

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

GRACE QUEIROZ DAVID PERES

**MECANISMOS DE BIOCONTROLE E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE
CEPAS DE *Trichoderma* NA CULTURA DA SOJA**

Ilha Solteira
2023

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - PPGA

GRACE QUEIROZ DAVID PERES

**MECANISMOS DE BIOCONTROLE E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE
CEPAS DE *TRICHODERMA* NA CULTURA DA SOJA**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Especialidade: Sistemas de Produção.

PhD. Paulo Cezar Ceresini
Orientador

PhD. André Rodrigues dos Reis
Coorientador

FICHA CATALOGRÁFICA

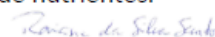
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

P437m Peres, Grace Queiroz David.
Mecanismos de biocontrole e promoção de crescimento de cepas de
Trichoderma na cultura da soja / Grace Queiroz David Peres. -- Ilha
Solteira: [s.n.], 2023
175 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia
de Ilha Solteira. Especialidade: Sistemas de Produção, 2023

Orientador: Paulo Cezar Ceresini
Coorientador: André Rodrigues dos Reis
Inclui bibliografia

1. Controle biológico. 2. Proteção de plantas. 3. Podridão vermelha da raiz.
4. Fitoalexinas. 5. Indução de resistência. 6. Eficiência do uso de nutrientes.


Raiane da Silva Santos

Supervisora Técnica de Seção
Seção Técnica de Referência, Atendimento ao usuário e Documentação
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
CRB/8-9999

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Mecanismos de biocontrole de doenças e promoção de crescimento por Trichoderma na cultura da soja.

AUTORA: GRACE QUEIROZ DAVID

ORIENTADOR: PAULO CEZAR CERESINI

COORDENADOR: ANDRÉ RODRIGUES DOS REIS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA, área: Sistemas de Produção pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 PAULO CEZAR CERESINI
Data: 31/01/2023 17:56:51-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. PAULO CEZAR CERESINI (Participação Presencial)
Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

Documento assinado digitalmente
 MARCO EUSTAQUIO DE SA
Data: 02/02/2023 14:02:25-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. MARCO EUSTAQUIO DE SA (Participação Presencial)
Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

 ORIVALDO ARF
Data: 02/02/2023 15:38:02-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. ORIVALDO ARF (Participação Presencial)
Departamento de Fitotecnia Tecnologia de Alimentos e Socio Economia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

 MARCO ANTONIO CAMILLO DE CARVALHO
Data: 31/01/2023 16:29:07-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. MARCO ANTONIO CAMILLO DE CARVALHO (Participação Virtual)
Departamento de Agronomia / Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT

Documento assinado digitalmente
 OSCAR MITSUO YAMASHITA
Data: 31/01/2023 16:18:20-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. OSCAR MITSUO YAMASHITA (Participação Virtual)
Departamento de Agronomia / Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT

Ilha Solteira, 31 de janeiro de 2023

DEDICATÓRIA

A Deus, autor da vida, pelas bênçãos concedidas e por ser um guia na minha trajetória.

Aos meus pais Wilson Costa David e Cléa de Carvalho Queiroz David, exemplos de caráter e dignidade, pelo amor, educação e apoio nos momentos difíceis.

Ao meu esposo Walmor Moya Peres, que aceitou entrar neste desafio comigo e esteve sempre presente, incentivando em cada etapa. Unidos somos fortes

Aos meus filhos Letícia David Peres e Gabriel David Peres, minha razão de viver, que não mediram esforços para entender e me ajudar na realização desse trabalho tão importante para a minha carreira.

Ao meu irmão Wilson Costa David Júnior, que sempre esteve próximo de mim, se colocando à disposição para compartilhar minhas angústias, tristezas e alegrias.

A minha querida avó Conceição de Carvalho Queiroz (in memorian), que tanto fez por mim ao longo da sua vida, mas que continua sendo minha força e inspiração.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e determinação fazendo com que os meus objetivos fossem alcançados ao longo deste trabalho.

À Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT, pela concessão do afastamento para a qualificação a nível de Doutorado.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, essencial no meu processo de formação, pelo fornecimento de estrutura física e materiais que foram fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo apoio (Código de Financiamento 001) na realização do presente trabalho.

A minha família, por todo o apoio, paciência e pela ajuda, que muito contribuíram para a realização da tese.

Ao Professor PhD. Paulo Cezar Ceresini pela orientação, pelos ensinamentos e pelo respeito ao longo dessa trajetória.

Ao Professor Dr. Marco Eustáquio de Sá pela pessoa, pela paciência, pelos ensinamentos desempenhados com tanta dedicação e amizade.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pelos ensinamentos, incentivos e dedicação ao programa de pós-graduação.

Aos colegas de curso Matheus Pereira de Brito Mateus, Nayane Cristina Bonfim, Cleverson Rodrigues e Lucas Alves de Almeida pela amizade e pelo trabalho em conjunto na instalação e avaliação dos experimentos que foram fundamentais para a obtenção dos resultados e para a defesa da tese.

Aos colegas de trabalho pelos incentivos e pelas trocas de experiências que me permitiram crescer não só como pessoa, mas também como profissional.

Ao Engenheiro Agrônomo/Empresário Marcos Cesar Costa da empresa Geoclean nutrição e proteção de plantas pela parceria que culminou na intenção e na realização do Doutorado.

Aos Técnicos de Laboratório, Selma Maria Bozitte de Moraes, Fábio Amaral de Almeida Moraes, Sinval Antonio de Abreu, Élton Souza, pelo excelente serviço prestado, pelos ensinamentos no manuseio dos equipamentos e pela paciência e companheirismo ao longo do curso.

Aos técnicos da Fazenda Experimental de Pesquisa e Extensão - FEPE, da Faculdade de Engenharia, Campus de Ilha Solteira - UNESP, localizada no município de Selvíria - MS, pelos serviços prestados durante a condução do experimento.

Aos profissionais da Seção Técnica da Pós-Graduação, Márcia Regina Nagamachi Chaves, Graciele Perez Viegas Nizo, Thaíz Lenquist da Rocha, pelo excelente atendimento e serviço prestado.

A todos que participaram, direta ou indiretamente para o desenvolvimento desta pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizagem.

OBRIGADA.

“Educar verdadeiramente não é ensinar fatos novos ou enumerar fórmulas prontas, mas sim preparar a mente para pensar”.

(Albert Einstein).

RESUMO

A Soja é uma cultura de expressão mundial, o Brasil se destaca como maior produtor e exportador desta *commodity*, com áreas de cultivo em expansão a cada ano. Com isso, também somos um dos países que mais importa defensivos agrícolas e adubos químicos. Atualmente são realizadas ao menos 6 aplicações de defensivos ao longo do ciclo da cultura. Pensando em um modelo de agricultura com menos impactos ao meio ambiente e à saúde do agricultor, mas mantendo alta produtividade, avaliamos a capacidade de cepas de *Trichoderma* quanto ao biocontrole e a produção de enzimas ligadas a este microrganismo, indução de resistência, capacidade de se estabelecer endofiticamente em raízes de soja, no controle da morte súbita da soja, na promoção de crescimento por meio da produção de AIA e da solubilização de fosfatos e pela qualidade fisiológica das sementes de soja produzidas. Os isolados de *Trichoderma* spp. amazônicos se destacaram em todos os atributos avaliados e são promissores para alcançar altas produtividades e manter a segurança na saúde do trabalhador rural e do meio ambiente. O isolado TQ, identificado como *T. atroviride* se destacou para a maioria dos parâmetros avaliados, sendo considerado promissor para o uso na cultura da soja, na proteção de doenças e na promoção de crescimento de plantas.

Palavras-chave: agricultura sustentável; bioprodutos; *Glycine max*; indução de resistência; proteção de plantas.

ABSTRACT

Soybean is a crop of world expression, Brazil stands out as the largest producer and exporter of this commodity, with areas of cultivation expanding every year. As a result, we are also one of the countries that most import agricultural pesticides and chemical fertilizers. Currently, at least 6 pesticide applications are carried out throughout the crop cycle. Thinking about a model of agriculture with less impact on the environment and the health of the farmer, while maintaining high productivity, we evaluated the ability of *Trichoderma* strains in terms of biocontrol and the production of enzymes linked to this microorganism, induction of resistance, ability to establish endophytes in soybean roots, control sudden soybean death, promote growth through AIA production and phosphate solubilization, and the physiological quality of the soybean seeds produced. *Trichoderma* spp. Amazonians stood out in all evaluated attributes and are promising to achieve high productivity and maintain safety in the health of rural workers and the environment. The TQ isolate, identified as *T. atroviride*, stood out for most of the evaluated parameters, being considered promising for use in the soybean crop, in the protection of diseases and in the promotion of plant growth.

Keywords: sustainable agriculture; bioproducts; *Glycine max*; induction of resistance; plant protection.

LISTA DE FIGURAS

	Capítulo II	
Figura 1	- Altura de inserção da primeira vagem de soja sob a aplicação dos isolados de <i>Trichoderma</i> sp. via foliar. UNESP, Ilha Solteira - SP.	64
Figura 2	- Número de vagens por planta de soja sob aplicação de isolados de <i>Trichoderma</i> sp. via foliar. UNESP, Ilha Solteira - SP.	65
Figura 3	- Número de sementes por vagem de soja sob aplicação de isolados de <i>Trichoderma</i> sp. e Ni via foliar. UNESP, Ilha Solteira - SP.	67
Figura 4	- Massa de mil sementes de soja sob aplicação de isolados de <i>Trichoderma</i> sp. e Ni via foliar. UNESP, Ilha Solteira - SP.	67
Figura 5	- Germinação de sementes de soja após aplicação de <i>Trichoderma</i> sp. via foliar. UNESP, Ilha Solteira - SP.	71
Figura 6	- Emergência de plântulas de soja, em função da temperatura diária, após aplicação de isolados de <i>Trichoderma</i> sp. e via foliar. UNESP, Ilha Solteira - SP.	72
Figura 7	- Porcentagem de plântulas normais na primeira contagem da germinação após aplicação de isolados de <i>Trichoderma</i> sp. via foliar. UNESP, Ilha Solteira - SP.	72
Figura 8	- Comprimento de plântulas de soja após aplicação de isolados de <i>Trichoderma</i> sp. via foliar. UNESP, Ilha Solteira - SP.	75
Figura 9	- Número de plântulas normais da germinação final no teste de envelhecimento acelerado, oriundas de sementes após aplicação de isolados de <i>Trichoderma</i> sp. via foliar. UNESP, Ilha Solteira - SP.	77
Figura 10	- Número de plântulas normais de soja na primeira contagem da germinação no teste de envelhecimento acelerado, oriundas de sementes após aplicação de isolados de <i>Trichoderma</i> sp. via foliar. UNESP, Ilha Solteira - SP.	77
	Capítulo III	
Figura 1	- Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>glycines</i> sozinho e com isolados de <i>Trichoderma</i> sp. em meio de cultivo BDA. UNESP, Ilha Solteira - SP.	97

Figura 2	- Confronto em placas entre <i>Trichoderma</i> isolados TQ (a), TF (b) e TC (c) (esquerda) e <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>glycines</i> (direita), após 72 h de incubação. Detalhe da área de confronto em microscópio estereoscópio 25x (d), fiálides e macroconídios de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>glycines</i> 100x (e), Interação das hifas de <i>Trichoderma</i> sp. e <i>F. solani</i> (f), UNESP, Ilha Solteira - SP.	98
Figura 3	- a) Aspecto da placa de cultivo aos 7 dias de crescimento evidenciando o crescimento do <i>Trichoderma</i> sp. sobre toda a placa. b) Imagem da zona de crescimento de <i>T. atroviride</i> em microscópio estereoscópio evidenciando a secreção de gotículas de metabólitos. c) Fotomicrografia mostrando conidióforo de <i>Trichoderma atroviride</i> , UNESP, Ilha Solteira - SP.	99
Figura 4	- Imagens de microscopia eletrônica de varredura evidenciando estratégias de biocontrole, a, b, c e d, e na figura e observa-se a morfologia fúngica do <i>Trichoderma atroviride</i> na zona de pareamento de culturas crescendo sobre <i>F. solani</i> f. sp. <i>glycines</i> , lâmina evidenciando a aderência da hifa de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Fusarium</i> aumento de 400x azul de algodão com lactofenol.	99
Figura 5	- Teores de Clorolila a, b e total, caroteno e feofitinas a, b e total em folhas de soja inoculadas com <i>Trichoderma</i> , <i>Trichoderma</i> + <i>Fusarium</i> e <i>Fusarium</i> . UNESP, Ilha Solteira - SP	101
Figura 6	- Concentração de açúcar total e sacarose em plantas de soja inoculadas com <i>Trichoderma</i> (T), <i>Trichoderma</i> + <i>Fusarium</i> (T+F) e <i>Fusarium</i> (F), UNESP, Ilha Solteira - SP.	102
Figura 7	- Determinação de teores de Nitrato e amônio em plantas de soja inoculadas com <i>Trichoderma</i> , <i>Trichoderma</i> + <i>Fusarium</i> e <i>Fusarium</i> , UNESP, Ilha Solteira - SP.	103
Figura 8	- Teores de ácido alantóico, alantoina e ureídeos presentes em plantas de soja tratadas com <i>Trichoderma</i> , <i>Trichoderma</i> + <i>Fusarium</i> e <i>Fusarium</i> . UNESP, Ilha Solteira - SP.	104
Figura 9	- Comprimento de parte aérea e raízes de plantas de soja aos 45 dias inoculadas com <i>Trichoderma</i> , <i>Trichoderma</i> + <i>Fusarium</i> e <i>Fusarium</i> . UNESP, Ilha Solteira - SP.	105
Figura 10	- Massa seca parte aérea e de raízes de plantas de soja aos 45 dias inoculadas com <i>Trichoderma</i> , <i>Trichoderma</i> + <i>Fusarium</i> e <i>Fusarium</i> . UNESP, Ilha Solteira - SP.	105
Figura 11	- Observação do aspecto geral das plantas de soja tratadas com <i>Trichoderma</i> , <i>Trichoderma</i> + <i>Fusarium</i> e <i>Fusarium</i> aos 45 dias de cultivo (2018). UNESP, Ilha Solteira - SP.	106

Figura 12	- Aspecto geral de plantas de soja aos 55 dias de cultivo: a) planta de soja com <i>Trichoderma</i> (com T) e sem inoculação de <i>Trichoderma</i> (sem T); b) aspecto geral de planta de soja inoculada com <i>Fusarium</i> (F) e <i>Trichoderma</i> + <i>Fusarium</i> (TF) UNESP, Ilha Solteira - SP.	107
Figura 13	- Observação do aspecto geral das plantas de soja tratadas com <i>Trichoderma</i> (T) evidenciando o aspecto sadio e a tonalidade do trifólio aos 55 dias de cultivo. UNESP, Ilha Solteira - SP.	108
Figura 14	- Observação do aspecto geral das plantas de soja inoculadas com <i>Fusarium</i> exibindo sintomas de SDS, com destaque ao tamanho reduzido dos folíolos e clorose (início dos sintomas foliares) aos 55 dias de cultivo. UNESP, Ilha Solteira - SP.	108
Figura 15	- a) Obtenção dos dados biométricos das plantas de soja tratadas com <i>Trichoderma</i> , <i>Trichoderma</i> + <i>Fusarium</i> e <i>Fusarium</i> aos 45 dias de cultivo 2018. b) Biometria soja 2020. UNESP, Ilha Solteira - SP.	109
Figura 16	- Exibição de sintomas de SDS em caule de soja ao final do ciclo. UNESP, Ilha Solteira - SP	110
Figura 17	- Análise foliar para macronutrientes em plantas de soja tratadas com <i>Trichoderma</i> , <i>Trichoderma</i> + <i>Fusarium</i> e <i>Fusarium</i> aos 45 dias de cultivo. UNESP, Ilha Solteira - SP.	111
Figura 18	- Análise foliar para micronutrientes em plantas de soja tratadas com <i>Trichoderma</i> , <i>Trichoderma</i> + <i>Fusarium</i> e <i>Fusarium</i> aos 45 dias de cultivo. UNESP, Ilha Solteira - SP.	112
Figura 19	- Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre as variáveis analisadas para plantas de soja tratadas com <i>Trichoderma</i> , <i>Trichoderma</i> + <i>Fusarium</i> e <i>Fusarium</i> aos 45 dias de cultivo. UNESP, Ilha Solteira - SP.	113
Figura 20	- Aspecto das folhas de soja tratadas com <i>Trichoderma</i> (A), <i>Trichoderma</i> + <i>Fusarium</i> (B) e <i>Fusarium</i> (C e D) visualizadas em microscópio eletrônico de varredura. UNESP, Ilha Solteira - SP.	114
Figura 21	- Caracterização morfológica de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>glycines</i> presente nas raízes da soja, visualizadas em microscópio eletrônico de varredura evidenciando as fiálides e formação de falsas cabeças. UNESP, Ilha Solteira - SP.	115
Figura 22	- Hifas de <i>T. atroviride</i> em tecido radicular de soja (a). Hifas e esporos de <i>Trichoderma atroviride</i> em vasos lenhosos de pecíolo de soja (a). UNESP, Ilha Solteira - SP.	116

