp. causa podridões de raiz e colo, cujo sintoma prevalente é o escurecimento do sistema radicular acompanhado pelo processo de decomposição do tecido (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011). *Sclerotinia sclerotiorum*, desenvolve sobre a planta micélio branco, seguido pela formação de escleródios nas vagens (KIMATI et al. 2005). Já *Macrophomina phaseolina* causa a “podridão de carvão da raiz”, fazendo com que sistema radicular tome coloração acinzentada, favorecendo o aparecimento de estruturas negras, denominadas microescleródios (SEIXAS; MAZARO; REY, 2017). Por fim, *Diaporthe longicolla* agente causal de podridão radicular, podridão de sementes e possíveis lesões nas hastes causa perdas consideráveis na cultura da soja, tendo relatos em diferentes

partes do mundo (ZHAO et al. 2021).

Tais patógenos ocasionam perdas expressivas na produtividade de uma lavoura. A aplicação de agroquímicos, que é a forma de controle comumente empregada, vem perdendo força com o passar dos anos, apresentando inúmeras desvantagens no cenário agrícola, como contaminação ambiental, surgimento de fitopatógenos com resistência a moléculas, doenças iatrogênicas, além da eliminação de organismos benéficos presentes no solo, impactando a segurança ambiental e alimentar. É nesse cenário que surge o controle biológico, que se apresenta como uma alternativa viável e segura para o controle de doenças, tendo em vista a facilidade destes antagonistas se estabelecerem no ecossistema. De modo geral, o controle baseia-se na aplicação de um microrganismo benéfico para controle de um microrganismo fitopatogênico (SILVA et al. 2019, MORANDI et al. 2005).

Se tratando de controle biológico de doenças, agentes da rizosfera se evidenciam, pois, o ambiente do solo tende a ser um local estável, com menor oscilação climática se comparado com a parte aérea, logo, a sobrevivência e atuação de organismos antagônicos neste ambiente é dinâmica e favorável (BETTIOL; MORANDI, 2009). Dentre eles, o gênero *Trichoderma* ganha destaque no cenário mundial, considerados simbiossiontes de plantas e micoparasitas fúngicos eficazes, fazendo com que diversas espécies do gênero mostrem aptidão como biofungicidas comerciais (SCHUSTER, SCHOLL, 2010).

Trichoderma spp. são fungos saprofíticos, cosmopolitas habitantes do solo, pertencentes à família dos Ascomycetes. Possuem potencial antagonista no controle de bactérias, fungos e nematoides, em especial fungos causadores de podridões radiculares (*M. phaseolina*, *Fusarium* spp., *S. sclerotiorum* e *D. longicolla*). Dentre as espécies estudadas tem-se *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma viride*, e *Trichoderma asperellum* (BLASZCZYK et al. 2014; MEDEIROS; BAVIA; SEIXAS, 2022). Estes microrganismos além de colonizarem as raízes das plantas, colonizam a rizosfera e o rizoplane, apresentando com isso um complexo modo de ação: antibiose produzindo metabólitos tóxicos à fitopatógenos; degradação da quitina componente da parede celular do fungo (favorecendo o micoparasitismo); competição

por nutrientes e espaço; indução de resistência em plantas; que aliados ao crescimento vegetal que proporcionam, produção de sideróforos, e solubilizadores de fósforo, se mostram uma excelente opção para uso na agricultura como agentes de biocontrole (TYŚKIEWICZ, 2022; GAJERA, 2013; SEGARRA et al. 2010; BORGES-CHAGAS et al. 2015).

Dessa forma, o objetivo do trabalho é prospectar isolados de *Trichoderma* spp. presentes no solo, e determinar seu potencial quanto a promoção e crescimento, solubilização de nutrientes, indução de resistência e biocontrole de patógenos de solo que acometem a cultura da soja.

1.2 OBJETIVO GERAL

Prospectar isolados de *Trichoderma* spp. presentes no solo de diferentes áreas da fazenda experimental da UTFPR Campus Dois Vizinhos, identificando seu potencial, quanto a promoção e crescimento, solubilização de nutrientes, indução de resistência e em especial ações de biocontrole do antagonista frente aos principais de patógenos de solo que acometem a cultura da soja.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Prospectar isolados de *Trichoderma* spp. no solo da Universidade, através de iscas montadas à campo;
- Identificar em nível de espécies os diferentes isolados de *Trichoderma* spp. encontradas;
- Testar o potencial dos isolados de *Trichoderma* spp. no controle dos patógenos:

Macrophomina phaseolina, *Fusarium tucumaniae*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Diaporthe longicolla*;

- Avaliar a solubilização de fosfato e potássio dos isolados;
- Avaliar o potencial antagonista dos isolados de *Trichoderma* spp. em cultura pareada/ confronto direto e antibiose *in vitro*;
- Verificar se os isolados de *Trichoderma* spp. apresentam ação de indução de resistência nas plantas de soja em casa de vegetação;
- Observar o efeito da inoculação dos isolados de *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento vegetal, bem como na composição nutricional da seiva e teste de germinação.

2. REVISÃO

2.1 A CULTURA DA SOJA

A principal finalidade da soja é o fornecimento de óleo e farelo, tendo em sua composição uma média de 37 a 42% de proteínas, e teor de óleo entre 37 a 42%. Dessa forma, sua utilidade é vasta, sendo usada a campo como adubo verde, forragem, feno e pastagem; ou na alimentação humana e animal, usando os grãos para a produção de farinha, farelo e óleo; e a torta utilizada na fabricação de rações, bem como na indústria de materiais adesivos, colas, tintas, plásticos, entre outros (SEDIYAMA, 2016).

Obtendo desta forma importância econômica mundial, com um aumento de produção de 1,5 milhões de tonelada em 1970 para 95,6 milhões de toneladas em 2015. Sendo responsável por promover a agricultura empresarial no Brasil, expandir a fronteira agrícola, desenvolver a indústria nacional de maquinário agrícola, profissionalizar e gerar incremento no comércio internacional, aprimorar o transporte e armazenamento, acelerar a urbanização, tecnificar outros cultivos, entre outras ações que a constitui como um marco no desenvolvimento agroindustrial do país (DALL'AGNOL, 2016).

No Brasil, atualmente a cultura é responsável por uma área plantada de 45,290 milhões de hectares, produção média de 155,269 milhões de toneladas, e produtividade estimada para o ano de 2024 de 3.431 kg/há (CONAB, 2024).

A produção mundial de soja em 2022, foi de 349,367 milhões de toneladas, onde o maior produtor do grão foi o Brasil, seguido por Estados Unidos da América (EUA), Argentina e Índia respectivamente (USDA, 2022).

Esta dissimetria que vem ocorrendo nos últimos anos na produção mundial de soja entre Brasil e EUA, se deve a impossibilidade dos americanos aumentarem sua área cultivada, pois o plantio da soja no país compete com a produção de milho, o qual

é o mantimento base na alimentação norte americana e também usado para a produção de etanol no país (GALE, VALDES, ASH, 2019). Já no Brasil, a expansão da soja é eminente, haja visto que as áreas degradadas da pecuária na região do cerrado tendem a migrar para a produção do grão, por apresentar viabilidade econômica e processo produtivo à baixo custo (COSTA, FRAGA 2021).

2.1.1 Crescimento e desenvolvimento da cultura

A soja, *Glycine max*, pertence à família Fabáceae, subfamília Faboidea. É considerada uma planta anual herbácea, com raiz pivotante; caule ereto e herbáceo; folhas compostas trifolioladas alternadas, do tipo ovais-lanceoladas; flor completa, contendo cálice e corola, bem como o androceu e gineceu, sendo considerada uma planta autógama; com fruto do tipo vagem de coloração amarela-bruna ou preta (SANTOS, 1995).

Após a semente entrar em contato com a umidade do solo, inicia-se o processo de germinação, fazendo-se necessário o entendimento dos estádios vegetativos subsequentes a este evento, tratado por Fehr e Caviness (1977) e Neumaier et al. (2000) para cultivares de hábito de crescimento determinado, como:

Ve: caracterizando a emergência, quando os cotilédones estão acima do solo;

Vc: estágio cotiledonar, quando os cotilédones não mais se tocarem;

V1: primeiro nó, quando as folhas unifolioladas estiverem completamente desenvolvidas. Neste estágio a planta já é capaz de gerar energia fotossintética, e realizar a absorção de água pelas raízes;

V2: segundo nó, folha trifoliolada completamente desenvolvida no nó acima. Aqui, as plantas infectadas pela bactéria do gênero *Bradyrhizobium* spp. iniciam a fixação biológica de nitrogênio, aumentando gradativamente nos demais estádios, até atingir o ápice em R5.

V3: terceiro nó, quando a segunda folha trifoliolada estiver completamente desenvolvida no terceiro nó. E assim por diante para V3, V4, etc. Entre um

estádio a outro decorrem de três a cinco dias.

Ainda segundo Fehr e Caviness (1977) e Neumaier et al. (2000), os estágios reprodutivos representam o florescimento e maturação da planta, sendo de R1 a R2 o florescimento, R3 e R4 o desenvolvimento da vagem, R5 e R6 do grão, R7 e R8 a maturação da planta:

R1: Uma flor aberta na haste principal;

R2: flor aberta em um dos últimos nós, com a folha desenvolvida (taxa de FBN aumenta e se mantém elevada até o pico em R5);

R3: vagem com 5 mm em um dos quatro últimos nós superiores (crítico ao estresse, podendo comprometer rendimento);

R4: vagem com 2 cm de comprimento (estádio crítico a estresse, podendo comprometer o rendimento);

R5: semente com 3 mm de comprimento (Intenso enchimento de grãos e partição de fotoassimilados, aqui se atinge a máxima fixação biológica de nutrientes (FBN) que é reduzida no final do estágio; estresses por seca nesta fase reduzem o rendimento, pois o solo precisa estar úmido para que ocorra a FBN e a absorção de nutrientes pelas raízes, a necessidade hídrica varia de 6 a 8 mm/dia.

R6: vagem com semente verde que preencha sua cavidade (planta consolida o crescimento em estatura, e tem o máximo peso de vagens, alto acúmulo de matéria seca e nutrientes, que será reduzido a partir dos próximos estádios);

R7: Uma vagem normal sobre a haste principal com coloração madura (maturação fisiológica, cessando o acúmulo de matéria seca, grãos com 60% de umidade, ponto crítico em caso de estresse por excesso de chuva ou pragas, podendo reduzir rendimento de grãos);

R8: 95% de vagens com coloração madura (necessidade de 5-10 dias com tempo seco após este estágio, para a soja possuir menos de 15% de umidade);

R9: maturação para colheita.

A soja é classificada como planta de dias curtos, sensível a mudanças de latitudes e data de semeadura, pois responde muito bem às variações de fotoperíodo (BONATO; VELLO, 1999). Se tratando de temperatura, a melhor faixa para a germinação, crescimento e desenvolvimento da cultura está entre 20° a 30°, onde a ideal é de 30°, sendo nulo seu crescimento em temperaturas menores que 10°, e acima de 40°, onde ocorrem distúrbios na floração e retenção das vagens (SEDIYAMA, 2009).

A disponibilidade hídrica também é um fator crucial nos estádios de desenvolvimento da cultura. Na fase que contempla a germinação e emergência, a soja precisa absorver 50% do seu peso em água, logo, a quantidade de água no solo não deve ultrapassar 85% do total máximo disponível, nem ser inferior a 50%. Com o passar dos estádios, a necessidade hídrica aumenta, chegando ao máximo na floração e enchimento de grãos, com necessidade de 7 a 8 mm/dia, e reduzindo após este período; sendo que no ciclo todo são necessários de 450 a 800 mm de água (SILVA et al. 2005).

Quanto ao manejo da cultura, um fator de destaque é a época de semeadura, por ser uma planta muito sensível a variações climáticas, logo deve-se atentar a cultivar empregada, bem como a região onde será cultivada. Em geral no Brasil, a maturação não é satisfatória quando a semeadura é realizada antes de primeiro de outubro e posteriores a vinte de dezembro (SEDIYAMA, 2005).

Respeitar a profundidade de semeadura, também é fundamental, porquanto auxilia na germinação homogênea e a emergência acelerada das plântulas. A profundidade varia de 3-5 cm, para solos argilosos preconiza-se semear a 3 cm de profundidade, enquanto que para solos arenosos, recomenda-se 5 cm (BAHRY; CHALLIOL; CARLESSO, 2017).

2.2 PATÓGENOS HABITANTES DE SOLO COM OCORRÊNCIA NA CULTURA DA SOJA

Dentre as doenças de solo na cultura da soja, podemos destacar para a região Sul do Brasil, as podridões radiculares, estando entre as principais, a podridão cinzenta, causada por *Macrophomina phaseolina*; podridão vermelha da raiz ou morte súbita por *Fusarium* spp. (REIS et al. 2014); podridão radicular causada por *Diaporthe longicolla* (GHISSI; REIS; DEUNER, 2014); e a podridão da haste e da vagem, ou mofo branco, onde estima-se que de toda a área cultivada do Brasil com soja, 23% tem se a presença de *Sclerotinia sclerotiorum*, o agente causal da doença (MEYER et al. 2016).

2.2.1 *Fusarium* spp.

Fusarium spp. (sin. *Fusarium brasiliense*, *F. tucumaniae*, *F. crassistipitatum*) é conhecido como causador da “podridão vermelha da raiz” ou “síndrome da morte súbita” (SMS) (SOARES et al., 2023), foi estudado taxonomicamente, patologicamente e filogeneticamente pelo DNA, fazendo com que os pesquisadores Aoki et al. (2005), indicassem quatro novas espécies associadas à SMS, sendo eles: *Fusarium brasiliense*, *Fusarium tucumaniae*, *Fusarium cuneirostrum*, e *Fusarium virguliforme*.

Em meio de cultura BDA, apresenta-se com micélio branco, e quando ocorre a formação dos macroconídios a cor muda para azul. Os macroconídeos medem de 3,8-5 µm x 34-66 µm (KIMATI et al. 2005). *Fusarium* spp. pode permanecer no solo ou em restos culturais por longos períodos devido a formação de estruturas de resistência, denominadas clamidósporos (ROY et al. 1997).

Os sintomas iniciais desta doença, são manchas avermelhadas abaixo do solo, na raiz, a mancha aumenta e cerca o sistema radicular adquirindo coloração vermelha-arroxeadas, seguida pela cor negra no tecido cortical. O lenho obtém cor castanho-clara acima do solo. Podendo formar um anel avermelhado, acompanhado por pulverulência

de cor bege, que são os conídios, isso geralmente ocorre em condições de alta umidade, acompanhado por folhas carijós (KIMATI et al. 1997).

Tais sintomas podem ser observados tanto em cultivares suscetíveis, quanto em cultivares resistentes à doença, isso devido ao patógeno infectar ambas as cultivares, porém em genótipos resistentes, a taxa de infecção e os sintomas são abrandados (NIJITI et al. 1997).

2.2.2 *Macrophomina phaseolina*

A *Macrophomina phaseolina*, ocasiona a doença denominada “podridão de carvão da raiz”, é comumente manifestada quando a cultura passa por déficit hídrico, tendo como seu sítio de ação as raízes. Quando o fungo coloniza o hospedeiro, o sistema radicular toma uma coloração acinzentada, e a epiderme se desprende facilmente, fazendo com que apareçam estruturas negras e pode-se perceber a presença de microescleródios. Na parte aérea, as folhas ficam murchas e secam, porém, permanecem aderidas. Podendo matar a planta na fase de enchimento de grãos (SEIXAS; MAZARO; REY, 2017).

Os prejuízos são acentuados em climas secos, em especial quando a lavoura possui “pé-de-grade” no solo, porque a planta desenvolve o sistema radicular mais raso, não resistindo veranicos (HENNING, 1997).

O fungo é considerado polífago, infectando mais de 500 espécies de plantas. Apresenta micélio unicelulado, com as extremidades multinucleadas. Em soja ocorre a formação de picnídios, os quais se caracterizam por serem negros e globosos com 100-250 µm de comprimento, estes sendo unicelulares e hialinos. Quando atinge o hospedeiro, produz microescleródios multicelulares, que em contato com o hospedeiro algumas células germinam infectando as raízes, como nem todas as células do microescleródio germinam, este pode germinar e infectar em diferentes períodos. Com o passar do tempo, o microescleródio no solo reduz sua vida útil, em condições de umidade, há baixa oxigenação e a sobrevivência é diminuída (KIMATI et al. 2005).

Macrophomina phaseolina se destaca pela grande variedade de enzimas hidrolíticas que degradam polissacarídeos e lignoceluloses da parede celular para penetrar no hospedeiro, como endoglucanases, exocellobiohidrolases e β -glicosidases para a hidrólise da celulose; e lacases, lignina peroxidases, galactose oxidases e cloroperoxidases, haloperoxidases e heme peroxidases para degradação de lignina (ISLAM et al. 2012). Além de possuir vários metabólitos fitotóxicos que auxiliam nos estágios iniciais da infecção (SALVATORE et al. 2020).

Quanto ao manejo da doença a campo, pode-se citar a combinação de: (i) promoção de resposta de defesa da planta com agentes de biocontrole, e eliciadores via resistência sistêmica induzida ou resistência sistêmica adquirida; (ii) resistência genética do hospedeiro via cruzamento ou modificação genética; (iii) redução da densidade de inóculo, através de práticas agrícolas, metabólitos vegetais que apresentem alelopatia, controle biológico, ferramentas genéticas e controle químico (MARQUEZ et al. 2021).

2.2.3 *Sclerotinia sclerotiorum*

Sclerotinia sclerotiorum, causadora do “mofo branco da soja”, é caracterizada por formar estruturas de resistência irregulares e rígidas de coloração escura, denominadas escleródios, os quais podem permanecer no solo com a ausência de hospedeiros por longos anos. Sob condições de alta umidade, e temperatura entre 10-21 °C, estas estruturas originam micélio ou apotécios. Os apotécios lançam sobre o hospedeiro os ascósporos num período de dois a dezessete dias, o que equivale a cerca de trinta milhões de ascósporos (SEIXAS; MAZARO; REY, 2017). Tais apotécios se caracterizam por serem pedicelados, e os ascósporos por serem hialinos, unicelulares, ovais e levemente alongados (GOULART, 2005).

Os sintomas iniciais da doença na cultura são manchas de anasarca, seguida por lesões castanho-claro, desenvolvendo sobre a planta micélio branco, seguido pela formação de escleródios localizados externamente ou internamente à vagem. A

doença pode ser disseminada via sementes (KIMATI et al. 2005). *Sclerotinia sclerotiorum* coloniza mais de 400 espécies de plantas, sendo a maioria dicotiledôneas, embora também tenha ocorrência em plantas monocotiledôneas de importância agrícola (BOLTON et al. 2005).

As fases de maior vulnerabilidade da planta, se dão do estágio de floração plena (R2) até iniciar a formação das vagens (R3/R4); as infecções começam geralmente a partir da inflorescência, e axilas de folhas e ramos laterais, podendo atingir qualquer órgão da planta (KIMATI et al. 1997).

O que atrai a maior atenção neste patossistema, são os escleródios, que são constituídos por agregados de hifas envoltos por uma “capsula” de células contendo melanina, a qual a protege em condições ambientais adversas e da degradação microbiana (HENSON et al. 1999). A ausência da biossíntese de melanina afeta o desenvolvimento do escleródio, e o crescimento vegetativo, porém não interfere na patogenicidade do fungo (LIANG et al. 2018).

A medula representa a porção interna do escleródio, e está introduzida em uma matriz fibrilar constituída por β -glucanos e proteínas (LE TOURNEAU, 1979).

Ao todo foram caracterizados três estágios de desenvolvimento dos escleródios, (i) a chamada iniciação, onde ocorre a agregação de hifas para formar a massa branca; (ii) o desenvolvimento, onde há o crescimento e agregação das hifas, para aumentar o tamanho, e (iii) a maturação, onde se tem a deposição de melanina nas células periféricas, e a constituição da matriz interna (TOWNSEND; WILLETTS, 1953).

2.2.4 *Diaporthe longicolla*

Diaporthe longicolla é o agente causal da podridão radicular ou também chamada de podridão radicular de geográfico, os sintomas iniciais são morte do lenho da raiz principal, tomando coloração branca, com o surgimento de linhas irregulares sem formato definido de cor preta, o que lembra a demarcação de um mapa, e por isso geográfico (GHISSI, REIS, DEUNER, 2014).

Além de podridão radicular, o complexo *Diaporthe/Phomopsis* se caracteriza por apresentar outras doenças, como a seca da haste e da vagem, podridão de sementes, e cancro da haste da soja (ZHANG, 1998).

A podridão de sementes ocasionada por *D. longicolla* e *D. sojae*, faz com que as sementes apresentem descoloração do tegumento, podendo ficar brancas, com enrugamento, alongadas ou apresentarem rachaduras. E tendem a não apresentar sintomas ou sinais no período da colheita (KULIK, 1999).

Na seca da haste e da vagem, há a formação de pontuações negras, chamadas de picnídios, que ocorrem sobre o pecíolo, haste e vagem, e tendem a aparecer no final do ciclo da cultura. Através de micélio dormente ou picnídios, o patógeno pode permanecer no solo ou nas sementes. A doença é favorecida sob condições chuvosas, e períodos de umidade e temperaturas altas (HENNING et al. 2009).

2.3 DIFICULDADES NO CONTROLE QUÍMICO DE DOENÇAS

Diferentes moléculas fungicidas estão disponíveis no mercado, sendo que em sua maioria há relatos de resistência. São exemplos, os genótipos variantes de *Oculimacula yallundae*, *Oculimacula acuformis*, *Septoria tritici*, *Fusarium* spp. e *Microdochium* spp. resistentes a fungicidas de sítio único, carbamatos de metil benzimidazol, inibidores de demetilação, inibidores externos de quinona, e inibidores de succinato desidrogenase (LUCAS, HAWKINS, FRAAIJE, 2014). Espécies de *Phytophthora* spp. e de *Pythium* spp resistentes ao metalaxil, fungicida do grupo dos triazóis (WANG et al. 2021, WANG et al. 2020, VAN JAARSVELD et al. 2002); e *Colletotrichum* spp. e *Penicillium* spp. relatados com resistência à azoxystrobin, do grupo das estrubirulinas (ZHANG et al. 2009, LUO, SCHOENEBERG, 2021).

Além da resistência às moléculas de fungicidas químicos, o uso de fungicidas traz preocupações ambientais, à saúde humana e animal. Ao atingir o solo por meio do tratamento de sementes, aplicação em sulco ou aérea, além de apresentarem ação direta sobre os patógenos de interesse, também atingem antagonistas e outros microrganismos benéficos, como mineralizadores da matéria orgânica do solo, solubilizadores de fosfato, e simbioses presentes da rizosfera (SILVA, MELO, 1997).

2.4 CONTROLE BIOLÓGICO

Segundo Morandi, Bettiol e Ghini (2005), controle biológico é o “controle de um microrganismo por meio de outro microrganismo”. Em muitas doenças ocasionadas por patógenos de solo, empregam-se diferentes agentes de biocontrole, ou antagonistas como são chamados, entre eles destacam-se as rizobactérias. Estas bactérias empregadas na inoculação de sementes ou pulverização/mistura em substratos, são capazes de controlar doenças por meio do antagonismo ou indução

de resistência. Muitas delas ficam próximas as raízes das plantas para se nutrirem dos exsudatos radiculares, garantindo sua proteção (ROMEIRO, 2007).

O solo tem sido visto como um reservatório de potenciais antagonistas para o controle biológico, nas últimas décadas as principais buscas foram identificar tais microrganismos, e os resultados mostram que a maioria dos agentes de controle biológico do mercado foram isolados do solo, mesmo para controle de doenças da parte aérea (ALABOUVETTE; STEINBERG, 2006). Isso se deve também, ao solo ser um sistema menos oscilante em níveis climáticos se comparado a parte aérea, sendo considerado um ambiente ideal para a utilização de microrganismos de caráter antagonista (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Agentes de controle biológico, como o *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp., apresentam destaque mundial, proporcionando uma larga escala de produtos comerciais, utilizados em diversas culturas para controle de podridões radiculares e murchas ocasionadas por múltiplos patógenos habitantes de solo, entre eles *Phomopsis sclerotioides*, *Phytophthora cryptogea*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, e *Fusarium* spp. (BETTIOL et al. 2012).

Os antagonistas utilizados no controle biológico de doenças, podem apresentar mecanismos de ação diretos ou indiretos. Os diretos distinguem por reduzirem a quantidade de inóculo na rizosfera, ou diminuem o potencial de infecção do patógeno, nele incluem: o (i) parasitismo, onde o antagonista parasita as hifas e estruturas de resistência do hospedeiro; a (ii) competição, onde ambos irão competir por nutrientes e por espaço; e (iii) antibiose, quando o antagonista produz um metabólito tóxico ao patógeno (DEKETELAERE et al. 2017).

Já os mecanismos de ação indiretos, incluem: a (i) resistência induzida, quando o antagonista induz uma resposta bioquímica da planta contrária ao patógeno; e a (ii) promoção de crescimento, onde o antagonista promove o crescimento da planta enquanto reduz os efeitos da doença (DEKETELAERE et al. 2017).

Tendo em vista tais mecanismos de ação dos agentes de biocontrole, há uma forte tendência do mercado mundial na redução do uso de fungicidas químicos, e no uso cada vez mais acentuado dos produtos biológicos à base destes agentes, isso se

deve também ao maior nível de segurança que apresentam a saúde humana e ambiental (MENZLER; HOKKANEN, 2006).

2.5 ASPECTOS GERAIS DE *Trichoderma* spp.

Dentre os fungos antagonistas, o mais completo em modos e ação e estudado em todo o mundo, é o gênero *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. virens*, *T. viride*), fungo habitante de solo que se destaca no controle de patógenos radiculares como *Macrophomina* spp., *Fusarium* spp., *Diaporthe* spp., e em especial no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, o qual coloniza e parasita seus escleródios (MEDEIROS, BAVIA, SEIXAS, 2022).

É um fungo filamentoso, pertencente à divisão Ascomycota, subdivisão Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales e família Hypocreaceae (WAGHUNDE, SHELAK, SABALPARA, 2016). É um fungo saprofítico, encontrado na superfície do solo e serapilheira. Apresenta rápido crescimento em meio de cultura, inicialmente com hifas de coloração branca, evoluindo para verde. Possui hifas hialinas e conídios unicelulares de cor verde ou também hialinos (Figura 01) (SAMUELS, 2006).

Figura 01 - a) Aspecto de *Trichoderma* spp. em cultivo *in vitro*; b) Colonização de escleródios de *S. sclerotiorum*; c) Estruturas de hifas e conídios vista em microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 500 vezes.



Fonte: Arquivo pessoal (2022)

Possui reprodução assexuada, apresentando em solos temperados cerca de 101 a 103 gramas de propágulos, os quais podem ser cultivados facilmente em condições laboratoriais. Sua fase sexuada está ligada ao gênero *Hypocrea*, porém a maioria das estirpes utilizadas no controle biológico não apresentam este estágio (WAGHUNDE; SHELAK; SABALPARA, 2016).

A maioria das estirpes deste agente vive em solos ácidos e em climas temperados. Podendo produzir estruturas de resistência, como clamidósporos ou microescleródios, as quais lhe possibilita sobreviver no ambiente mesmo em condições adversas (MONTE; BETTIOL; HERMOSA, 2019).

É considerado um fungo cosmopolita extremamente versátil, com alto aproveitamento do substrato disponível, capaz de colonizar tanto ambientes nutricionalmente ricos, como uma floresta tropical, quanto solos pobres. Conseguem regular seu crescimento, formação de conídios e produção de enzimas de acordo com o ambiente em que se encontram (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010). Dessa forma, a razão mais comum para a morte de patógenos próximos ao *Trichoderma* spp. é a escassez nutricional, pois apresenta grande habilidade em adquirir ATP de açúcares como celulose, glucana e quitina, largamente disponível em ambientes fúngicos (CHET, 1997).

2.5.2 Mecanismos de ação do gênero *Trichoderma*

2.5.1.1 Competição

A competição é definida, pelo comportamento desigual de dois ou mais organismos por um recurso energético, onde a utilização desse recurso por um organismo implica na redução para o outro (MONTE; BETTIOL; HERMOSA, 2019).