Capítulo IV

Figura 1	- Atividade quitinolítica de cepas de <i>Trichoderma</i> isoladas no agroecossistema amazônico, cultivo em placas. UNESP, Ilha Solteira - SP.	152
Figura 2	- Atividade quitinolítica de cepas de <i>Trichoderma</i> isoladas do agroecossistema amazônico. UNESP, Ilha Solteira - SP.	153
Figura 3	- A imagem mostra o isolado TQ crescendo sobre o meio de cultura seletivo rico em compostos de celulose (CMC), a seta indica o tamanho do halo usado para calcular o índice enzimático. UNESP, Ilha Solteira - SP.	154
Figura 4	- Índice de ação enzimática (IE) de cepas de <i>Trichoderma</i> . UNESP, Ilha Solteira - SP.	155
Figura 5	- Tubos contendo as reações que revelam a concentração de ácido indol acético produzidos pelos isolados de <i>Trichoderma</i> em diferentes tempos de cultivo. UNESP, Ilha Solteira - SP.	157
Figura 6	- Concentração de AIA produzido por isolados de <i>Trichoderma</i> em diferentes tempos de tempo de incubação. UNESP, Ilha Solteira - SP.	158
Figura 7	- Imagem mostrando o crescimento dos isolados <i>Trichoderma</i> em meio indicador de solubilização de fosfato, onde a alteração da cor do meio indica a liberação de P. UNESP, Ilha Solteira - SP.	159
Figura 8	- Isolados de <i>Trichoderma</i> crescendo em meio NBRIP. UNESP, Ilha Solteira - SP.	160
Figura 9	- Concentração de P Livre em solução com diferentes tratamentos aos três, seis e nove após a inoculação. UNESP, Ilha Solteira-SP.	160
Figura 10	- Concentração de Gliceolina (Abs - g mf ⁻¹) com e sem o uso de autoclave dentro de cada tratamento. UNESP, Ilha Solteira - SP.	161
Figura 11	- Concentração de Gliceolina (Abs - g mf ⁻¹) para cada tratamento dentro da condição de autoclavado ou não. UNESP, Ilha Solteira - SP	162
Figura 12	- Concentração de Faseolina (Abs - g mf ⁻¹) com e sem o uso de autoclave dentro de cada tratamento. UNESP, Ilha Solteira - SP.	163
Figura 13	- Concentração de Faseolina (Abs - g mf ⁻¹) para cada tratamento dentro da condição de autoclavado ou não. UNESP, Ilha Solteira - SP.	163
Figura 14	- Mesocótilos de sorgo em solução elicitora proveniente dos isolados de <i>Trichoderma</i> . UNESP, Ilha Solteira - SP.	164

Figura 15 - Acúmulo de desoxiametidina em mesocótilos de sorgo elicitados por cepas de *Trichoderma* tendo a água como controle negativo e o ASM bion e *Saccharomyces cerevisiae* como controles positivos. Unesp, Ilha Solteira - SP. 165

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Análise de variância (quadrados médios) para os parâmetros biométricos altura de planta, inserção da 1ª vagem, nós por planta e número de vagens por planta para aplicações foliares de isolados de <i>Trichoderma</i> sp. com presença e ausência de níquel. UNESP, Ilha Solteira - SP.	63
Tabela 2	- Análise de variância (quadrados médios) para os parâmetros biométricos sementes por planta, sementes por vagem, massa de mil sementes e produtividade para aplicações foliares de isolados de <i>Trichoderma</i> sp. com presença e ausência de níquel. UNESP, Ilha Solteira - SP.	66
Tabela 3	- Análise de variância para germinação final (GF), primeira contagem da germinação (PG), emergência a campo (EM), índice de velocidade de emergência (IVE), comprimento de planta (CP), massa seca de planta (MSPA), envelhecimento acelerado (EA), plântulas normais na primeira contagem do envelhecimento acelerado (PEA) e condutividade elétrica (CE) em soja submetida a aplicação de níquel e <i>Trichoderma</i> sp.. UNESP, Ilha Solteira - SP.	70
Tabela 4	- Desdobramento da interação para o teste de condutividade elétrica, UNESP, Ilha Solteira - SP.	79

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	20
2	CAPÍTULO I: Revisão de literatura	24
2.1	A cultura da soja	26
2.2	Problemas relacionados à agricultura convencional	27
2.3	Bioestimulantes	29
2.4	Controle biológico de doenças de plantas: potencialidades de uso para uma agricultura sustentável	33
2.4.1	Controle biológico	33
2.4.2	Mecanismos de ação dos agentes de biocontrole	34
2.4.3	Bactérias como agentes de controle biológico	35
2.4.4	Biocontrole mediado por leveduras	37
2.4.5	Biocontrole mediado por fungos	37
2.5	CONCLUSÕES	39
2.6	AGRADECIMENTOS	39
2.7	REFERÊNCIAS	40
3	CAPÍTULO II: Aplicação de <i>Trichoderma</i> e níquel afeta a produtividade e qualidade fisiológica de sementes de soja?	49
3.1	INTRODUÇÃO	51
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	56
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.4	CONCLUSÕES	75
3.5	REFERÊNCIAS	76
4	CAPÍTULO III: Biocontrole da síndrome da morte súbita e promoção de crescimento por <i>Trichoderma</i> na soja	82
4.1	INTRODUÇÃO	84

4.2	MATERIAL E MÉTODOS	86
4.2.1	Teste de antagonismo in vitro	86
4.2.1.2	Cultivo pareado para obtenção das fotografias em MEV	87
4.2.2	Identificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	87
4.2.3	Biocontrole da Síndrome da morte súbita da soja in vivo	88
4.2.4	Avaliação dos parâmetros fisiológicos, biométricos e nutricionais das plantas de soja:	89
4.2.4.1	Pigmentos fotossintetizantes	89
4.2.4.2	Ureídeos, açúcares totais e sacarose	89
4.2.4.2.1	Determinação de açúcares	89
4.2.4.2.2	Determinação de nitrato e amônio	90
4.2.4.2.3	Determinação de ureídeos	90
4.2.4.3	Avaliações biométricas	91
4.2.4.4	Análise química do material vegetal	91
4.2.5	Aspecto geral das plantas	91
4.2.5.1	Avaliação em microscópio eletrônico de varredura (MEV)	91
4.2.6	Análise estatística dos resultados	92
4.3	RESULTADOS	92
4.4	DISCUSSÃO	112
4.5	CONCLUSÕES	127
4.6	AGRADECIMENTOS	128
4.7	REFERÊNCIAS	129
5	CAPÍTULO IV: Caracterização de isolados de <i>Trichoderma</i> prospectados no agroecossistema amazônico e seleção de potenciais agentes de biocontrole e promotores de crescimento de plantas	137
5.1	INTRODUÇÃO	139
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	140
5.2.1	Obtenção dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	140
5.2.2	Atividade quitinolítica	141
5.2.3	Atividade celulolítica	141

5.2.4	Determinação de ácido indol acético (AIA)	142
5.2.5	Cultivo em meio seletivo para microrganismos solubilizadores de fosfato (método qualitativo)	143
5.2.6	Indução de resistência	144
5.2.6.1	Acúmulo de gliocinas em cotilédones de soja	144
5.2.6.2	Acúmulo de faseolinas em hipocótilos de feijão	145
5.2.6.3	Acúmulo de desoxianocianidina em mesocótilos de sorgo	146
5.2.7	Registro fotográfico das placas de petri	147
5.2.8	Análises estatísticas	147
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	148
5.4	CONCLUSÕES	162
	REFERÊNCIAS	163

1 INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, a agricultura é um dos pilares da economia, ocupando uma área plantada de 77 milhões de hectares, atingindo uma produção de 312,2 milhões de toneladas de grãos em 2022, com crescimento de 3,3% ou 2,49 mil hectares sobre a safra anterior, além da geração de mais de 19 milhões de postos de trabalhos. O setor agropecuário representa 48% das exportações totais do país e os produtos do agronegócio geram um saldo comercial de US\$ 72,5 bilhões (CNA, 2022). Contudo, esse sucesso vem sendo alcançado com o uso exagerado de defensivos agrícolas para o controle de plantas invasoras, pragas e doenças nas culturas.

Os agricultores brasileiros têm comprado grandes volumes de defensivos agrícolas, ultrapassando os produtores Estadunidenses, tornando-se o terceiro no *ranking* de consumo destes agroquímicos (FAOSTAT, 2022).

Embora o uso de pesticidas seja uma prática antiga, seu uso foi intensificado após a Segunda Guerra Mundial (GAVRILESCU, 2005). Os impactos ambientais advindos da aplicação de agrotóxicos são extensos. Existem problemas relacionados à deriva destes produtos, contaminação dos solos, ar, água e alimentos. Além disso, muitas vezes, não atuam de forma efetiva sobre o microrganismo alvo e acabam por comprometer a biodiversidade (MORILLO, 2017). A contaminação das pessoas que aplicam estes produtos ou das que se alimentam com produtos contaminados, ou ainda as que vivem em áreas agrícolas e respiram o ar afetado pela deriva na aplicação dos pesticidas é um fato relevante e preocupante. Existem estudos que comprovam a presença de até seis moléculas de defensivos agrícolas no leite materno (CARNEIRO, 2015).

Diferentemente de outros modelos de políticas de integração nacional que ocorreram no passado, a sociedade brasileira é atualmente mais crítica e vem demonstrando grande preocupação com os impactos da agricultura no ambiente e suas consequências. E por conseguinte, vem resultando no surgimento de segmentos de mercado para produtos diferenciados, produzidos sem o uso de agrotóxicos e/ou portadores de selos que garantem o uso adequado desses defensivos (MASSRUHÁ *et al.*, 2020).

Nesse sentido, com o crescimento gradual da população e a necessidade de produzir cada vez mais alimentos, há tendência natural no aumento dos problemas

ocasionados por esse modelo de agricultura. Além disso, o incremento dos custos com o controle químico, a perda da eficiência de alguns agrotóxicos, devido à resistência dos organismos alvos, e os problemas ambientais, em decorrência do uso destas substâncias, indicam a necessidade da busca de produtos biocompatíveis para o controle de fitopatógenos, dentre os quais estão os agentes de biocontrole (MORANDI, 2014).

O Brasil é o maior produtor mundial de soja. A cultura foi implantada em todas as regiões do país, ocupando áreas de norte a sul, leste a oeste do território nacional (CONAB, 2022). A produção desta oleaginosa é fortemente dependente do uso de defensivos agrícolas para o controle de pragas e doenças. Isto leva a um custo elevado de produção e ao meio ambiente que sofre as consequências do uso massivo de pesticidas. É preciso repensar nossa agricultura.

Os defensivos usados de forma indiscriminada têm gerado surgimento de resistência nos patógenos, além de ser baixa a eficiência para patógenos radiculares, como já discutido por Maffia e Mizubuti (2005) e David *et al.* (2018). Dentre as principais doenças da soja, podem-se citar a ferrugem asiática e a morte súbita ou podridão vermelha da raiz, todas causadas pelo complexo *Fusarium solani*. Esta doença causa grandes perdas de produção tornando-se uma preocupação mundial, visto que ocorrem nas maiores regiões produtoras do grão como Brasil, Argentina e Estados Unidos da América (AOKI, O'DONNELL e SCANDIANI, 2005; MARBURGER *et al.*, 2018; NAVI; YANG, 2016; ROY *et al.*, 1997; SPAMPINATO; SCANDIANI; LUQUE, 2021).

Como vantagens ao uso de pesticidas, os fungos do gênero *Trichoderma*, em especial o *Trichoderma atroviride*, objeto deste estudo, podem além de promover o controle de patógenos (DEGANI; DOR, 2021), aumentar a eficiência na absorção e uso de nutrientes (FIORENTINO *et al.*, 2018), melhorar a eficiência do uso do N, aumentar e modular a arquitetura das raízes e disponibilizar alguns como o P, através da fosfatase ácida ou alcalina (BONONI *et al.*, 2020) e produzir sideróforos quelando o Fe, atenuar estresses (salino, hídrico e a peroxidação lipídica) (BROTMAN *et al.*, 2013; GULER *et al.*, 2016) e, ainda, atuar como indutores de resistência de plantas (PASCHOLATI; SOUZA; CARDOSO FILHO, 2019; SALAS-MARINA *et al.*, 2015; SALAS-MARINA *et al.*, 2011) e como consequência, aumentar a produtividade das culturas. *Trichoderma atroviride* pode estabelecer relação simbiótica (endofítico) com

plantas como já descrito para tomate, algodão, feijão e soja (REBOLLEDO-PRUDENCIO *et al.*, 2020; SBRAVATTI JÚNIOR *et al.*, 2013; GUZMÁN-GUZMÁN *et al.*, 2017; PATEL *et al.*, 2019; PEDRERO-MÉNDEZ *et al.*, 2021) .

Como já mencionado, são considerados microrganismos eficientes por melhorarem a absorção e a eficiência do uso dos nutrientes. Além disso, muitas cepas são capazes de produzir hormônios vegetais, como auxinas e/ou análogos a estes (VINALE *et al.*, 2008).

Trichoderma é conhecido também por sua capacidade de realizar biorremediação de solos contaminados com herbicidas (COLLA *et al.*, 2008; CECHINEL, 2019), metais pesados (FONTES, 2016), resíduos industriais, derivados de petróleo (LEONEL *et al.*, 2018) e/ou diminuir o estresse de plantas que crescem em solos contaminados, auxiliando a fitorremediação (MASTOURI; BJÖRKMAN; HARMAN, 2012).

Druzhinina *et al.* (2018) relataram o micoparasitismo de espécies de *Trichoderma* sobre fungos fitopatogênicos e oomicetos por meio da produção de enzimas hidrolíticas como as glucanases, proteases e quitinases, que degradam a parede celular dos fitopatógenos. A atividade antifúngica foi verificada pela produção de metabólitos secundários como os peptaibols, poliquetídeos, terpenos e pironas que apresentaram efeito antibiótico sobre diversos patógenos como *Rhizoctonia*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Gaeumannomyces*, *Botrytis*, entre outros (KUBICEK *et al.*, 2011; HERMOSA *et al.*, 2014; MARRA *et al.*, 2019).

Além da comprovada eficácia de *Trichoderma atroviride* como hiperparasita, este ainda é capaz de induzir a resistência de plantas, agindo como elicitor. Liu *et al.* (2022) sugerem que a sinalização de ácido jasmônico e etileno (JA/ ET) pode dominar a resistência sistêmica induzida (ISR) do trigo contra giberela.

De acordo com Shaw *et al.* (2016), as espécies de *Trichoderma* relacionadas ao crescimento vegetal e aumento de produtividade, raramente se destacam como antagonistas de fitopatógenos, sendo raro apresentar esta dupla aptidão.

O *Trichoderma atroviride*, objeto deste estudo, demonstrou comportamento endofítico em soja, capacidade de controle de fitopatógenos, além de atuar melhorando a eficiência do uso de nutrientes, moldando a estrutura da raiz e aumentando a capacidade de absorção de Fe e P, além de produzir auxinas, celulasas

e quitinases que atuam na interação com a planta e autoproteção contra fungos fitopatogênicos. Desta forma, acreditamos que o uso de *Trichoderma atroviride* na cultura da soja pode ajudar a alcançar altas produtividades pela promoção de crescimento, redução de estresses bióticos e abióticos, permitindo reduzir o uso de defensivos agrícolas e até mesmo adubos químicos.

Diante do exposto acima, o uso de microrganismos benéficos como os fungos do gênero *Trichoderma* pode ser uma alternativa viável e de baixo custo devido seu grande potencial biotecnológico.

Trabalhos que avaliam a aplicação de *Trichoderma atroviride*, seus modos de ação, efeitos na produtividade, na qualidade de sementes e na indução de resistência de plantas são escassos.

Nos trabalhos realizados foram testadas as seguintes hipóteses:

- O *Trichoderma atroviride* produz metabólitos que atuam na promoção do crescimento de plantas;
- *T. atroviride* produz substâncias que atuam no biocontrole;
- *T. atroviride* é capaz de disponibilizar P complexado (fosfato de cálcio, fosfato de magnésio, quebrando as ligações e o tornando assimilável (in vitro).
- *T. atroviride* é eficiente no controle de patógenos radiculares, em especial *Fusarium solani* agente causal da morte súbita da soja;
- *T. atroviride* é capaz de estabelecer relação endofítica com a soja;
- *T. atroviride* é capaz de atenuar os danos causados pelo complexo *Fusarium solani* em plantas de soja.
- *T. atroviride* melhora a eficiência fotossintética, teores de clorofila e pigmentos acessórios como carotenóides, açúcares e ureídeos;
- *T. atroviride* influencia os componentes de produção na cultura da soja;
- O *Trichoderma atroviride* aumenta a produtividade das sementes de soja a campo;
- *Trichoderma atroviride* melhora a qualidade das sementes obtidas de soja;
- *Trichoderma atroviride* ativa a resistência induzida em plantas de soja.

2 **CAPÍTULO I: Revisão de literatura**

RESUMO

A agricultura no Brasil é um dos pilares da economia do país com uma área plantada de 60,7 milhões de hectares, uma produção de 230,3 milhões de toneladas de grãos e geração de 19 milhões de postos de trabalhos. Contudo, esse sucesso vem sendo alcançado com o uso exagerado de defensivos agrícolas nas culturas o que tem ocasionado uma série de problemas ambientais e de saúde pública. O uso de microrganismos eficientes com ação bioestimulante e no controle biológico é uma alternativa para diminuir os impactos dessa contaminação da cadeia alimentar. Desta forma a aplicação de microrganismos (fungos filamentosos, leveduras, bactérias) apresenta-se como uma ferramenta inteligente para a redução e/ou eliminação do uso de agroquímicos contra fitomoléstias e na promoção de crescimento de plantas, aumentando a produtividade das culturas. O objetivo dessa revisão foi apresentar um histórico do controle biológico no Brasil e potencialidades do seu uso como ferramenta para uma agricultura mais sustentável e com menores danos ao meio ambiente. O sucesso do biocontrole passa pelo conhecimento dos mecanismos de ação dos seus agentes, pesquisas que atestem a sua eficiência in vivo, formulações dos produtos biológicos, compatibilidade destes com outros produtos aplicados na cultura, adaptação aos diversos ambientes de cultivo, garantia de qualidade dos produtos, dificuldade de registro e principalmente pelo treinamento de mão de obra para trabalhar nessa área.

Palavras-chave: sustentabilidade; fitopatógenos; antagonismo.

ABSTRACT

Agriculture in Brazil is one of the pillars of the country's economy with a planted area of 60.7 million hectares, a production of 230.3 million tons of grains and generation of 19 million jobs. However, this success has been achieved with the exaggerated use of pesticides in crops, which has caused a series of environmental and public health problems. The use of efficient microorganisms with biostimulant action and biological control is an alternative to reduce the impacts of this contamination of the food chain. In this way, the application of microorganisms (filamentous fungi, yeasts, bacteria) presents itself as an intelligent tool for the reduction and or elimination of the use of agrochemicals against plant diseases and in the promotion of plant growth, increasing the productivity of cultures. The objective of this review was to present a history of biological control in Brazil and the potential of its use as a tool for more sustainable agriculture and with less damage to the environment. The success of biocontrol involves knowledge of the mechanisms of action of its agents, research that attests to its efficiency in vivo, formulations of biological products, their compatibility with other products applied in the crop, adaptation to different cultivation environments, guarantee of product quality , difficulty in registering and mainly due to the training of labor to work in this area.

Keywords: Sustainability; phytopathogens; antagonismo.

2.1 A cultura da soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é originária da China. Quando os portugueses e espanhóis navegavam buscando novas rotas de comércio, no século XVII, levaram a soja para o continente europeu onde ficou limitada aos jardins da corte. Já no continente americano, foi introduzida apenas em 1890 nos Estados Unidos, a princípio, cultivada como forrageira, destinada à alimentação animal.

As primeiras cultivares chegaram ao Brasil em 1882, na Bahia, mas não se adaptaram ao clima. Somente em 1891, o Instituto de Agronomia de Campinas introduziu novas cultivares e distribuiu sementes de soja para os produtores rurais do estado de São Paulo. Apenas, a partir de 1924, iniciaram os cultivos comerciais. O país tinha uma área de produção de 640 hectares, gerando 450 toneladas de grão por ano. O Brasil apareceu em estatísticas internacionais só em 1949 com a produção de 25 mil toneladas, mas com cultivos ainda restritos à região sul do país, onde se tornou uma opção de cultura de verão alternada ao trigo no inverno. Na década de 60 houve um salto na produção, de 206 mil toneladas, em 1960, para 1,056 milhão de toneladas, em 1969, com a maior área de produção no sul. Atualmente o Mato Grosso é o estado com a maior produção do grão.

A soja é uma das culturas mais importantes na economia mundial, sendo considerada base da alimentação de diversos povos. Seus grãos constituem importante fonte de proteínas, utilizados para a alimentação e na indústria para a produção de óleo vegetal, farelo e biocombustível.

O Brasil se destaca entre os maiores produtores e exportadores mundiais dessa leguminosa com uma produção de 151.419,4 milhões de toneladas, em uma área cultivada de 43.529,9 milhões de hectares e uma produtividade de 3.479 kg ha⁻¹ (CONAB, 2022), tornando-a uma fonte de riqueza para o país, gerando renda, emprego e contribuindo para melhorar o saldo da balança comercial.

Apesar da grande evolução tecnológica e das inovações para o manejo ao longo das últimas décadas, a cultura ainda enfrenta muitos desafios, dentre eles: o crescimento da demanda mundial por alimentos, as variações climáticas, os custos de produção elevados, o uso de insumos de baixa qualidade e/ou inadequado com consequente poluição ambiental e aparecimento de pragas e doenças resistentes que tem limitado a área de cultivo e a produtividade.

O aumento da população mundial até 2050 deve superar os 9,5 bilhões de pessoas e a produção agrícola deverá crescer 60% para atender a essa demanda alimentar (SAATH e FACHINELLO, 2018). Dessa forma, urge a necessidade do desenvolvimento de tecnologias alternativas para enfrentar os desafios, diminuindo os custos de produção, melhorando o rendimento, protegendo a cultura com ênfase na aplicação de insumos biológicos.

2.2 Problemas relacionados à agricultura convencional

O modelo de agricultura atual implica na adoção de kits tecnológicos onde normalmente é comercializada a semente e os agroquímicos que devem ser utilizados durante o ciclo da cultura. Isto envolve uma elevação do custo de produção, muitas vezes, uso desnecessário de inseticidas e fungicidas, nos quais já se determina o momento e o número de aplicações dos defensivos agrícolas. O uso intensivo destas substâncias tanto encarece o produto final quanto gera danos à saúde do trabalhador rural, a de pessoas que vivem em áreas agrícolas e ao meio ambiente.

De acordo com Zambolim (2014), as doenças de plantas sempre foram motivo de preocupação desde o século XIX, pois as epidemias geram grandes prejuízos econômicos e ambientais. Populações sofreram morte massiva por fome devido à ocorrência de epidemias nos cultivos. Um fato de destaque na história da fitopatologia foi a infestação dos batatais na Irlanda pelo fungo fitopatogênico *Phytophthora infestans*. Em decorrência da doença, morreram em torno de 1 milhão de pessoas e muitas tiveram que migrar. Este evento ficou conhecido como “A Grande Fome” (entre 1845 a 1852) e reduziu a população da Irlanda a 25 por cento (MOURA, 2002). Na cultura da soja, chegou a haver perda na produção em até 75% na região sul do país, devido à presença do fungo causador da ferrugem asiática. A brusone também causou grandes prejuízos às lavouras de arroz (50%). Na cultura do mamoeiro podem ocorrer grandes prejuízos, devido ao apodrecimento precoce dos frutos causado por *Colletotrichum gloeosporioides*, gerando danos de até 80%, bem como a fusariose no abacaxi e doenças relacionadas a patógenos radiculares ou de partes aéreas de diversas espécies agrícolas.

Os fungicidas tornaram-se necessários e inevitáveis, devido ao crescimento populacional e a necessidade do aumento da produtividade, para suprir a demanda por alimentos.

O Brasil fica em terceiro lugar no ranking de uso de pesticidas, perdendo apenas para os Estados Unidos e a China (FAOSTAT, 2022). Mesmo assim, o controle de doenças fúngicas tem se tornado um desafio, pois o uso de fungicidas para doenças radiculares é de baixa eficiência (DAVID *et al.*, 2018; MAFFIA; MIZUBUTI, 2005). O uso indiscriminado de fungicidas sistêmicos favorece o surgimento de novas raças resistentes a estas moléculas (OLIVEIRA *et al.*, 2015). Devido à intensificação no uso destes produtos, seus resíduos são facilmente encontrados no ambiente (solo, água, ar) e em produtos vegetais, visto que grande parte dos produtores não respeita o período de carência dos produtos aplicados nas culturas, tais como herbicidas, fungicidas, inseticidas, acaricidas, dentre outros. Vários desafios têm sido colocados na agricultura moderna, como a produção de produtos com qualidade, com redução no uso de pesticidas, respeito aos limites de tolerância de resíduos nos produtos comercializados, menor agressão ao meio ambiente e a sustentabilidade econômica, social e ambiental (ZAMBOLIM, 2014).

Relatos de resistência de patógenos à fungicidas sistêmicos vêm de diferentes partes do mundo. Vinodkumar (2017) descreve os prejuízos causados pela resistência à fungicidas por *Sclerotinia sclerotiorum*, na cultura do cravo, algodão, açafrão e bananas, no estado de Tamil Nadu, na Índia. No mesmo estudo, foram testados isolados de *Trichoderma*, oriundos da rizosfera de diferentes culturas e sua ação sobre patógenos, citando-se ainda os problemas gerados na perda da biodiversidade microbiana devido aos fungicidas não atuarem de forma específica nos organismos alvo.

Estudos estimam que menos de 0,1% dos pesticidas aplicados às culturas realmente atinjam a praga alvo, enquanto o remanescente entra facilmente no meio ambiente contaminando o ar, a água e o solo (PATINHA *et al.*, 2017; SPADOTTO, 2006; CARNEIRO, 2015). No Brasil, a resistência cruzada à azoxistrobina e piraclostrobina pelo patógeno da brusone do trigo *Pyricularia oryzae* à fungicidas tem causado muitos prejuízos à produção de trigo, de forma que o uso de defensivos químicos se tornou totalmente ineficaz (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Desta forma, urge a necessidade de buscar alternativas mais eficazes e menos danosas ao ambiente e à saúde humana. Dentre estas alternativas, destacam-se o uso de bioestimulantes e o controle biológico.

2.3 Bioestimulantes

Com o desenvolvimento da biotecnologia, bioquímica e da fisiologia vegetal, novos compostos têm sido identificados nos vegetais. Os avanços tecnológicos propiciam a síntese de novas moléculas eficientes que, quando aplicadas nas plantas, melhoram sua proteção e aumentam a produtividade. Esses agroquímicos de controle hormonal, classificados como biorreguladores, bioestimulantes e bioativadores, além de fitoquímicos antiestressantes, complexantes e condicionadores do sistema solo-planta, têm adquirido crescente importância na agricultura. O acibenzolar-S-metil (*Bion®) é considerado um produto que tem ação antiestresse promovendo aumento na produtividade, produtos compostos por aminoácidos, algas, sacarídeos, fosfitos, podem estimular os mesmos efeitos antiestressantes. Todos esses grupos de agroquímicos possuem potencial para melhorar e aumentar a produção de cultivos de forma econômica (CASTRO, 2010).

Para Bourscheidt (2011), o termo bioestimulante se refere à mistura de produtos à base de hormônios, micronutrientes, aminoácidos e vitaminas. Outros autores se referem aos bioestimulantes de forma a relacioná-los com os hormônios vegetais. Albrechet *et al.* (2012) definem reguladores vegetais ou biorreguladores como substâncias ou associações, podendo elas ser análogos químicos de hormônios vegetais. Os reguladores vegetais possuem ampla aplicabilidade fitotécnica em inúmeras culturas.

Castro e Vieira (2001) conceituam os bioestimulantes como substâncias sintéticas, constituídas por misturas de um ou mais biorreguladores com outros compostos quimicamente diferentes, como os sais minerais, e que provocam alterações nos processos vitais e estruturais da planta. Estes podem ser aplicados diretamente nas plantas, em folhas, frutos e sementes, provocando alterações nos processos vitais e estruturais (CASTRO; MELOTTO, 1989; FARIA, 2017).

Du Jardin (2015) aborda o tema bioestimulantes de uma forma mais ampla, considerando desde substâncias inorgânicas, aminoácidos, hormônios ou

microrganismos que desencadeiem respostas fisiológicas nas plantas. Por possuírem efeitos similares aos hormônios vegetais, podem promover aumento de qualidade e incremento na produção.

Estes produtos são transportados dentro da planta através das suas células, ativando várias reações fisiológicas como a expressão de proteínas. Estas proteínas interagem com vários mecanismos de defesa contra estresses na planta, permitindo que ela enfrente melhor as condições adversas, tais como estiagens, baixo pH, alta salinidade de solo, radicais livres, estresses por temperatura alta, efeitos tóxicos de níveis elevados de alumínio, ferimentos causados por pragas, ventos, granizo, ataque de viroses e deficiência de nutrientes (CASTRO, 2006). Por estas características, diversos autores atribuem o papel de controle biológico, visto que agem como elicitores estimulando a produção de proteínas de defesa vegetal, além do aumento na produtividade relacionado com a promoção de crescimento (CERIBOLLA, 2015; BONTEMPO, 2016; FARIA, 2017).

Produtos de regulação hormonal contendo auxinas têm sido amplamente utilizados no enraizamento de estacas para a propagação vegetativa. Também têm sido aplicadas para evitar a queda de frutos e para aumentar a produção de cultivos (TAIZ *et al.*, 2017).

Alguns microrganismos apresentam capacidade de produção de auxinas e/ou induzem a planta a produzi-las. Giberelinas desempenham um importante papel na germinação de sementes e aumentam a biomassa na produção, podendo restringir ou promover o florescimento e incrementar a produtividade. Citocininas combinadas com auxinas atuam na morfogênese e organogênese em cultura de tecidos e ampliam a duração de hortaliças em pós-colheita (CASTRO, 2010; BONTEMPO, 2016).

Os controladores hormonais, ou reguladores de crescimento vegetal, têm despertado atenção cada vez maior no agronegócio, à medida em que as técnicas de cultivo evoluem, principalmente, em culturas de grande importância econômica, como a soja. Dentre eles, pode-se citar os bioestimulantes (JARDIM, 2015).

O extrato de algas tem sido utilizado como bioestimulante em diversas culturas. A espécie *Ascophyllum nodosum* L. tem se destacado por apresentar propriedades que estimulam o crescimento vegetal, resistência de plantas às doenças e aumento na produtividade em grandes culturas como a soja (UGARTE *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2008; CRAIGIE, 2011, MARQUES *et al.*, 2014). Silva *et al.* (2008) verificaram a

eficácia de extrato de algas em sementes e plântulas de soja. Para os autores, o extrato gerou aumento na produtividade apresentando boa relação de custo benefício, o que têm estimulado seu uso no tratamento de sementes de soja.

Os estudos são bastante controversos, alguns apontam resultados eficazes e outros já mencionam que não pode ser verificado aumento na produtividade. Em alguns casos até resultados negativos, como no estudo de Binsfeld *et al.* (2014), os autores concluíram — ao testarem diferentes bioestimulantes sobre os efeitos na germinação de sementes — que o produto sofre influência dos lotes de sementes, apresentando efeitos mais pronunciados em lotes com maior vigor. No mesmo estudo, os pesquisadores não observaram efeitos positivos sobre as taxas de germinação, mas puderam verificar estes efeitos no desenvolvimento de plântulas. Um dos produtos testados (tiamethoxam), inclusive, apresentou efeitos negativos sobre a germinação de sementes e no desenvolvimento de plântulas de soja. Galindo *et al.* (2015) avaliaram efeito de bioestimulantes na cultura do milho; no estudo em questão, não foi observado aumento na produtividade. Já para Santos *et al.* (2017), em ensaios com 3 produtos bioestimulantes e 3 formas de aplicação, os resultados foram considerados positivos, visto que os produtos proporcionam incremento na altura de planta, maior produção de massa seca de raiz e aumento do volume do sistema radicular, tanto em aplicação via semente quanto via foliar.

Avaliando os efeitos de um produto bioestimulante composto por citocinina, ácido giberélico e ácido indolbutírico, Bertolin *et al.* (2010) constataram efeitos positivos na produtividade de duas variedades de soja, sendo os melhores resultados obtidos com a aplicação do produto na fase reprodutiva, visto que o aumento no tamanho das plantas não refletiu diretamente no aumento de produtividade. Neste estudo, os autores testaram doses e épocas de aplicação.