Trichoderma spp. apresenta crescimento rápido, colonizando facilmente o substrato onde se encontra, dificultando o crescimento de fitopatógenos próximos ao local (SRIVASTAVA et al. 2015).

O antagonista também compete por ferro e carbono, elementos essenciais para a sobrevivência de microrganismos fúngicos filamentosos. Ao competir por estes nutrientes, controla o crescimento de outros fungos menos eficientes na absorção (WAGHUNDE; SHELAKE; SABALPARA, 2016). Portanto, em baixas concentrações de ferro no solo, *Trichoderma* spp. produz sideróforos, que são quelantes de ferro, suprimindo suas demandas, e em contraponto, os subprodutos da hidrólise destes sideróforos, aumentam a disponibilidade de ferro para plantas em solos com escassez do nutriente (LEHNER et al. 2013). Segarra et al. (2010) evidencia a habilidade da competição de *T. asperellum* sobre *F. oxysporum* pv. *lycopersisi*, na produção de sideróforos por *Trichoderma* spp. em condições de baixas doses de ferro, onde o agente reduziu significativamente as populações de *F. oxysporum* em todas as doses testadas, porém as maiores proporções de sideróforos se deram nas menores doses de ferro.

Outra questão é a habilidade de *Trichoderma* spp. solubilizar o fósforo retido nos óxidos de ferro e alumínio do solo, o que aumenta o suprimento nutricional de fosfato pelas plantas, auxiliando na promoção de crescimento das mesmas (BORGES-CHAGAS et al. 2015).

2.5.1.2 Antibiose

A antibiose ocorre quando um organismo libera compostos difusíveis de baixo peso molecular ou antibióticos capazes de inibir o crescimento de outro organismo (BENITEZ, 2004).

Algumas espécies de *Trichoderma* spp. produzem quitinase e β 1,3 glucanase, enzimas responsáveis pela degradação/lise da parede celular no momento do micoparasitismo de fungos fitopatogênicos. Muitas estirpes apresentam mais de 100 diferentes tipos de metabólitos secundários que desempenham antibiose contra fitopatógenos, entre eles, tem-se o etileno, cianeto de hidrogênio, aldeídos e cetonas (SRIVASTAVA et al. 2015).

O gênero *Trichoderma*, também produz metabólitos da classe dos policetídeos, os quais apresentam ação antibacteriana, antiparasitárias, e são descritos como tóxicos para *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium middletonii*, *Fusarium oxysporum*, *Bipolaris sorokiniana*, entre outros (RAMANDA; LOPES; ULHOA, 2019).

2.5.1.3 Micoparasitismo

O micoparasitismo é o ataque direto de um microrganismo a outro, que envolve reconhecimento, ataque, penetração e morte do hospedeiro (BENITEZ, 2004). *Trichoderma* spp. libera enzimas digestivas com atividade quitinolítica que degradam a parede celular dos fungos parasitados, podendo dessa forma, extrair os nutrientes necessários (SRIVASTAVA et al. 2015). Há relatos de que *Trichoderma* spp. ao interceptar sinais vindo de fitopatógenos próximos da rizosfera, consegue expandir-se em direção às hifas do patógeno e as colonizar (ZEILINGER et al. 1999).

Em trabalho realizado por Qualhato et al. (2013), ao estudarem a antibiose de *T. asperellum* e *T. harzianum* sobre *S. sclerotiorum*, *F. solani* e *R. solani*, observaram

a produção de enzimas voláteis como β 1,3-glucanase, quitinase, fosfatase ácida, proteases ácidas e alginato liase, que auxiliaram na lise da parede celular, facilitando o micoparasitismo sobre as hifas de fitopatógenos.

2.5.1.4 Indução de resistência vegetal

A indução de resistência ocorre quando há o aumento de metabólitos de defesa na planta, tais como as enzimas quitinase, glucanase, fenilalanina amonialiase e chalcona sintase (SOOD et al. 2020).

O eliciador mais conhecido e característico do gênero *Trichoderma* é a proteína EPL1 ou Sm1, a qual age na expressão de genes empregados no micoparasitismo, reconhecimento e autoproteção da própria parede celular e enrolamento de hifas em torno do hospedeiro. Sua ausência afeta a expressão de genes de micoparasitismo, além do processo de enrolamento micoparasitário do hospedeiro, e a expressão de genes de defesa da planta. Acredita-se que EPL1 atua como uma molécula de identificação para as próprias hifas e as hifas do hospedeiro, não se autodegradando; além de preservar contra a degradação enzimática da parede celular quando em confronto, tendo ação na proteção do hospedeiro e de suas enzimas (GOMES et al. 2015)

Em estudo proposto por Guzmán-Valle et al. (2013), com variedades de cebola inoculadas com *Sclerotium rolfsii*, apresentaram o mecanismo de indução de resistência por *Trichoderma asperellum* através do aumento da atividade das enzimas glucanase, quitinase e peroxidase nas raízes, bulbos e folhas. Muthukumar e Venkatesh (2014) também avaliaram o aumento das enzimas de defesa da planta pela inoculação de *Trichoderma harzianum* separado e em conjunto com *Pseudomonas fluorescens* contra *S. rolfsii*. Singh et al. (2014) constataram um aumento da fenilalanina amônia liase, polifenol oxidase, peroxidase e cinamil álcool desidrogenase quando aplicado *T. harzianum* via tratamento de sementes de girassol. Ácidos ferúlico, p-cumárico, ácido gálico também tiveram seus níveis aumentados aos quatorze dias.

A deposição de lignina e acúmulo de proteínas PR se elevaram pela aplicação combinada no tratamento de sementes e no tratamento de solo.

Trichoderma spp. ainda contribui significativamente no controle de nematoides via indução de resistência. Em experimento realizado por Martínez-Medina et al. (2017), observaram que o agente estimula as respostas dependentes de ácido jasmônico e ácido salicílico em tomateiro. Ao estimular a defesa dependente de ácido salicílico, fez com que houvessem limitações quanto à penetração da raiz por *Meloidogyne incognita*, sequencialmente ao aumentar a defesa dependente de ácido jasmônico, comprometeu a fecundidade do nematoide, controlando desta forma, o parasitismo por indução de resistência na planta.

REFERÊNCIAS

- ALABOUVETTE, C., STEINBERG C. THE SOIL AS A RESERVOIR FOR ANTAGONISTS TO PLANT DISEASES. In An Ecological and Societal Approach to Biological Control, J. Eilenberg and H.M.T. Hokkanen (eds) 2006.
- AMORIM, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A. Manual de fitopatologia. 4ed. Piracicaba, Agronomia ceres, 2011.
- AOKI, T., O'DONNELL, K., SCANDIANI, M.M. Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of Fusarium: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. **Mycoscience**. The Mycological Society of Japan and Springer-Verlag Tokyo 2005. DOI 10.1007/s10267-005-0235-y.
- BAHRY, C. A., CHALLIOL, CARLESSO. **Sistemas de produção de soja orgânica**. In Mazaro, S. M. Porto Alegre RS, Editora cinco continentes, 2017.
- BENÍTEZ T, RINCÓN AM, LIMÓN MC, CODÓN AC. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol*. 2004 Dec;7(4):249-60.
- BETTIOL, W. **Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agosto, 2012. ISSN 1516-4691.
- BETTIOL, W., MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças em plantas: usos e perspectivas**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Meio Ambiente, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Jaguariuna, SP, 2009.
- BLASZCZYK L., SIWULSKI M., SOBIERALSKI K., LISIECKA J., JĘDRYCZKA M. *Trichoderma* spp.—Application and prospects for use in organic farming and industry. *J. Plant Prot. Res*. 2014;54:309–317. doi: 10.2478/jppr-2014-0047
- BOLTON, M.D., BART, P. H. J. THOMMA, A.N.D., BERLIN D. N. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. MOLECULAR PLANT PATHOLOGY (2006) BLACKWELL PUBLISHING LTD. DOI: 10.1111/J.1364-3703.2005.00316.X.
- BONATO, E. R.; VELLO, N. A. Aspectos genéticos do tempo para o florescimento em variantes naturais de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, v. 34, 1999.
- BORGES CHAGAS, L.F., CHAGAS JUNIOR, A.F., RODRIGUES DE CARVALHO, M,

DE OLIVEIRA MILLER, L., OROZCO COLONIA, B.S. Evaluation of the phosphate solubilization potential of *Trichoderma* strains (*Trichoplus* JCO) and effects on rice biomass. *Journal of soil science and plant nutrition*, 15(3), 794-804. Epub 00 de septiembre de 2015. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162015005000054>

CHET, I. *Trichoderma*-Application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soil-born pathogenetic fungi. In: Innovative approaches to plant disease control. Chet I (Ed.). John Wiley and Sons. 1987, pp.137-160.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira**. Boletim maio de 2022, Vol 9, n.08.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, safra 2023/2024.

CORREIA, K. C.; MICHEREFF, S. J. Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos. 1. ed. - Recife: EDUFRPE, 2018.208 p.

COSTA NETO, P. R., ROSSI, L. F. S. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em fritura. *Química Nova*, v.23, p. 4, 2000.

DALL'AGNOL, A. A Embrapa Soja no contexto do desenvolvimento da soja no Brasil: histórico e contribuições. Brasília, DF: Embrapa, 2016.

DEKETELAERE, S., TYVAERT, L., FRANÇA, S.C., HÖFTE, M. Desirable Traits of a Good Biocontrol Agent against *Verticillium* Wilt. **Front Microbiol.** 2017;8:1186. Published 2017 Jul 6. doi:10.3389/fmicb.2017.01186

FEHR, W.R., CAVINESS, C.E. Stages of soybean development. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1977. 11p.

GAJERA, H., DOMADIYA, R., PATEL, S., KAPOPARA, M., GOLAKIYA, B. Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system—A review. **Curr. Res. Microbiol. Biotechnol.** 2013.

GALE, F., VALDES C., ASH, M. Interdependence of China, United States, and Brazil in Soybean Trade. USDA Economic Research Service, 2019.

GHISSI, V.C., REIS, E.M., DEUNER, C.C. Etiology of phomopsis root rot in soybean. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 40, n. 3, p. 270-272, 2014.

GOMES, Eriston Vieira et al. The Cerato-Platanin protein Epl-1 from *Trichoderma harzianum* is involved in mycoparasitism, plant resistance induction and self cell wall protection. *Scientific Reports*, 2015 | 5:17998 | DOI: 10.1038/srep17998.

GOULART, A.C.O. Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle. dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2005.

GUZMÁN-VALLE, P. Induction of resistance to *Sclerotium rolfsii* in different varieties of onion by inoculation with *Trichoderma asperellum*. **Eur J Plant.** 2013.

HENNING, A. A. Patologia de sementes. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1997. 43p.

HENNING A.A., ALMEIDA, M.R.A., GODOY, C.V., SEIXAS, C.D.S., YORINORI, J.T., COSTAMILAN, L.M., FERREIRA, L.P., MEYER, M.C., SOARES, R.M., DIAS, W.P. Manual de identificação de doenças da soja, Embrapa Soja, Londrina, PR, 2005. ISSN 1516-781X.

HENSON, J.M., BUTLER, M.J., DAY, A.W. The dark side of mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37, 1999.

IPEA, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Agronegócio brasileiro começa 2022 com superávit de US\$ 7,7 bilhões. Disponível em: <https://www.ipea.gov.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=38952>. Acesso em: 09 jun 2022.

ISLAM, M.S., HAQUE, M.S., ISLAM, M.M., EMDAD, E.M., HALIM, A., HOSSEN, Q.M., HOSSAIN, M.Z., AHMED, B., RAHIM, S., RAHMAN, M.S., ALAM, M.M., HOU, S., WAN, X., SAITO, J.A., ALAM, M. Tools to kill: genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. **BMC Genomics.** 2012 Sep 19;13:493. doi: 10.1186/1471-2164-13-493. PMID: 22992219; PMCID: PMC3477038.

KIMATI, H., AMORIN, A., BERGAMIN FILHO, L.E.A., CAMARGO, J.A.M., REZENDE. Doenças da soja *in* Manual de fitopatologia, São Paulo, Agronômica Seres, 3 ed. 1997.

KULIK M, SINCLAIR J. Phomopsis seed decay. *Compêndio de doenças da soja.* 1999.

LEHNER, S.M., ATANASOVA, L., NEUMANN, N.K., KRSKA, R., LEMMENS, M., DRUZHININA, I.S., SCHUHMACHER, R. Isotope-assisted screening for iron-containing metabolites reveals a high degree of diversity among known and unknown siderophores produced by *Trichoderma* spp. **Appl Environ Microbiol.** 2013 Jan;79(1):18-31. doi: 10.1128/AEM.02339-12. Epub 2012 Oct 12. PMID: 23064341; PMCID: PMC3536107.

LE TOURNEAU, D. Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. **Phytopathology**, 1979, 69, 887–890.

- LIANG, Y., XIONG, W., STEINKELLNER, S., FENG, J. Deficiency of the melanin biosynthesis genes SCD1 and THR1 affects sclerotial development and vegetative growth, but not pathogenicity, in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Mol Plant Pathol.** 2018 Jun;19(6):1444-1453. doi: 10.1111/mpp.12627. Epub 2018 Jan 30.
- LUCAS, J.A., HAWKINS, N.J., FRAAIJE, B.A. The evolution of fungicide resistance. **Adv Appl Microbiol.** 2015;90:29-92. doi: 10.1016/bs.aambs.2014.09.001
- LUO, O., SCHOENEBERG, A., HU, M. Resistance to Azoxystrobin and Thiophanate-Methyl Is Widespread in *Colletotrichum* spp. Isolates From the Mid-Atlantic Strawberry Fields. **Plant disease.** 15 Sep 2021 <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-20-2048-RE>
- MARTÍNEZ-MEDINA, A., APPELS, F.V.W., VAN WEES, S.C.M. Impact of salicylic acid- and jasmonic acid-regulated defences on root colonization by *Trichoderma harzianum* T-78. **Plant Signal Behav.** 2017. Doi:10.1080/15592324.2017.1345404.
- MARQUEZ, N., GIACHERO, M.L., DECLERCK, S., DUCASSE, D.A. *Macrophomina phaseolina*: Características gerais de patogenicidade e métodos de controle. **Frontiers in plant science**, 2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634397>
- MEDEIROS, F.H.V., BAVIA, G.P., SEIXAS, C.D.S. Manejo de doenças fúngicas radiculares da soja. In Meyer, M.C., BUENO, A.F., MAZARO, S.M., SILVA, J.C. Bioinsumos na cultura da soja. Brasília, DF: Embrapa, 2022.
- MEYER, M.C.; CAMPOS, H.D.; GODOY, C.V.; UTIAMADA, C.M. (Ed.). Ensaio cooperativos de controle biológico de mofo branco na cultura da soja - safras 2012 a 2015. Londrina: Embrapa Soja, 2016.
- MONTE, E., BETTIOL, W., HERMOSA, R. *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças em plantas. In MEYER, M.C., MAZARO, S.M., SILVA, J.C. *Trichoderma* uso da agricultura. Brasília, DF: Embrapa, 2019.
- MORANDI, M.A.B., BETTIOL, W., GHINI, R. Situação do controle biológico de doenças de plantas no Brasil. Embrapa, Jaguariuna, 2005.
- MUTHUKUMAR, A., VENKATESH, A. Biological inductions of systemic resistance to collar rot of peppermint caused by *Sclerotium rolfsii*. **Acta Physiologiae Plantarum.** 2014. 36. 1421-1431. 10.1007/s11738-014-1520-1.
- NEUMAIER, N. NEPONUCENO, A.L., FARIAS, J.R.B., OYA, T. Estádios de desenvolvimento da cultura da soja. In: BONATO, E. Estresses em soja. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000.
- NIJITI, V.N, SUTTNER, J.R; GRAY, L.E; GIBSON, P.T; LIGHTFOOT, D.A. Rate-

reducing resistance to *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* underlies field resistance to soybean sudden death syndrome. **Crop Science**, v.37, 1997.

QUALHATO, T.F., LOPES, F.A., STEINDORFF, A.S., BRANDÃO, R.S., JESUINO, R.S., ULHOA, C.J. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. **Biotechnol Lett.** 2013 Sep;35(9):1461-8. doi: 10.1007/s10529-013-1225-3.

RAMANDA, M.H.S., LOPES, F.A.C., ULHOA, C.J. *Trichoderma*: metabólitos secundários. In MEYER, M.C., MAZARO, S.M., SILVA, J.C. *Trichoderma* uso da agricultura. Brasília, DF: Embrapa, 2019.

RAJANI, P., RAJASEKARAN, C., VASANTHAKUMARI, M.M., OLSSON, S.B., RAVIKANTH, G., UMA SHAANKER, R. Inhibition of plant pathogenic fungi by endophytic *Trichoderma* spp. through mycoparasitism and volatile organic compounds. **Microbiol Res.** 2021 Jan;242:126595. doi: 10.1016/j.micres.2020.126595. Epub 2020 Sep 17. PMID: 33017769
RAJESH, R., WAGHUNDE, RAHUL, M. SHELAK AND AMBALAL N. SABALPARA. "Trichoderma: A significant fungus for agriculture and environment." **African Journal of Agricultural Research** 11, no. 22 (2016): 1952-1965.

REIS, E.M. Efeitos da rotação de culturas na incidência de podridões radicais e na produtividade da soja. **Summa Phytopathologica** [online]. 2014, v. 40, n. 1. Epub 09 Maio 2014. ISSN 1980-5454. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052014000100001>.

ROMEIRO, R.S, Controle biológico de doenças em plantas. Editora UFV – Universidade Federal de Viçosa, 2007.

ROY, K.W. *Fusarium solani* on soybean roots: nomenclature of the causal agent of sudden death syndrome and identity and relevance of *F. solani* form B. **Plant Disease**, V.81, 1997.

SALVATORE, M.M., FÉLIX, C., LIMA, F., FERREIRA, V., NAVIGLIO, D., SALVATORE, F. Metabólitos secundários produzidos por *Macrophomina phaseolina* isolados de eucalipto *globulus*. Agricultura, 2020. 10 : 72 . 10.3390/agriculture10030072

SAMUELS, G.J. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, 96 (2006), pp. 195-206, 2006.

SANTOS, O.S. A cultura da soja 1 – Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. 2 ed. São Paulo: Globo, 1995. ISBN 85-250-0593-3.

SCHUSTER, A., SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Appl Microbiol Biotechnol.** 2010;87(3):787-799. doi:10.1007/s00253-010-2632-1.

SEDIYAMA, T. Tecnologias de produção e usos da soja. Londrina, PR: Mecenass, 2009. 314 p. ISBN 9788589687089.

SEDIYAMA, T. Produtividade da soja. Londrina: Ed. Mecenass, 2016.

SEGARRA, G., CASANOVA, E., AVILÉS, M., TRILLAS, I. *Trichoderma asperellum* strain T34 controls *Fusarium* wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron. **Microb Ecol.** 2010 Jan;59(1):141-9. doi: 10.1007/s00248-009-9545-5.

SEIXAS, C. D. S., MAZARO, S. M., REY, M. S. Sistemas de produção de soja orgânica. In Mazaro, S. M. Porto Alegre RS, Editora cinco continentes, 2017.

SILVA, C.M.M.S., MELO, I. S. Biodegradação de fungicidas benzimidazóis in MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. de. Microbiologia ambiental. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPMA, 1997. 438 p.

SILVA, R.N., MONTEIRO, V.N., STEINDORFF, A.S., GOMES, E.V., NORONHA, E.F., ULHOA, C.J. *Trichoderma*/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security. *Fungal Biol.* 2019 Aug;123(8):565-583. doi: 10.1016/j.funbio.2019.06.010

SILVA, F. V. S., LEITE, R.M.V.B.C., HOFFMAN-CAMPO, C. B. GAZZONI, D.L., BROWN, G.G, CARNEIRO, G.E.S., CORSO, I.C., FERREIRA, L.P., BASSOI, M.C., DIAS, W.P. Tecnologias de produção de soja – Paraná 2005. Londrinha: Embrapa soja, 2005.

SINGH, B.N., SINGH, A., SINGH, B.R., SINGH, HARIKESH. *Trichoderma harzianum* elicits induced resistance in sunflower challenged by *Rhizoctonia solani*. **Journal of applied microbiology.** 116. 2014. 10.1111/jam.12387.

SOARES, R. M.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; COSTAMILAN, L. M.; MEYER, M. C.; HENNING, A. A.; ALMEIDA, A. M. R.; YORINORI, J. T.; FERREIRA, L. P.; DIAS, W. P. Manual de identificação de doenças de soja. Londrina: Embrapa Soja, 2023. 79 p. (Embrapa Soja. Documentos, 256).

SOOD, M., KAPOOR, D., KUMAR, V., SHETIWIY, M. S., RAMAKRISHNAN, M., LANDI, M., ARANITI, F., & SHARMA, A. *Trichoderma*: The "Secrets" of a Multitalented Biocontrol Agent. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(6), 762. 2020. <https://doi.org/10.3390/plants9060762>

SRIVASTAVA, M., KUMAR, V., SHAHID, M., PANDEY, S., & SINGH, A. *Trichoderma*-a potential and effective bio fungicide and alternative source against notable phytopathogens: **A review. African Journal of Agricultural Research**, 2016, 11(5), 310-316.

TOWNSEND, B. B. WILLETTS, H.J. The development of sclerotia of certain fungi. **Trans. Br. Mycol. Soc.** 1953, pp. 213-221, 10.1016/S0007-1536(54)80003-9

TYŚKIEWICZ R, NOWAK A, OZIMEK E, JAROSZUK-ŚCISEŁ J. *Trichoderma*: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. **Int J Mol Sci.** 2022;23(4):2329. Published 2022 Feb 19. doi:10.3390/ijms23042329

USDA, United States Department of Agriculture. Disponível em: <
<https://usdabrazil.org.br/dados-e-analises/>> Acesso em: 06 jun. 2022.

VAN JAARSVELD, E., WINGFIELD, M.J., DRENT, A. Effect of Metalaxyl Resistance and Cultivar Resistance on Control of *Phytophthora nicotianae* in Tobacco. **Plant Dis.** 2002 Apr;86(4):362-366. doi: 10.1094/PDIS.2002.86.4.362.

WANG, M., VAN VLEET, S., MCGEE, R., PAULITZ, T., PORTER, L., SCHROEDER, K., VANDEMARK, G., CHEN, W. Chickpea Seed Rot and Damping-Off Caused by Metalaxyl-Resistant *Pythium ultimum* and Its Management with Ethaboxam. **Plant Dis.** 2021 Jun;105(6):1728-1737. doi: 10.1094/PDIS-08-20-1659-RE

WANG, W., LIU, X., HAN, T., LI, K., QU, Y., GAO, Z. Differential Potential of *Phytophthora capsici* Resistance Mechanisms to the Fungicide Metalaxyl in Peppers. **Microorganisms.** 2020 Feb 18;8(2):278. doi: 10.3390/microorganisms8020278.

ZHANG Z, ZHU Z, MA Z, LI H. A molecular mechanism of azoxystrobin resistance in *Penicillium digitatum* UV mutants and a PCR-based assay for detection of azoxystrobin-resistant strains in packing- or store-house isolates. **Int J Food Microbiol.** 2009 May 31;131(2-3):157-61. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.015

ZHAO, X., ZHANG, Z., ZHENG, S., YE, W., ZHENG, X., WANG, Y. Genome Sequence Resource of *Diaporthe longicolla* YC2-1, a Fungal Pathogen Causing Phomopsis Stem Blight in Soybean. **Mol Plant Microbe Interact.** 2021 Jul;34(7):842-844. doi: 10.1094/MPMI-12-20-0340-A. Epub 2021 Aug 15. PMID: 33630650.

ZEILINGER, S., GALHAUP, C., PAYER, K., WOO, S.L., MACH, R.L., FEKETE, C., LORITO, M., KUBICEK, C.P. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. **Fungal Genet Biol.** 1999 Mar;26(2):131-40. doi: 10.1006/fgbi.1998.1111.

3. ESTUDO 01: BIOPROSPECÇÃO DE ISOLADOS E ESTUDO *IN VITRO*

3.1 INTRODUÇÃO

Os fungos do gênero *Trichoderma* pertencem ao filo Ascomycota, subdivisão Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales e família Hypocreaceae (DRUZHININA, 2012).

Dentre suas principais características, destacam-se seu rápido crescimento, presença de micélio inicialmente branco, de aspecto cotonoso, passando para verde com o início da esporulação (DOMSCH et al. 1980).

Trichoderma spp. são capazes de metabolizar diferentes fontes de carbono, nitrogênio, ferro e oxigênio disponíveis, o que lhes permite se multiplicarem rapidamente na rizosfera. É um fungo saprofítico, encontrado na superfície do solo, serrapilheira e madeira em decomposição. Pode ser observado em variados tipos de solos, mas a maioria dos isolados são encontrados em solos ácidos e em clima temperado, geralmente associado a raízes e a matéria orgânica morta (MACHADO et al., 2012; MONTE et al., 2019; SAMUELS, 2006).

O antagonista é um potencial agente no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*, sendo capaz de colonizar e inviabilizar seus escleródios. O uso combinado de *Trichoderma* spp. associado aos demais manejos na cultura da soja, vem sendo empregado, por apresentarem completo modo de ação (competição, antibiose, micoparasitismo e indução de resistência) sobre *S. sclerotiorum*, conseguindo parasitar micélio, escleródio e apotécio do fitopatógeno, além de secretar enzimas hidrolíticas como endoquitinases que rompem a célula do hospedeiro e favorecem o ataque (TROIAN, 2014).

Tendo em vista que a infecção da soja por *S. sclerotiorum* ocorre especialmente através da germinação carpogênica, por meio dos ascósporos, o uso de *Trichoderma* spp. deve ser empregado preventivamente, com vistas a inibir a germinação dos escleródios e reduzir a densidade de inóculo inicial ao longo do tempo, ou seja, deve ser empregado na fase de dormência do fitopatógeno, impedindo o prolongamento do

ciclo, evitando a germinação e instalação da doença a campo. Portanto, recomenda-se que o biocontrole seja aplicado logo após a colheita, na entressafra, até o período vegetativo da soja na safra posterior, fazendo com que o *Trichoderma* spp. se estabeleçam no solo e desempenhem o biocontrole durante todo o ciclo da cultura (MEYER et al. 2019; MEYER, CAMPOS, LOBO-JUNIOR, 2019; MEYER, MAZARO, GODOY, 2022).

Além da aplicação na entressafra, e nos estádios vegetativos da cultura, o uso de *Trichoderma* spp. no tratamento de sementes é eficiente no controle do mofo branco, além de permanecerem associados a rizosfera e acompanharem o desenvolvimento radicular da planta em todo o ciclo da cultura (SILVA et al. 2017; LOUZADA et al. 2009).

O maior número de bioprodutos registrados à base de *Trichoderma* spp., são para aplicação no solo, o que favorece a aplicabilidade, pois é o habitat natural do antagonista, e as condições de umidade e temperatura são mais estáveis em comparação à parte aérea. A aplicação de *Trichoderma* spp. para controle de doenças foliares é limitada, pois requer adjuvantes que protejam contra a radiação UV, ainda que algumas espécies, como *T. harzianum* e *T. stromaticum* sejam mais resistentes as variações ambientais, a maioria das espécies são muito sensíveis a radiação, e um produto confiável deve resistir as condições adversas. Além do uso de adjuvantes, a aplicação em horários mais frescos, a compatibilidade de misturas, e a agitação constante da calda no momento da aplicação são fundamentais (MEDEIROS, et al. 2019; FERNANDES et al. 2015).

Quanto as formulações, *Trichoderma* spp. podem produzir estruturas de resistência como clamidósporos e microescleródios, podendo desta forma sobreviver em condições adversas, porém esta produção é muito baixa e pouco explorada no Brasil. Normalmente são utilizadas unidades como: conídios por g, conídios por mL, conídios viáveis por g ou por mL, unidades formadoras de colônias por g ou unidades formadoras de colônias por mL. Sendo utilizadas formulações como WP: pó-molhável, WG: grânulos dispersíveis, SC: suspensão concentrada se EC: concentrado emulsionável. A maioria destes produtos tem recomendação para aplicação terrestre

para controle de fitopatógenos de solo ou estruturas de resistência, porém existem alguns que são aplicados no tratamento de sementes ou parte aérea (MONTE et al., 2019; PINTO et al., 2016; MEDEIROS et al., 2019; MASCARIN et al., 2019).

3.2 PROCEDIMENTO METODOLÓGICO

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de bioquímica, na casa de vegetação e fazenda experimental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus Dois Vizinhos.

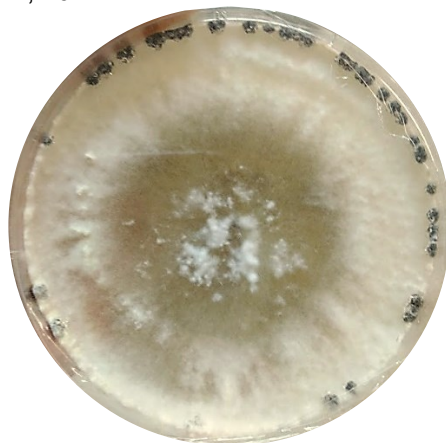
3.2.1 PROSPECÇÃO DE *Trichoderma* spp.

3.2.1.1 Produção de escleródios *in vitro*

Para a produção dos escleródios de *S. sclerotiorum*, foi utilizada a estirpe CMES 2131 oriunda da Embrapa Soja. Utilizou-se placas de Petri® descartáveis de 8,3 cm de diâmetro, contendo meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar) comercial, no total foram utilizadas 200 placas.

Este procedimento ocorreu em câmara de fluxo laminar, onde realizou-se o repique do patógeno com placas matrizes com cerca de dez dias de crescimento. Com auxílio de uma alça de platina estéril, foram retirados discos de micélio da placa matriz, de 7 mm de diâmetro, e transferidos para placas de Petri® assépticas contendo meio BDA. As placas foram fechadas e seladas com plástico filme de PVC, e em seguida incubadas em BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas por um período de 15 dias, até formação de escleródios no entorno da placa (Figura 02).

Figura 02 - Placas de Petri® contendo escleródios de *S. sclerotiorum*, com 15 dias de crescimento. Campus Pato Branco, 2024.

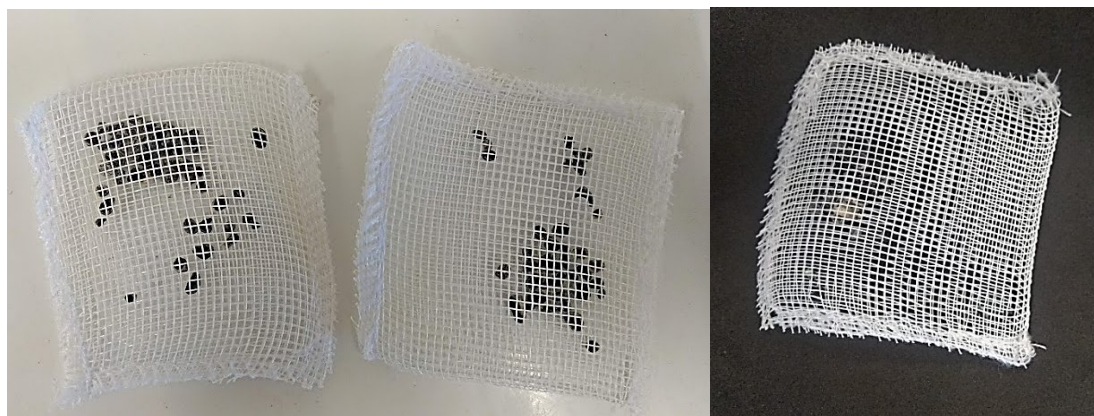


Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Após este período, as placas foram levadas à câmara de fluxo laminar para a retirada dos escleródios formados.

Para a produção das iscas, foram confeccionados saquinhos de tela de nylon, de 5x5 cm, onde cerca de 20 escleródios foram alocados para cada saquinho (Figura 03).

Figura 03 - Saquinhos de nylon contendo escleródios de *S. sclerotiorum*. Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

3.2.1.2 Implantação dos saquinhos de nylon contendo escleródios (iscas) à campo

Cada saquinho de escleródios citado no item 3.1 foi colocado em um local distinto da fazenda da UTFPR Campus Dois Vizinhos, totalizando 28 saquinhos em 28 locais como mostrado na tabela 01.

Tabela 01 - Locais de implantação das iscas, número da amostra, UNEP (Unidade de estudo e pesquisa) do Campus e respectivas coordenadas. Campus Pato Branco, 2024.

Nº AMOSTRA	VEGETAÇÃO	UNEP/ÁREA	COORDENADAS	
			Latitude	Longitude
1	Eucalipto	Área florestal	S-25°-42'0-7"	W-53°0-5'-42"
2	Pinus	Área florestal	S-25°-42'0-6"	W-53°0-5'-44"
3	Bananal	Fruticultura	S-25°-41'-46"	W-53°0-5'-40"
4	Abacateiro	Fruticultura	S-25°-41'-52"	W-53°0-5'-40"
5	Caquizeiro	Fruticultura	S-25°-43'0-4"	W-53°0-4'-47"
6	Citros	Fruticultura	S-25°-41'-52"	W-53°0-4'0-7"
7	Videira	Fruticultura	S-25°-41'-48"	W-53°0-5'-38"
8	Romã	Fruticultura	S-25°-41'-48"	W-53°0-5'-39"
9	Tomateiro	Avicultura	S-25°-43'0-4"	W-53°0-4'-47"
10	Mandiocal	Avicultura	S-25°-41'-45"	W-53°0-5'-41"
11	Abóbora	Fruticultura	S-25°-41'-42"	W-53°0-5'-38"
12	Abóbora	Fruticultura	S-25°-41'-42"	W-53°0-5'-38"
13	Guabiroba	Fruticultura	S-25°-41'-48"	W-53°0-5'-36"
14	Romã	Fruticultura	S-25°-41'-48"	W-53°0-5'-37"
15	Canavial	Mecanização	S-25°-41'-37"	W-53°0-5'-27"
16	Rami	Pequenos Animais	S-25°-41'-35"	W-53°0-5'-27"
17	Bambu	Bambuzal	S-25°-43'0-4"	W-53°0-4'-47"
18	Floresta	Apicultura	S-25°-41'-29"	W-53°0-5'-54"
19	Floresta	Apicultura	S-25°-41'-29"	W-53°0-5'-53"

20	Horta	Horticultura	S-25°-41'-52"	W-53°0-4'0-7"
21	Mata horta	Horticultura	S-25°-41'-52"	W-53°0-5'-59"
22	Bananal	Horticultura	S-25°-41'-59"	W-53°0-5'-59"
23	Troncos	Horticultura	S-25°-41'-59"	W-53°0-6'0-1"
24	Bananal	Horticultura	S-25°-41'-59"	W-53°0-5'-58"
25	Mata	Horticultura	S-25°-41'-52"	W-53°0-5'-59"
26	Bananal	Arboreto	S-25°-42'-15"	W-53°0-5'46"
27	Tronco	Arboreto	S-25°-42'-18"	W-53°0-5'46"
28	Bambu	Arboreto	S-25°-42'-16"	W-53°0-5'45"

Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Na implantação das iscas, foi utilizado uma pá de jardinagem para retirada da serapilheira superficial, onde foi depositado o saquinho com escleródios. Em seguida a serapilheira foi reposta sobre a isca. Para facilitar a localização, utilizou-se bandeiras enumeradas próximas ao local de implantação (Figura 04).

Figura 04 - Implantação das iscas à campo. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Após um período de 20 dias, com auxílio de uma pá de jardinagem e um saco plástico, foram coletadas as 28 iscas. Os escleródios que apresentaram algum sinal de colonização por *Trichoderma* spp. foram repicados em placas de Petri e incubados em BOD (Figura 05).

Figura 05 - Coleta das íscas de escleródios 20 dias após instalação. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.

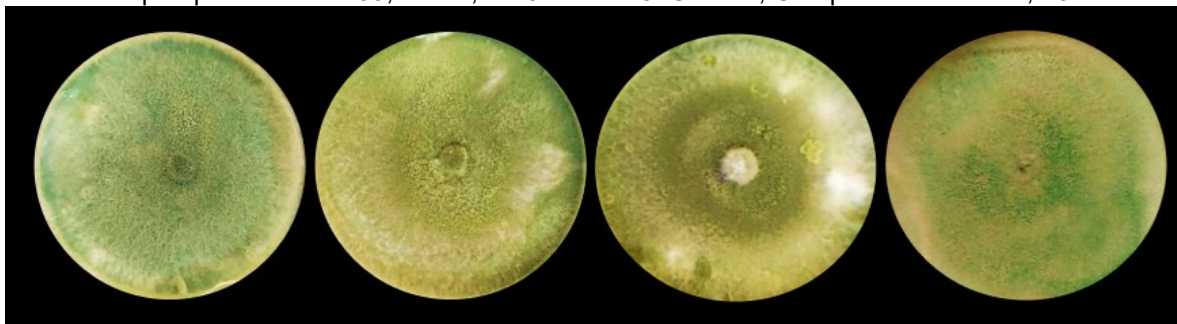


Fonte: Arquivo pessoal (2024)

3.2.1.3 Isolamento de *Trichoderma* spp.

Os escleródios colonizados por *Trichoderma* spp. apresentavam coloração esverdeada, e foram levados para câmara de fluxo laminar, onde foram transferidos um a um em placas de Petri® com meio BDA. As placas foram fechadas com plástico filme de PVC e incubadas em BOD a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. Onde foram repicadas até se obterem colônias puras (Figura 06).

Figura 06 - Placas de Petri® com dez dias de crescimento contendo os isolados de *Trichoderma* spp. prospectadas: MS09, MS27, MS04 e MS28. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

3.2.1.4 Identificação dos fungos selecionados

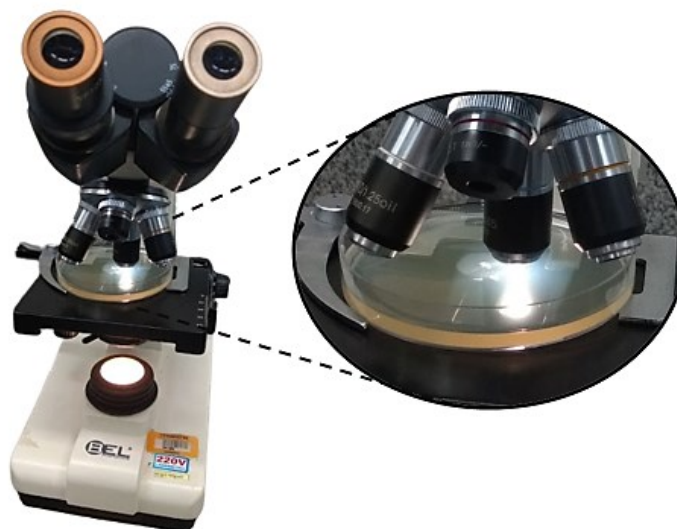
Foram obtidos quatro isolados do antagonista, todas da espécie *T. koningiopsis*. Identificadas pelo método POP#GoG-010 – Identificação de microrganismos por sequenciamento de DNA (ITS).

3.2.1.5 Morfologia da colônia

Em câmara de fluxo laminar, com placas de Petri® descartáveis de 8,3 cm de diâmetro, contendo 20 mL de meio BDA; transferiu-se com auxílio de alça de platina estéril uma amostra de hifas de cada isolado estudado (MS04, MS09, MS27 e MS28), a fim de avaliar a morfologia da colônia em placa, e morfologia das hifas em microscópio óptico.

As avaliações foram realizadas diariamente de forma qualitativa, utilizando apenas fotos. O microscópio utilizado foi o microscópio óptico Bel Photonics, com a objetiva de 100x e 400x (Figura 07).

Figura 07 – Utilização da placa de Petri® com a colônia no primeiro dia de avaliação em microscópio óptico na objetiva de 400x. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Nos dois primeiros dias de avaliação, utilizou-se a própria placa para leitura no microscópio, nas duas avaliações subsequentes utilizaram-se lâminas preparadas com auxílio de fita adesiva.

3.2.1.5 Crescimento micelial

Para avaliação do crescimento micelial dos quatro isolados de *Trichoderma koningiopsis*, utilizaram-se placas de Petri® descartáveis de 8,3 cm de diâmetro, contendo 20 mL de meio BDA, onde transferiu-se com auxílio de alça de platina estéril um disco de micélio no centro da placa.

As placas foram seladas com plástico filme de PVC e incubadas em BOD sob temperatura de 25 °C com fotoperíodo de 12 horas. Com auxílio de uma régua graduada avaliou-se a cada 24 horas o crescimento micelial da colônia.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetição por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de

normalidade de Shapiro-Wilk; por se tratar de um experimento qualitativo x quantitativo, realizou-se a ANOVA seguido da análise de regressão no software Rbio (BHERING, 2017).

3.2.1.6 Avaliação do crescimento em diferentes temperaturas

Em câmara de fluxo laminar, utilizando placas de Petri® descartáveis de 8,3 cm de diâmetro, contendo 20 mL de meio BDA, transferiu-se um disco de micélio de 7 mm de diâmetro de cada isolado de *T. koningiopsis* no centro da placa.

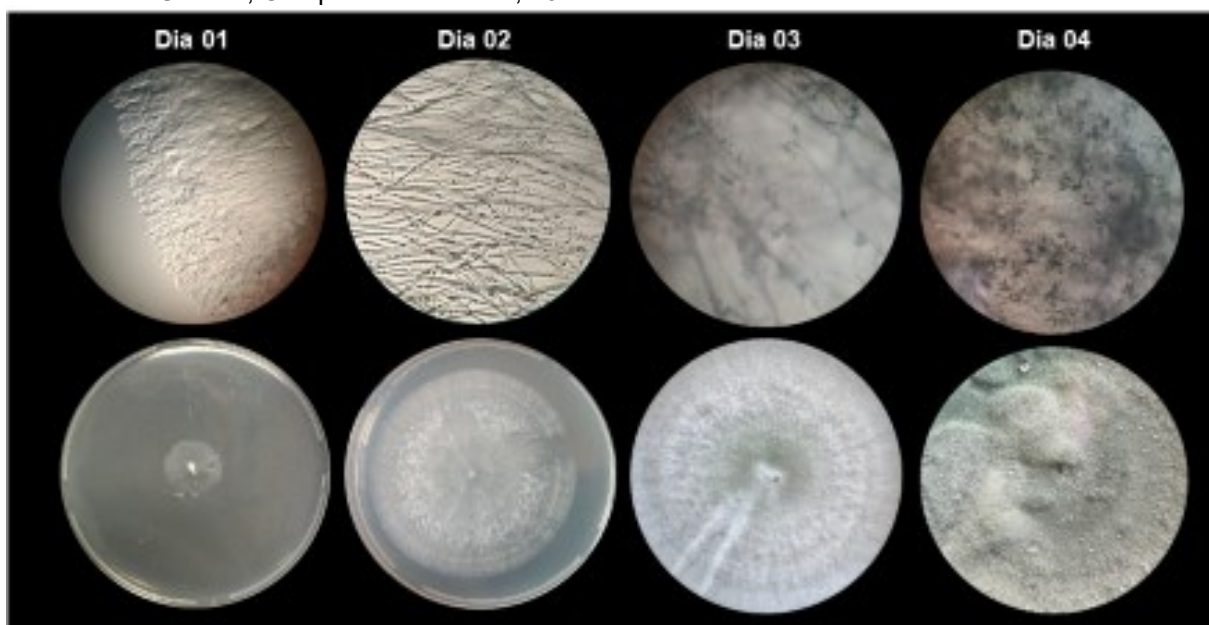
O estudo envolveu seis temperaturas distintas, sendo: 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C e 35 °C, sob fotoperíodo de 12 horas. A fim de verificar o tempo em dias para que cada isolado complete o crescimento na placa.

3.3 RESULTADOS E DISSCUSSÕES

3.3.1 Morfologia da colônia

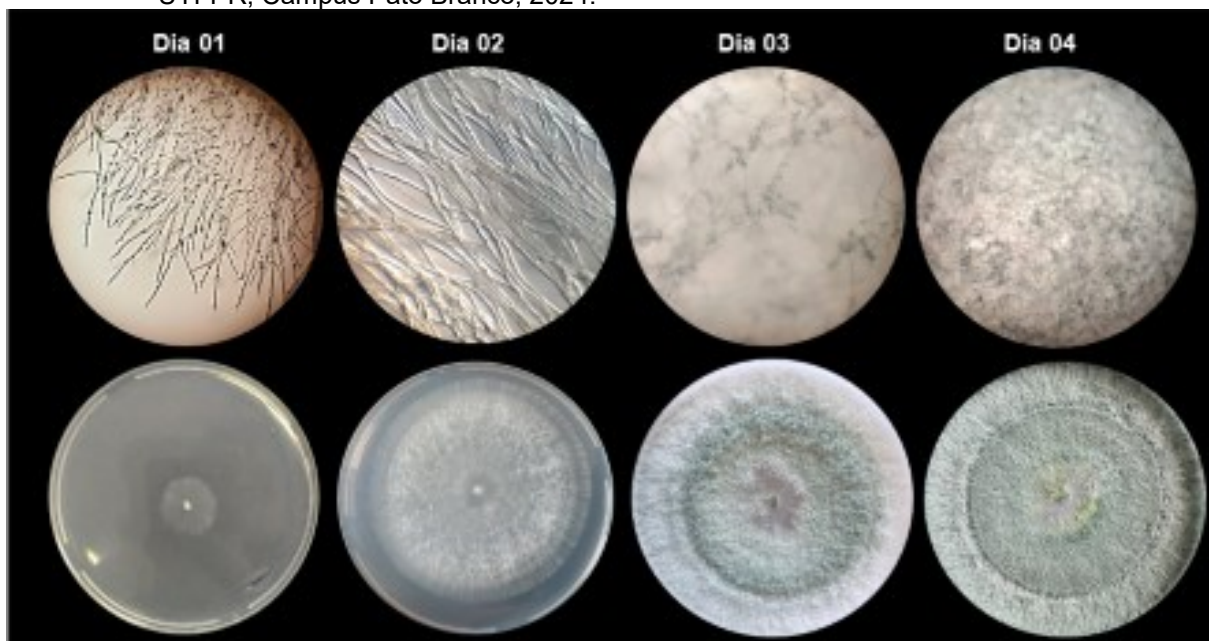
Pode-se observar com a análise diária das colônias, que nos dois primeiros dias de crescimento à 25°C, o antagonista não produz esporos, apenas ocorre o alongamento de hifas (Figura 08 a 11), iniciando a esporulação a partir do terceiro dia, onde também completa seu crescimento micelial na placa de Petri.

Figura 08 – Morfologia das hifas e aspecto de crescimento da colônia de *T. koningiopsis* isolado MS04 em quatro dias de avaliação. Dia 01 e 02 objetiva de 400x; dia 03 e 04 objetiva de 100x. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



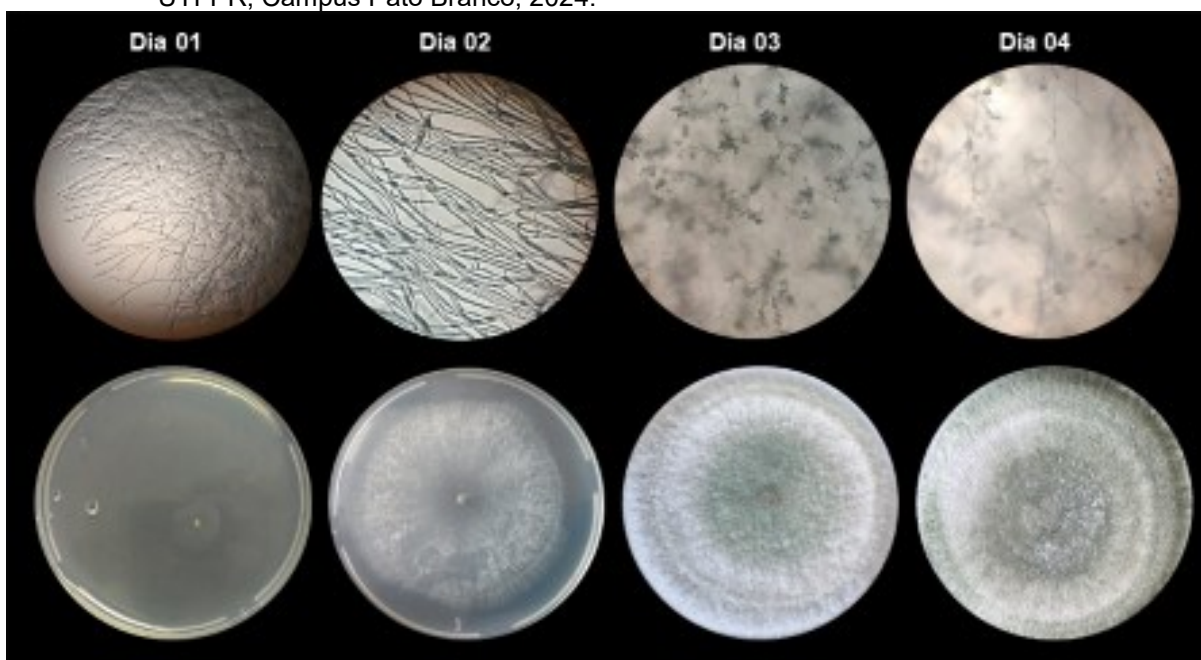
Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Figura 09 – Morfologia das hifas e aspecto de crescimento da colônia de *T. koningiopsis* isolado MS09 em quatro dias de avaliação. Dia 01 e 02 objetiva de 400x; dia 03 e 04 objetiva de 100x. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



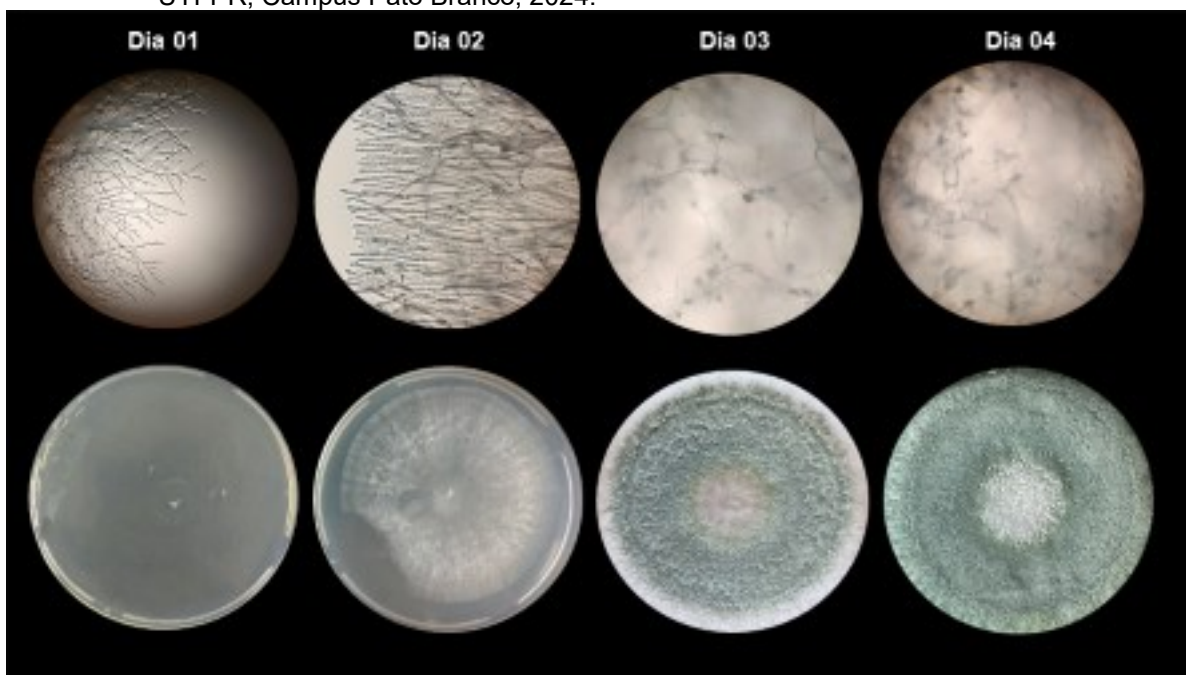
Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Figura 10 – Morfologia das hifas e aspecto de crescimento da colônia de *T. koningiopsis* isolado MS27 em quatro dias de avaliação. Dia 01 e 02 objetiva de 400x; dia 03 e 04 objetiva de 100x. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Figura 11 – Morfologia das hifas e aspecto de crescimento da colônia de *T. koningiopsis* isolado MS28 em quatro dias de avaliação. Dia 01 e 02 objetiva de 400x; dia 03 e 04 objetiva de 100x. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

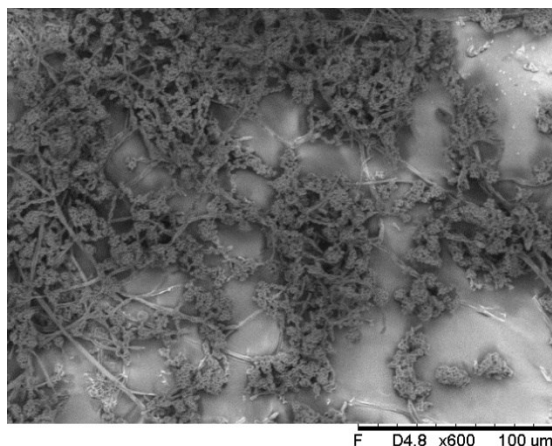
Na figura abaixo (Figura 12 e Figura 13) percebe-se a estrutura e os conídios de *T. koningiopsis* isolado MS28 e MS09 no terceiro dia de avaliação. Nesta fase assexuada, por meio de micélio vegetativo, formam-se conidióforos em um eixo central com ramificações laterais, que terminam em estruturas conidiogênicas do tipo fiálide, onde produz-se os conídios unicelulares, podendo ser esféricos, ovais ou alongados. Tais conidióforos são encontrados dispersos pela colônia no formato de tufo (MEYER, MAZARO, DA SILVA, 2019).

Figura 12 – Hifas de *T. koningiopsis* MS28, seguido por conídios dispersos, no terceiro dia de crescimento vegetativo. Leitura em microscópio óptico; observação de 100x e 400x. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

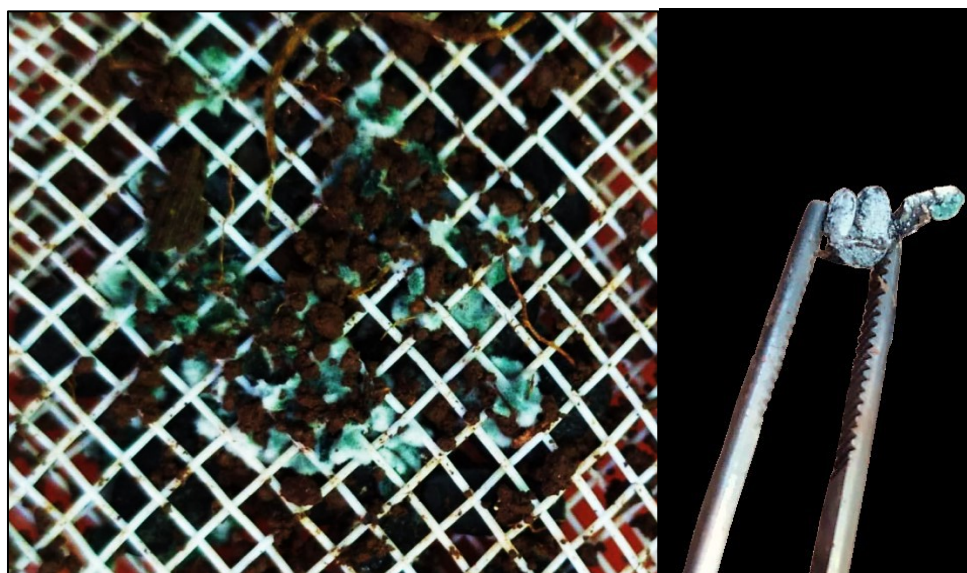
Figura 13 – Hifas de *T. koningiopsis* MS09 no sétimo dia de crescimento vegetativo. Leitura em microscópio eletrônico de varredura; observação de 600x. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

A escolha de escleródios de *S. sclerotiorum* como iscas para *Trichoderma* spp. se deu pela facilidade de produção em meio *in vitro*, bem como fácil manipulação à campo. *Trichoderma* spp. são comumente usados para controle de mofo branco, pois se caracterizam por micoparasitarem micélio, escleródio e apotécio do fitopatógeno, além de secretarem enzimas hidrolíticas como endoquitinases que rompem a célula do hospedeiro. Por isso, o melhor momento de aplicação do agente se dá na fase de dormência do fitopatógeno, de forma preventiva, impedindo o prolongamento do ciclo, evitando a germinação e instalação da doença a campo (Figura 14) (TROIAN, 2014; MEYER, CAMPOS, LOBO-JUNIOR, 2019).