Corrêa e Martins (2017) também observaram efeitos benéficos deste estimulante quando aplicado em diferentes estádios do ciclo reprodutivo da soja. Os autores destacam que os produtos bioestimulantes são empregados, na maioria das vezes, via sementes. No entanto, também vem sendo realizadas aplicações foliares em diferentes estádios fenológicos, observando-se aumento do número de vagens por planta e a produtividade de grãos. Quanto à produtividade de grãos, as pesquisas revelam diferentes porcentagens de incremento na produção, sendo possível observar aumento de 37% em relação às plantas que não receberam bioestimulantes. Para os

referidos autores, o aumento da produtividade não está relacionado ao maior crescimento da parte aérea, considerando-se a altura das plantas, ramos por planta e altura de inserção da primeira vagem, mas sim à efetividade do bioestimulante quando aplicado na fase reprodutiva, como por exemplo, nos estádios reprodutivos, R1 e R5. Nesta fase fenológica, o número de vagens por planta pode ser em torno de 25% maior quando comparado à aplicação na fase vegetativa. Já para a produtividade de grãos, podem-se observar incrementos em torno de 40% em relação à aplicação do produto via sementes. Resultados semelhantes foram obtidos por Bertolin *et al.* (2010).

Outros autores salientam o papel de microrganismos capazes de promover o crescimento e/ou aumento de produtividade através dos mais diversos mecanismos de ação. Alguns microrganismos são endofíticos e podem ser aplicados via tratamento de sementes, outros devem ser aplicados no sulco de plantio, outros ainda devem ser aplicados via foliar em um ou mais estádios fenológicos da planta. Alguns destes organismos são capazes de realizar fosfatase ácida e/ou alcalina (BONONI, 2020), produzirem sideróforos (liberação de Fe) (VINALE *et al.*, 2013; FIORENTINO *et al.*, 2018), disponibilizando nutrientes para as plantas que estariam complexados e indisponíveis no solo.

Outro problema relacionado à agricultura convencional, nos tempos atuais, é o uso massivo de fertilizantes químicos. Estes são utilizados para alcançar altas produtividades nas lavouras. Além do alto custo, os fertilizantes também constituem uma fonte de poluentes relacionados à agricultura, sendo lixiviados muitas vezes para os rios, afetando a qualidade da água, promovendo a eutrofização de corpos d'água e comprometendo a biota local. Cabral (2007), cita que o uso de fertilizantes agrícolas e a criação de animais constituem outras importantes fontes de nitrato e/ou amônio em água subterrânea. Concentrações elevadas de nitrato, nitrito e amônia estão vinculados à incidência de doenças e problemas ambientais, tais como: câncer de estômago, bexiga, mama, síndrome do bebê azul, acidificação do solo, toxicidade dos peixes, eutrofização (BAIRD; CANN, 2011).

Além do aumento no número de vagens e na altura da planta, estes organismos podem atuar como atenuantes do estresse oxidativo aumentando a atividade de enzimas como a catalase e peroxidase. Também são encontrados estudos que apontam produtos biológicos como elicitores do sistema de defesa vegetal através da

expressão de proteínas de resistência, produção de quitinases, celulasas e reforços na parede celular, bem como produção de substâncias antagonicas a microrganismos patogênicos (OLIVEIRA *et al.*, 2012; BOAVA *et al.*, 2010; DORIGHELLO, 2017).

O uso de produtos biológicos apresenta como vantagem aos demais bioestimulantes a capacidade de controle de patógenos. Muitos destes patógenos estão estabelecidos no solo onde as sementes serão depositadas, podendo impedir a germinação, atacar as radículas ou causar *damping off* das plântulas comprometendo o *stand* de plantio (DORIGHELLO, 2017).

O fato é que muitas vezes o solo apresenta os patógenos, mas as plantas não expressam a doença, devido à presença de microrganismos antagonicos que tornam o solo supressivo (DAVID *et al.*, 2018). Estas interações benéficas entre microrganismos e plantas têm sido estudadas e vários produtos comerciais já foram lançados. No entanto, as interações entre os antagonistas, patógenos, as espécies vegetais e o solo são bastante complexas e dependem de diversos fatores, de forma que nem sempre se obtém os mesmos resultados.

2.4 Controle biológico de doenças de plantas: potencialidades de uso para uma agricultura sustentável

2.4.1 Controle biológico

De acordo com Baker e Cook (1974), o mundo biológico é uma vasta rede de interações de populações ativas em um estado de equilíbrio dinâmico, que refletem em mudanças no seu ambiente físico e nas suas inter-relações. Na natureza, existem os antagonistas naturais e as populações tendem a se equilibrar. No entanto, com o modelo da agricultura predominam os monocultivos, podendo levar a uma ataque massivo de pragas ou doenças pela perda da diversidade e a falta dos potenciais antagonistas destes organismos patogênicos.

Para Franz e Krieg (1982), o biocontrole consiste no uso de seres vivos para limitar, através da ação antrópica, as populações de certos animais e plantas daninhas. Hoje é vasta a aplicação do controle biológico na agricultura, sendo bastante efetivo no controle de doenças de plantas.

O controle pode ser realizado de forma clássica, quando há introdução (importação) de um inimigo natural em um ambiente em distúrbio, quando há promoção de práticas que permitam manter presentes (conservação) e até mesmo multiplicar os inimigos naturais no próprio ambiente (propagação) (MORANDI, 2009).

O primeiro relato do uso da técnica de controle biológico data de 1.200 a.C., com o cultivo de bambu entre plantas de citrus, com o objetivo de manter a população de formigas do gênero *Crematogaster*, que previniam o ataque de lagartas nos pomares (BARBOSA, 2004).

Um fato marcante na história mundial do controle biológico ocorreu em 1888 na Califórnia, onde foi introduzida uma joaninha (*Rodolia cardinalis*) para o controle de pulgão branco do citrus. Contudo, também existem relatos de tentativas mal sucedidas, principalmente quando envolvem a introdução de um organismo que não ocorria naquele ambiente, por isto é necessário um estudo bastante efetivo antes de lançar mão da introdução de organismos de outras áreas ou mesmo outros países. Sem um estudo do impacto da introdução do organismo, a população deste pode crescer demasiadamente e tornar-se praga, caso não haja um antagonista a ele (PARRA, 2014).

O biocontrole de doenças de plantas pode ser conceituado como controle de um microrganismo por meio de outro microrganismo. Iniciou-se como ciência em 1926 com o monitoramento do agente causal da sarna-comum da batata (MORANDI, 2014).

No Brasil, o controle biológico e seu uso estão relacionados à criação do Instituto Biológico de São Paulo em 1927. No momento, o foco eram os estudos de controle para as pragas e doenças do cafeeiro (GONÇALVES, 1996).

2.4.2 Mecanismos de ação dos agentes de biocontrole

O controle biológico exige um estudo aprofundado sobre a ecofisiologia da espécie alvo. Para que se tenha sucesso na introdução de um agente de controle biológico é necessário estudar não apenas a interação dele com a do organismo alvo, bem como a relação com o ambiente e outras espécies. As principais formas de ação dos agentes de biocontrole são: (PARRA *et al.*, 2022)

- Antibiose - caracterizado pela produção de um ou mais metabólitos que terão ação sobre o outro organismo, inibindo a germinação, crescimento ou esporulação.
- Competição - quando os organismos ocupam o mesmo nicho ecológico e competem por espaço, alimento e oxigênio.
- Parasitismo - quando um organismo se nutre de estruturas do outro organismo. Os hiperparasitas atacam hifas, estruturas de resistência e reprodução.
- Hipovirulência - introdução de linhagens do patógeno menos agressivas ou avirulentas que irão transmitir estas características aos microrganismos patogênicos ou competir pelos sítios de infecção.
- Predação - quando o agente de biocontrole se nutre dos patógenos e de outras fontes de matéria orgânica.
- Indução de resistência - quando de alguma forma o agente de biocontrole estimula ou ativa os mecanismos bioquímicos de defesa da planta.

De certa forma, normalmente, os microrganismos utilizados como agentes de biocontrole apresentam mais de uma das ações descritas e é preciso que este tenha certa tolerância às moléculas comerciais mais utilizadas, sendo compatível com pesticidas e herbicidas (ZAMBOLIM, 2014).

O biocontrole pode ser aplicado a vários tipos de organismos: plantas daninhas, animais (principalmente os insetos pragas), nematoides, vírus, bactérias e fungos. Neste estudo, abordaremos o controle de fitopatógenos.

2.4.3 Bactérias como agentes de controle biológico

No cenário mundial, o uso de microrganismos no controle biológico apresenta-se como uma alternativa inteligente para a redução e/ou eliminação do uso de agroquímicos contra fitomoléstias. O emprego de procariotos como agentes antagonicos de fitopatógenos tem se mostrado uma alternativa crescente no manejo integrado de doenças (LANNA FILHO, *et al.*, 2010).

As interações entre antagonista-patógeno-hospedeiro vêm sendo discutidas em diversos trabalhos, devido à grande diversidade de microrganismos, ambientes e suas relações ecológicas (TIMPER *et al.*, 2016; MA, 2015).

Dentre os gêneros de bactérias promotoras de biocontrole destacam-se: *Pseudomonas* fluorescentes (*P. putida* e *P. fluorescens*), *Bacillus* ssp., *Streptomyces* ssp. e *Pasteuria penetrans*.

A preocupação com a alta toxidez das moléculas químicas disponíveis no mercado estimulou diversos estudos como o de Oliveira *et al.* (2017). Os autores apresentam o uso de *Bacillus subtilis* como alternativa viável ao uso de nematicidas químicos. Após 30 dias de semeadura da cultura, os resultados obtidos com o biocontrole se igualam ao controle químico com o nematicida carbofurano.

Vários estudos apontam a eficácia do uso de *Bacillus subtilis*. Uma vantagem deste grupo é capacidade de formar endósporos. Estes são estruturas de resistência e sobrevivência capazes de manter a bactéria no ambiente por longos períodos. Além da capacidade de Biocontrole, as bactérias deste gênero são descritas como rizobactérias promotoras do crescimento em plantas, podendo ser epifíticas e endofíticas (LANNA FILHO *et al.*, 2010; CORRÊA *et al.*, 2010). Produzem uma grande diversidade de metabólitos antifúngicos como os lipopeptídeos das famílias das surfactina, iturina e fengicina. A surfactina promove a ação antibacteriana como demonstrado por Ongena *et al.*, (2005). Sua ação antifúngica é amplamente estudada. Ma (2015) demonstrou a eficácia da aplicação de *Bacillus subtilis* em plantas de tomate infectadas pelo fungo *Rhizoctonia solani* tendo apresentado bom controle sobre o patógeno radicular. Corrêa *et al.* (2010) também encontraram bons resultados contra a podridão de raízes de alface hidropônica causadas por *Pythium aphanidermatum* e como agente promotor de crescimento.

Kupper *et al.* (2003) verificaram taxa de eficiência de *Bacillus subtilis* no controle de *Colletotrichum acutatum* comparada ao do fungicida benomyl. Khedher *et al.* (2015) comprovaram a atividade antifúngica de *Bacillus subtilis* sobre o crescimento de *Rhizoctonia solani* in vitro e constatou eficiência de 81% no controle da podridão negra da batata, bem como, sua ação promotora de crescimento nestas plantas. *Pasteuria penetrans* tem sido utilizada por sua ação antagônica a nematoides do gênero *Meloidogyne*, seu mecanismo de ação foi descrito por Timper (2016).

Apesar de não causar a morte dos nematoides, diretamente, esta bactéria atua sobre a fertilidade das fêmeas e o número de ovos viáveis. Quando as fêmeas são infectadas, passam a eliminar uma massa de endósporos da bactéria que coloniza o solo. Em solos com concentrações elevadas de endósporos, estes apresentam fator

de supressão aos nematoides, podendo exercer ação principalmente sobre os juvenis. Sharma (2003) obteve controle de nematoides de galha da soja em até 10% nas maiores doses de aplicação de *Pasteuria penetrans*.

As *Pseudomonas* do grupo fluorescente têm sido intensamente estudadas para o controle biológico devido à grande diversidade de organismos, as quais apresentam ação antagônica. Peixoto (1997) descreve sua ação no controle da murcha do tomateiro causada por outra bactéria do mesmo gênero, a *Pseudomonas solanacearum*. Em experimento in vitro, ficou demonstrado seu efeito antagônico sobre diversas bactérias, contudo, em experimento a campo, seu efeito não foi tão efetivo, mas apresentou taxas de controle da murcha bacteriana em 60% e também foi demonstrada sua ação como promotora de crescimento.

Corrêa et al. (2010) destacaram as ações de *Pseudomonas chlororaphis* sobre o fungo causador de podridão de raízes de alface em cultivo hidropônico. A inoculação com o agente de biocontrole promoveu um ganho de massa de 6 a 13% e aumento no número de folhas entre 4 a 7%, quando comparadas à testemunha. A aplicação do patógeno *Pythium aphanidermathum* em plantas que não receberam *Pseudomonas* causou subdesenvolvimento das plantas de alface em 20%.

Santos et al. (2010) obtiveram 33 isolados de *Pseudomonas* oriundos de solos de diferentes áreas, destes 19 demonstraram efeito inibitório sobre *Macrophomina phaseolina*, causador da podridão de carvão. Lanna Filho et al. (2010) avaliaram o efeito do biocontrole da mancha bacteriana e a pinta preta por bactérias epifíticas em tomateiro. O estudo demonstrou a eficácia de *Bacillus pumilus* e *Paenibacillus macerans*. Em folíolos destacados, as bactérias epifíticas controlaram em 70% o número de células de *Xantomonas* no filoplano, realizando de forma eficiente o controle sobre estes patógenos.

Para o controle de uma das principais doenças do arroz, a brusone, cujo agente causal é o fungo fitopatogênico *Magnaporthe oryza*, Rêgo et al. (2013) verificaram que as bactérias *Burkholderia pyrrocinia* e *Pseudomonas fluorensceus*, bem como o fungo filamentoso *Trichoderma asperellum* promoveram controle significativo da doença com o tratamento de sementes de arroz.

2.4.4 Biocontrole mediado por leveduras

Leveduras têm sido utilizadas com sucesso no biocontrole de fitopatógenos, principalmente como tratamento em pós colheita de espécies frutíferas. Estudos desenvolvidos por Lassois (2008) demonstraram o efeito benéfico da aplicação de duas leveduras no controle de doenças da bananeira. O autor utilizou as leveduras *Pichia anômala* e *Candida oleophila*, obtendo resultados de 59% de redução da podridão de bananas tratadas com leveduras em comparação à testemunha. Sui (2012) destaca os efeitos positivos do tratamento com *Candida oleophila* em frutos de maçã. A levedura promoveu bom controle contra os patógenos *Penicillium expansum* e *Botrytis cinérea*, principalmente, quando as leveduras receberam pré-tratamento com o complexo GB (glicina e betaina). O uso de GB melhorou a adaptação de *Candida* nos fermentos das frutas, melhorando desta forma sua eficiência.

O uso de leveduras como antagonistas aos fungos fitopatogênicos *Colletotrichum musae*, *Fusarium moniliforme* e *Cephalosporium* sp. foi objeto de estudo de Lassois (2008), onde os autores avaliaram, ao longo de 3 anos, o controle destes patógenos sob a influência de moléculas químicas e dos agentes de biocontrole *Candida oleophila* e *Pichia anômala*. Os testes sob condições controladas demonstraram o bom efeito de *Candida oleophila* sob o patógeno *Colletotrichum musae*. Todavia, no ambiente natural este potencial pode ser ainda maior, mas não é fácil prever o comportamento. Existe a necessidade de testes a campo em condições naturais, visto que as interações com o ambiente ou outras espécies pode favorecer o controle ou diminuir a ação dos antagonistas.

2.4.5 Biocontrole mediado por fungos

A busca por fungos endofíticos antagonistas é abordada por Sbravatti Junior e colaboradores (2013). Os autores estudaram fungos endofíticos em eucalipto com potencial antagônico a *Botrytis cinerea*, causador do mofo cinzento em mudas de eucalipto, sendo eles: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* sp..

Os fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* estão entre os mais estudados e utilizados como agentes de biocontrole de fitopatógenos em todo o mundo. Possuem mecanismos de ação muito diversificados, têm ação antagônica sobre diversos

fitopatógenos, agem por competição, predação, produzem metabólitos voláteis e não voláteis de ação comprovada em diversos estudos, agem como promotores de crescimento de plantas (BORTOLIN *et al.*, 2019; FIORENTINO *et al.*, 2018; PERES, 2022) e estimulam a defesa do vegetal (BEZERRA *et al.*, 2019; BENÍTEZ *et al.*, 2004; GARNICA-VERGARA *et al.*, 2016; ISAIAS, 2014). Esses mecanismos, diretos ou indiretos, podem atuar de forma coordenada e sua importância no processo de controle dependerá da cepa de *Trichoderma*, dos fungos antagonizados, da planta do cultivo e das condições ambientais, incluindo a disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura, concentração de ferro. Cada mecanismo implica a produção de compostos e metabólitos específicos, como fatores de crescimento de plantas, enzimas hidrolíticas, antibióticos, sideróforos, e permeases de carbono e nitrogênio (BENÍTEZ *et al.*, 2004).