Figura 14 – Escleródios de *S. sclerotiorum* colonizados por *T. koningiopsis*. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Dessa forma, ao coletar as 28 iscas à campo, observou-se a colonização dos escleródios pelos antagonistas em quatro locais coletados, resultando em quatro isolados de *T. koningiopsis* nativas do solo.

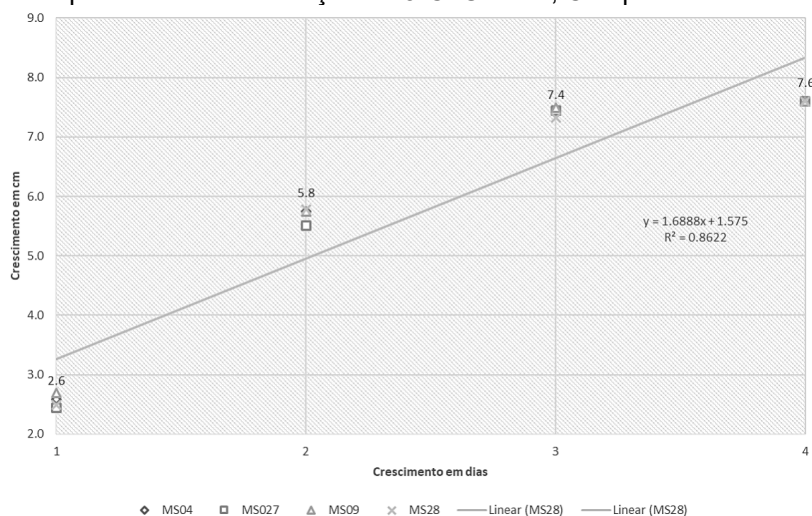
Trichoderma spp. colonizam naturalmente os escleródios, e por isso são considerados eficientes no controle de *S. sclerotiorum*. Estudos apontam que a

aplicação de biofungicidas na soja durante a safra 2014/15, nos estádios V2 e V4 reduziram a formação de apotécio em até 89%, sendo que os tratamentos usando bioprodutos à base de *T. harzianum* e *T. asperellum* apresentaram maior porcentagem de colonização de escleródios com uma aplicação, e dois bioprodutos à base de *T. asperellum* após duas aplicações, evidenciando a eficiência do agente no controle biológico de mofo branco (MEYER et al. 2019).

3.3.2 Crescimento micelial

Comparando-se o crescimento dos quatro isolados de *T. koningiopsis*, sob a temperatura padrão de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, pode-se perceber pela figura 15, que os quatro isolados de *T. koningiopsis* (MS04, MS09, MS27 e MS28) não diferiram entre si, obtendo um crescimento similar nos quatro dias de avaliação.

Figura 15 – Crescimento micelial (cm) de *T. koningiopsis* isolados MS04, MS09, MS27 e MS28 ao longo de quatro dias de incubação à 25°C. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.

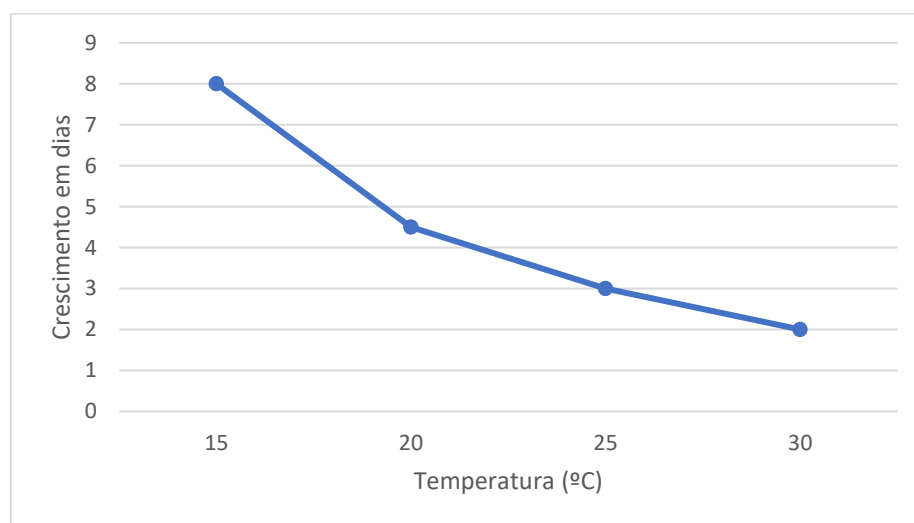


Fonte: Arquivo pessoal (2024)

3.3.3 Avaliação do crescimento em diferentes temperaturas

Quanto à temperatura, não houve diferença no crescimento micelial dos isolados de *T. koningiopsis*. Não ocorrendo crescimento micelial na temperatura de 10 °C, apenas a partir de 15 °C os isolados cresceram e completaram o crescimento com 8 dias de incubação. Em 20 °C esse crescimento variou entre 4 a 5 dias. A temperatura ótima situou-se entre 25 °C (obtendo crescimento completo em três dias) e 30 °C (crescimento em dois dias). A partir da temperatura de 35°C os isolados não se desenvolveram *in vitro* (Figura 16).

Figura 16 – Crescimento micelial de *T. koningiopsis* isolados MS04, MS09, MS27 e MS28 expresso em dias, sob quatro temperaturas 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

A maioria das espécies de *Trichoderma* spp. são consideradas mesófilas, não tendo crescimento ideal em baixas temperaturas, porém a temperatura ótima varia conforme o isolado e a espécie. Em estudo, 360 isolados do antagonista foram testadas quanto a resistência ao frio, destas, 13 espécies cresceram em meio de cultura à 5°C, a maioria dos isolados eram da espécie *T. viride* (KREDIKS, 2003).

Outro estudo aponta que isolados de *T. afroharzianum* e *T. atroviride*

apresentaram melhor crescimento e colonização de plantas de tomate em 25°C e 20°C, respectivamente (DI LELIO et al. 2021). Para *T. harzianum* e *T. viride* a temperatura ótima encontrou-se entre 25-40°C e para *T. asperellum* e *T. hamatum*, na faixa de 25-35°C (ZEHR, 2017). Para Widden e Hsu (1987), *T. polysporum* e *T. viride* competiram melhor em crescimento na serrapilheira de pinus sob baixa temperatura, numa faixa de 5-15°C, já *T. hamatum* e *T. koningii* competiram melhor em temperaturas mais elevadas (20-25°C).

Em amostras de solo de florestas tropicais de alta altitude no Himalaia, foram isoladas três espécies de *Trichoderma* spp. sendo eles, *T. harzianum*, *T. koningii* e *T. viride*, os quais apresentaram crescimento entre 9-35 °C, sendo considerada ótima, a temperatura de 24 °C, porém conseguindo esporular mesmo submetido em condições de baixíssima temperatura, como na de 4°C (GHILDIYAL; PANDEY, 2008).

O produto comercial Plant Helper (AmPac Biotech) com registro nos Estados Unidos, foi elaborado utilizando uma cepa de *Trichoderma atroviride* isolada no Alaska, e, portanto, tolerante ao frio, usado no controle biológico de *Microdochium nivale*, *Myriosclerina borealis* e *Pythium* sp. (BETTIOL et al. 2019).

Portanto, embora a maioria das estirpes conhecidas de *Trichoderma* spp. sejam mesófilas e tenham seu potencial maximizado nessas temperaturas, a depender do isolado, suas características ótimas são variáveis, podendo preferir diferentes faixas de temperatura.

3.4 CONCLUSÕES

Quatro isolados de *Trichoderma koningiopsis* foram isoladas na fazenda experimental da UTFPR Campus Dois Vizinhos. Observou-se que o crescimento completo na placa à 25 °C com fotoperíodo de 12 horas, se dá no período de três dias, sendo que nos dois primeiros dias não ocorre esporulação, iniciando apenas no terceiro dia. Verificou-se também que em temperaturas inferiores a 15 °C e superiores a 30 °C não ocorre crescimento micelial, sendo que a faixa ótima encontra-se entre 25-30 °C.

REFERÊNCIAS

- BETTIOL, W., MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças em plantas: usos e perspectivas**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Meio Ambiente, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Jaguariuna, SP, 2009.
- DI LELIO, I., COPPOLA, M., COMITE, E., MOLISSO, D., LORITO, M., WOO, S.L., PENNACCHIO, F., RAO, R., DIGILIO, M.C. Temperature Differentially Influences the Capacity of Trichoderma Species to Induce Plant Defense Responses in Tomato Against Insect Pests. **Front Plant Sci.** 2021 Jun 9;12:678830. doi: 0.3389/fpls.2021.678830. PMID: 34177994; PMCID: PMC8221184.
- DOMSCH, K.H. et al. Compendium of soil fungi. London: Academic, 1980. 630p.
- DRUZHININA, I.S., SHELEST, E., KUBICEK, C.P. Novel traits of Trichoderma predicted through the analysis of its secretome. **FEMS Microbiol. Ecol.** 2012;337:1–9. doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02665.x.
- FERNANDES, É. K., RANGEL, D. E., BRAGA, G. U., ROBERTS, D. W. Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. **Current Genetics**, v. 61, n. 3, p. 427-440, 2015.
- GHILDIYAL, A., PANDEY, A. Isolamento de Cepas Antifúngicas Tolerantes ao Frio de Trichoderma sp. De locais glaciais da região indiana do Himalaia. **Jornal de Pesquisa de Microbiologia**, 2008, 559-564.
- KREDICS, L. Influence of Environmental Parameters on Trichoderma Strains with Biocontrol Potential. **Food Technol. Biotechnol.** 41 (1) 37–42 (2003).
- MACHADO, D.F.M., PARZIANELLO, F.R., DA SILVA, A.C.F., ANTONIOLLI, Z.I. Trichoderma no Brasil: o fungo e o bioagente. **Rev. Ciências Agrárias**, 2012. 35: 274-288, 2012(<https://doi.org/10.19084/rca.16182>).
- MEDEIROS, F.H.V., GUIMARÃES, R.A., PEREIRA, J.C., MAGALHÃES, V.C., SOUZA, J.T. Trichoderma: interações e estratégias. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. da (Eds.). *Trichoderma* uso na agricultura. Brasília, DF: Embrapa, 2019.
- MEYER, M.C.; CAMPOS, H.D.; GODOY, C.V.; UTIAMADA, C.M. (Ed.). Ensaios cooperativos de controle biológico de mofo branco na cultura da soja - safras 2012 a 2015. Londrina: Embrapa Soja, 2016.
- MEYER, M.C., CAMPOS, H.D., LOBO-JUNIOR, M. Avaliação a campo de

Trichoderma em mofo-branco. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. da (Eds.). Trichoderma uso na agricultura. Brasília, DF: Embrapa, 2019.

MEYER, M.C., MAZARO, S.M., GODOY, C.V. CONTROLE BIOLÓGICO DE MOFO-BRANCO NA CULTURA DA SOJA. IN. MEYER, M.C., BUENO, A.F., MAZARO, S.M., SILVA, J.C. Bioinsumos na cultura da soja, Brasília, DF: Embrapa, 2022.

MONTE, E., BETTIOL, W., HERMOSA, R. *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças em plantas. In MEYER, M.C., MAZARO, S.M., SILVA, J.C. *Trichoderma* uso da agricultura. Brasília, DF: Embrapa, 2019.

PINTO, Z. V.; WEILER, C. A.; MORANDI, M. A. B.; LUCON, C. M. M.; BETIOL, W. Controle de qualidade de produtos biológicos a base de fungos. In: MEDEIROS, F. H. V.; SILVA JÚNIOR, M. B. da; PEREIRA, P. de F.; CARDOSO, A. M. S.; FARIA, A. F. de; GADAGA, S. J. C.; LIMA, P. P.; JULIATTI, B. C. M.; LUZ, A. L. F.; SANTOS, G. de S.; NICOLLI, C. P. (Ed.). Controle biológico de doenças de plantas: integrando técnicas para entregar resultados. Lavras: UFLA, 2016. p. 103-122. Disponível em: < <http://www.nucleoestudo.ufla.br/nefit/livros/livro-2016.pdf> >. Acesso em: 08 ago. 2019.

SAMUELS, G.J. Trichoderma: Systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, 96 (2006), pp. 195-206, 2006.

SILVA, F.F., CASTRO, E. M., MOREIRA, S.I., FERREIRA, T. C., LIMA, A.E., ALVES, E. Emergence and ultrastructural analysis of soybean seedlings inoculated with *Sclerotinia sclerotiorum* under the effect of *Trichoderma harzianum* application **Summa Phytopathol.** 43 (1) • Jan-Mar 2017. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2212>

TROIAN, R.F. Análise do secretoma da interação entre *Trichoderma harzianum* e os estágio de desenvolvimento do fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. Universidade de Brasília, 2014.

WIDDEN, P., HSU, D. Competition between *Trichoderma* species: Effects of temperature and litter type. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 19, Issue 1, 1987, Pages 89-93.

ZEHRA, A., DUBEY, M.K. MEENA, M. UPADHYAY, R.S. Effect of different environmental conditions on growth and sporulation of some *Trichoderma* species. **Journal of Environmental Biology**, 2017.

4. ESTUDO 02: ANTAGONISMO E ANTIBIOSE PROMOVIDOS POR ISOLADOS DE *Trichoderma koningiopsis*

4.1 INTRODUÇÃO

As doenças são consideradas as principais causas de redução da produção nas lavouras, sendo os fitopatógenos fúngicos, em especial os habitantes de solo, o maior grupo responsável por estas perdas (ALMEIDA et al. 2014). Inúmeros fungicidas químicos são utilizados nas lavouras com vistas a reduzir os danos ocasionados por doenças, porém os efeitos negativos do emprego destes produtos, fazem com que a procura por agentes biológicos cresça comercialmente em escala mundial, em especial do gênero *Trichoderma*.

Dentre os mecanismos estudados, o antagonismo promovido por *Trichoderma* spp., pode ser observado em diferentes organismos fitopatogênicos, entre fungos, bactéria e nematoides, o que é conhecido por sua interação direta, podendo exercer hiperparasitismo/micoparasitismo, competição por espaço, nutrientes e antibiose (ZHANG et al. 2017).

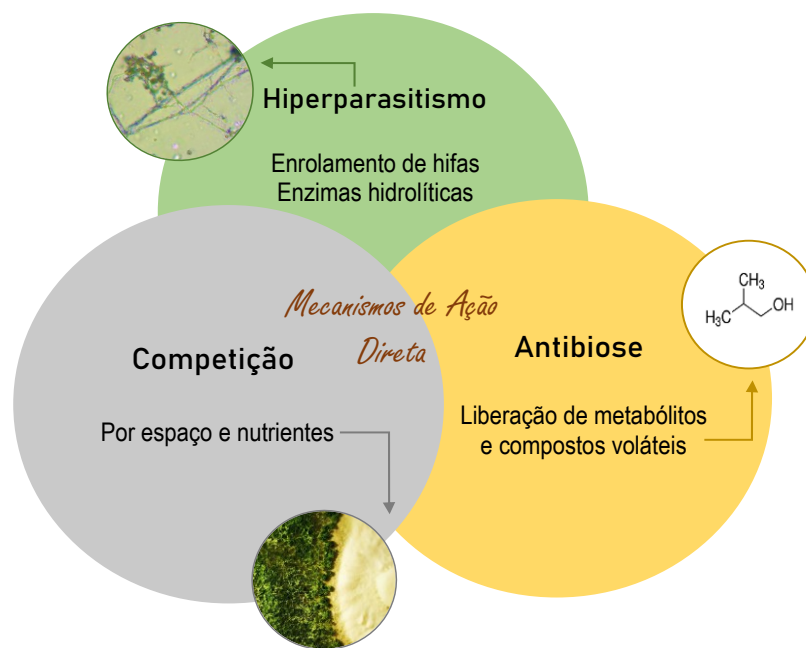
Estudos mostram que *Trichoderma* spp. podem reconhecer a presença de micélio patogênico na rizosfera e direcionar suas hifas ao patógeno, realizando o hiperparasitismo das mesmas, por meio do enrolamento de hifas e desenvolvimento de apressórios, seguido pela liberação das enzimas líticas quitinases e β -1,3-glucanases, que possibilitam a degradação da parede celular dos fitopatógenos, formadas em sua maioria por quitina e glucana (ZEILINGER et al. 1999; SIVAN, 1989).

Outro fator que contribui para o sucesso deste gênero no controle biológico de doenças de plantas, é seu rápido crescimento, que o torna um competidor eficiente, se sobressaindo sobre fitopatógenos de crescimento lento, bem como a colonização eficaz de diferentes tipos de substratos (OSZUST et al. 2020).

Além do hiperparasitismo e competição, a liberação de compostos orgânicos voláteis (VOC's) produzidos por este gênero de fungos, contribuem para a morte

celular do fitopatógeno. Os VOC's compreendem metabólitos secundários de baixo peso molecular liberado pelo antagonista com efeito biofungicida, podendo também atuar como promotor de crescimento de plantas (Figura 17) (RUANGWONG et al. 2021).

Figura 17 – Interações diretas exercidas por *Trichoderma* spp. frente a fitopatógenos. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

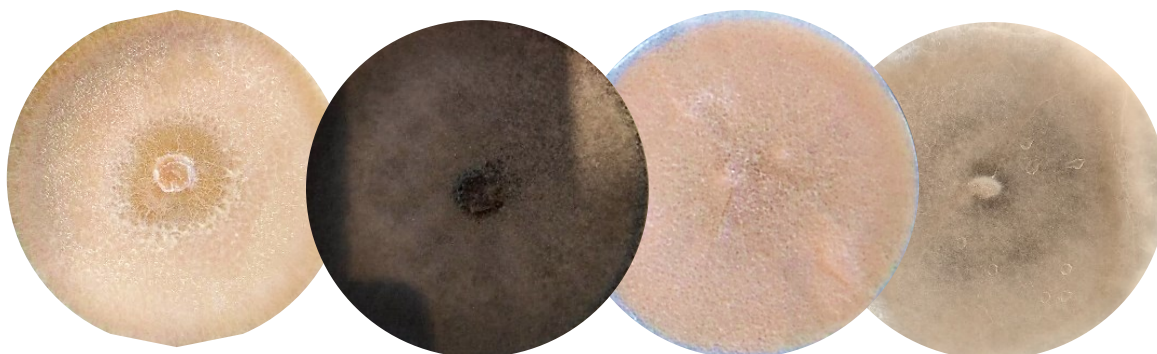
A fim de observar os efeitos de antagonismo e antibiose exercidos por *T. koningiopsis*, utilizaram-se neste estudo, os principais fitopatógenos habitantes de solo que atingem a cultura da soja, causadores de podridões radiculares, como *Macrophomina phaseolina*, causador da podridão cinzenta; *Fusarium* spp. causador da podridão vermelha da raiz (Reis et al. 2014); *Diaporthe longicolla* causadora da podridão radicular (Ghissi, Reis, Deuner, 2014); e a podridão da haste e da vagem, ou mofo branco, ocasionada por *Sclerotinia sclerotiorum*.

4.2 PROCEDIMENTO METODOLÓGICO

4.2.1 Avaliação de antagonismo por confronto direto

Para a avaliação de confronto direto, seguiu-se a metodologia descrita por Dennis e Webster (1971). Foram utilizadas placas de Petri® descartáveis com 8,3 cm de diâmetro, contendo 20 mL de meio BDA. Como patógenos desafiantes utilizaram-se: *Fusarium tucumaniae* (CMES 25), *Macrophomina phaseolina* (CMES 1474), *Diaporthe longicolla* (CMES 1582) e *Sclerotinia sclerotiorum* (CMES 2131), todos do acervo da micoteca da Embrapa Soja (Figura 18).

Figura 18 - Placas de Petri® com sete dias de crescimento contendo: *N. phaseoli*, *M. phaseolina*, *D. longicolla* e *S. sclerotiorum*, respectivamente. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Em câmara de fluxo laminar, com auxílio de alça de platina estéril foi transferido um disco de micélio de 7 mm de diâmetro de cada patógeno com distância de um centímetro da borda da placa. Do lado oposto, a um centímetro da borda, foi transferido um disco de micélio de cada um dos quatro isolados de *T. koningiopsis* (Figura 19). Cada placa corresponde a uma unidade experimental.

Figura 19 - Placa de Petri® em cultura pareada/confronto direto. Do lado esquerdo o disco de micélio de *Trichoderma* spp. e do lado oposto o disco de micélio do patógeno. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

As placas foram seladas com plástico filme de PVC e incubadas em BOD sob temperatura de 25 °C com fotoperíodo de 12 horas. Com auxílio de uma régua graduada avaliou-se a cada 24 horas o crescimento micelial dos patógenos, até cada testemunha (isenta de *T. koningiopsis*) atingir o crescimento completo na placa.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetição por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk; por se tratar de um experimento qualitativo x quantitativo, realizou-se a ANOVA seguido da análise de regressão no software Rbio (BHERING, 2017).

4.2.2 Avaliação morfológica das hifas

A avaliação morfológica das hifas foi realizada no microscópio óptico Zeiss Primo Star.

4.2.3 Avaliação do potencial de antibiose

Avaliou-se a antibiose do antagonista por meio da extração dos metabólitos em meio líquido, e também dos metabólitos voláteis.

4.2.3.1 Obtenção dos metabólitos filtrados

Para avaliação de antibiose dos metabólitos produzidos por *Trichoderma* spp., foi adaptada a metodologia descrita por Marquez et al. (2018). Onde utilizaram-se erlenmeyers com 150 mL de caldo BD (Batata Dextrose) autoclavados. Em câmara de fluxo laminar, transferiu-se três discos de micélio de cada isolado do antagonista. Os frascos foram vedados com algodão e papel kraft, e alocados em agitador orbital shaker a 150 rpm sob temperatura controlada de 25 °C, na ausência de luz, por um período de sete dias.

Após o crescimento em meio líquido, com auxílio de uma micropipeta foi retirado 7,5 mL da suspensão de cada erlenmeyers e transferidos em eppendorfs, que foram postos em centrífuga refrigerada e centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos.

Em seguida, em câmara de fluxo laminar, filtrou-se o sobrenadante com membrana Millipore® com espessura do poro de 0,22 µm e diâmetro de 33 mm, com o uso de uma seringa acoplada.

3.2.3.2 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A solução de trabalho descrita no item 4.2.3.1 foi considerada o tratamento de 100%. A suspensão fúngica utilizada foi de 10^5 UFC.mL⁻¹ de cada um dos quatro fitopatógenos: *Fusarium tucumaniae* (CMES 25), *Macrophomina phaseolina* (CMES

1574), *Diaporthe longicolla* e *Sclerotinia sclerotiorum* (CMES 2131), obtidos da “Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais” da Embrapa Soja em Londrina, PR.

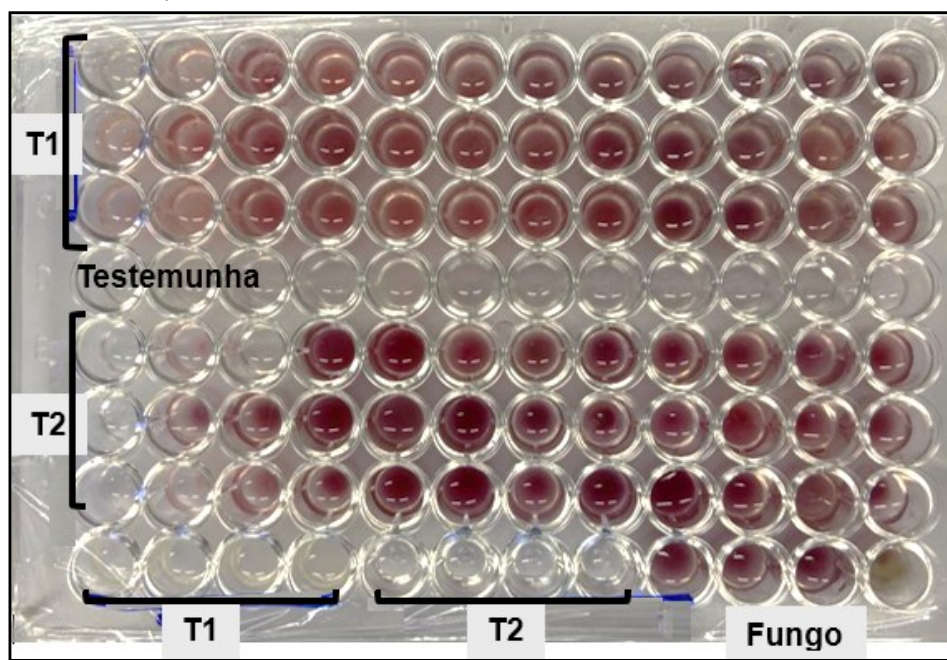
A metodologia empregada foi baseada em Vismara (2019).

Cada linha da placa de Elisa conta com doze poços e correspondeu a uma repetição do tratamento, onde foi realizada a microdiluição da solução de trabalho feito por meio da micropipeta.

Com uma micropipeta multicanal de 12 canais foram adicionados 100 µL de meio de cultura BD autoclavado em cada poço. Em seguida no primeiro poço de cada linha adicionou-se 100 mL da solução de trabalho correspondente a cada tratamento, a partir daí fez-se a microdiluição para os demais 11 poços na sequência.

Por fim, 20 µl da suspensão fúngica foram adicionados conforme tratamento (*N. phaseoli*, *M. phaseolina*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*), exceto na linha D e nos quatro últimos poços da linha H (Figura 20).

Figura 20 - Placa de Elisa com 96 poços, simulando a microdiluição dos tratamentos. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Em seguida, as placas foram vedadas com filme plástico de PVC, e acondicionadas em BOD a 25 °C por um período de 48 horas.

Passadas as 48 horas, adicionou-se 10 µL de tetrazólio a 1% em todos os poços de todas as placas. O tetrazólio está ligado as enzimas desidrogenases, as quais reduzem o 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio nos tecidos vivos durante a glicólise no ciclo de Krebs, fazendo com que quando adicionado de forma incolor fique após a reação num tom vermelho (FRANCA NETO et al. 1988). Por ser fotossensível, foi mantido em BOD no escuro a 25 °C por mais 48 horas para revelação do resultado.

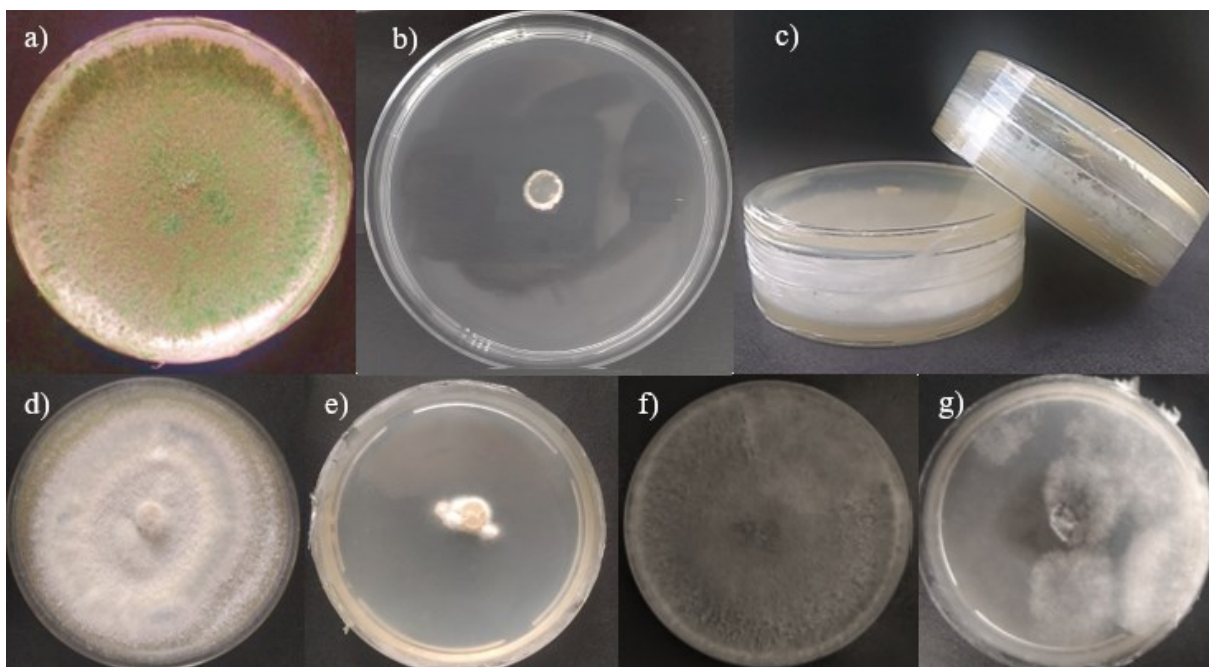
A avaliação é visual e qualitativa, nos poços onde houver a presença da coloração vermelha, é porque o fitopatógeno se manteve viável (vivo), e não teve seu crescimento inibido pela solução de trabalho.

4.2.4 Avaliação da antibiose promovida por compostos orgânicos voláteis

Para a análise dos compostos voláteis, utilizou-se a metodologia da placa selada, descrita por Intana et al. (2021), a qual consiste em selar uma placa de Petri® de 8,3 cm de diâmetro, com 20 mL de meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar) contendo um disco de micélio do patógeno de 7 mm de diâmetro, acoplada em outra placa com uma colônia de *T. koningiopsis* com idade de sete dias. Cada conjunto de placas acopladas corresponde a uma unidade experimental.

Como testemunha para o padrão de crescimento micelial de cada fitopatógeno, foi preparado o acoplamento com placas contendo apenas o meio de cultura, sem a colônia de *T. koningiopsis*.

Figura 21 – Ensaio prévio da antibiose promovida por compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma koningiopsis* MS09 sobre *F. tucumaniae*, e *M. phaseolina*: a) Colônia de *T. koningiopsis* MS09 com dez dias de crescimento; b) Disco de micélio do fitopatógeno; c) Acoplamento de ambas as placas a e b; d) Testemunha de *F. tucumaniae*, após 15 dias de crescimento; e) Crescimento de *F. tucumaniae*, após 15 dias em placa invertida com MS09; f) Testemunha de *M. phaseolina* após 15 dias de crescimento; g) Crescimento de *M. phaseolina* após 15 dias em placa invertida com MS09, nesta placa já há a presença de micélio do antagonista. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Os fitopatógenos utilizados nos experimentos foram: *Fusarium tucumaniae* (CMES 25), *Macrophomina phaseolina* (CMES 1574), *Diaporthe longicolla* e *Sclerotinia sclerotiorum* (CMES 2131), obtidos da “Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais” da Embrapa Soja em Londrina, PR.

As placas foram vedadas com plástico filme, e incubadas em BOD à 25 °C com fotoperíodo de 12 horas. Com auxílio de uma régua graduada avaliou-se a cada 24 horas o crescimento micelial dos fitopatógenos.

Ao final do experimento foi realizada a microscopia eletrônica de varredura para avaliar possíveis danos morfológicos nas hifas do fitopatógeno.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetição por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de

normalidade de Shapiro-Wilk; por se tratar de um experimento qualitativo x quantitativo, realizou-se a ANOVA (Scott-Knott à 5% de probabilidade) seguido da análise de regressão no software Rbio (BHERING, 2017).

4.2.5 Avaliação morfológica das hifas

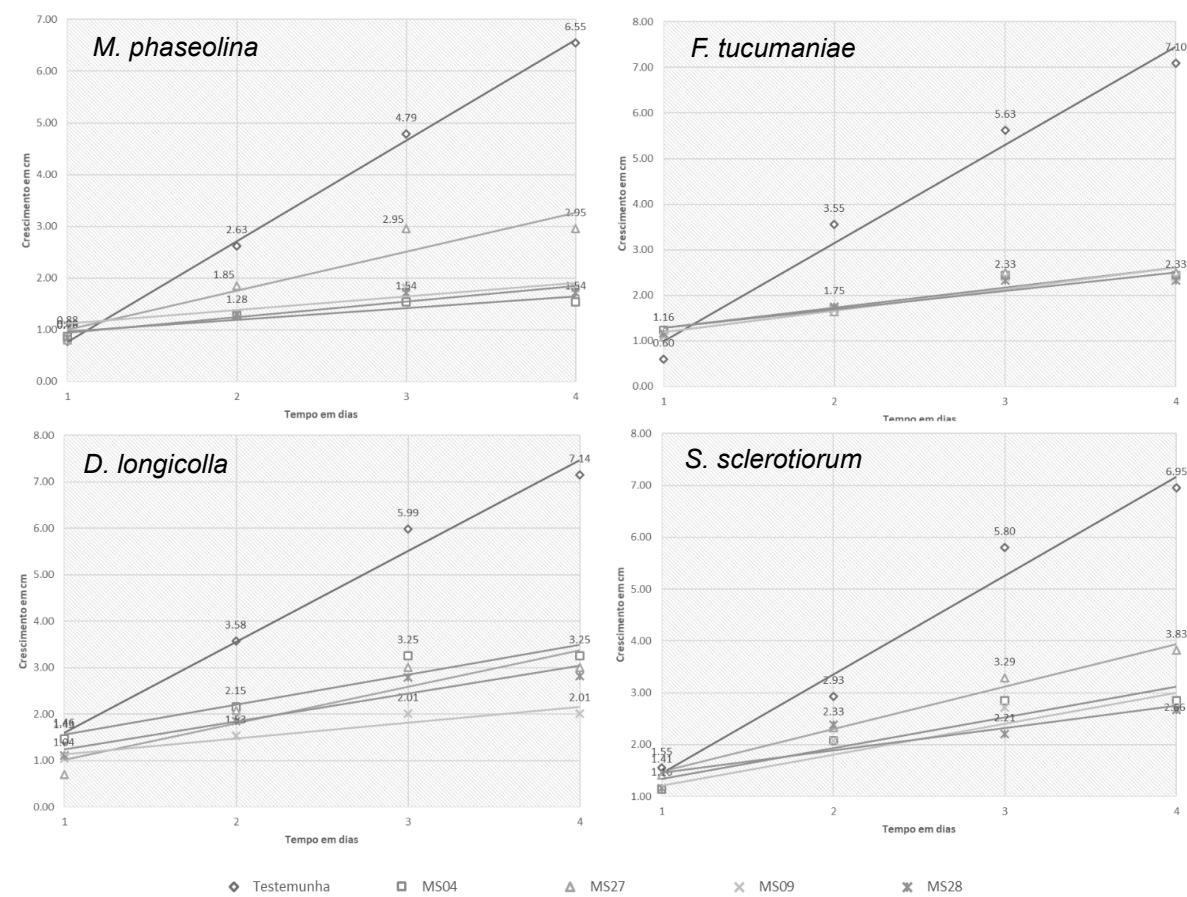
A avaliação morfológica das hifas foi realizada através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), por meio do microscópio Hitachi TM 3000.

4.3 RESULTADOS E DISSCUSSÕES

4.3.1 Resultados - Antagonismo por confronto direto

Observa-se pela figura 22, que no confronto com *M. phaseolina*, três dos quatro isodalos (MS04, MS09, MS28) reduziram 76% e MS27 reduziu 54% do crescimento radial do fitopatógeno em relação à testemunha. Já para *N. phaseoli*, não houve diferença significativa entre os tratamentos contendo *T. koningiopsis*, porém estes tratamentos diferiram da testemunha. Havendo uma redução de 67% no crescimento micelial de *F. tucumaniae* promovido pelos isolados em estudo.

Figura 22 – Efeito antagonista de *T. koningiopsis* isolados MS04, MS09, MS27 e MS28 sobre o crescimento micelial (cm) *M. phaseolina*, *F. tucumaniae*, *D. longicolla* e *S. sclerotiorum* respectivamente, ao longo de quatro dias. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Tabela 02 – Equação da reta e R² ajustado referentes ao crescimento micelial de *M. phaseolina*, *F. tucumaniae*, *D. longicolla* e *S. sclerotiorum*. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.

<i>M. phaseolina</i>	Equação	R ² ajustado
Testemunha	$y = 1.9488x - 1.1875$	0.9885
MS04	$y = 0.755x + 0.25$	0.8612
MS27	$y = 0.2625x + 0.8563$	0.8929
MS09	$y = 0.225x + 0.7437$	0.8942
MS28	$y = 0.3x + 0.6438$	0.8864
<i>F. tucumaniae</i>	Equação	R ² ajustado
Testemunha	$y = 2.1575x - 1.175$	0.977
MS04	$y = 0.438x + 0.8525$	0.84955
MS27	$y = 0.4713x + 0.7187$	0.84745
MS09	$y = 0.4713x + 0.7187$	0.8983
MS28	$y = 0.4062x + 0.875$	0.83485

<i>D. longicolla</i>	Equação	R ² ajustado
Testemunha	$y = 1.955x - 0.3538$	0.9814
MS04	$y = 0.6463x + 0.9125$	0.8998
MS27	$y = 0.7825x + 0.2375$	0.79525
MS09	$y = 0.3413x + 0.7938$	0.83635
MS28	$y = 0.6037x + 0.6313$	0.85915
<i>S. sclerotiorum</i>	Equação	R ² ajustado
Testemunha	$y = 1.9075x - 0.4625$	0.9716
MS04	$y = 0.82x + 0.6625$	0.8799
MS27	$y = 0.5913x + 0.75$	0.9864
MS09	$y = 0.6x + 0.6063$	0.8445
MS28	$y = 0.4325x + 1.0225$	0.7269

Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Mendoza et al. (2015) observaram o mesmo efeito no controle *in vitro*, onde onze isolados de *Trichoderma* spp. demonstraram parasitismo de hifas de *M. phaseolina*, e quatro apresentaram antibiose formando um halo de inibição em placa. Sridharan et al. (2021) evidenciam que *T. longibrachiatum* reduziu em 58% o crescimento de *M. phaseolina*, além de atestar seu efeito de antibiose.

Também foi observado a produção de β -1,3-glucanase e N-acetilhexosaminidase, além de micoparasitismo por isolados de *Trichoderma* spp. em experimento com *M. phaseolina* isoladas de feijão e sorgo, o que pode explicar seu sucesso na redução do crescimento micelial (LARRALDE-CORONA et al. 2019).

O mesmo foi verificado por Pimentel et al. (2020) relatando que o isolado mais eficaz no controle de *F. virguliforme*, que acomete a soja nos EUA, é o *T. harzianum*, o qual foi capaz de reduzir em 92% o crescimento radial do fitopatógeno. Neste mesmo estudo foi comprovada a ação de micoparasitismo de *T. harzianum*, além da expressão de genes de resistência vegetal, como β 1,6-glucano sintase, α 1,3-glucanase, quitinase e endoquitinase.

A produção de metabólitos secundários também pode explicar a vantagem de *Trichoderma* spp. em cultura pareada. Mironenka et al. (2021) observaram que além de suprimir o crescimento de *F. culmorum*, o antagonista produziu em placa o metabólito zearalenona. Porém a produção de metabólitos de *Trichoderma* spp. é

ampla, podendo ser incluídos álcoois, ácidos, ésteres, cetonas, entre outros (LI et al. 2018).

Analisando os resultados obtidos com os quatro isolados de *T. koningiopsis* (Figura 22), para *Diaporthe longicolla* há uma redução média de 54% a 71% do crescimento micelial promovido pelos isolados de *Trichoderma koningiopsis* e de 44% a 63% para *S. sclerotiorum* em relação a testemunha.

Das et al. (2014) observaram uma redução de 84% e 78% no crescimento de *Phomopsis vexans*, ao utilizarem *T. viride* e *T. harzianum* respectivamente. Em outro estudo in vitro, Anita et al. (2012) obtiveram 100% de inibição do crescimento de *Phomopsis theae* Petch, quando em contato com metabólitos de *T. atroviride*, também descreveram a síntese de enzimas de defesa, como amilase, celulase e quitinase, ao serem postos em confronto direto.

Há muitos estudos envolvendo *Trichoderma* spp. e *S. sclerotiorum*. Zhang et al. (2016), perceberam que em cultura pareada as hifas do antagonista se entrelaçavam com as hifas de *S. sclerotiorum* e formavam um gancho, evidenciando o micoparasitismo do mesmo, tendo-se observado uma redução de 51,2% do crescimento micelial do fitopatógeno, e também o efeito de promoção de crescimento das plantas, exercido por *Trichoderma* spp.

Outro estudo envolvendo a co-inoculação de dois isolados, *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma asperellum* desafiados com *S. sclerotiorum*, mostraram-se efetivos na produção de respostas de resistência em plantas de berinjela, havendo maior produção de ácido chiquímico em 72 horas, além da expressão de enzimas de defesas, como Fenilalanina Amônia Liase e Peroxidase (Pratap-Singh et al. 2021). Outro mecanismo relatado e que explica o sucesso do antagonista na supressão de *S. sclerotiorum*, é a produção de compostos orgânicos voláteis que exibem supressão ao fitopatógeno (SILVA et al. 2021).

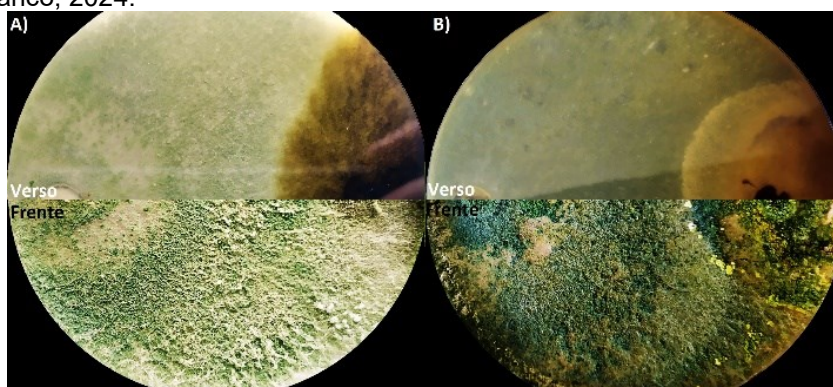
O mecanismo de micoparasitismo pode ser observado pelas figuras 23 e 24, onde o isolado MS28 micoparasita as hifas de *M. phaseolina*, *N. phaseoli*, *D. longicolla* e *S. sclerotiorum*.

Figura 23 - Micoparasitismo de *T. koningiopsis* MS28 em: a) *M. phaseolina*, b) *N. phaseoli*, c) *D. longicolla* e d) *S. sclerotiorum*. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

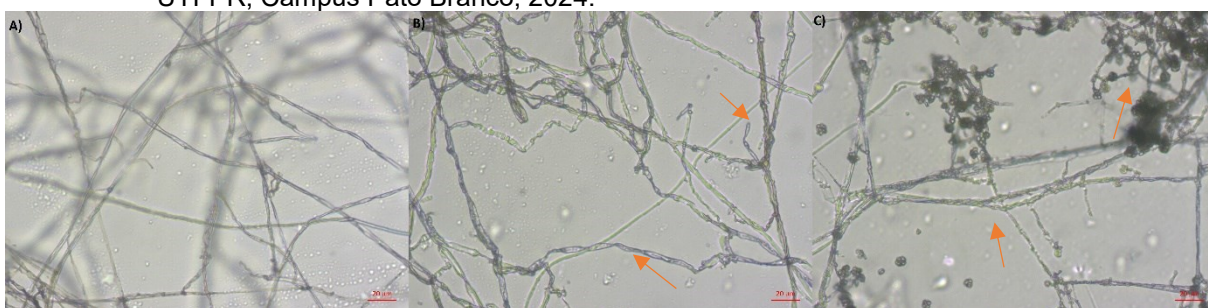
Figura 24 - Frente e verso das placas de a) *M. phaseolina* e b) *D. longicolla*. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Em microscópio óptico observa-se danos de estreitamento e enrolamento de hifas de *M. phaseolina* em placas pareadas com *T. koningiopsis* isolado MS27 (Figura 25-B), além do micoparasitismo (Figura 25-C).

Figura 25 - a) Testemunha de *M. phaseolina*, b) e c) *M. phaseolina* pareada com *T. koningiopsis*. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



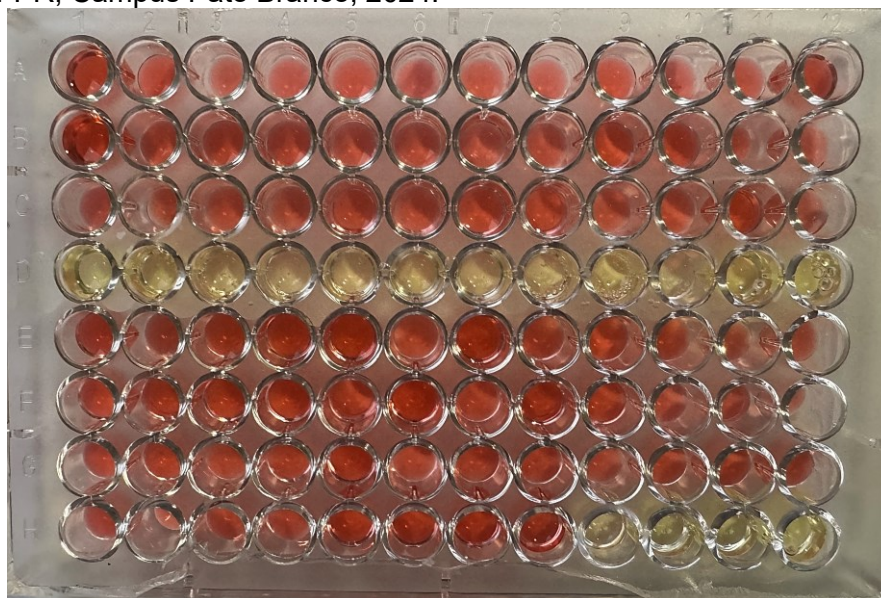
Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Percebe-se, portanto, que os quatro isolados de *T. koningiopsis* apresentaram potencial no controle biológico dos fitopatógenos em estudo, comprovando pela figura acima o micoparasitismo das hifas.

4.3.2 Resultados – Concentração Inibitória Mínima

Com a metodologia utilizada para a extração dos metabólitos filtrados, não houve resultado significativo, ou seja, os metabolitos extraídos dos quatro isolados de *T. koningiopsis* não resultaram na morte celular dos fitopatógenos estudados, em nenhuma das concentrações do MIC (Figura 25).

Figura 25 – Efeito dos metabólitos filtrados de *T. koningiopsis* isolados MS04, MS09, MS27 e MS28 sobre *D. longicolla* utilizando a metodologia da concentração inibitória mínima. A coloração vermelha indica que não houve morte celular do fitopatógenos. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.

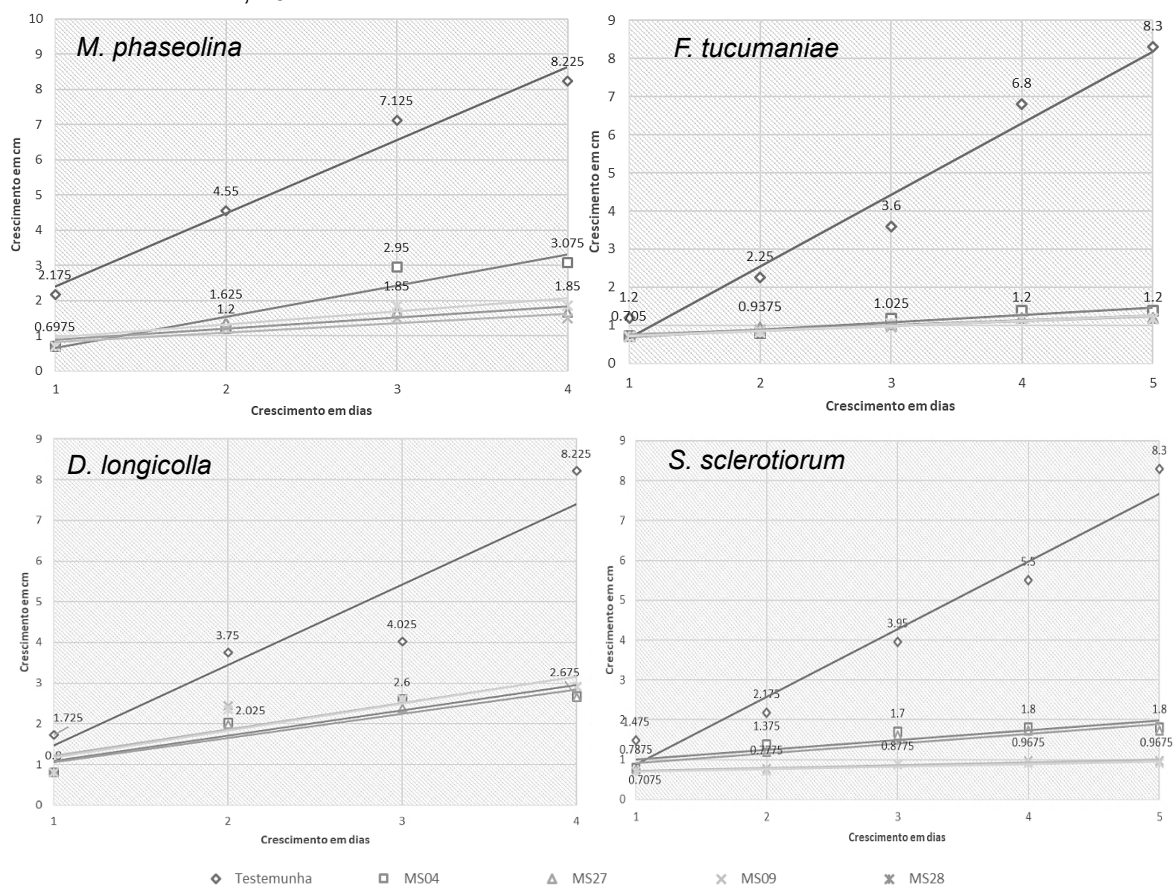


Fonte: Arquivo pessoal (2024)

4.3.3 Resultados - Antibiose por compostos orgânicos voláteis

Os resultados do efeito dos compostos orgânicos voláteis mostraram redução de 98% no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina*, 96% no crescimento de *Fusarium tucumaniae*, 63% no crescimento de *Diaporthe longicolla*, e 60% no crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* em relação à testemunha aos 4 dias após implantação do experimento (Figura 26 e 27).

Figura 26 – Efeito dos metabólitos voláteis de *T. koningiopsis* isolados MS04, MS09, MS27 e MS28 sobre o crescimento micelial (cm) de *M. phaseolina*, *F. tucumaniae*, *D. longicolla* e *S. sclerotiorum* respectivamente, ao longo de quatro dias. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



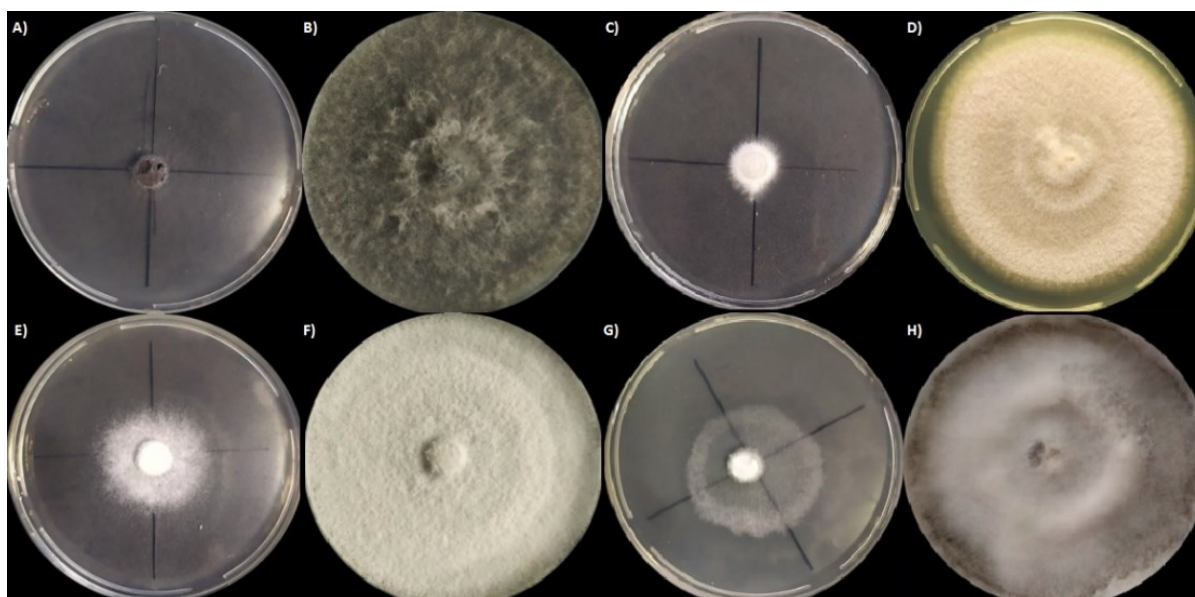
Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Tabela 03 – Equação da reta e R^2 ajustado referentes ao crescimento micelial de *M. phaseolina*, *F. tucumaniae*, *D. longicolla* e *S. sclerotiorum*. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.

<i>M. phaseolina</i>	Equação	R^2 ajustado
Testemunha	$y = 2.0725x + 0.3375$	0.9752
MS04	$y = 0.8883x - 0.24$	0.8980
MS09	$y = 0.315x + 0.575$	0.8243
MS27	$y = 0.265x + 0.5563$	0.8483
MS28	$y = 0.3668x + 0.59$	0.7502
<i>F. tucumaniae</i>	Equação	R^2 ajustado
Testemunha	$y = 1.6975x - 0.8125$	0.9587
MS04	$y = 0.245x + 0.6675$	0.8504
MS09	$y = 0.245x + 0.7575$	0.8079
MS27	$y = 0.0618x + 0.6408$	0.8232
MS28	$y = 0.071x + 0.6465$	0.9426
<i>D. longicolla</i>	Equação	R^2 ajustado
Testemunha	$y = 1.6975x - 0.8125$	0.9587
MS04	$y = 0.245x + 0.6675$	0.8504
MS09	$y = 0.245x + 0.7575$	0.8079
MS27	$y = 0.0618x + 0.6408$	0.8232
MS28	$y = 0.071x + 0.6465$	0.9426
<i>S. sclerotiorum</i>	Equação	R^2 ajustado
Testemunha	$y = 1.9775x - 0.5125$	0.8750
MS04	$y = 0.62x + 0.475$	0.8528
MS09	$y = 0.595x + 0.4625$	0.8878
MS27	$y = 0.6475x + 0.575$	0.7784
MS28	$y = 0.6625x + 0.5125$	0.8237

Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Figura 27 - Placas aos 15 dias de avaliação: a) *Macrophomina phaseolina* em placa selada com a estipe MS28; b) Testemunha de *M. phaseolina*; c) *Fusarium tucumaniae* em placa selada; d) Testemunha *F. tucumaniae*; e) *Diaporthe longicolla* em placa selada; f) Testemunha de *D. longicolla*; g) *Sclerotinia sclerotiorum* em placa selada; h) Testemunha de *S. sclerotiorum*. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Estudos mostram a eficiência desta espécie sob diferentes modos de ação, destacando a capacidade de antibiose por compostos orgânicos voláteis (Ruangwong et al., 2021; Khong et al. 2022; You et al. 2022).