Diversos outros fungos demonstraram efeito inibitório sobre fitopatógenos em estudos realizados por alguns pesquisadores. Piccinin *et al.* (2010) comprovaram a ação de metabólitos do basidiocarpo de shiitake no controle de manchas foliares de sorgo. Marino *et al.* (2013) demonstraram a ação antagonica de outro basidiomiceto, o *Pleurotus ostreatus* em um experimento in vivo para cultivo de alface, utilizando o substrato exaurido na confecção de canteiros infestados com concentração conhecida de nematoides. Todos os isolados promoveram redução no número de galhas e ovos quando comparados à testemunha.

Diversos autores pesquisaram o efeito antagonico de *Clonostachys rosea* sobre fungos fitopatogênicos, bem como os seus metabólitos, responsáveis pela antibiose. Este bioagente de controle também é considerado hiperparasita de fungos como *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora palmivora*, dentre outros (MORANDI *et al.*, 2001; SARAIVA *et al.*, 2014; SIVERA-PÉREZ *et al.*, 2010; LIU, 2016). Devido ao seu potencial de controle de fitopatógenos e pragas agrícolas, o *Clonostachys rosea* tem sido estudado em busca de formulações e meios alternativos de cultivo para produção massal. Carvalho *et al.* (2014) demonstraram bons resultados em cultivo em meio líquido sob agitação, contendo dextrose como fonte de carboidrato, em pH 4,0 e fotoperíodo de 12 horas.

Soares (2010), estudando a ação de fungos sobre nematoides, constataram o ótimo desempenho in vitro do fungo *Monacrosporium robustum* sobre espécies

diferentes de nematoides (*Heterodera glycines*, *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*, *Rotylenchulus reniformis* e *Tylenchulus semipenetrans*). Em laboratório, a adição de exemplares destes nematoides à cultura do fungo levaram entre 8 horas a 3 dias para a completa eliminação dos fitonematoides. Entretanto, os mesmos autores, testando diversos fungos em condições de campo, não obtiveram os mesmos resultados. O controle a campo foi mais efetivo usando uma mistura de fungos (*Arthrobotrys musiformis*, *Arthrobotrys oligospora*, *Dactylela leptospora*, *Monacrosporium robustum* e *Paecilomyces lilacinus*) sob o cultivo protegido e/ou irrigado. Não conseguiram obter bons resultados aplicando estes predadores de nematoides em um pomar de citrus, devido ao longo período de seca que se estabeleceu no momento da condução do experimento a campo. Desta forma, está claro que tanto para nematoides ou fungos causadores de fitomoléstias, o controle biológico é bastante complexo, uma vez que são seres vivos, que interagem com a microbiota local e alguns fatores ambientais podem ser limitantes.

2.5. Conclusões

O controle biológico no Brasil tem ganhado mercado. Atualmente, podemos falar em controle biológico para grandes culturas como a soja, tendo como produtos inseticidas, nematicidas e fungicidas. Já se estabeleceu a relação de antagonismo às principais doenças da soja. Hoje o desafio está nas formulações dos produtos biológicos, na compatibilidade destes com outros produtos aplicados na cultura, adaptação aos diversos ambientes de cultivo, garantia de qualidade dos produtos, viabilidade e dificuldade de registro ainda são entraves ao uso de agentes de biocontrole.

O sucesso do biocontrole passa pelo conhecimento dos mecanismos de ação dos seus agentes, pesquisas que atestem a sua eficiência in vivo, formulações que se mantenham estáveis por longos períodos e, principalmente, pelo treinamento de mão de obra para trabalhar nesta área.

2.6 Agradecimentos

Agradecemos à Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT) por possibilitar nosso afastamento para qualificação a nível de doutorado e à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita” (UNESP) pelo acolhimento pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

REFERÊNCIAS

- AOKI, T. *et al.* 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**, Oxford, v. 46, n. 3, p. 162-183, 2005.
- BAIRD, C.; CANN, M. **Química ambiental**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2011. 844 p
- BAKER, K.; COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens**. [S. l.]: WH Freeman and Company, 1974.
- BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas o homem e o meio ambiente**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2004. 215 p.
- BENITEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Basel, v.7, p. 249-260, 2004.
- BERTOLIN, D. C.; SÁ, M. E.; ARF, O.; FURLANI JUNIOR, E.; COLOMBO, A. S.; CARVALHO, F. L. B. M. Aumento da Produtividade de Soja com a Aplicação de Bioestimulantes. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 2, p. 339-347, 2010.
- BEZERRA, G. d. A., *et al.* Identificação e seleção de espécies de *Trichoderma* spp. endofíticos de bromélias de restingas como agentes de biocontrole da fusariose em frutos de abacaxi. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 45, p. 172-178, 2019.
- BINSFELD, J. A., *et al.* Uso de bioativador, bioestimulante e complexo de nutrientes em sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Brasília, DF, v. 44, p. 88-94, 2014.
- BOAVA, L. P. *et al.* Atividade de quitinases e peroxidases em folhas de eucalipto em diferentes estágios de desenvolvimento após tratamento com acibenzolar-S-metil (ASM) e inoculação com *Puccinia psidii*. **Tropical Plant Pathology**, Heidelberg, v. 35, p.124-128, 2010.
- BONONI, L. **Bioprospecção de *Trichoderma* spp. envolvidas na solubilização de fosfato e no controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja**. 2020. 135 f. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo- USP, São Paulo, 2020.
- BONONI, L., *et al.* Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. **Scientific Reports**, London, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020.
- BONTEMPO, A. F., *et al.* Influência de bioestimulantes e nutrientes na emergência e no crescimento inicial de feijão, soja e milho. **Brazilian journal of maize and sorghum**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 86-93, 2016.

BORTOLIN, G. S., *et al.* Trichoderma na promoção do desenvolvimento de plantas de *Paspalum regnellii* Mez. **Revista de Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 135-145, 2019.

BOURSCHEIDT, C. **Bioestimulante e seus efeitos agrônômicos na cultura da soja (glycine Max)**. 2011. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso-Curso de Agronomia do Departamento de Estudos Agrários da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul-UNIJUÍ, Ijuí, 2011.

BROTMAN, Y., *et al.* Trichoderma-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. **PLoS pathogens**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e1003221, 2013.

CABRAL, N. M. T. Teores de nitrato (NO₃⁻) e amônio (NH₄⁺) nas águas do aquífero Barreiras nos bairros do Reduto, Nazaré e Umarizal-Belém/PA. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p.1804-1808, 2007.

CARNEIRO, F. F. **Dossiê ABRASCO**: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: EPSJV, São Paulo: Expressão Popular, 2015. 624 p.

CASTRO, P. R. C. Agroquímicos de controle hormonal na agricultura tropical. **Série Produtor Rural**, Piracicaba, n. 32, 2006. 46p.

CASTRO, P. R. C. Novos agroquímicos controle hormonal e outros fotoquímicos. Agroanalysis especial abisolo – **Revista do agronegócio da FGV**, São Paulo, v. n. 1, p. 30-32, 2010.

CARVALHO, A. L. A. **Produção massal do fungo Clonostachys rosea em meio líquido**. 2014. 55 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Lavras- UFLA, Minas Gerais, 2014.

CASTRO, P. R. C. **Ação de stimulate no desenvolvimento inicial de plantas de algodoeiro (Gossypium hirsutum L.)**. Piracicaba: USP. Departamento de Ciências Biológicas, 2002. 3 p.

CASTRO, P. R. C.; VIEIRA, E. L. **Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, p.132.

CASTRO, P. R. C.; MELLOTO, E. Bioestimulantes e hormônios aplicados via foliar. In: BOARETO, A. E.; ROSOLEM, C. A. **Adubação foliar**. Campinas: Fundação Cargill, 1989. v. 1, cap. 8, p. 191-235, 2001.

CASTRO, P. R. C.; VIEIRA, E.L. **Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Livraria e Editora Agropecuária, Guaíba, 2001. p. 132,.

CECHINEL, L. (2019). **Isolamento de fungos a partir de solo com uso intenso de agroquímicos, visando a biorremediação**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnólogo em Gestão Ambiental), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2019.

CERIBOLLA, E. C. **Bioestimulante na cultura da soja (*Glycine max* L.)**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia), Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ, Ijuí, 2015.

COLLA, L. M., *et al.* Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, p. 809-813, 2008.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, Brasília, DF, v. 9, safra 2021/2022, n. 9, nono levantamento, Brasília, p.1-99, junho 2022.

CORREA, C. V. ; MARTINS, B. N. M. . Aumento de produtividade da soja com a aplicação de bioestimulantes. **Campo e Negócios: Grãos**, Uberlândia, p. 14 - 17, 01 maio 2017.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL (CNA). **Boletim safra de grãos 2021/2022**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos/>. Acessado 05/01/2023.

CORRÊA, E. B.; BETTIOL, W.; SUTTON, J. C. Controle biológico da podridão radicular (*Pythium aphanidermatum*) e promoção de crescimento por *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 e *Bacillus subtilis* GB03 em alface hidropônica. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 4, p. 275-281, 2010.

CRAIGIE, J. S. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. **Journal of applied phycology**, Dordrecht, v. 23, p. 371-393, 2011.

DAVID, G. Q. *et al.* Rhizoctonia como fitopatógeno no agroecossistema brasileiro. In: LOPES, Ueder Pedro; MICHEREFF, Sami Jorge. **Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos**. Recife: EDUFRPE, 2018. p. 35-55.

DEGANI; DOR. Trichoderma Biological Control to Protect Sensitive Maize Hybrids against Late Wilt Disease in the Field. **Journal of Fungi**, Basel, v. 7, 2021.

DORIGHELLO, D. V. **Versatilidade de *Bacillus* spp. no controle biológico de doenças de plantas e na promoção de crescimento de soja**. 2017. 135 f. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista- UNESP, Botucatu, 2017.

DRUZHININA, I. S *et al.* Massive lateral transfer of genes encoding plant cell walldegrading enzymes to the mycoparasitic fungus *Trichoderma* from its plantassociated hosts. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 14, n. 4, p. e1007322, 2018.

DU JARDIN, Patrick. Bioestimulantes vegetais: Definição, conceito, principais categorias e regulamentação. **Scientia horticulturae**, Amsterdam, v. 196, p. 3-14, 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS-FAOSTAT. **Crops**. [S. l.: s. n.], 2022.

FARIA, T. C. **Desempenho de bioestimulantes e sua viabilidade econômica na cultura da soja**. 2017. 62 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

FIORENTINO, N., *et al.* Trichoderma-Based Biostimulants Modulate Rhizosphere Microbial Populations and Improve N Uptake Efficiency, Yield, and Nutritional Quality of Leafy Vegetables. **Front Plant Sci**, Lausanne, v. 9, 2018.

FONTES, L. d. C. **Isolamento e seleção de fungos com potencial para biorremediação a partir de ambientes aquáticos com histórico de contaminação por metais pesados**. 2016. 92 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo- USP, São Paulo, 2016.

FRANZ, J.; A. KRIEG. **Biological pest control, with regard to integrated measures**. **Biological pest control, with regard to integrated measures**. 3rd ed. [S. l.: s. n.], 1982.

FRANZ, J. M *et al.* **Controle biológico de pragas, no que diz respeito a medidas integradas**. **Controle biológico de pragas, no que diz respeito a medidas integradas**. 3. ed. emendada, 1982.

GALINDO, F. S. **Desempenho agrônomo do milho e do trigo em função da inoculação com azospirillum brasilense e doses e fontes de nitrogênio**. 2015. 150 f. (Dissertação) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2015.

GARNICA-VERGARA, A., *et al.* The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from Trichoderma atroviride regulates Arabidopsis thaliana root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. **New Phytologist**, Cambridge, v. 209, n. 4, p. 1496-1512, 2016.

GAVRILESCU, M. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. **Engineering in Life Science**, Weinheim, v. 5, n. 6, p. 497-526, 2005.

GONÇALVES, L. Fatos históricos do controle biológico. **Revista Floresta e Ambiente**, Seropedica, ano 3, p. 96-101, 1996.

GULER, N. S., *et al.* Trichoderma atroviride ID20G inoculation ameliorates drought stress-induced damages by improving antioxidant defence in maize seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 38, n. 6, p. 132, 2016.

GUZMÁN-GUZMÁN, P., *et al.* Identification of effector-like proteins in Trichoderma spp. and role of a hydrophobin in the plant-fungus interaction and mycoparasitism. **BMC genetics**, London, v. 18, n. 1, p. 1-20, 2017.

HERMOSA, R., *et al.* The contribution of Trichoderma to balancing the costs of plant growth and defense. **Int. Microbiol**, Basel, v. 16, n. 2, p. 69-80, 2013.

ISAIAS, C. O., *et al.* Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 40, p. 34-41, 2014.

KHEDHER, S. B., *et al.* Efficacy of *Bacillus subtilis* v26 as a biological control agente against *Rhizoctonia solani* on potato. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 338, p. 784-792, 2015.

KUBICEK, C. P. *et al.* Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. **Genome Biology**, London, v. 12, n. 4, R40, 2011.

KUPPER, K.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, p. 251-257, 2003.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 12, 2010.

LASSOIS, L. *et al.* Biological control of crown rot of bananas with *Pichia anomala* strain K and *Candida oleophila* strain O. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 45, n. 3, p. 410-418, 2008.

LEONEL, L. V., *et al.* Biorremediação do solo. **Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa**, [s. l.], v. 26, n. 51, p. 37-52, 2018.

LIU, H., *et al.* Effects of *Trichoderma atroviride* SG3403 and *Bacillus subtilis* 22 on the Biocontrol of Wheat Head Blight. **Journal of Fungi**, Basel, v. 8, n. 12, p. 2022.

LIU, J. Y., *et al.* Transaldolase gene Tal67 enhances the biocontrol activity of *Clonostachys rosea* 67-1 against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Philadelphia, v. 474, p. 503-508, 2016.

LIU, Y. and N. von Wirén. Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 68, n. 10, p. 2581-2592, 2017.

MA, X., *et al.* Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 90, p. 34-41, 2015.

MAFFIA, L. A. e E. S. MIZUBUTI. **Epidemiologia de doenças radiculares**. Recife: UFRPE, 2005. p. 209-246.

MARBURGER, D. A., *et al.* Characterizing the Effect of Foliar Lipo-chitoooligosaccharide Application on Sudden Death Syndrome and *Sclerotinia* Stem Rot in Soybean. **Plant Health Progress**, St. Paul, v. 19, n. 1, p. 46-53, 2018.

MARRA, R. *et al.* Application of Trichoderma Strains and Metabolites Enhances Soybean Productivity and Nutrient Content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 67, n. 7, p. 1814-1822, 2019.

MASSRUHA, S. M. F. S.; Leite, M. A. A. ; Luchiari, A. ; EVANGELISTA, S.R.M. A transformação digital no campo rumo à agricultura sustentável e inteligente. *In*: MASSRUHA, S. M. F. S. *et al.* (org.). **Agricultura digital**: pesquisa, desenvolvimento e inovação nas cadeias produtivas. Brasília, DF: Embrapa, 2020. v. 1, p. 20-45.

MASTOURI, F. *et al.* Trichoderma harzianum enhances antioxidant defense of tomato seedlings and resistance to water deficit. **Molecular plant-microbe interactions**, St. Paul, v. 25, n. 9, p. 1264-1271, 2012.

MORANDI, M. A. B. **Influência de fatores bióticos e abióticos no estabelecimento de Clonostachys rosea em tecidos de roseira e controle biológico de Botrytis cinerea pelo antagonista em restos culturais.** [S. l.: s. n.], 2001.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W.. **Controle biológico de doenças de plantas no Brasil.** [S. l.: s. n.], 2009.

MORANDI, M. A.; BETTIOL, W.; PAULA JÚNIOR, T. J. Controle biológico de doenças de plantas. ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, WC; RODRIGUES, FA (Eds.). **O essencial da fitopatologia**: controle de doenças de plantas. Viçosa: UFV, 2014. p. 175-234.

MORANDI, Marcelo Augusto Boechat. **Influência de fatores bióticos e abióticos no estabelecimento de Clonostachys rosea em tecidos de roseira e controle biológico de Botrytis cinerea pelo antagonista em restos culturais.** [S. l.: s. n.], 2001.

MORILLO, E.; VILLAYERDE, J. Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 586, p. 576-597, 2017.

MOURA, R.M. Relembrando Anton de Bary e sua obra fitopatológica. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, p. 337-343, 2002.

NAVI, S. S. e YANG, X. Sudden death syndrome—a growing threat of losses in soybeans. **CAB Rev** 11, [s. l.], v. 1, 2016.

OLIVEIRA, A. G.; CHAGAS JÚNIOR, A. F.; SANTOS, G. R.; MILLER, L. O.; CHAGAS, L. F. B. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por Trichoderma spp. **Revista Verde**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 149-155, 2012.