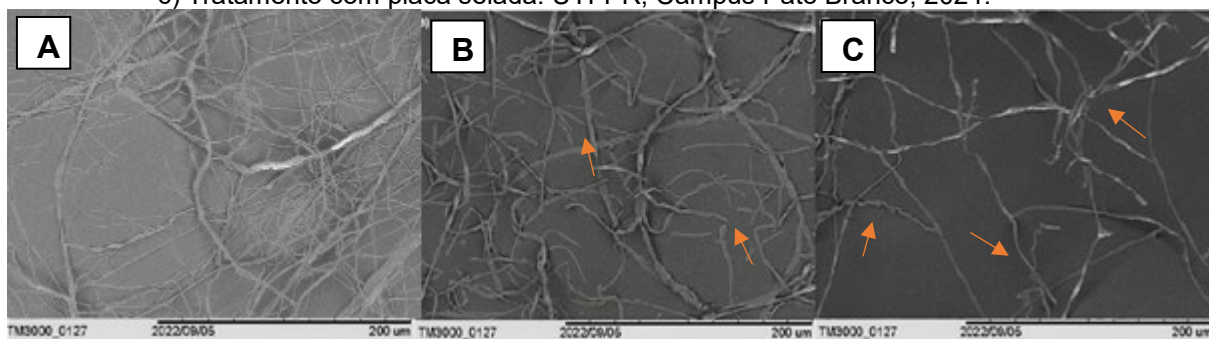
Tao et al. (2020) mostram o efeito dos metabólitos orgânicos voláteis dos isolados de *T. asperellum* ZJSX5003 e GDFS1009, as quais apresentaram redução do crescimento micelial de *F. oxysporum* em 73% e 74%, respectivamente. Caracterizando seis metabólitos voláteis, 2-Metil-1-propanol, 3-Metil-1-butanol, 3-Metil-3-buten-1-ol, Acetil metil carbinol, Butano-2,3-diol e 6- n-pentil-2H-piran-2-ona (6-PAP). Rajani et al. (2020) ao utilizarem estirpes de *Trichoderma* spp. endofíticos verificaram pelo ensaio de placa dupla, que os VOC's do agente reduzem o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* e *Fusarium oxysporum*, porém não apresentaram controle sobre *Macrophomina phaseolina*.

Silva et al. (2021) estudaram o efeito de VOC'S de diferentes idades de

colônias de *T. koningiopsis*, *T. asperelloides*, *T. longibrachiatum*, *T. lentiforme*, *T. perbedyi* e *T. azevedoi* sobre o crescimento de *S. sclerorum*. Os resultados mostram que os VOC'S produzidos por *T. azevedoi* CEN1241 foi o que demonstrou maior redução no crescimento de *S. sclerorum*, em especial nas fases de esporulação e na fase patogênica. O trabalho também conclui que a capacidade de esporulação do agente *T. lentiforme* CEN1416 não está relacionada com sua maior inibição do crescimento micelial do patógeno pela produção de VOC'S.

Em microscopia eletrônica de varredura pode-se observar os danos morfológicos nas hifas de *M. phaseolina*, sofridos pelos compostos orgânicos voláteis de *T. koningiopsis*, apresentando rompimento (Figura 28-B) e estreitamento de hifas (Figura 28-C).

Figura 28 - Microscopia eletrônica das hifas de *M. phaseolina* aos 15 dias, sendo: a) Testemunha; b) e c) Tratamento com placa selada. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Estudos mostram que tais compostos orgânicos voláteis, podem atuar como promotores de crescimento em plantas. Lee et al. (2016) verificaram que estirpes de *Trichoderma* spp. aumentaram em até 40% a biomassa vegetal. Os tomateiros expostos aos VOC's apresentaram aumento de biomassa, tamanho de parte aérea e comprimento radicular. Observou-se também que o crescimento do tomateiro era maior em função da duração da exposição aos voláteis.

4.4 CONCLUSÕES

Verificou-se que os quatro isolados de *T. koningiopsis* MS04, MS09, MS27 e MS28 foram eficientes no controle *in vitro* de *F. tucumaniae*, *M. phaseolina*, *D. longicolla* e *S. sclerotiorum*, apresentando como modo de ação a competição por espaço e nutrientes, micoparasitismo e antibiose por compostos orgânicos voláteis, observando danos nas hifas dos fitopatógenos. Pode-se constatar que não houve efeito dos metabólitos filtrados sobre os fitopatógenos pela metodologia aplicada.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F.B., RODRIGUES, L.M., COELHO, C. The still underestimated problem of fungal diseases worldwide. *Front. Microbiol.* 2019; 10:214. doi: 10.3389/fmicb.2019.00214.
- ANITA, S., PONMURUGAN, P., GANESH BABU, R. Significance of secondary metabolites and enzymes secreted by *Trichoderma atroviride* isolates for the biological control of *Phomopsis* canker disease. *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(45), pp. 10350-10357, 5 June, 2012. DOI:10.5897/AJB12.599
- BHERING, L.L. Rbio: A Tool For Biometric And Statistical Analysis Using The R Platform. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.17: 187-190p, 2017.
- DAS, S.N., SARMA, T. C., TAPADAR, S. A. In vitro evaluation of fungicides and two species of *Trichoderma* against *Phomopsis vexans* causing fruit rot of brinjal (*Solanum melongena* L.). **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 4, n. 9, p. 1-2, 2014.
- DENNIS, C., WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. *Transactions of the British Mycological Society*, Cambridge, v. 57, n. 1, p. 59-363, 1971.
- FRANÇA NETO, J.B., PEREIRA, L.A.G., COSTA, N.P., KRYZANOWSKI, F.C., HENNING, A.A. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja. Embrapa Soja, Londrina PR, 1988.
- GHISSI, V.C., REIS, E.M., DEUNER, C.C. Etiology of *phomopsis* root rot in soybean. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 40, n. 3, p. 270-272, 2014.
- INTANA, W., KHEAWLENG, S., SUNPAPAO, A. *Trichoderma asperellum* T76-14 liberou compostos orgânicos voláteis contra a podridão pós-colheita de frutas em melões (*Cucumis melo*) causada por *Fusarium incarnatum* . **J Fungi (Basileia)** 2021;7(1):46. Publicado em 12 de janeiro de 2021. doi:10.3390/jof7010046
- LEE, S., YAP, M., BEHRINGER, G., HUNG, R., BENNETT, J.W. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. **Fungal Biol Biotechnol.** 2016 Sep 29;3:7. doi: 10.1186/s40694-016-0025-7. PMID: 28955466; PMCID: PMC5611631.
- LI, N., ALFIKY, A., WANG, W. Reconhecimento e inibição mediados por compostos voláteis entre agentes de controle biológico de *Trichoderma* e *Fusarium oxysporum* . **Microbiol Frontal** . 2018;9:2614. Publicado em 31 de outubro de 2018. doi:10.3389/fmicb.2018.02614

MARQUEZ, E., MARTINS, I., MELLO, S.C.M. Antifungal potential of crude extracts of *Trichoderma* spp. **Biota Neotropica** 18(1): e20170418, 2018.

MENDOZA, J.L., PÉREZ, M.I., PRIETO, J.M., VELÁSQUEZ, J.D., OLIVARES, J.G., LANGARICA, H.R. Antibiose de cepas de *Trichoderma* spp nativas do nordeste do México contra o fungo patogênico *Macrophomina phaseolina*. **Braz. J. Microbiol.** 2015.

MIRONENKA, J., RÓŻALSKA, S., SOBOŃ, A., BERNAT, P. *Trichoderma harzianum* metabolites disturb *Fusarium culmorum* metabolism: Metabolomic and proteomic studies. **Microbiol Res.** 2021 Aug;249:126770. doi: 10.1016/j.micres.2021.126770. Epub 2021 Apr 21. PMID: 33932742.

LARRALDE-CORONA, C.P., SANTIAGO-MENA, M.R., SIFUENTES-RINCÓN, A.M., RODRÍGUEZ-LUNA, I.C., RODRÍGUEZ-PÉREZ, M.A., SHIRAI, K., NARVÁEZ-ZAPATA, J.A. Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. **Appl Microbiol Biotechnol.** 2008 Aug;80(1):167-77. doi: 10.1007/s00253-008-1532-0. Epub 2008 Jun 4. PMID: 18523764.

OSZUST, K., CYBULSKA, J., FRĄC, M. How do *Trichoderma* genus fungi win a nutritional competition battle against soft fruit pathogens? A report on niche overlap nutritional potentiates. **Int. J. Mol. Sci.** 2020;21:4235. doi: 10.3390/ijms21124235.

PIMENTEL, M.F., ARNÃO, E., WARNER, A.J., SUBEDI, A., ROCHA, L.F., SROUR, A., BOND, J.P., FAKHOURY, A.M. *Trichoderma* Isolates Inhibit *Fusarium virguliforme* Growth, Reduce Root Rot, and Induce Defense-Related Genes on Soybean Seedlings. **Plant Dis.** 2020 Jul;104(7):1949-1959. doi: 10.1094/PDIS-08-19-1676-RE. Epub 2020 May 12. PMID: 32396055.

PRATAP SINGH, S., KESWANI, C., PRATAP SINGH, S., SANSINENEA, E., XUAN HOAT, T. *Trichoderma* spp. mediated induction of systemic defense response in brinjal against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Curr Res Microb Sci.** 2021 Jul 24;2:100051. doi: 10.1016/j.crmicr.2021.100051. PMID: 34841342; PMCID: PMC8610364.

RAJANI, P., RAJASEKARAN, C., VASANTHAKUMARI, M.M., OLSSON, S.B., RAVIKANTH, G., UMA SHAANKER, R. Inhibition of plant pathogenic fungi by endophytic *Trichoderma* spp. through mycoparasitism and volatile organic compounds. **Microbiol Res.** 2021 Jan;242:126595. doi: 10.1016/j.micres.2020.126595. Epub 2020 Sep 17. PMID: 33017769.

REIS, E. M., BOARETTO, C. DANELLI, A. L. D. *Macrophomina phaseolina*: density and longevity of microsclerotia in soybean root tissues and free on the soil, and competitive saprophytic ability. **Summa Phytopathologica** jun 2014, Volume 40 N. 2

RUANGWONG, O.U., WONGLOM, P., SUWANNARACH, N., KUMLA, J., THAOCHAN, N., CHOMNUNTI, P., PITIJA, K., SUNPAPAO, A. Volatile Organic Compound from *Trichoderma asperelloides* TSU1: Impact on Plant Pathogenic Fungi. **J Fungi (Basel)**. 2021 Mar 5;7(3):187. doi: 10.3390/jof7030187. PMID: 33807949; PMCID: PMC7999943.

RUANGWONG, O.U., WONGLOM, P., SUWANNARACH, N., KUMLA, J., THAOCHAN, N., CHOMNUNTI, P., PITIJA, K., SUNPAPAO, A. Volatile Organic Compound from *Trichoderma asperelloides* TSU1: Impact on Plant Pathogenic Fungi. **J Fungi (Basel)**. 2021 Mar 5;7(3):187. doi: 10.3390/jof7030187. PMID: 33807949; PMCID: PMC7999943.

SRIDHARAN, A.P., SUGITHA, T., KARTHIKEYAN, G., NAKKEERAN, S., SIVAKUMAR, U. Metabolites of *Trichoderma longibrachiatum* EF5 inhibits soil borne pathogen, *Macrophomina phaseolina* by triggering amino sugar metabolism. **Microb Pathog**. 2021 Jan;150:104714. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104714. Epub 2020 Dec 28. PMID: 33383148.

SILVA, R.L., MUNIZ, P.C., PEIXOTO H.S., LUCCAS, G.D., TAVARES, S.J.B. MELLO, M. Mycelial Inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Trichoderma* spp. Volatile Organic Compounds in Distinct Stages of Development. **Pak J Biol Sci**. 2021 Jan;24(4):527-536. doi: 10.3923/pjbs.2021.527.536. PMID: 34486312.

SIVAN, A., CHET, I. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*. 1989;135:675–682. doi: 10.1099/00221287-135-3-675.

TAO L, ZHANG Y, LI Y, LUO L, ZHANG Z, CHEN J. [Antagonistic activity of volatile metabolites from *Trichoderma asperellum*]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2020 Jun 25;36(6):1181-1189. Chinese. doi: 10.13345/j.cjb.190442. PMID: 32597067.

VISMARA, L.S. Óleos essenciais na indução de resistência em morangos ao mofo cinzento, à *Botrytis cinerea* in vitro e ação toxicológica. Tese (Doutorado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, PR, 2019.

YOU J, LI G, LI C, ZHU L, YANG H, SONG R, GU W. Biological Control and Plant Growth Promotion by Volatile Organic Compounds of *Trichoderma koningiopsis* T-51. **J Fungi (Basel)**. 2022 Jan 28;8(2):131. doi: 10.3390/jof8020131. PMID: 35205885; PMCID: PMC8875031.

ZHANG, J., CHEN, G.-Y., LI, X.-Z., HU, M., WANG, B.-Y., RUAN, B.-H., ZHOU, H., ZHAO, L.-X., ZHOU, J., DING, Z.-T. Phytotoxic, antibacterial, and antioxidant activities of mycotoxins and other metabolites from *Trichoderma* sp. *Nat. Prod. Res*.

2017;31:2745–2752. doi: 10.1080/14786419.2017.1295235.

ZHANG, F., GE, H., ZHANG, F., GUO, N., WANG, Y., CHEN, L., JI, X., LI, C. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant Physiol Biochem.** 2016 Mar;100:64-74. doi: 10.1016/j.plaphy.2015.12.017. Epub 2016 Jan 8. PMID: 26774866.

ZEILINGER, S., GALHAUP, C., PAYER, K., WOO, S.L., MACH, R.L., FEKETE, C., LORITO, M., KUBICEK, C.P. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. **Fungal Genet Biol.** 1999.

5. ESTUDO 03: SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO E POTÁSSIO E ANÁLISE NUTRICIONAL DE SEIVA

5.1 INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é um dos nutrientes com disponibilidade limitada no solo. Na planta desempenha papel fundamental em processos bioquímicos, como produção de energia, respiração, fotossíntese e processos enzimáticos; constituindo-se como importante componente da membrana celular e de ácidos nucleicos. Apesar da quantidade de fósforo total ser alta no solo, sua disponibilidade para as plantas é limitada, principalmente em se tratando de solos ácidos que retém com maior facilidade o nutriente (ANAND et al. 2016).

Grandes quantidades de fósforo são aplicadas em solos brasileiros para suprir a rápida imobilização de fósforo inorgânico, por se tratarem de solos altamente intemperizados, ricos em ferro e alumínio (WITHERS et al. 2018).

Já o potássio (K) não é um elemento estrutural, porém é considerado um catalisador de reações celulares, responsável pelo balanço iônico e abertura estomática (BIDWELL, 1974). Em solos tropicais, os teores de potássio são geralmente baixos, fazendo-se necessária a adubação suplementar com KCl (ANDA, 2008).

Diferentes estudos caracterizam os benefícios da utilização de isolados de *Trichoderma* spp. em associação com raízes de plantas, entre eles, o aumento na absorção de nutrientes, o que favorece a promoção de crescimento de feijão, trigo e soja (Öğüt, 2005; Bononi et al. 2020).

Trichoderma spp. podem produzir uma vasta gama de ácidos orgânicos capazes de solubilizar fosfato inorgânico presente no solo, como ácido cítrico, cumárico, glucurônico, acético, butírico e fumárico (SCERVINO et al. 2010; ZHAO et al. 2013). Se tratando de solubilização de potássio, também ocorre a liberação de ácidos orgânicos como ácido cítrico, oxálico e glucônico, que levam a dissociação de silicatos, mica e feldspato (VASSILEVA et al. 2000).

Desta forma, o objetivo do trabalho foi verificar se os isolados de *Trichoderma koningiopsis* prospectadas, são eficientes solubilizadoras de fósforo e potássio *in vitro*, verificando também a composição nutricional da seiva das plantas de soja.

5.2 PROCEDIMENTO METODOLÓGICO

5.2.1 Solubilização de Fósforo

Para o ensaio de solubilização de fosfato utilizou-se o meio de cultura NBRIP (*National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium*) modificado (NAUTIYAL, 1999), composto por 5 g de cloreto de magnésio; 0,5 g de sulfato de magnésio; 0,2 g de cloreto de potássio; 0,1 g de sulfato de amônio; 5 g de fosfato de potássio tribásico; 10 g de glicose e 20 g de ágar.

O meio foi vertido em tubos de ensaio, que após solidificado, foi transferido um disco de micélio de 4 mm de diâmetro, de cada isolado de *T. koningiopsis*.

Em seguida, os tubos foram vedados com plástico filme de PVC e incubados em BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas. As avaliações foram realizadas em intervalos de 24 horas até o sétimo dia, e por meio de régua milimetrada mensurou-se a zona de solubilização indicada pela alteração da cor do meio de cultura e solubilização do nutriente.

Para o cálculo do índice de solubilização (IS), adaptou-se a metodologia utilizada por Barraquero, Baya, Cormenzana (1976) e por Chagas Junior et al. (2010), usando-se a razão entre o diâmetro do halo de solubilização e o diâmetro da colônia bacteriana que, neste caso, foi o diâmetro do tubo de ensaio com 1,5 cm; Correspondendo a:

$$IS = \frac{\text{Diâmetro da zona de solubilização (cm)}}{\text{Diâmetro da colônia (cm)}}$$

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetição por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk; seguido pela ANOVA (Scott-Knott à 5% de probabilidade) e análise de regressão no software Rbio (BHERING, 2017).

5.2.2 Solubilização de Potássio

Utilizou-se o meio Agar Pikovskaya Modificado seguindo a metodologia proposta por Velázquez-Gurrola et al. (2015), composto por 0,5 g de extrato de levedura; 10 g de glicose; 5 g de KNO₃; 0,5 g de (NH₄)₂SO₄; 0,1 g de MgSO₄; 0,0001 g de MnSO₄; 0,0001 g de FeSO₄; 0,0026 g de Verde de Bromocresol, todos dissolvidos em 1 L de água destilada, pH ajustado em 7,0 e adicionado 20 g de ágar, seguido de autoclavagem por 15 min a 120°C.

O meio foi vertido em tubos de ensaio, após solidificado, transferiu-se um disco de micélio com 4 mm de diâmetro, de cada isolado de *T. koningiopsis*.

Em seguida, os tubos foram vedados com plástico filme de PVC e incubados em BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas. As avaliações foram realizadas em intervalos de 24 horas até o quarto dia, e por meio de régua milimetrada mensurou-se a zona de solubilização indicada pela alteração da cor do meio de cultura da cor azul para amarela.

Para o cálculo do índice de solubilização (IS), adaptou-se a metodologia utilizada por Barraquero, Baya, Cormenzana (1976) e por Chagas Junior et al. (2010), usando-se a razão entre o diâmetro do halo de solubilização e o diâmetro da colônia bacteriana que, neste caso, foi o diâmetro do tubo de ensaio com 1,5 cm; Correspondendo a:

$$IS = \frac{\text{Diâmetro da zona de solubilização (cm)}}{\text{Diâmetro da colônia (cm)}}$$

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetição por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk; seguido pela ANOVA (Scott-Knott à 5% de probabilidade) e análise de regressão no software Rbio (BHERING, 2017).

5.2.3 Análise de seiva de plantas de soja inoculadas com *T. koningiopsis*

O experimento foi conduzido na casa de vegetação da UTFPR Campus Dois Vizinhos. A unidade experimental composta por vasos com capacidade de oito litros, contendo substrato comercial.

Preparou-se uma suspensão de esporos na concentração de 1×10^{10} esporos por mL de cada isolado de *T. koningiopsis* testada. As sementes de soja utilizadas foram da cultivar Brasmax Zeus IPRO, as quais foram tratadas utilizando 4 mL da solução de esporos por quilograma de sementes.

As plantas foram conduzidas até estágio V7, onde foram coletados dois trifólios de cada repetição, estes trifólios foram prensados em prensa hidráulica adaptada, e a seiva retida em eppendorfs acoplados. Os eppendorfs com a seiva foram centrifugados à 10.000 rpm por 5 minutos. Em seguida, transferiu-se 100 µl do sobrenadante para outro eppendorf acrescido de 900 µl de etanol 95°. Posteriormente esta solução foi vertida em cubetas de acrílico e as leituras realizadas no equipamento Nir (Near Infrared Reflectance) (Figura 29).

Figura 29- Procedimento para análise de seiva: a) Coleta dos trifólios da soja; b) Prensagem das folhas para obtenção da seiva; c) Centrifugação; d) Adição do etanol; e) Leitura no Nir; f) Laudo gerado pelo programa. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Pelo programa foram mensurados: nitrogênio total, fósforo, potássio, magnésio, enxofre, boro, cobre, ferro, manganês e zinco.

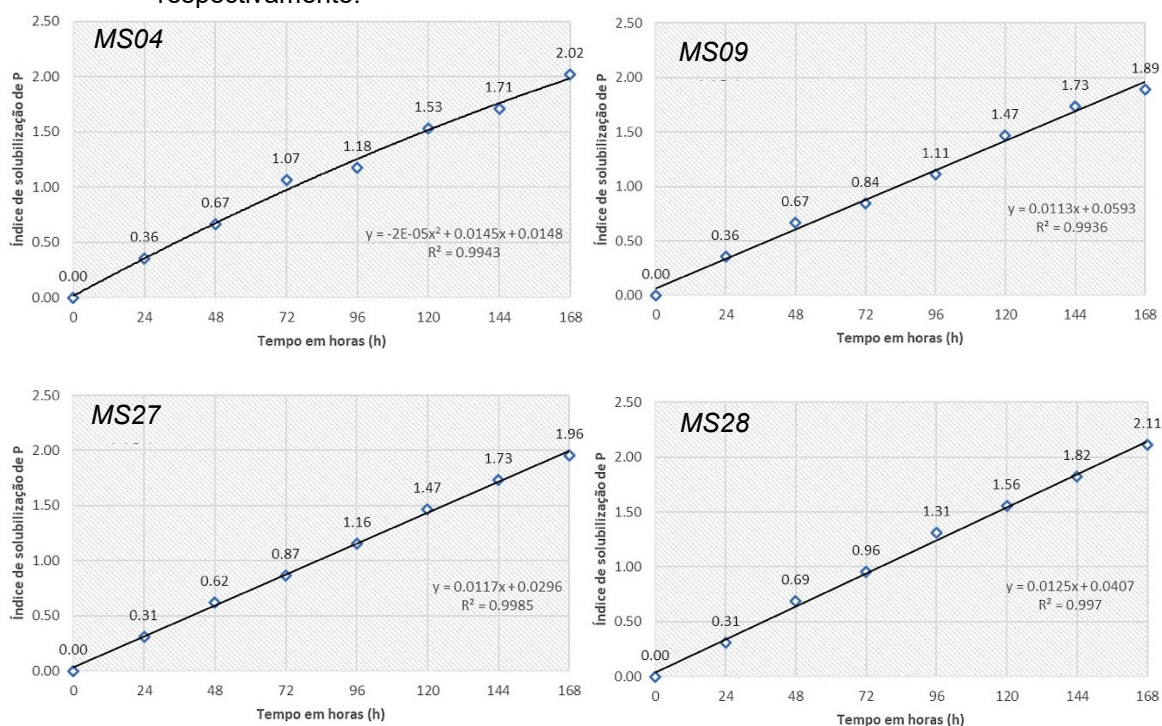
O delineamento utilizado foi o inteiramente ao acaso, com quatro repetições por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido pela ANOVA, Scott-Knott à 5% de probabilidade, no software Rbio (BHERING, 2017).

5.3 RESULTADOS E DISSCUSSÕES

5.3.1 Solubilização de fósforo e potássio

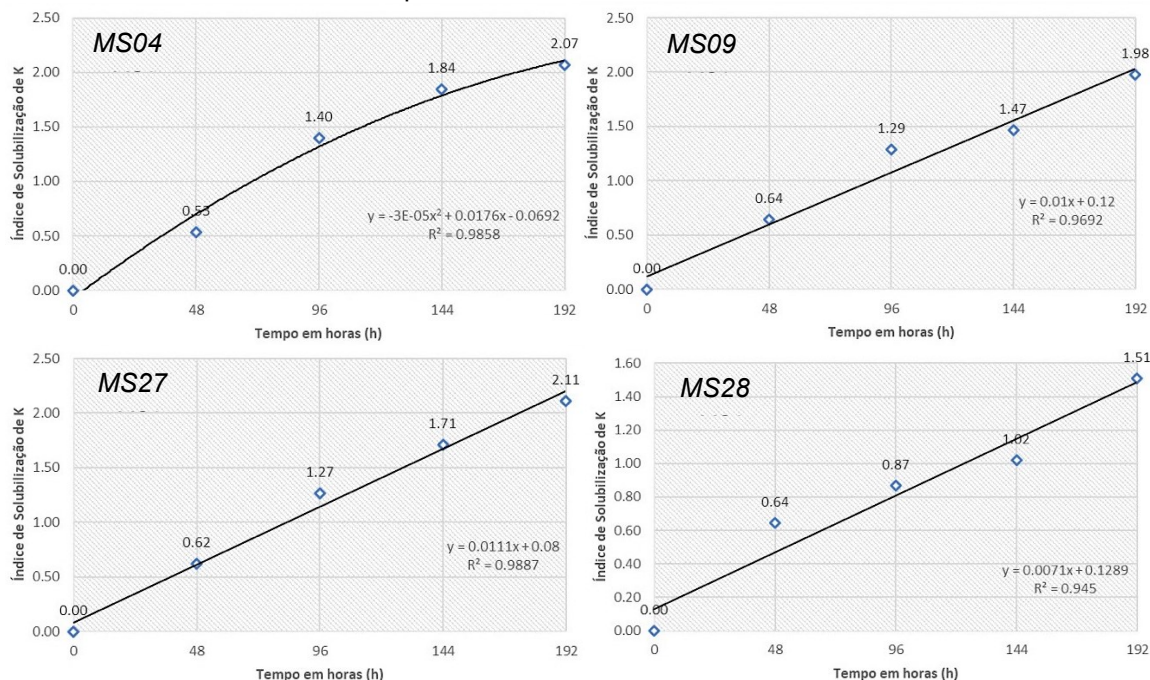
Constatou-se que os quatro isolados de *T. koningiopsis* estudadas comportaram-se como bons solubilizadores de fósforo e potássio em meio NBRIP e em meio Pikovskaya (Figuras 30 e 31), apresentando aumentos consideráveis do halo de solubilização no decorrer dos dias avaliados.

Figura 30: Índice de Solubilização (IS) de fósforo de *T. koningiopsis* isolado MS04, MS09, MS27 e MS28, respectivamente, em meio de cultura NBRIP, no decorrer de sete dias de avaliação. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024. CVs= 9,49%; 14,54%; 10,64%; 11,96%, respectivamente.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

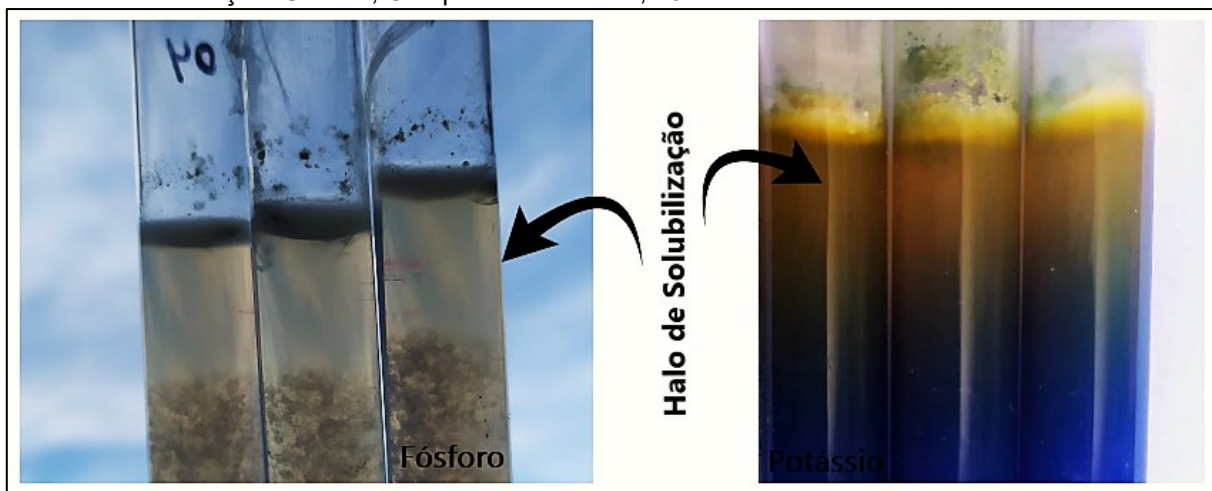
Figura 31: Índice de Solubilização (IS) de potássio de *T. koningiopsis* isolado MS04, MS09, MS27 e MS28, respectivamente, em meio de cultura Pikovskaya Modificado, no decorrer de quatro dias de avaliação. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024. CVs= 16,3%; 6,02%; 10,99%; 12,77%, respectivamente.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

O halo/gradiente de solubilização pode ser notado pela solubilização de fósforo promovido pelos isolados; e pela mudança de pH (entre 3,7 a 5,5) do meio de cultura promovida pelo indicador Verde de Bromocresol, devido a liberação de ácidos orgânicos como ácido láctico, cítrico, málico, tartárico e succínico pelo microrganismo, reduzindo o pH e por consequência aumentando a solubilização de potássio (PRAJAPATI et al. 2012) (Figura 32).

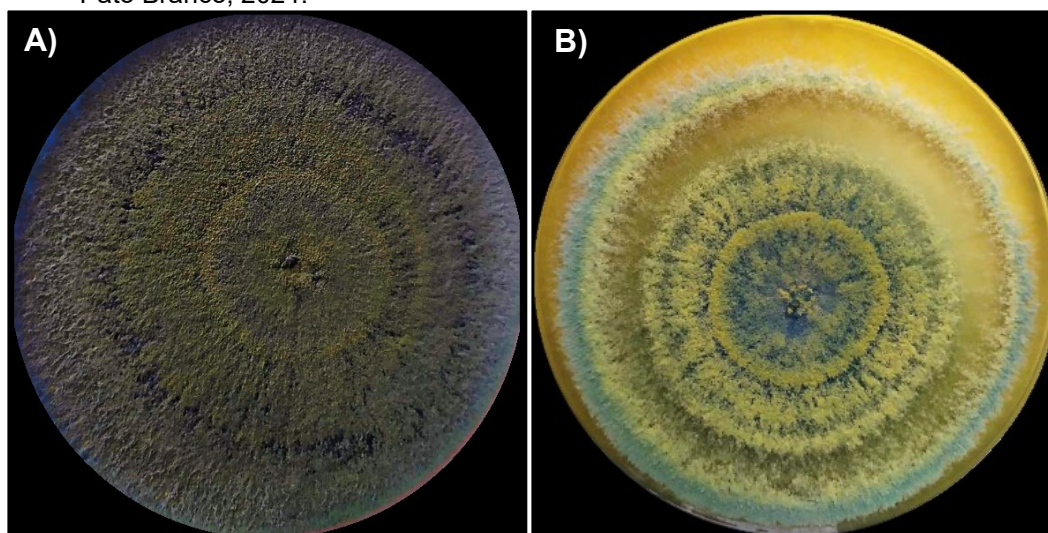
Figura 32 - Halo/gradiente de solubilização de fósforo e potássio do isolado MS04 no quarto dia de avaliação. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Na figura abaixo pode-se observar a diferença entre um isolado de *Trichoderma* sp. que não solubiliza potássio (Figura 33-A) e o isolado MS09 que solubiliza o nutriente (Figura 33-B), havendo a mudança de coloração no meio de cultura de azul para amarela.

Figura 33 - Placa de Petri contendo o meio Pikovskaya modificado, sendo A) Isolado de *Trichoderma* spp. não solubilizadora de potássio e B) Isolado MS09 de *T. koningiopsis*. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Bononi et al. (2020) observaram que ao adicionarem ao tratamento estirpes de *Trichoderma* spp. isolados de solo amazônico com potencial solubilizador de fósforo, houve aumento de biomassa de plantas de soja, mesmo sem a aplicação de fosfato natural e supertriplo. Porém, os tratamentos que continham a estirpe do microrganismo combinadas com estas fontes de fosfato, obtiveram um maior ganho de biomassa, onde para as raízes, por exemplo, houve um aumento de 111,2% a 156,1%.

Além dos inúmeros estudos que exploram as vantagens da inoculação do agente na solubilização de nutrientes, para ganho de biomassa e produtividade em diversas culturas; estudos revelam que o uso de *Trichoderma* spp. faz com que haja rápida maturação, estabilização e aumento de fósforo disponível na vermicompostagem. Busato et al. (2021) verificaram que a inoculação combinada de estirpes de *Trichoderma* spp. e fosfato natural, aumentaram o teor de ácidos húmicos e de fósforo solúvel em ácido cítrico do vermicomposto.

Além de *Trichoderma* spp. outros fungos são citados como solubilizadores de potássio no solo, como o gênero *Saccharomyces*, *Schawnniomyces*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Aspergillus*, além de fungos micorrízicos e ectomicorrízicos (HARO; BENITO, 2019). Bactérias também são citadas como potenciais agentes solubilizadores, como *Bacillus mucilaginosus*, *B. edaphicus*, *B. circulans* e *Paenibacillus* spp., capazes de solubilizar os minerais biotita, feldspato, ilita, muscovita, ortoclásio e mica (ETESAMI; EMAMI; ALIKHANI, 2017).

Essa solubilização de nutrientes observada *in vitro* reflete no aumento do elemento na seiva da planta. Na tabela 01 observa-se um aumento médio de 12% no nível de P encontrado na seiva, e de 23% de potássio quando utilizado os isolados MS04 e MS28 no tratamento de sementes de soja, e de 14% e 7,5% utilizando MS09 e MS27, respectivamente. Além de uma diferença significativa nos níveis de magnésio, boro, cobre e zinco, quando as sementes foram tratadas com o isolado MS28.

Tabela 04 - Concentração de nutrientes (mg.L⁻¹) na seiva de plantas de soja tratadas com *T. koningiopsis* isolados MS04, MS09, MS27 e MS28, em estágio V7 utilizando o equipamento NIR. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.

Trat.	N	P	K	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Z
TEST	5418.19 a	510.85 b	4431.84 d	327.59 b	220.41 a	2.11 b	1.41 b	4.42 a	13.47 a	5.32 b
MS04	5489.67 a	590.83 a	5435.96 a	221.89 b	221.89 a	2.74 b	1.69 b	4.45 a	16.25 a	5.93 b
MS09	5357.00 a	555.96 a	5052.33 b	357.39 b	222.04 a	2.74 b	1.62 b	4.43 a	14.54 a	6.45 b
MS27	5419.62 a	582.07 a	4759.01 c	326.31 b	222.72 a	2.79 b	1.42 b	4.42 a	15.09 a	5.81 b
MS28	5275.24 a	558.52 a	5483.50 a	417.26 a	224.89 a	3.58 a	2.09 a	4.66 a	18.60 a	8.87 a
CV (%)	19.01	15.83	13.84	11.11	10.89	16.30	14.02	8.40	18.66	29.55

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0, 05$).

Fonte: Arquivo pessoal (2023)

O mesmo é observado por Song et al. (2023) ao verificarem o potencial da aplicação de *T. viride* em plantas de *Melilotus officinalis*, em solubilizar fósforo inorgânico insolúvel e mineralização deste fósforo, fazendo com que haja além do aumento de parte aérea das plantas, e peso seco das raízes, o aumento do teor de fósforo nos tecidos das mudas em comparação com a testemunha pelo método do azul de molibdênio.

A interação envolvendo a planta e sua simbiose com *Trichoderma* spp., culmina na promoção de crescimento e ganho de biomassa, pois o microrganismo auxilia liberando hormônios de crescimento como citocinina, giberilina e ácidos, além de solubilizar nutrientes muitas vezes indisponíveis como fosfato, potássio, cobre e zinco (MENDOZA et al. 2018).

5.4 CONCLUSÕES

Pode-se verificar que os isolados de *T. koningiopsis* estudadas, são bons agentes solubilizadores de fósforo e potássio, além de ocorrer um incremento nutricional na seiva das plantas.

REFERÊNCIAS

- ANAND, K., KUMARI, B. & MALLICK, M. A. Phosphate solubilizing microbes: An effective and alternative approach as biofertilizers. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 8, 37–40, <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijpps/article/view/9747> (2016).
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS - ANDA. Anuário Estatístico do Setor de Fertilizantes. São Paulo, 2008.
- BHERING, L.L. Rbio: A Tool For Biometric And Statistical Analysis Using The R Platform. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.17: 187-190p, 2017.
- BIDWELL, R.G.S. Plant physiology. Nova Iorque: MacMillan, 1974.
- BONONI, L., CHIARAMONTE, J.B., PANSA, C.C., MOITINHO, M.A., MELO, I.S. Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. *Sci Rep.* 2020 Feb 18;10(1):2858. doi: 10.1038/s41598-020-59793-8. PMID: 32071331; PMCID: PMC7028723.
- BUSATO, J.G., FERRARI, L.H., CHAGAS JUNIOR, A.F., DA SILVA, D.B., DOS SANTOS PEREIRA, T., DE PAULA, A.M. *Trichoderma* strains accelerate maturation and increase available phosphorus during vermicomposting enriched with rock phosphate. *J Appl Microbiol.* 2021 Apr;130(4):1208-1216. doi: 10.1111/jam.14847. Epub 2020 Sep 24. PMID: 32916018.
- ETESAMI, H., EMAMI, S., ALIKHANI, H.A. Potassium solubilizing bacteria (KSB):: Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects—A review. *J. Soil Sci. Plant. Nutr.* 2017;17:897–911. doi: 10.4067/S0718-95162017000400005.
- MENDOZA, A., ZAID, R., LAWRY, R., HERMOSA, R., MONTE, E., HORWITZ, B. A., MUKHERJEE, P. K. Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: role of the fungal secretome. *Fungal Biology Reviews*, v. 32, n. 2, p. 62-85, 2018.
- NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters*, 1999. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- ÖĞÜT, M., AKDAĞ, C., DÜZDEMİR, O., SAKIN, M.A. Single and double inoculation with *Azospirillum/Trichoderma*: The effects on dry bean and wheat. *Biol. Fertil. Soils.* 2005;41:262–272. doi: 10.1007/s00374-004-0818-3.
- PRAJAPATI, K., SHARMA, M. C., MODI, H. A. Isolation of two potassium solubilizing fungi from ceramic indus try soils. *Life Science Leaflets*, India, v.5, p.71-75, 2012.

SCERVINO, J.M., MESA, M.P., MONICA, I.D., RECCHI, M., MORENO, N.S., GODEAS, A. Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salt solubilization. *Biol. Fertil. Soils*. 2010;46:755–763. doi: 10.1007/s00374-010-0482-8.

SONG, M., WANG, X., XU, H., ZHOU, X., MU, C. Effect of *Trichoderma viride* on insoluble phosphorus absorption ability and growth of *Melilotus officinalis*. *Sci Rep*. 2023 Jul 31;13(1):12345. doi: 10.1038/s41598-023-39501-y. PMID: 37524898; PMCID: PMC10390638.

VELÁZQUEZ-GURROLA, A., RAMOS-ALEGRÍA, M.P. Beneficios de microorganismos solubilizadores de P y K en la recuperación y mantenimiento de suelos agrícolas. Lima, Peru, ProHass, 2015. pp 495-499.

VASSILEVA, M.; AZCON, R.; BAREA, J.; VASSILEV, N. Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*, v. 35, n. 7, p. 693-697, 2000. DOI: 10.1016/S0032-9592(99)00132-6.

WITHERS, P. J. A.; RODRIGUES, M.; SOLTANGHEISI, A.; CARVALHO, T. S.; GUILHERME, L. R.; BENITES, V. D. M.; GATIBONI, L. C.; SOUSA, D. M. G.; NUNES, R. S.; ROSOLEM, C. A.; ANDREOTE, F. D.; OLIVEIRA JUNIOR, A.; COUTINHO, E. L. M.; PAVINATO, P. S. Transitions to sustainable management of phosphorus in Brazilian agriculture. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 2537, 2018.

ZHAO, K., PENTTINEN, P., ZHANG, X., AO, X., LIU, M., YU, X., CHEN, Q. Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. *Microbiol. Res*. 2014;169:76–82. doi: 10.1016/j.micres.2013.07.003.

6. ESTUDO 04: EFEITO DE *T. koningiopsis* NA RESPOSTA DE DEFESA E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE SOJA

6.1 INTRODUÇÃO

A ativação da resposta de defesa vegetal é dependente de elicitores, ou também chamados de indutores de resposta de defesa, os quais são liberados pelo microrganismo envolvido, os exoelicitores, e os endolicitores que são os próprios tecidos vegetais (MONTESANO, 2003).

Após o contato com este agente elicitor, desencadeia-se uma cascata de sinalização na planta, promovendo a indução de resistência. Esta pode ser classificada em Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) e Resistência Sistêmica Induzida (RSI).

A RSA é ativada a partir de um sinal liberado por um sítio de necrose/infecção, o qual é transmitido por toda a planta a fim de evitar futuras infecções. A indução é via salicinato dependente, e neste caso ocorre a produção de fitoalexinas, deposição de calose, e expressão de genes de defesa como a expressão de proteínas relacionadas a patogêneses (PR-Proteínas). Já a RSI não produz sintomas ou sinais, mas ativa a defesa de forma sistêmica, está correlacionada a organismos não patogênicos, e sua rota preferencial é do ácido jasmônico e etileno (SILVA et al. 2008).

Alguns autores relatam outro fator de resistência, a Resistência Induzida (RI), a qual ativa a defesa da planta contra patógenos biotróficos, necrotróficos e contra estresses abióticos. Esta por sua vez é ativada pelo ácido β -aminobutírico, e sinalizada por ácido abscísico (Aba) (TON et al. 2005) (Figura 34).

Figura 34 – Esquematisação dos três tipos de resistências encontradas na planta, sendo sistêmica adquirida, sistêmica induzida e resistência induzida. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

As plantas ao responderem aos indutores são capazes de manter uma memória imunológica no decorrer do tempo. A resposta imune inata é ativada quando padrões moleculares associados a microrganismos (MAMP), ou seja, moléculas de ataque, são reconhecidas pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRR) localizados na membrana celular; estes também podem reconhecer os padrões moleculares associados ao dano (DAMP) formados por moléculas hidrolíticas no tecido vegetal (MONTE, BETTIOL, HERMOSA, 2021).

Estes padrões induzem a imunidade inata desencadeada por MAMP ou PAMP, e imunidade inata desencadeada por efetores (ETI) (JAROSZUK-ŚCISEŁ, 2019).

Trichoderma spp. provoca a defesa do tipo ETI e também a imunidade inata desencadeada por MAMP. A defesa ETI faz com que haja estresse oxidativo, porém *Trichoderma* spp. abre vantagem no ambiente rizosférico por suportar o estresse e liberação de espécies reativas de oxigênio. Para limitar o acesso de *Trichoderma* spp. ao apoplasto da epiderme e do cortex, há a regulação do ácido salicílico que controla a deposição de calose, impedindo sua proliferação para o sistema vascular (MONTE, BETTIOL, HERMOSA, 2021). Alonso-Ramirez et al. (2014) mostra que em plantas de

Arabidopsis onde não há produção de ácido salicílico e por consequência não ocorre deposição de calose, *Trichoderma* spp. consegue penetrar via raízes, atingir o sistema vascular e parte aérea, ocasionando um colapso na planta.

Além de ativar o sistema de defesa vegetal, *Trichoderma* spp. está associado à promoção de crescimento de plantas, exercendo um papel de simbiose. Sua colonização e rápido crescimento se deve ao fornecimento de sacarose pela planta, em contrapartida, o fungo libera fitormônios promotores de crescimento como giberilinas, auxinas e ácido indolacético (IAA) que proporcionam o aumento da colonização da rizosfera e rizoplane pelas raízes (DRUZHININA et al. 2011; ZHANG et al. 2013).

6.2 PROCEDIMENTO METODOLÓGICO

6.2.1 Resposta de defesa de plantas de soja inoculadas com *T. koningiopsis*

6.2.1.1 Determinação de Gliceolina

Para este teste foi seguido o método proposto por Stangarlin et al. (2010). Sementes de soja da cultivar TMG 7062 IPRO foram semeadas em bandejas com areia, irrigadas diariamente com água deionizada por um período de oito dias. Ao fim deste período foram retirados apenas os cotilédones isentos de injúrias.

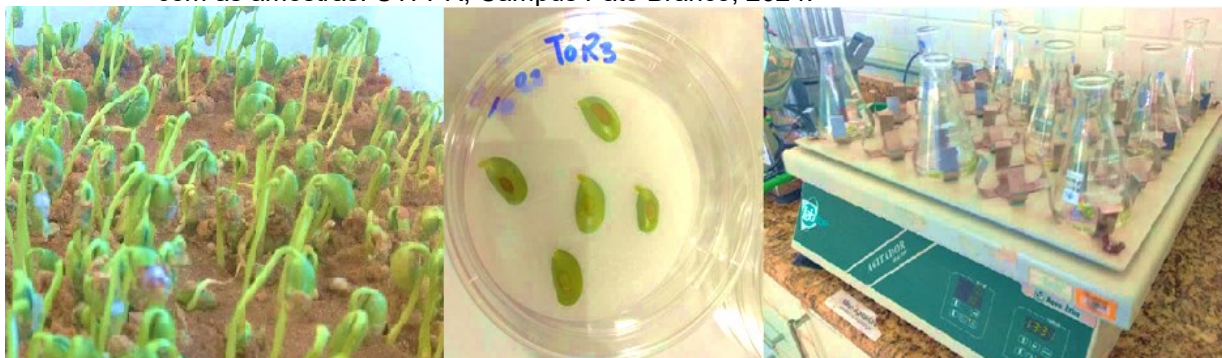
Os cotilédones foram higienizados com água deionizada, e com auxílio de um bisturi foram realizados cortes longitudinais na superfície adaxial de cada cotilédone. Em placas de Petri® contendo um disco de papel Gesrmitest®, umedecido com 1 mL de água ionizada, foram postos 5 cotilédones em cada placa, compondo uma unidade experimental.

Sobre cada cotilédone, foi adicionado 20 µL de uma suspensão de esporos na concentração de 1×10^{10} esporos por mL de cada isolado de *T. koningiopsis*. Em

seguida, as placas foram tampadas e vedadas com papel alumínio, e dispostas em BOD a 25 °C por um período de 20 horas.

Após este período, os cotilédones de cada placa foram pesados em balança analítica, e transferidos para erlenmeyer contendo 10 mL de água deionizada. Na sequência, os frascos foram colocados sobre agitador orbital shaker a 160 rpm por uma hora. Fez-se a leitura do sobrenadante em espectrofotômetro a 258 nm em cubeta de quartzo (Figura 35).

Figura 35 - Procedimento para quantificação das gliceolinas: a) Cotilédones emergidos na areia, b) Cotilédones dispostos em disco de germitest em placa de Petri; c) Agitador orbital shaker com as amostras. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

O experimento foi realizado em DIC, com quatro repetições por tratamento, sendo eles a suspensão de quatro *Trichoderma spp.*, mais a testemunha composta por água deionizada.

6.2.1.2 Cultivo das plantas em casa de vegetação

Sementes de soja da cultivar Brasmax Zeus IPRO foram semeadas em vasos com capacidade de 8 L contendo substrato comercial. Os tratamentos foram compostos por quatro repetições de vasos, contendo duas plantas de soja cada, totalizando 5 tratamentos, sendo os quatro isolados MS04, MS09, MS27, MS28, mais a testemunha (isenta de inóculo), em delineamento inteiramente ao acaso.

Quando a soja atingiu estágio V3, realizou-se a inoculação de *T. koningiopsis*

via pulverização na parte aérea, utilizando-se uma concentração de 1×10^{10} esporos por mL de cada isolado de *T. koningiopsis* testada. Após 24 horas, aplicou-se como desafiante uma solução de esporos de oídio (*Erysiphe diffusa*) na concentração de 1×10^6 esporos por mL.

Para quantificação das variáveis de resistência no decorrer do tempo, o material vegetal para as análises foi coletado em cinco etapas, identificadas como tempo 01: 0 horas; tempo 02: 48 horas; tempo 03: 96 horas; tempo 04: 144 horas e tempo 05: 192 horas após aplicação.

6.2.1.3 Preparo do extrato enzimático

Foi seguida a metodologia desenvolvida por Moerschbacher (1988) descrito por Guzzo & Martins (1996). Para a preparação do extrato, as amostras de tecidos (cerca de 0,3g) foram maceradas em almofariz contendo 0,2g de micropérolas de vidro, 0,1g de resina Dowex e 0,2g de PVPP (polivinilpolipirrolidona), este material foi vertido em eppendorf e acrescentado 0,5 mL de tampão borato de sódio, o deixado reagir por um período de 5 minutos. Posteriormente, o material foi centrifugado a 20.000 g, a 4 °C por 20 minutos, e o sobrenadante recolhido em outro tubo Eppendorf identificado (Figura 36).

Figura 36 - Procedimento para obtenção do extrato enzimático, maceração da amostra, extrato vertido em tubos Eppendorf e posterior centrifugação. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

6.2.1.4 Determinação das proteínas totais

Para quantificar o total de proteínas, seguiu-se a metodologia de Bradford (1976). Em tubos de ensaio enumerados, utilizou-se 40 µl do extrato vegetal descrito no item 2.2.1, adicionou-se 460 µL de água destilada e 1 mL do reagente Bio-Rad (Sigma). Em seguida foi agitado em vórtex e lido em espectrofotômetro, procedendo à leitura a 595 nm para obter valor da absorbância.

6.2.1.5 Determinação da quitinase

Em tubos Eppendorf, foram transferidos 100 mg de substrato para quitinase, 400 µL tampão fosfato de sódio 0,2 M, 500 µL do extrato vegetal preparado e posto em banho maria à 50 °C por 40 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado a 7000 rpm 10 minutos, e o sobrenadante transferido para um novo Eppendorf, e realizada leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

6.2.1.6 Determinação da β 1,3 glucanase

Metodologia desenvolvida por Wirth & Wolf (1990) descrito por Guzzo e Martins (1996). Em tubos Eppendorf adicionou-se 200 µL de extrato vegetal, mais 400 µL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e 200 µL de substrato Curdlan (Sigma).

Em seguida, os Eppendorfs foram incubados em banho maria por um período de 50 min na temperatura de 40 °C. A reação foi interrompida adicionando 200 µL de HCL 2N e resfriado em gelo por 10 min. Posteriormente, o material foi centrifugado por 5 minutos, a 10.000 g para remoção do substrato insolúvel não hidrolisado. E a absorbância do sobrenadante determinada em espectrofotômetro à 600 nm.

6.2.1.7 Determinação da fenilalanina amônia-liase (FAL)

Seguiu-se a metodologia proposta por Rodrigues, Bezerra e Coelho (2006). Pesou-se 0,5 g do material vegetal, transferido para cadinhos e macerados com 4 mL do tampão TRIS – HCL pH 8,0. O material foi vertido em eppendorf e centrifugado a 6000 g na temperatura de 4 °C por 10 minutos. Uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foi transferida para um tubo de ensaio identificado, acrescentando mais 3 mL do tampão de extração TRIS. Na sequência, a solução foi agitada em vórtex, obtendo-se assim, o extrato enzimático.

Posteriormente, transferiu-se 1,5 mL do extrato enzimático, acrescidos de 1 mL do tampão de extração e 0,5 mL de fenilalanina. Em seguida incubou-se em banho-maria por um período de 30 minutos na temperatura de 40 °C. Após incubação, a reação foi interrompida com banho de gelo. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 290 nm em cubeta de quartzo.

6.2.1.8 Determinação dos compostos fenólicos totais

A análise dos compostos fenólicos totais foi realizada em duas etapas, seguindo o método adaptado de Bieleski e Turner (1966). Pesou-se 0,3 g de material vegetal, adicionando 5 mL da solução MCA (metanol, clorofórmio, água 6 / 2,5 / 1,5), e macerado em almofariz. O material resultante foi vertido em Eppendorf e centrifugado a 6.000 rpm, na temperatura de 20 °C por 20 minutos, coletando o sobrenadante. Do resíduo sólido restante foi realizado nova extração, adicionando mais 4 mL de MCA, agitando no vórtex e centrifugando novamente a 6.000 rpm, 20 °C por 20 minutos. O sobrenadante coletado é adicionado ao anterior, obtendo o extrato MCA. Neste extrato adicionou-se 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água deionizada, e centrifugado a 6.000 rpm, 20 °C por 15 minutos.

A segunda etapa é composta pela determinação de fenóis totais pelo método

adaptado de Jennings (1991). Retirou-se 0,5 mL da parte superior do sobrenadante, adicionando 0,5 mL de água + 0,5 mL do reagente de Folin – Ciocalteau diluído 1:10, e misturada em vórtex. Após 15 minutos, é adicionado 5 mL do reagente alcalino A (preparado de carbonato de sódio 2% em solução de hidróxido de sódio 0,1 N). Agitou-se novamente em vórtex e após 50 minutos fez-se a leitura em espectrofotômetro a 760 nm.

6.2.1.9 Análise estatística

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetição por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk; por se tratar de um experimento qualitativo x quantitativo, realizou-se a ANOVA (Scott-Knott à 5% de probabilidade) seguido da análise de regressão no software Rbio (BHERING, 2017). Para o ensaio de gliceolinas realizou-se apenas ANOVA (Tukey a 5% de probabilidade).

6.2.2 Efeito na promoção de crescimento de plantas de soja

O experimento foi conduzido na casa de vegetação da UTFPR Campus Dois Vizinhos. A unidade experimental foi composta por vasos de PVC de 20 cm de diâmetro x 70 cm de altura, contendo substrato comercial (Figura 37).

Figura 37 – Plantas de soja conduzidas em tubos de PVC de 70 cm de altura, para avaliação do crescimento. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Preparou-se uma suspensão de esporos na concentração de 1×10^{10} esporos por mL de cada isolado de *T. koningiopsis* testada. As sementes de soja utilizadas foram da cultivar Brasmax Zeus IPRO, as quais foram tratadas utilizando 4 mL da solução de esporos por quilograma de sementes. Para cada vaso foi semeada uma semente de soja tratada.

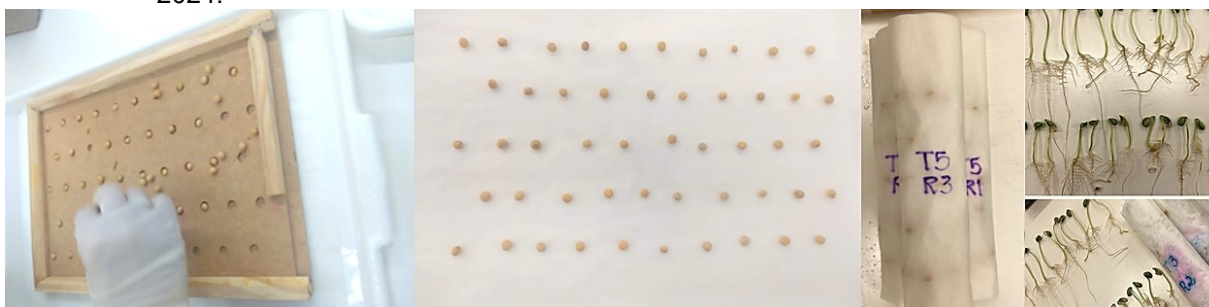
As plantas foram conduzidas até estágio V7, onde avaliou-se o comprimento da parte aérea, comprimento radicular, diâmetro do caule, volume do sistema radicular, massa verde e massa seca da parte aérea e radicular.

O delineamento utilizado foi o inteiramente ao acaso, com quatro repetições por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido pela ANOVA, Scott-Knott à 5% de probabilidade, no software Rbio (BHERING, 2017).

6.2.3 Efeito no teste de germinação de sementes de soja

Para avaliação da porcentagem de germinação (%G) foram utilizados rolos de papel Germitest®, cada rolo composto por três folhas, umedecidas com água destilada na concentração de 2,5 vezes a massa seca do papel (BRASIL, 2009). Cada rolo contendo 50 sementes de soja da cultivar Brasmax Zeus IPRO, compondo a unidade experimental. Utilizou-se cinco tratamentos, sendo, a testemunha com água destilada e os quatro isolados de *T. koningiopsis*, MS04, MS09, MS27 e MS28 (Figura 38).

Figura 38 – Implantação do teste de germinação de sementes de soja. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Para o teste de comprimento de plântulas foram utilizadas quatro repetições de 10 sementes de soja. Os papéis foram umedecidos previamente com água destilada equivalente a 2,5 vezes a massa seca do papel. As sementes de soja foram posicionadas de forma que a micrópila estivesse voltada para a parte inferior do papel. Os rolos foram acondicionados em sacos plásticos posicionados verticalmente no germinador por sete dias a 25 °C.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido pela ANOVA, Scott-Knott à 5% de probabilidade, no software Rbio (BHERING, 2017).