OLIVEIRA, G. R. F., *et al.* Influência do Bacillus subtilis no controle biológico de nematoides e aspectos produtivos do feijoeiro. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 47-58, 2017.

OLIVEIRA, S. C. d., *et al.* Resistência cruzada aos fungicidas IQo azoxistrobina e piraclostrobina no patógeno da brusone do trigo *Pyricularia oryzae* no Brasil. **Summa Phytopathologica** Botucatu, v. 41, p. 298-304, 2015.

ONGENA, M. *et al.* Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. **Applied microbiology and biotechnology**, Heidelberg, v. 69, p. 29-38, 2005.

PARRA, J. R. P. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Pulo: Manole, 2002.

PARRA, J. R. P. Biological Control in Brazil: an overview. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 71, 2014.

PARRA-ARROYO, L. *et al.* Highly hazardous pesticides and related pollutants: Toxicological, regulatory, and analytical aspects. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 807, p. 151879, 2022.

PARRA-ARROYO, L. *et al.* Pesticidas altamente perigosos e poluentes relacionados: aspectos toxicológicos, regulatórios e analíticos. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 807, p. 151879, 2022.

PASCHOLATI, S. F. *et al.* Indução de resistência por *Trichoderma*. **Trichoderma: uso na Agricultura**; Embrapa Soja, Brasília, v. 1, p. 235-254, 2019.

PATEL, J., *et al.* Trichoderma-mediated biocontrol and growth promotion in plants: an endophytic approach. *In*: KUMAR, A.; SINGH, A. K.; CHOUDHARY, K. K. **Role of Plant Growth Promoting Microorganisms in Sustainable Agriculture and Nanotechnology**. [S. l.]: Woodhead, 2019. p. 219-239.

PATINHA, C., *et al.* Long-term application of the organic and inorganic pesticides in vineyards: environmental record of past use. **Applied Geochemistry**, Oxford, v. 88, p. B, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apgeochem.2017.05.014>

PEDRERO-MÉNDEZ, A., *et al.* Why Is the Correct Selection of Trichoderma Strains Important? The Case of Wheat Endophytic Strains of *T. harzianum* and *T. simmonsii*. **Journal of Fungi**, Basel, v. 7, 2021.

PEIXOTO, A. R. Controle biológico da murcha do tomateiro, por *Pseudomonas* sp. fluorescentes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 153-160, 1997.

PERES, W. M. **Uso de Trichoderma atroviride na cultura do feijoeiro**. 2022. 101 f. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista- UNESP, Ilha Solteira, 2022.

PICCININ, E.; DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F. Cogumelo “Shiitake” (*Lentinula edodes*) reduz o crescimento de fitopatógenos e a severidade de manchas foliares em sorgo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.36, n.1, p. 68-72, 2010.

REBOLLEDO-PRUDENCIO, O. G., *et al.* Chapter 1 - Trichoderma in the rhizosphere: an approach toward a long and successful symbiosis with plants. GUPTA, V. K. *et al.* **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. London: Elsevier, 2020. p. 3-38.

RÊGO, M. C. F. *et al.* Uso de agentes de biocontrole sobre a brusone das panículas do arroz em campo. **Tropical Plant Pathology**, Heidelberg, v. 38, Supplement, 2013.

ROY, K.W. Fusarium solani on soybean roots: nomenclature of the causal agent of sudden death syndrome and identity and relevance of Fusarium solani form B. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n.3, p.259-266, 1997.

ROY, K.W. *et al.* Sudden death syndrome: Fusarium solani as incitant and relation of Heterodera glycines to disease severity. **Phytopathology**, St. Paul, v. 79, n.2, p.191-197, 1989.

SAATH, K. C. d. O. and A. L. Fachinello. Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, Brasília, DF, v. 56, p. 195-212, 2018.

SALAS-MARINA, M. A., *et al.* Colonization of Arabidopsis roots by Trichoderma atroviride promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 131, n. 1, p. 15-26, 2011.

SALAS-MARINA, M. A., *et al.* The Epl1 and Sm1 proteins from Trichoderma atroviride and Trichoderma virens differentially modulate systemic disease resistance against different life style pathogens in Solanum lycopersicum. **Front Plant Sci**, Lausanne, v. 6, p. 77, 2015.

SANTOS, P. J. C.; BENATO, L.C.; SOUZA, N.V.; VIEIRA, N.D.; ALMEIDA, A.M.R. Utilização de Pseudomonas fluorescens no controle biológico de Macrophomina phaseolina. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, [S. l.], 2010.

SANTOS, V. M.; MELO, A. V. ; CARDOSO, D. P. ; GONÇALVES, A. H ; SOUSA, D. C. V.; SILVA, A. R . Using biostimulants growth of soybean Glycine max (L.). **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**, [s. l.], v. 12, p. 512-517, 2017

SARAIVA, R. M., *et al.* Uso e perspectiva de Clonostachys rosea como agente de biocontrole. **Revista de Ciências Agrícola**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 78-91, 2014.

SBRAVATTI JÚNIOR, J. A., *et al.* Seleção in vitro de fungos endofíticos para o controle biológico de Botrytis cinerea em Eucalyptus benthamii. **Floresta**, Curitiba, v. 43, n. 1, p. 145-152, jan/mar. 2013.

SHARMA, R. D. **Controle biológico do nematoide das galhas com a bactéria Pasteuria penetrans**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2003. 13 p.

SHAW, S., *et al.* Transcriptional reprogramming underpins enhanced plant growth promotion by the biocontrol fungus *Trichoderma hamatum* GD12 during antagonistic interactions with *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. **Molecular plant pathology**, Chichester, v. 17, n. 9, p. 1425-1441, 2016.

SILVA, T. T. A.; PINHO, E. V. R. V.; CARDOSO, D. L.; FERREIRA, C. A.; ALVIM, P. O.; COSTA, A. A. F. Qualidade fisiológica de sementes de milho na presença de bioestimulantes. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 840-846, 2008.

SILVERA-PÉREZ, A. E., *et al.* Controle do mofo cinzento com *Clonostachys rosea* na produção de mudas de fúcsia. **Tropical Plant Pathology**, Heidelberg, v. 35, p. 163-169, 2010.

SOARES, P. L. M. **Formulação de fungos nematófagos à base de bagaço de cana e implantação de uma unidade piloto de produção e distribuição no Câmpus da UNESP/FCAV**. 2010. 257 f. Tese (Pós-Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias, 2010.

SPADOTTO, C. A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. **Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar**, São Manuel, p. 1-9, 2006.

SPAMPINATO, C. P., *et al.* Soybean sudden death syndrome: Fungal pathogenesis and plant response. **Plant pathology**, West Sussex, v. 70, n. 1, p. 3-12, 2021.

SUI, Y., *et al.* Pretreatment of the yeast antagonist, *Candida oleophila*, with glycine betaine increases oxidative stress tolerance in the microenvironment of apple wounds. **International Journal of food microbiology**, Amsterdam, v. 157, p. 45-51, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 858 p.

TIMPER, P., *et al.* Influence of crop production practices on *Pasteuria penetrans* and suppression of *Meloidogyne incognita*. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 99, p. 64-71, 2016.

UGARTE, R. A.; SHARP, G.; MOORE, B. Changes in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. Plant morphology and biomass produced by cutter rake harvests in southern New Brunswick, Canada. **Journal of Applied Phycology**, Heidelberg, v. 18, p. 351-359, 2006.

VIEIRA, E. L. **Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor de plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2001. 122p. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2001.

VINALE, F., *et al.* Trichoderma–plant–pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 1-10, 2008.

VINALE, F., *et al.* (2013). Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. **FEMS microbiology letters**, Oxford, v. 347, n. 2, p. 123-129, 2013.

VINODKUMAR, S.; INDUMATHI, T.; NAKKEERAN, S. *Trichoderma asperellum* (NVTa2) as a potential antagonist for the management of stem rot in carnation under protected cultivation. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 113, 2017.

3 CAPÍTULO II: Aplicação de *Trichoderma* e níquel afeta a produtividade e qualidade fisiológica de sementes de soja?

RESUMO

A aplicação de *Trichoderma* e níquel tem proporcionado melhoria em diversas culturas. Este estudo avaliou o efeito de aplicações foliares de *Trichoderma* sp. e níquel (Ni) em cultivo de soja BMX Potência no estágio R5 sobre os componentes de produção, produtividade e qualidade fisiológica das sementes. Os tratamentos consistiram em 4 isolados de *Trichoderma* sp. (sendo 1 comercial) mais a testemunha e 2 formas de aplicação de níquel (presença e ausência de 50 ppm) em esquema fatorial 5 x 2 com 4 repetições. Na colheita, foram separadas 10 plantas sequenciais para a biometria e obtenção das sementes para os testes de laboratório. Foram avaliadas características de vigor pelo teste de germinação, primeira contagem da germinação, emergência a campo, IVE, comprimento de plântulas, massa seca de plântulas, envelhecimento acelerado e condutividade elétrica. As sementes produzidas mostraram alto desempenho nos testes de vigor. Os tratamentos com *Trichoderma* propiciaram incremento nos componentes de produção: número de vagens, aumento no número de sementes por vagem, número de sementes por planta e na massa de 1000 grãos, demonstrando ação na promoção de crescimento nas plantas de soja. Os isolados de *Trichoderma* sp. proporcionaram vigor de sementes superiores à testemunha e ao produto comercial.

Palavras-chave: microrganismos benéficos; micronutrientes, vigor.

Does the application of *Trichoderma* and nickel affect the productivity and physiological quality of soybean seeds?

ABSTRACT

The application of *Trichoderma* and nickel has provided improvement in several crops. This study evaluated the effect of foliar applications of *Trichoderma* sp. and nickel (Ni) in soybean cultivation BMX Potency at stage R5 on the components of production, productivity and physiological quality of seeds. Treatments consisted of 4 *Trichoderma* sp. (1 commercial) plus the control and 2 forms of nickel application (presence and absence of 50 ppm) in a 5 x 2 factorial scheme with 4 replications. At harvest, 10 sequential plants were separated for biometrics and obtaining seeds for laboratory tests. Vigor characteristics were evaluated by germination test, first germination count, field emergence, IVE, seedling length, seedling dry mass, accelerated aging and electrical conductivity. The seeds produced showed high performance in vigor tests. The treatments with *Trichoderma* provided an increase in the production components: number of pods, increase in the number of seeds per pod, number of seeds per plant and in the mass of 1000 grains, demonstrating action in promoting growth in soybean plants. *Trichoderma* sp. provided superior seed vigor to the control and the commercial product.

Keywords: beneficial microorganisms; micronutrientes; force.

3.1. Introdução

A soja (*Glycine max*) é a principal oleaginosa produzida e consumida no mundo. Tal importância reside no fato de, ao ser processada, origina dois subprodutos, o óleo e o farelo. Ambos são muito utilizados como ração animal e também na alimentação humana. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de soja desde o ano de 2020, quando ultrapassou os Estados Unidos. Na safra 2021/2022, a área ocupada pela cultura em nosso país foi de 35,1 milhões de hectares, com uma produção de 118,9 milhões de toneladas e uma produtividade de 3.382 Kg ha⁻¹ (USDA, 2022).

No cenário atual, o Brasil vem apresentando um ritmo crescente de expansão das áreas com a cultura da soja. Demandas internacionais aliadas à estabilidade de preços e avanços tecnológicos na área de biotecnologia e qualidade das sementes que proporcionam melhorias no sistema de cultivo têm ditado esse ritmo de crescimento que nos leva a uma previsão para a safra 22/23 de 42,5 milhões de hectares plantados com a cultura e uma produção estimada em 139 milhões de toneladas (USDA, 2022).

Apesar da previsão otimista de expansão na área de plantio para a safra 22/23, o aumento nos custos de produção em 142% para fertilizantes e 116% com proteção do cultivo pode inibir esta expansão. Ainda, o uso de fertilizantes nas lavouras pode ser reduzido, em decorrência da escassez e do produto e elevados preços de mercado, afetados por problemas internacionais, como a invasão russa à Ucrânia, visto que grande parte dos nossos fertilizantes tem origem russa. De forma que os países produtores desta oleaginosa têm buscado alternativas para suprir a falta de fertilizantes.

A demanda por alimentos não cessa e a agricultura tem suprido esta necessidade de produção mundial de alimentos, baseada no uso massivo de agroquímicos, especialmente os herbicidas e os fertilizantes químicos. O modelo atual de agricultura é totalmente dependente destes insumos agrícolas, com um custo muito alto ao meio ambiente. É preciso buscar solução tecnológica para o aumento de produtividade sem aumentar o volume de agroquímicos, de forma a reduzir os danos oriundos da atividade agrícola.

Diversos estudos apontam o uso de microrganismos eficientes favorecendo o desenvolvimento das plantas, ganho em produtividade e/ou aumento no teor de

nutrientes no tecido vegetal (biofortificação) (PII *et al.*, 2015; VEJAN *et al.*, 2016). O papel da microbiota do solo tem ganhado destaque nos últimos anos. Hoje sabemos que a aplicação de *Bradyrhizobium* na soja é uma prática comum e comprovadamente eficiente, pois o microrganismo reduz o uso de fertilizantes nitrogenados gerando grande redução nos custos de produção (ZUFFO *et al.*, 2021; HUNGRIA *et al.*, 2010; HUNGRIA, VARGAS; e CAMPO, 1997; VARGAS e HUNGRIA, 1997; CARGNELUTTI *et al.*, 2021). Existem muitos microrganismos capazes de solubilizar fosfato (BONONI *et al.*, 2020), potássio, além de disponibilizar compostos altamente adsorvidos nas partículas de solo como, por exemplo, o ferro e o fósforo (VEJAN, 2016; RIBAS, 2016; FIORENTINO, 2018). Desta forma, têm-se avançado os estudos sobre microrganismos benéficos e suas ações na promoção de desenvolvimento vegetal. O uso de microrganismos pode reduzir a necessidade de fornecimento de adubos químicos e até mesmo substituí-los, como ocorre com o N na soja e a inoculação com *Bradyrhizobium*. Isso se tornaria uma alternativa viável ecológica e economicamente ao intenso uso de agroquímicos.

O gênero *Trichoderma* tem sido apontado como um potencial solubilizador de fosfatos (BONONI *et al.*, 2020). Algumas espécies têm capacidade de solubilizar P, K e agem também como sideróforos (RIBAS, 2014), além de atuarem no ambiente rizosférico protegendo as plantas contra patógenos radiculares (PII *et al.*, 2015).

A qualidade fisiológica das sementes tem papel importante na formação inicial e no desenvolvimento das plantas de soja, proporcionando incrementos na produção (SCHUCH, 2009), sendo que a avaliação da qualidade fisiológica das sementes sobre o estabelecimento e desempenho das plantas de soja em condições de campo têm sido relevantes, devido à importância desta oleaginosa no agronegócio mundial (SCHUCH; KOLCHINSKI; FINATTO, 2009).

De acordo com Peske *et al.* (2012), a qualidade das sementes pode ser atribuída aos seguintes atributos: genéticos (que envolvem além da pureza varietal, outros aspectos genéticos com influência do ambiente como potencial de produtividade, resistência a pragas e moléstias, precocidade, qualidade do grão e resistência a condições adversas de solo e clima, entre outros); físicos (pureza física, umidade, danos mecânicos, peso de 1.000 sementes, aparência e peso volumétrico); fisiológicos (expresso principalmente pelo vigor e germinação, além de dormência em algumas espécies) e sanitários (além da infecção e infestações das sementes por

microrganismos patogênicos que podem afetar a germinação e o vigor, a semente infectada pode se tornar o principal veículo de introdução de patógenos em algumas áreas).

Inúmeros fatores influenciam na qualidade fisiológica das sementes, dentre eles, podemos citar a quantidade de reserva responsável por nutrir as plântulas nas fases iniciais de desenvolvimento, a sanidade das sementes, uma vez que patógenos podem prejudicar a germinação, e emergência (STRAHL *et al.* 2021). Danos mecânicos e danos causados por insetos, que também afetam a germinação. A disponibilidade de nutrientes que influi na formação do embrião e na translocação de fotoassimilados para os órgãos de reserva, assim como na composição química da semente, dessa forma, pode-se maximizar a qualidade da semente (SÁ, 1994)

Para maximizar a produção e a qualidade fisiológica das sementes de soja, podem ser utilizados microrganismos benéficos em conjunto com micronutrientes, que aplicados nas plantas, promoverão um melhor desempenho inicial, plantas com maior vigor, estande homogêneo e como consequência, gerarão aumento na produtividade da cultura. Estudos com níquel (Ni) e com o fungo *Trichoderma* spp. podem ser promissores para alavancar áreas de cultivo com maior produtividade, com melhor sanidade e com a possibilidade de gerar sementes com elevado padrão fisiológico (SEREGIN, 2006).