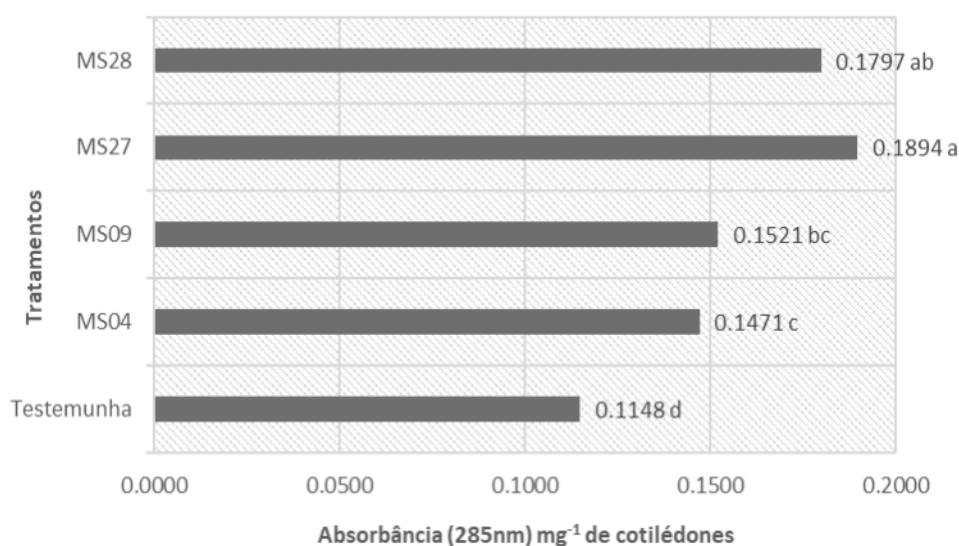
6.3 RESULTADOS E DISSCUSSÕES

6.3.1 Resposta de defesa de plantas de soja inoculadas com *T. koningiopsis*

As fitoalexinas são metabólitos secundários que atuam na defesa vegetal, através da atividade antimicrobiana que desempenham. Em soja, a gliceolina é expressa na interação do microrganismo com a planta, e os cotilédones são usados para verificar a ação elicitora biótica ou abiótica (SCHWAN-ESTRADA et al. 2000). Esse composto atua sobre o microrganismo por meio da desorganização celular, ruptura de membrana, granulação citoplasmática, inibição de enzimas extracelulares, além da inibição da germinação de esporos e crescimento micelial (CAVALCANTI et al. 2008).

Neste trabalho, ao verificar a atividade da gliceolina em cotilédones de soja, pode-se perceber que todos os tratamentos diferiram da testemunha (Figura 38) aumentando o acúmulo do metabólito em até 39%.

Figura 38 - Absorbância (285nm) mg^{-1} de cotilédones de soja tratados com quatro isolados de *Trichoderma* spp. e na testemunha com água destilada. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.



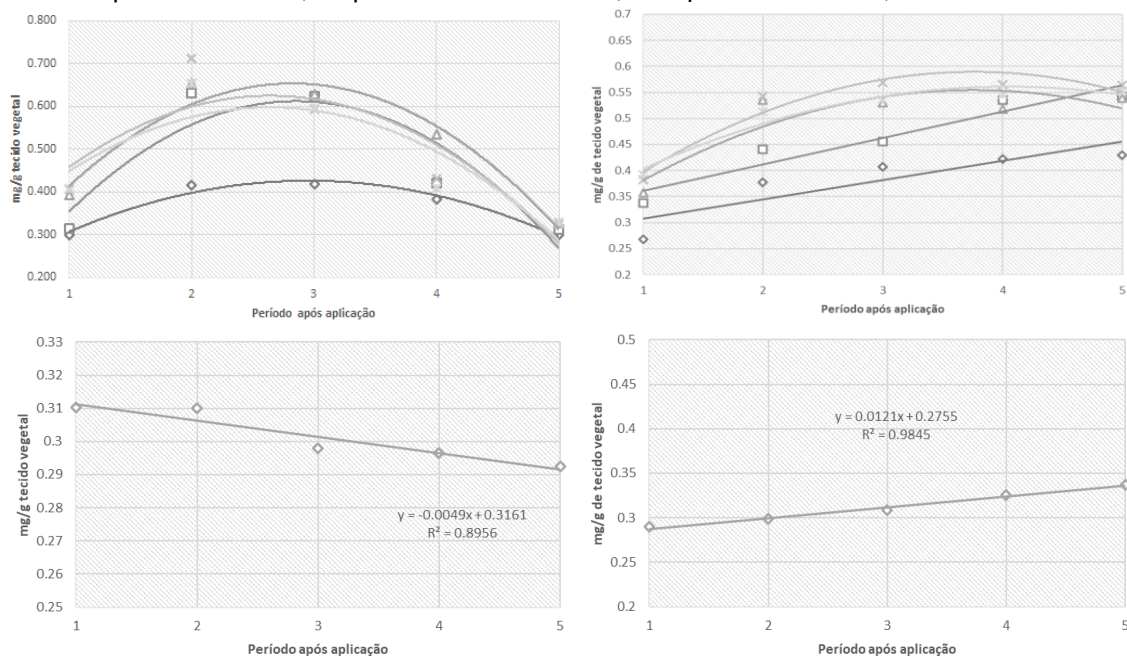
Fonte: Arquivo pessoal (2024)

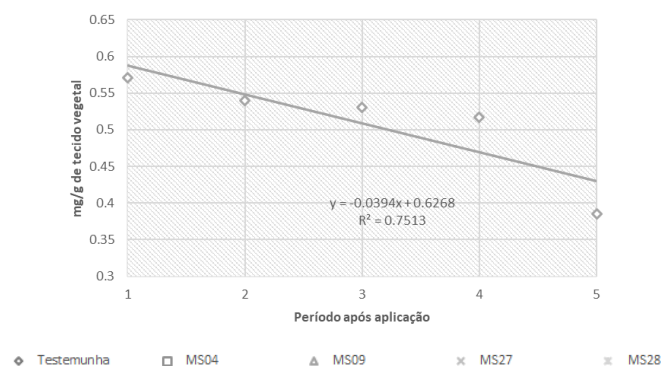
Ferreira et al. (2019) também observaram que *T. asperellum* e outros gêneros de *Bacillus* promoveram o acúmulo de gliceolina em soja. O mesmo ocorreu para Marek et al. (2019) verificando um maior acúmulo de fitoalexinas em cotilédones de soja e hipocótilo de feijão quando inoculados com *T. tomentosum*.

Em outro estudo, *T. asperellum* foi utilizado com vistas a reduzir a mancha angular (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) de pepino em cultivo hidropônico, os resultados apontaram uma redução de até 80% da doença, além da expressão de genes de defesa: o gene da via do fenilpropanoide que codifica a fenilalanina amonialiase, e o gene lipoxigenase que codifica a hidroziperoxido liase, além do acúmulo de compostos fenólicos e de fitoalexinas (YEDIDIA et al. 2003).

No estudo para avaliar o potencial dos isolados MS07, MS09, MS27 e MS28 na indução de resistência em plantas de soja, verificou-se que as enzimas ativadas foram a quitinase e a β 1,3 glucanase (Figura 39). Porém para Compostos fenólicos, proteínas e FAL não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Figura 39 - Resposta de defesa de plantas de soja inoculadas com *T. koningiopsis* isolados MS04, MS09, MS27 e MS28, na expressão de Quitinase, β -1,3 Glucanase, compostos fenólicos, proteínas e FAL, respectivamente. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.





Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Tabela 05 – Equação da reta e R^2 ajustado referentes à resposta de defesa de plantas de soja inoculadas com *T. koningiopsis* isolados MS04, MS09, MS27 e MS28, na expressão de Quitinase e β -1,3 Glucanase. UTFPR, Campus Pato Branco, 2024.

Tratamentos	Equação	R^2
Quitinase		
Testemunha	$y = -0.0313x^2 + 0.1846x + 0.1537$	0.9628
MS04	$y = -0.0749x^2 + 0.4275x + 0.0017$	0.8222
MS09	$y = -0.0719x^2 + 0.4061x + 0.0802$	0.9517
MS27	$y = -0.0619x^2 + 0.3271x + 0.1933$	0.7537
MS28	$y = -0.0556x^2 + 0.2933x + 0.2111$	0.7751
β -1,3 Glucanase		
Testemunha	$y = 0.037x + 0.27$	0.8726
MS04	$y = 0.0505x + 0.3104$	0.9164
MS09	$y = -0.0229x^2 + 0.1718x + 0.2321$	0.7960
MS27	$y = -0.0252x^2 + 0.1898x + 0.2326$	0.9241
MS28	$y = -0.0171x^2 + 0.1382x + 0.2817$	0.9468

Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Quando ocorre a indução de resistência em plantas, uma grande produção de proteínas de defesa é ativada, são conhecidas como proteínas relacionadas à patogênese (PR-Proteínas), fazendo com que haja um aumento de sua concentração nos tecidos vegetais, destacando-se o aumento de peroxidases, quitinases, β 1,3 glucanases, FAL, aumento do ácido salicílico e deposição de lignina (VERBENE et al. 2000).

O efeito “*priming*” é um termo utilizado na indução de resistência, quando há

um pré-condicionamento da planta contra uma infecção, ativando rapidamente seu sistema de defesa (PASCHOLATI; DALIO, 2018). Estudos comprovam a atuação direta de espécies de *Trichoderma* spp. na ativação de “primings” induzindo respostas imunes de forma mais rápida em plantas e com maior efetividade na defesa, ocorrendo maior acúmulo e ativação destas proteínas celulares inativas, que se tornam prontamente disponíveis diante de um ataque patogênico (MORÁN-DIEZ, et al. 2021).

Liu et al. (2021) ao estudarem o efeito de *Trichoderma* spp. sobre plantas de repolho infectadas com *Botrytis cinerea*, verificaram que a aplicação do agente ocasionou o aumento de ascorbato peroxidase em 1,46 vezes, controlando também o ataque de *B. cinerea*. Pratap-Singh et al. (2021) ao tratarem plantas de berinjela com *T. harzianum* e *T. asperellum* desafiadas com *S. sclerotiorum* observaram que houve aumento na concentração de ácido chiquímico com ápice nas 72 horas após aplicação, enquanto que compostos fenólicos não diferiram.

No presente trabalho o ponto de máxima produção de quitinase e β -1,3 glucanase foram nas 48 horas e 192 horas após aplicação, respectivamente, com aumento médio de 59% de quitinase e de 27% de β -1,3 glucanase.

Gajera et al. (2015) ao tratarem diferentes mudas de amendoim com *T. viride*, desafiadas com *Aspergillus niger*, verificaram que houve um aumento no terceiro dia após aplicação, de 3,5 e 2,3 vezes das enzimas polifenol oxidase e β -1,3 glucanase, respectivamente; e de 1,6 vezes de FAL ao sexto dia, e 2,3 à 2,8 vezes no nono dia após aplicação.

6.3.2 Efeito na promoção de crescimento de plantas de soja

A Tabela 06 apresenta o efeito do tratamento de sementes de soja com os quatro isolados de *T. koningiopsis* sobre os parâmetros agronômicos avaliados.

Tabela 06 – Efeito do tratamento de sementes com *T. koningiopsis* isolados MS04, MS09, MS27 e MS28 sobre a massa verde da parte aérea (MV-PA), massa verde da raiz (MV-RZ), massa seca da parte aérea (MS-PA), massa seca raiz (MS-RZ), comprimento parte aérea (COMP-PA), Comprimento raiz (COMP-RZ), volume da raiz (VOL-RZ) e diâmetro do caule (DIÂM-C) de plantas de soja em estágio V7. UTFPR Campus Pato Branco, 2024.

Tratamentos	MV-PA	MV-RZ	MS-PA	MS-RZ	COMP-PA	COMP-RZ	VOL-RZ	DIÂM-C
TESTE	21.98 c	8.54 b	4.54 b	1.01 b	45.25 c	53.25 a	235.00 d	4.93 c
MS04	36.86 a	15.01 a	8.17 a	1.82 a	52.73 b	60.50 a	447.50 a	7.43 b
MS09	31.12 b	9.31 b	6.35 b	1.32 b	59.00 a	56.25 a	330.00 c	6.65 b
MS27	37.41 a	13.32 b	7.94 a	1.41 b	57.67 a	62.00 a	377.50 b	7.08 b
MS28	42.46 a	17.98 a	8.88 a	2.15 b	57.7 a	58.25 a	445.00 a	8.28 a
CV (%)	14.8	22.25	19.07	27.14	15.80	13.26	10.93	9.31

* Médias seguida pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott knott à 5% de probabilidade.

Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Para a variável massa verde e massa seca da parte aérea, os tratamentos que se destacaram foram os isolados MS04, MS27 e MS28. Já para massa verde da raiz, houve uma melhor resposta dos isolados MS04 e MS28.

Um incremento médio de 28% foi obtido no comprimento da parte aérea, quando utilizada os idolados MS09, MS27 e MS28 em comparação com a testemunha. E de aproximadamente 89% no volume do sistema radicular utilizando MS04 e MS28. O diâmetro do caule aumentou em 68% utilizando o isolado MS28 no tratamento de sementes em comparação com a testemunha.

Na figura 40, verifica-se o crescimento promovido pelo isolado MS28 em relação a testemunha no estágio V7.

Figura 40 – Plantas de soja tratadas com a) Testemunha com água destilada e b) *T. koningiopsis* isolado MS28. UTFPR Campus Pato Branco, 2024.



Fonte: Arquivo pessoal (2024)

O mesmo incremento foi percebido por Joo e Hussein (2022) ao estudarem o efeito volátil de diferentes isolados de *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento de plântulas de *Raphanus sativus*, verificando que o melhor tratamento resultou do isolado de *T. harzianum* H22, com um aumento de 200% de massa verde total.

Degani et al. (2021) também observaram um aumento no comprimento da parte aérea e massa de plantas de milho tratadas com *T. longibrachiatum*. Liu et al. (2022) observaram este efeito, na promoção de crescimento em plântulas de pepino co-inoculadas com metabólitos de isolados de *Trichoderma* spp. Outros estudos mostram a eficiência do uso de diferentes isolados de *Trichoderma* spp. no aumento do enraizamento lateral de *Syringa oblata* (LIU et al., 2020), e no aumento de biomassa e produção de metabólitos de *Rheum Palmatum* pela estirpe *Trichoderma citrinoviride* HT-1 isolado da raiz da mesma espécie (CHEN et al., 2022). *T. koningiopsis* HT-1

mostrou-se eficiente no aumento de biomassa e tamanho de plantas de *Arabidopsis thaliana* (YOU et al., 2022).

6.3.3 Efeito no teste de germinação de sementes de soja

O ensaio de germinação *in vitro* com o tratamento de sementes de soja com os isolados estudados, demonstram que não houve diferença estatística entre as variáveis porcentagem de germinação, porcentagem de plântulas normais, comprimento de parte aérea, comprimento de raiz e massa seca total dos tratamentos com a testemunha (Tabela 07).

Tabela 07 – Porcentagem de sementes germinadas (%G), % plântulas normais, comprimento de parte aérea (PA), comprimento de raiz e massa seca total das plântulas de soja tratadas com testemunha e isolados MS04, MS09, MS27 e MS28 de *T. koningiopsis*. UTFPR Campus Pato Branco, 2024.

Tratamentos	%G	%Normais	Comp. PA (cm)	Comp. Raiz (cm)	MS Total (g)
Testemunha	99.50 ns*	65.75 ns	6.63 ns	8.54 ns	0.157 ns
MS04	99.50	63.25	6.53	8.62	0.160
MS09	98.50	61.00	6.54	8.33	0.170
MS27	98.00	66.75	6.67	8.91	0.179
MS28	99.00	63.75	6.84	9.75	0.183
CV (%)	2.04	12.01	8.32	15.96	16.76

*Na coluna, médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott (5%).
ns* não significativo.

Fonte: Arquivo pessoal (2024)

Sales et al. (2023) ao estudarem diferentes doses de *T. harzianum*, verificaram que doses de 350 g e 400 g por 100 kg de sementes, proporcionaram um aumento de 2% na germinação de sementes de soja. Outros estudos envolvendo outras espécies demonstram a eficiência do antagonista no tratamento de sementes, como o trabalho desenvolvido por Baseggio et al. (2017) onde o tratamento de sementes de aveia preta e cevada com *Trichoderma* spp. incrementaram a germinação e o desenvolvimento

das plântulas.

Estudos utilizando diferentes antagonistas, entre eles fungos e bactérias, demonstraram que *T. harzianum* se destacou aumentando o vigor, comprimento da parte aérea e raiz, além de aumentar em 88.75% a germinação das sementes de pepino tratadas (SHARMA et al. 2023).

Faria et al. (2003) verificaram que o uso combinado de *T. harzianum* fez com que houvesse maior porcentagem de germinação de sementes de algodão, maior porcentagem de emergência e vigor.

6.4 CONCLUSÕES

Com este estudo pode-se verificar que a inoculação de *T. koningiopsis* promoveu maior acúmulo de gliceolina em cotilédones de soja, além de um aumento na produção de quitinase e β 1,3 glucanase.

O antagonista também contribuiu na promoção de crescimento de plantas de soja, porém não houve diferença significativa quando utilizado no tratamento de sementes no teste de germinação *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ALONSO-RAMÍREZ, A., POVEDA, J., MARTÍN, I., HERMOSA, R., MONTE, E., NICOLÁS, C. Salicylic acid prevents *Trichoderma harzianum* from entering the vascular system of roots. *Mol Plant Pathol.* 2014 Oct;15(8):823-31. doi: 10.1111/mpp.12141. Epub 2014 May 7. PMID: 24684632; PMCID: PMC6638820.
- BASEGGIO, E.R., BERTELA, M., PAULA, S. MILANESI, P.M. Microbiolização com *Trichoderma* spp., combinada ou não com polímero, sobre a sanidade, germinação e vigor de sementes de aveia preta e cevada. *Scientific Electronic Archives Sci. Elec. Arch.* Vol. 10 (6) December 2017.
- BHERING, L.L. Rbio: A Tool For Biometric And Statistical Analysis Using The R Platform. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.17: 187-190p, 2017.
- BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extratcts by thin-layer electrophoresis and chomatography. *Analitical Biochemistry*, Orlando, v. 17, p. 278-293, 1966.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analitical Biochemistry*, Orlando, v.72, p.248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Regras para análise de sementes. Brasília: p. 399, 2009.
- CAVALCANTI, L.S. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S. et al. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos** Piracicaba: FEALQ, 2005. p.81-124.
- CHEN, D., SHI, W., WANG, Y., ZHAO, J., ZHANG, H., JIA, L., SUN, K. Molecular Traits Underlying the Growth Promotion and Metabolite Accumulation in *Rheum palmatum* Inoculated with Endophytic *Trichoderma citrinoviride* HT-1. *Int J Mol Sci.* 2022 Oct 28;23(21):13132. doi: 10.3390/ijms232113132. PMID: 36361917; PMCID: PMC9655554.
- DEGANI, O., RABINOVITZ, O., BECHER, P., GORDANI, A., CHEN, A. *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma asperellum* Confer Growth Promotion and Protection against Late Wilt **Disease in the Field.** *J Fungi* (Basel). 2021 Jun 2;7(6):444. doi: 10.3390/jof7060444. PMID: 34199413; PMCID: PMC8229153.
- DRUZHININA I.S., SEIDL-SEIBOTH V., HERRERA-ESTRELLA A., HORWITZ B.A., KENERLEY C.M., MONTE E., MUKHERJEE P.K., ZEILINGER S., GRIGORIEV I.V.,

KUBICEK C.P. *Trichoderma*: The genomics of opportunistic success. **Nat. Rev. Microbiol.** 2011;9:749–759. doi: 10.1038/nrmicro2637.

FARIA, A.Y.K., ALBUQUERQUE, M.C.F., NETO, D.C. Qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro submetidas a tratamentos químico e biológico. **Rev. bras. sementes** 25 (1), Jul 2003. Doi.org/10.1590/S0101-31222003000100019.

FERREIRA, M.G.C., BORGES, B.O., FRANCISCHINI, R., MELO, J.P., SOLINO, A.J.S., LEMOS, S.V. Indução fitoalexinas em cotilédones de soja e hipocótilos de feijão em função da aplicação de agentes de biocontrole. v. 6 n. 1 (2019): **Científica Multidisciplinary Journal** - ISSN 2358-260X

GAJERA, H.P., SAVALIYA, D.D., PATEL, S.V., GOLAKIYA, B.A. *Trichoderma viride* induces pathogenesis related defense response against rot pathogen infection in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Infect Genet Evol.** 2015 Aug;34:314-25. doi: 10.1016/j.meegid.2015.07.003. Epub 2015 Jul 6. PMID: 26160540.

GUZZO, S. D., MARTINS, E. M. F. Local and Systemic Induction of β 1,3 Glucanase and Chitinase in Coffee Leaves Protected Against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of phytopathology**, v. 144, n. 9 10, p. 449-454, 1996.

JAROSZUK-ŚCISEŁ, J., TYŚKIEWICZ, R., NOWAK, A., OZIMEK, E., MAJEWSKA, M., HANAKA, A., TYŚKIEWICZ, K., PAWLIK, A., JANUSZ, G. Phytohormones (Auxin, Gibberellin) and ACC Deaminase In Vitro Synthesized by the Mycoparasitic *Trichoderma* DEMTkZ3A0 Strain and Changes in the Level of Auxin and Plant Resistance Markers in Wheat Seedlings Inoculated with this Strain Conidia. **Int J Mol Sci.** 2019 Oct 4;20(19):4923. doi: 10.3390/ijms20194923. PMID: 31590281; PMCID: PMC6801869.

JENNINGS, A.C. The determination al dihydroxy phenolic compounds in extracts of plant tissues. *Analitical Biochemistry*, Orlando, v.118, p.396-398, 1991.

JOO, J.H., HUSSEIN, K.A. Biological Control and Plant Growth Promotion Properties of Volatile Organic Compound-Producing Antagonistic *Trichoderma* spp. **Front Plant Sci.** 2022 Jul 26;13:897668. doi: 10.3389/fpls.2022.897668. PMID: 35958189; PMCID: PMC9360753.

LIU, B., JI, S., ZHANG, H., WANG, Y., LIU, Z. Isolation of *Trichoderma* in the rhizosphere soil of *Syringa oblata* from Harbin and their biocontrol and growth promotion function. **Microbiol Res.** 2020 May;235:126445. doi: 10.1016/j.micres.2020.126445. Epub 2020 Feb 22. PMID: 32113127.

LIU, H., HAO, D., LI, Y., WANG, X., CHEN, J. Approaches for the establishment of optimized co-culture system of multiple *Trichoderma* strains for culture metabolites highly effective in cucumber growth promotion. **Front Microbiol.** 2022 Sep

27;13:1020077. doi: 10.3389/fmicb.2022.1020077. PMID: 36238592; PMCID: PMC9551241.

LIU, C.M., LIU, S.Y., LIAO, C.K., LO, C.T., LIN, K.C., PENG, K.C. Cabbage defense response provoked by *Trichoderma* Th-LAAO. **Arch Microbiol.** 2021 May;203(4):1641-1647. doi: 10.1007/s00203-020-02174-6. Epub 2021 Jan 11. PMID: 33432379.

MORÁN-DIEZ, M.E., MARTÍNEZ, D.E., ALBA, Á.E., RUBIO, M.B., HERMOSA, R., MONTE, E. *Trichoderma* and the Plant Heritable Priming Responses. **J Fungi (Basel)**. 2021 Apr 19;7(4):318. doi: 10.3390/jof7040318. PMID: 33921806; PMCID: PMC8072925.

MAREK, J., BORTULI, D., KNOB, A., SANTOS, L.A., FARIA, C.M.D.R. Indução de fitoalexinas em sorgo, soja e feijão por suspensão de fungos endofíticos. v. 24 n. 1: Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde, 2019. DOI: <https://doi.org/10.5212/publicatio%20uepg.v24i1.10326>

MONTESANO, M., BRADER, G., PALVA, E.T. Pathogen derived elicitors: Searching for receptors in plants. **Mol. Plant Pathol.** 2003;4:73–79. doi: 10.1046/j.1364-3703.2003.00150.x.

MONTE, E., BETTIOL, W., HERMOSA, R. *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças em plantas. In MEYER, M.C., MAZARO, S.M., SILVA, J.C. *Trichoderma* uso da agricultura. Brasília, DF: Embrapa, 2019.

PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. (Ed.). Manual de Fitopatologia. 5. ed. Ouro Fino: Ceres, 2018. p. 424-450.

RODRIGUES, A. A. C., BEZERRA NETO, E., COELHO, R. S.B.. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum* em Caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatol. bras.** [online]. 2006, vol.31, n.5. pp.492-499. ISSN 0100-4158. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582006000500009>.

SALES, G.O.S., GOMES, R.S.S., CARVALHO, T.K.N., SANTOS, M.R., MEDEIROS, J.G.F. Microbiolização de sementes de soja com *Trichoderma harzianum*: qualidade fisiológica e sanitária. *Nativa, Sinop*, v. 11, n. 2, p. 220-225, 2023.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Floresta**, v.30, n. 1-2, p. 129-137, 2000

SHARMA, A., SHUKLA, A., GUPTA, M. Effect of bioagents on cucumber seed

mycoflora, seed germination, and seedling vigour. *Sci Rep.* 2023 Apr 13;13(1):6052. doi: 10.1038/s41598-023-30253-3. PMID: 37055421; PMCID: PMC10101947.

SILVA, R.A., REIS, V.M., BALDANI, J.I., OLIVARES, F.L. Defesa de plantas contra o ataque de patógenos. Embrapa Seropédica RJ, 2008.

STANGARLIN, J.R. et al. Indução de fitoalexinas em soja e sorgo por preparações de *Saccharomyces boulardii*. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v. 27, n. 1, p. 91-98, 2010.

TON, J., JAKAB, G., TOQUIN, V., FLORS, V., IAVICOLI, A., MAEDER, M.N., MÉTRAUX, J.P., MAUCH-MANI, B. Dissecting the beta-aminobutyric acid-induced priming phenomenon in *Arabidopsis*. **Plant Cell**. 2005 Mar;17(3):987-99. doi: 10.1105/tpc.104.029728. Epub 2005 Feb 18. PMID: 15722464; PMCID: PMC1069713.

VERBENE, M. C.; VERPOORTE, R.; BOL, J. F.; MERCADO-BLANCO, J.; LINTHORST, H. J. M. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p. 779-783, 2000.

YEDIDIA, I., SHORESH, M., KEREM, Z., BENHAMOU, N., KAPULNIK, Y., CHET, I. Concomitant Induction of Systemic Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in Cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and Accumulation of Phytoalexins. **ASM Journals Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 69, No. 12, 2003.

YOU J, LI G, LI C, ZHU L, YANG H, SONG R, GU W. Biological Control and Plant Growth Promotion by Volatile Organic Compounds of *Trichoderma koningiopsis* T-51. **J Fungi (Basel)**. 2022 Jan 28;8(2):131. doi: 10.3390/jof8020131. PMID: 35205885; PMCID: PMC8875031.

ZHANG, F., ZHU, Z., YANG, X., SHEN, Q. *Trichoderma harzianum* T-E5 significantly affects cucumber root exudates and fungal community in the cucumber rhizosphere. **Appl. Soil Ecol.** 2013;72:41–48. doi: 10.1016/j.apsoil.2013.05.016.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a técnica de bioprospecção aplicada, pode-se obter quatro isolados de *T. koningiopsis*, as quais apresentaram crescimento ótimo na faixa de temperatura entre 25 °C e 30 °C.

Ao verificar o potencial antagonista dos quatro isolados MS04, MS09, MS27 e MS28 em confronto com os isolados de *N. phaseoli*, *M. phaseolina*, *D. longicolla* e *S. sclerotiorum*, observou-se potencial na competição por espaço e nutrientes, micoparasitismo e antibiose por compostos orgânicos voláteis, porém com a metodologia escolhida não houve antibiose utilizando os metabólitos filtrados dos isolados.

Estudos mostraram o potencial dos isolados como potenciais solubilizadoras de fósforo e potássio *in vitro*, além de incrementar a presença dos nutrientes na seiva da planta pelo método do Nir.

Os isolados do antagonista também se mostraram eficientes no aumento de gliceolina em cotilédones tratados, e ativando as rotas de defesa da quitinase, e β 1,3 glucanase. Além de promover o crescimento em plantas de soja tratadas com os isolados. Não havendo, porém, incremento no teste de germinação *in vitro*.

O trabalho deve avançar testando diferentes formulações dos isolados de *T. koningiopsis* para aplicação em plantas de soja a campo, verificando seu potencial fora do ambiente controlado.