A nutrição desempenha papel fundamental na qualidade fisiológica das sementes. A concentração de nutrientes minerais nos tecidos está diretamente relacionada ao seu desempenho onde a sua deficiência afeta inúmeros processos vitais da célula, comprometendo o vigor. De modo geral, quanto maior o teor de reserva nas sementes, maior será o vigor das plântulas originadas (HENNING *et al.* 2010).

O acúmulo de reservas nas sementes, quando feito adequadamente, promove um bom desenvolvimento inicial das plântulas até que essas se tornem autossuficientes. A germinação envolve uma drástica intensificação de processos metabólicos que atuam sobre os nutrientes armazenados durante o processo de maturação. Células que inicialmente sintetizavam amido insolúvel, proteínas e lipídios durante a formação da semente, passam a hidrolisar estes compostos. Esta inversão da ativação e translocação envolvem desativação de enzimas e transformação dos drenos em fontes (MARENCO; LOPES, 2005).

Os minerais desempenham funções específicas dentro da planta e das sementes, portanto, quando são disponibilizados de forma insuficiente, as plantas ficam com deficiências e, conseqüentemente, o aporte de nutrientes para a semente fica comprometido. Os nutrientes são geralmente fatores limitantes no crescimento, produção e reprodução de plantas, que dependem também diretamente do acúmulo de macro e micronutrientes. Nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, molibdênio, níquel e outros desempenham papel fundamental no desenvolvimento e crescimento das plantas, desde as fases iniciais da germinação (MARSCHNER, 2011).

O níquel é um micronutriente essencial, por ser constituinte da urease, enzima que catalisa a degradação da ureia em dióxido de carbono (CO_2) e amônia (NH_3), tornando-o importante para o metabolismo do nitrogênio nas plantas (REIS *et al.* 2014). Essa relação com a fixação simbiótica do nitrogênio (FBN) se dá pelo aumento da atividade da hidrogenase em bacterioides isolados dos nódulos. Trabalhos têm demonstrado que o baixo nível de níquel nos solos agrícolas pode limitar a atividade da hidrogenase (URETA *et al.*, 2005).

Segundo Seregin e Kozhevnikova (2006), a absorção do níquel pelas plantas é realizada principalmente pelo sistema radicular, via difusão passiva e transporte ativo, preferencialmente absorvido na forma de Ni^{2+} , embora possa ocorrer também nas formas Ni^+ e Ni^{3+} . Na forma solúvel, é rapidamente absorvido pelas raízes, apresentando grande mobilidade na planta. Citrato e malato podem servir para o transporte no xilema. No floema, a mobilidade é alta, sendo que 70% do níquel acumulado na parte aérea pode ser translocado para as sementes (LEVY, 2013).

O níquel tem importância como catalisador de enzimas em rotas bioquímicas nas plantas, afetando a ciclagem de carbono e nitrogênio e de metabólitos secundários. São conhecidas como dependentes do níquel, as enzimas: urease, monóxido de carbono desidrogenase, desidrogenase de Ni, metil coenzima M redutase, superóxido dismutase, NiFe hidrogenase, acetil-coenzima A sintase, RNA-A (KRAJEWSKA, 2009).

Na germinação de sementes (BROWN; WELCH; CARY, 1987), onde plantas cultivadas com privação de níquel produzem sementes com baixo índice de germinação e plântulas com crescimento reduzido. Na resistência de plantas a doenças (WELLS; WOOD, 2008), pesquisas de Graham *et al.* (1985) e Brown *et al.* (1987) demonstraram que níquel controla certas doenças, devido a alterações

metabólicas induzidas por meio da planta hospedeira, levando à redução da severidade da doença.

Nesse sentido, aplicações de níquel em plantas de soja poderiam incrementar os teores desse micronutriente nas sementes, promovendo a atividade da urease e contribuindo para produção de sementes de melhor qualidade (LAVRES; CÂMARA, 2016).

Microrganismos benéficos como o *Trichoderma* spp. ocorrem de forma natural nos ecossistemas, diminuindo os efeitos prejudiciais causados pelos fitopatógenos, evitando maiores perdas aos produtores. Algumas linhagens de *Trichoderma* spp. aumentam a superfície total do sistema radicular, favorecendo um maior acesso aos elementos minerais. São capazes de solubilizar e disponibilizar para as plantas o fosfato de rocha, ferro, cobre, manganês e zinco. Também podem melhorar os mecanismos ativos de absorção de macro e micronutrientes, bem como aumentar a eficiência na utilização de nutrientes importantes, como o nitrogênio (LUCON, 2009).

Outro fator relacionado ao melhor desenvolvimento de plantas por isolados benéficos de *Trichoderma* spp. é o aumento da resistência aos estresses abióticos (umidade, pH, temperatura) (CHAGAS JÚNIOR *et al.*, 2022). Pesquisas apontam que plantas tratadas com esses agentes podem ter seu desempenho favorecido quando cultivadas em condições subótimas, ou seja, em condições estressantes (LUCON, 2009).

O fungo *Trichoderma* spp. destaca-se como extraordinário agente de biocontrole. Sua ação antagonista ocorre em função da produção de metabólitos voláteis e não voláteis, pelo hiperparasitismo e pela competição por espaço e nutrientes (BRAND *et al.*, 2009). Além da sua ação como antagonista, destaca-se também como promotor de crescimento (VEJAN *et al.*, 2016). Trabalhos realizados por Lohmann *et al.* (2007) citam a redução da ocorrência de *Sclerotium rolfsii*, causador do “damping off” em plântulas de soja. Howell (2007) também encontrou redução da ocorrência de “damping off” na cultura do algodão. Junges *et al.* (2014) relata que houve aumento no vigor das plântulas de milho com aplicação de *Trichoderma* spp. nas sementes de milho.

Trichoderma spp. são microrganismos atóxicos ao homem e aos animais e o custo de aplicação é bem acessível. Alguns, ainda, podem persistir no solo ou nas plantas, podendo dispensar reaplicações. Sabe-se que a promoção de crescimento

de plantas por bactérias e por fungos pode envolver produção de hormônios vegetais e

vitaminas ou conversão de materiais a uma forma útil para a planta, absorção e translocação de minerais (FARIA; ALBUQUERQUE; CASSETARI NETO, 2003).

A adição de *Trichoderma* spp. a solos autoclavados aumentou a emergência e a matéria seca de plântulas de tomate e de fumo. Em solos naturais, observou-se que isolados de *Trichoderma* spp. proporcionaram maior germinação de sementes, emergência e vigor de plântulas de berinjela (FARIA; ALBUQUERQUE; CASSETARI NETO, 2003).

Na ocasião da semeadura, a aplicação pode ser realizada nas sementes, no substrato de mudas ou no sulco de plantio, antes do transplante das mudas. Assim, é possível oferecer uma vantagem competitiva ao agente benéfico em relação aos patógenos presentes no solo. Depois da cultura implantada no campo, os organismos antagonistas podem ser aplicados por pulverização ou gotejamento. Mesmo que o produto seja aplicado nas folhas, as suas estruturas propagativas desenvolver-se-ão em locais apropriados, como por exemplo nas raízes (LUCON, 2009).

Tendo em vista o cenário atual de escassez de agroinsumos, decorrente da guerra entre a Rússia e Ucrânia, e a necessidade de um aporte de nutrientes no período reprodutivo, onde a nodulação das raízes já está comprometida, o presente estudo tem por objetivo avaliar a eficiência da aplicação foliar tardia (R5) de níquel (Ni) e *Trichoderma atroviride* sobre a produtividade e a qualidade fisiológica de sementes de soja.

3.2 Material e métodos

O experimento foi desenvolvido na fazenda experimental da Universidade Estadual Paulista – UNESP, localizada no município de Selvíria-MS, Brasil (20°20'57" S e 51°24'30" W). O clima predominante, de acordo com a classificação de Köppen, é do tipo Aw (tropical com inverno seco), com temperatura média anual de 25°C, precipitação pluviométrica média anual de 1.330 mm e umidade relativa do ar média de 66%. A altitude local é de 348 m acima do nível do mar. O solo é classificado como Latossolo Vermelho Distrófico típico argiloso.

As sementes utilizadas foram da cultivar BMX Potência. A parcela experimental foi constituída por 5 linhas de soja com 5 m cada, espaçadas 0,45 m entre si, totalizando 11,25 m² a área de cada parcela. A área útil da parcela foi constituída pelas 3 linhas centrais, desprezando-se 0,5 m em ambas as extremidades.

A semeadura foi realizada no sistema direto, sendo que para o preparo da área de cultivo foi usado o dessecante glifosato (1.560 g ha⁻¹). No preparo do solo foi mantida a palha da cultura anterior (feijão caupi - 8.600 Kg ha⁻¹) e adubado conforme o resultado da análise de solo, onde foi adicionado NPK (8-28-16) na dose de 250 Kg ha⁻¹, conforme recomendação do Boletim Técnico 100 (RAIJ, 1996).

A área semeada foi irrigada por meio de pivô central com a aplicação de uma lâmina de água de 15 mm a cada 3 dias. Foram adotados os tratos culturais comuns à cultura com pulverização de inseticida para o controle de pragas e fungicida preventivo para ferrugem asiática. Os tratamentos experimentais foram aplicados via foliar, por meio de pulverização, no estágio de desenvolvimento caracterizado como R5 (granação das vagens).

O delineamento estatístico foi o de blocos casualizados em esquema fatorial 5 x 2, sendo 4 microrganismos + 1 testemunha e 2 formas de aplicação — com e sem Ni — com 4 repetições. Foram testados 4 isolados do fungo *Trichoderma* sp., sendo 3 isolados obtidos em solos supressivos na região de Alta Floresta- MT e um produto comercial de *Trichoderma asperellum*. A concentração utilizada para os isolados de *Trichoderma* sp. foi de 200 g do pó do produto (2 x 10⁹ esporos por g de produto) incorporados para 300 L há⁻¹ de calda, e duas formas de aplicação: com níquel (50 mg L⁻¹) e sem níquel (Ni) e as testemunhas, 1 sem isolado de *Trichoderma* sp. e sem níquel e outra com níquel (50 mg L⁻¹) e sem isolado de *Trichoderma* spp.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo testados quanto às pressuposições de normalidade residual através do teste Shapiro-Wilk e a homocedasticidade de variância pelo teste de Bartlett. Devido a atender as pressuposições da ANOVA, foi utilizada uma análise paramétrica sendo aplicado o teste Scott Knott a 5% de significância para comparação múltipla das médias no programa estatístico SISVAR.

Foram realizadas as seguintes avaliações:

Biometria: No momento da colheita foram retiradas 10 plantas sequenciais por tratamento/repetição para a obtenção dos dados biométricos. As plantas foram

levadas ao laboratório de sementes da UNESP- Ilha Solteira, sendo: avaliadas com auxílio de trena, a altura das plantas e de inserção da primeira vagem, bem como, contados o número de vagens e de grãos por planta, número de grãos por vagens e número de nós por planta.

Após a debulha manual das plantas obtidas na área útil de cada parcela foram determinados:

- **Massa de 1.000 grãos:** Para o cálculo da massa de 1.000 grãos foram pesadas 8 repetições por parcela, contendo 100 sementes cada, onde foi obtido o peso das amostras corrigindo-se o teor de umidade para 13%.

As sementes produzidas foram submetidas ao teste de germinação (teste padrão) e testes de vigor. Os testes de vigor empregados foram divididos em: testes fisiológicos (primeira contagem da germinação, emergência em campo, massa seca de plântulas e comprimento de plântulas); testes de resistência (envelhecimento acelerado) e teste bioquímico (condutividade elétrica), conforme metodologia descrita a seguir:

- **Germinação:** conduzida com quatro subamostras de 50 sementes por tratamento, distribuídas em rolos de papel germitest, umedecido com 2,5 vezes a sua massa com água deionizada, colocadas no germinador regulado com temperatura constante a 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). As contagens foram realizadas aos oito dias após a semeadura, computando-se a porcentagem de plântula normais, de acordo com os critérios estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (RAS, 2009).
- **Emergência de plântulas em campo:** realizado a partir da semeadura de quatro subamostras de 50 sementes por tratamento em areia umedecida, conduzido em condições ambientais, distribuídas em sulcos e cobertas com uma fina camada de areia. As plântulas emergidas foram contadas diariamente, entre o início da emergência (5º dia) e momento de estabilização numérica das contagens (15º dia após a instalação), determinando-se a porcentagem de emergência de plântulas normais (NAKAGAWA, 1994).
- **Comprimento de plântula:** cinco amostras de 20 sementes de cada tratamento foram distribuídas em rolos de papel germitest, umedecidos com água destilada na proporção de 2,5 por 1 (mL de água destilada por massa do papel seco em gramas) e mantidos em um germinador a 25 °C, por cinco dias

(NAKAGAWA, 1994). Sobre o papel umedecido foi traçada uma linha no terço superior, na direção longitudinal, onde as sementes foram colocadas direcionando-se a micrópila para baixo. O comprimento das plântulas consideradas normais (RAS, 2009) foi determinado ao final do quinto dia, com o auxílio de régua milimetrada (escala 1:100).

- **Massa da matéria seca de plântula:** este teste foi realizado junto com o teste de comprimento de plântula. Para determinação desta massa, 10 plântulas de cada parcela foram secas em estufa, com circulação forçada de ar a 65°C até atingirem massa constante e posteriormente pesadas em balança de precisão (0,001 g) (NAKAGAWA, 1994).
- **Envelhecimento acelerado:** conduzido conforme descrito por Marcos Filho (1999), em caixas plásticas, onde as sementes foram dispostas sobre a superfície de uma tela, posicionada acima da lâmina formada por 40 mL de água, mantidas em estufa a 41°C por 48 horas. Após esse período, foi realizado o teste de germinação, com quatro subamostras de 50 sementes por tratamento, distribuídas em rolos de papel germitest, umedecidos 2,5 vezes a sua massa, com água deionizada, mantidas no germinador regulado a temperatura constante de 25°C (± 2) e fotoperíodo de 12 horas. As contagens foram realizadas aos cinco dias após a semeadura, de acordo com os critérios estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (RAS, 2009). Paralelamente, foram efetuadas a determinação do teor de água das sementes, antes e após o envelhecimento, pelo método da estufa a 105°C $\pm$ 3°C por 24 h, com o objetivo de monitorar os procedimentos usados no teste.
- **Condutividade elétrica:** conduzido conforme o método descrito por Marcos Filho (2005), com quatro subamostras de 25 sementes por tratamento, cujas massas foram previamente determinadas. Após a determinação da massa de cada amostra, as sementes foram colocadas em copos plásticos contendo 75 mL de água deionizada, mantidas em germinador à temperatura de 25°C (± 2), com fotoperíodo de 12 horas, durante 24 horas. Decorrido esse período, foram determinados: a condutividade da solução e a condutividade da água (branco), sendo que do valor obtido foi subtraído o valor da condutividade da solução e dividido pela massa da amostra (g) e os resultados expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de sementes.

3.3 Resultados e Discussão

De acordo com a análise de variância para os parâmetros biométricos, presentes na Tabela 1, nota-se que para inserção da primeira vagem e número de vagens por planta ocorreu diferença significativa à $p < 0,05$ quanto à aplicação dos isolados de *Trichoderma* sp. via foliar. Para o fator Ni e a interação entre Ni x *Trichoderma* não foi verificado efeito significativo.

Tabela 1. Análise de variância (quadrados médios) para os parâmetros biométricos altura de planta, inserção da 1ª vagem, nós por planta e número de vagens por planta para aplicações foliares de isolados de *Trichoderma* sp. com presença e ausência de níquel. UNESP, Ilha Solteira– SP.

FV	GL	Quadrados Médios			
		Altura de Planta	Inserção 1ª Vagem	Nós planta ⁻¹	Vagens planta ⁻¹
Blocos	3	287,73 ^{ns}	1,32 ^{ns}	5,26 ^{ns}	24,27 ^{ns}
Níquel (Ni)	1	317,59 ^{ns}	3,499 ^{ns}	5,62 ^{ns}	90,81 ^{ns}
<i>Trichoderma</i> (T)	4	248,82 ^{ns}	14,55*	4,74 ^{ns}	284,05*
Ni x T	4	91,83 ^{ns}	1,90 ^{ns}	0,45 ^{ns}	42,996 ^{ns}
Erro	27	159,60	3,999	3,23	102,284
Média geral	-	79,99	12,49	16,90	57,96
CV (%)	-	15,79	16,01	10,64	17,45

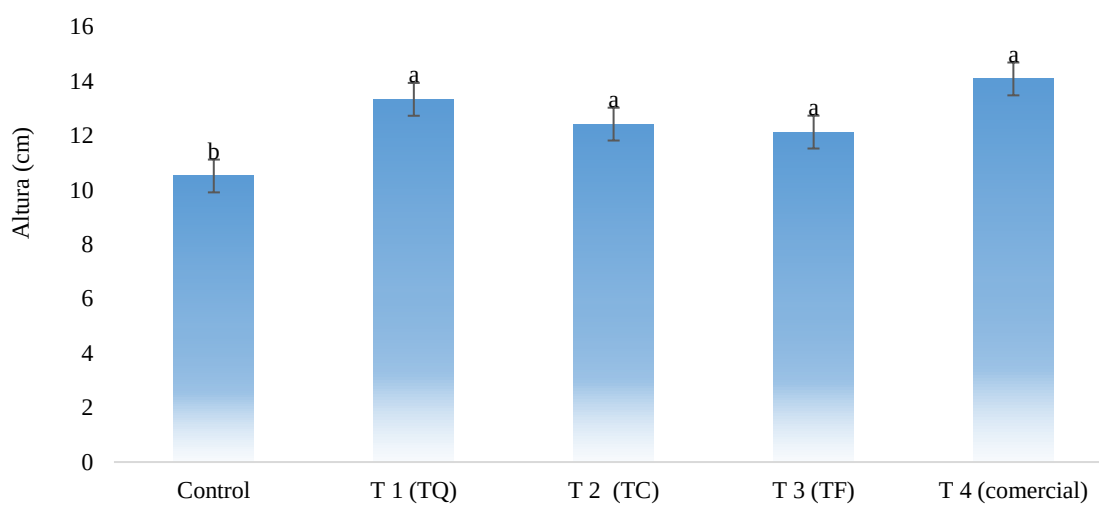
*, **, ^{ns} significativo a $P < 0,05$; $P < 0,01$ e não significativo, respectivamente.

Fonte: própria autora

Na figura 1, pode-se observar que o *Trichoderma* 4 (produto comercial) apresentou maior altura de inserção da primeira vagem, correspondendo a 14,08 cm, não diferindo dos demais, exceto no tratamento controle, em que não houve pulverização. Considerando-se que a colheita da soja é realizada mecanicamente em lavouras comerciais e em produtoras e multiplicadoras de sementes, essa característica é de extrema importância, pois a altura mínima de corte da plataforma é de 10 cm e qualquer oscilação do terreno no momento da colheita pode afetar o corte e consequentemente, deixar vagens no campo, trazendo maiores problemas,

posteriormente, como sobrevivência de fitopatógenos e insetos que atacam a cultura da soja.

Figura 1. Altura de inserção da primeira vagem de soja sob a aplicação dos isolados de *Trichoderma* sp. via foliar. UNESP, Ilha Solteira – SP.



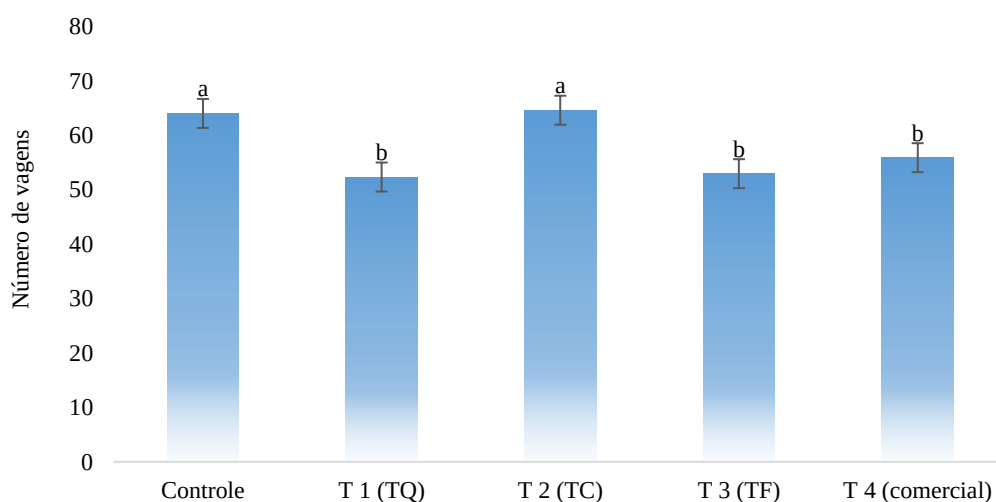
Fonte: própria autora

Com relação ao número de vagens por planta (Figura 2), a pulverização do isolado T2 proporcionou acréscimo de 8,7 vagens em relação aos tratamentos contendo este agente biológico, totalizando 64,61 vagens por planta, porém não diferiu do tratamento controle. O aumento no número de vagens no tratamento T2 se deve à capacidade do *Trichoderma* em promover maior fecundação das flores, mesmo que a aplicação tenha sido realizada tardiamente. Trata-se de uma ação rápida destes microrganismos que, efetivamente, agiram benéficamente, aumentando o número de vagens e evitando o abortamento das vagens formadas. Além disso, a sua rápida ação forneceu um aporte de nutrientes no momento de granação das vagens, de forma que todos os trichodermas promoveram incremento em algum dos componentes de produção. Tais resultados tornam evidente a importância destes promotores no potencial aumento de produção, necessitando de maiores pesquisas e aprofundamento nesta área. Vários são os estudos sobre a capacidade de promoção de crescimento e superação de estresses bióticos e abióticos promovidos por *Trichoderma*, Chagas Junior *et al.* (2019) concluem que *T. asperellum* UFT 201 é um

promotor de crescimento em plantas de soja, Chagas *et al.* (2017) obtiveram 9,1% a mais de produtividade com o uso de *T. asperellum*, também na cultura da soja.

O número de vagens por planta e número de sementes por vagem interferem diretamente no número de sementes por planta e a massa de 1000 grãos é outro fator importante que compõe os parâmetros relativos à produtividade. Desta forma, o aumento destes componentes é desejado e reflete em ganho de produtividade. Gonçalves *et al.* (2018) utilizaram *T. atroviride* e conseguiram aumentos na produtividade da ordem de 34,5 % em relação ao tratamento controle. Oliveira *et al.* (2012) atribuíram o aumento na produção da soja à melhora na absorção e uso dos macro e micronutrientes, em especial o P, além de aumentar a eficiência da planta no uso do nitrogênio (MACHADO *et al.*, 2012; VINALE *et al.*, 2013; CHAGAS *et al.*, 2015), bem como melhorar a síntese de fitohormônios de crescimento como o AIA (RIBAS, 2014). Chagas Junior *et al* (2019) obtiveram aumento na produtividade de soja inoculando *T. asperellum* UFT 201 com doses de 2 a 4 kg ha⁻¹. Muitas cepas de *Trichoderma* são capazes de solubilizar e disponibilizar fosfato, ferro, cobre, manganês e zinco para a planta (BONONI, 2020; CHAGAS *et al.*, 2015).

Figura 2. Número de vagens por planta de soja sob aplicação de isolados de *Trichoderma* sp. via foliar. UNESP, Ilha Solteira – SP



Fonte: própria autora

A análise de variância para os testes biométricos está apresentada na Tabela 2, na qual pode-se observar que a aplicação de isolados de *Trichoderma* spp.

influenciou no número de sementes por vagem e no peso de mil sementes, ambos os componentes podem influenciar a produtividade. Embora não tenha apresentado diferenças estatísticas os tratamentos que receberam *Trichoderma* apresentam valores superiores aos demais tratamentos. Nenhuma das variáveis foi afetada pela ação do Ni e também não ocorreu interação significativa entre Ni e *Trichoderma*.

Tabela 2. Análise de variância (quadrados médios) para os parâmetros biométricos sementes por planta, sementes por vagem, massa de mil sementes e produtividade para aplicações foliares de isolados de *Trichoderma* sp. com presença e ausência de níquel. UNESP, Ilha Solteira– SP.

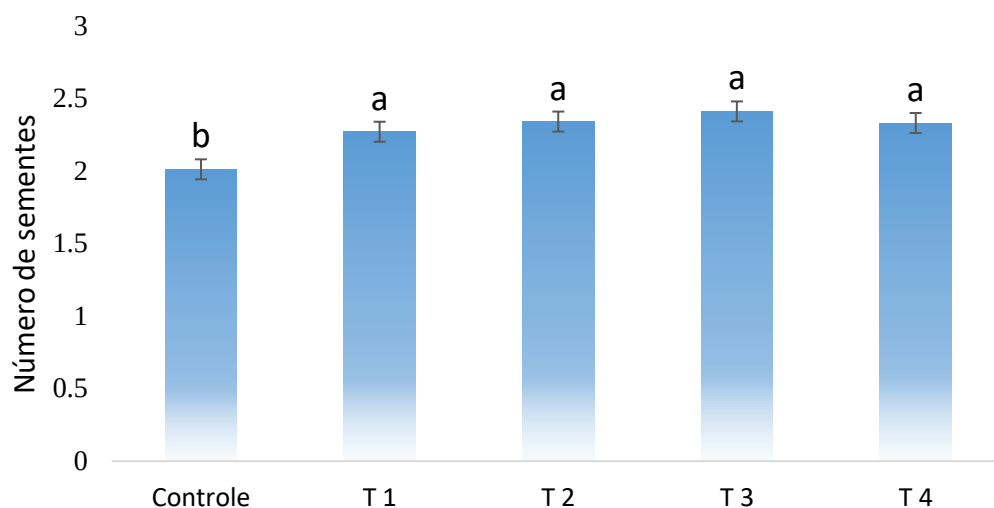
FV	GL	Quadrados médios			
		Sementes planta ⁻¹	Sementes Vagem ⁻¹	Massa de Mil Sementes	Produtividade
Blocos	3	113,05 ^{ns}	0,004 ^{ns}	1,73 ^{ns}	6989,45 ^{ns}
Níquel (Ni)	1	350,58 ^{ns}	0,004 ^{ns}	8,996 ^{ns}	63629,34 ^{ns}
Trichoderma (T)	4	1163,54 ^{ns}	0,188*	40,168**	72366,897 ^{ns}
Ni x T	4	263,56 ^{ns}	0,019 ^{ns}	14,054 ^{ns}	145026,12 ^{ns}
Erro	27	467,61	0,021	8,96	56864,95
Média geral	-	130,89	2,27	148,05	2847,695
CV (%)	-	16,52	6,40	2,02	8,37

*, **, ^{ns} significativo à $P < 0,05$; $P < 0,01$ e não significativo, respectivamente.

Fonte: própria autora

Como pode ser observado na Figura 3, ocorreu o aumento do número de sementes por vagem com a aplicação de isolados de *Trichoderma* sp., onde o isolado T3 foi o que proporcionou maior número de sementes, totalizando 2,41 sementes por vagem, no entanto, diferindo apenas do tratamento controle.

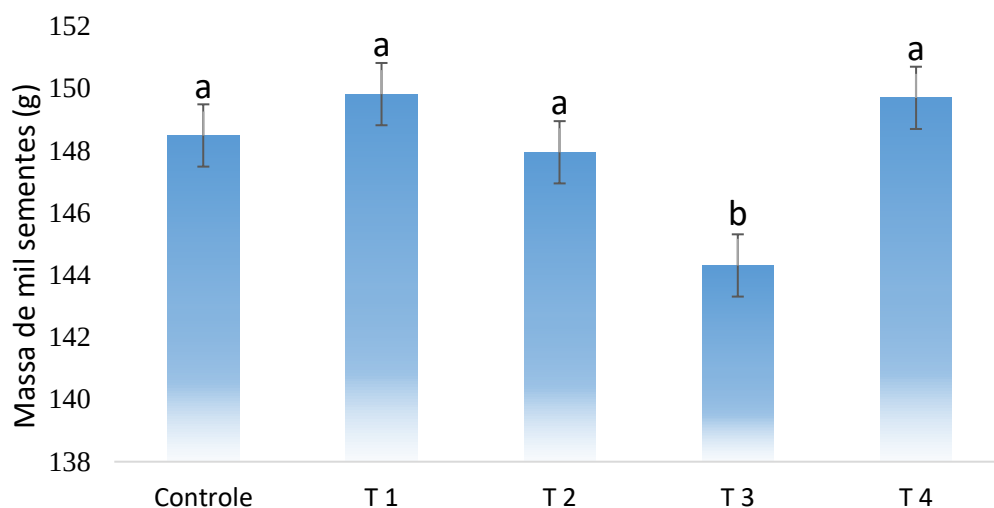
Figura 3. Número de sementes por vagem de soja sob aplicação de isolados de *Trichoderma* sp. e Ni via foliar. UNESP, Ilha Solteira – SP.



Fonte: própria autora

Na Figura 4 está apresentado o resultado para a massa de mil sementes. Verifica-se que o *Trichoderma* 3 apresentou a menor média. Embora tenha contribuído com maior número de sementes por vagem, o isolado de *Trichoderma* sp. T3 proporcionou sementes leves (Figura 4) e este fator teve impacto direto na massa de mil sementes, com massa de 144,31 g, ou seja, 5,51 g a menos que o tratamento com o isolado T1.

Figura 4. Massa de mil sementes de soja sob aplicação de isolados de *Trichoderma* spp. e Ni via foliar. UNESP, Ilha Solteira - SP.



Fonte: própria autora

Estudos apontam que existe uma correlação forte e negativa entre o número de sementes por vagem e a massa de 1000 sementes (PERINI *et al.*, 2012). Assim, os componentes de produção: número de vagens por planta, número de grãos por vagem e massa de 1000 sementes resultaram em maior efeito sobre o rendimento de grãos. Em nosso estudo, observamos que o isolado T2 propiciou um aumento no número de vagens por planta, enquanto o isolado T3 contribuiu para o aumento do número de grãos por vagem, ambas características contribuem para o aumento na produtividade. Em contrapartida, o isolado T1 não se destacou no aumento de vagens e/ou grãos, mas proporcionou melhor enchimento de grãos no que se refere à massa destes.

Desta forma, pode-se dizer, que todos os isolados de *Trichoderma* testados propiciaram aumento em algum dos componentes de produção da soja se comparado ao tratamento controle. Zuffo (2021) observou que adição de *Bradyrhizobium* spp. associada à adubação com N gerou sementes com maior massa, maior acúmulo de proteínas solúveis e por conseguinte, geraram sementes com melhor desempenho nos testes de vigor.

O aumento na produtividade da soja por microrganismos benéficos tem sido apontado com frequência na literatura, seja pela ação contra fitopatógenos (SILVA, 2017; MILANESI, 2013; TRIBONI, 2021; BEZERRA, 2022), proporcionando plantas saudáveis como observado por Lima (2021), seja pela diminuição dos estresses abióticos (AVNI, 1994; BROTMAN, 2013), como pela produção de metabólitos secundários como hormônios vegetais (ESPARZA-REYNOSO, 2023; CARILLO, 2020; CONTRERAS-CORNEJO, 2020; GARNICA-VERGARA, 2016). Lima (2021) destaca ainda que o efeito dos microrganismos sobressai em cultivares com menor desempenho, sendo uma alternativa para buscar aumento na qualidade das sementes e na produtividade.

Mesmo com a aplicação tardia, os isolados de *Trichoderma* afetaram de maneira significativa o número de vagens, seja pelo pegamento da flor ou mesmo pelo combate a patógenos que poderiam provocar o abortamento das vagens. Além de evitar o abortamento de vagens, nota-se, ainda, a ação benéfica no enchimento de grãos com aumento no número de grão por vagem e/ou a massa de sementes.

Este incremento no rendimento de grãos se deve ao aumento da resistência aos estresses abióticos (umidade, pH, temperatura) proporcionados por *Trichoderma*

como observado nos estudos de Lucon (2009) e Chagas Júnior *et al.* (2022). Chagas Junior *et al.* (2022) e Chagas Junior *et al.* (2019) testaram a aplicação de *T. asperellum* em sementes de soja e comprovaram sua ação na promoção de crescimento através do aumento na biomassa, manutenção do estande e aumento na produtividade. Lucon (2009) destaca a alta capacidade de *Trichoderma* no controle de fitopatógenos, devido aos diversos mecanismos de ação deste fungo rizosférico. Sua ação antagonista ocorre em função da produção de metabólicos voláteis e não voláteis, pelo hiperparasitismo e pela competição por espaço e nutrientes (BRAND *et al.*, 2009).

Autores também destacam sua ação bioestimulante promovendo o aumento na área radicular e a melhora na absorção de nutrientes (GARNICA-VERGARA, 2016; CHAGAS, 2017), o que pode favorecer o enchimento de grãos, assim como foi observado no presente estudo. Pesquisas apontam que plantas tratadas com esses agentes podem ter seu desempenho favorecido quando cultivadas em condições estressantes (CHAGAS JUNIOR *et al.*, 2022; LUCON, 2009).

Peres (2022) verificou o efeito benéfico de *T. atroviride* sobre os componentes de produção (número de nós, vagens e sementes por planta e massa de 100 sementes) e produtividade do feijoeiro, valores de produtividade 44,0% superiores ao tratamento controle, os teores de clorofila total, A e B nas plantas de feijão tratadas com 2,0 kg de *Trichoderma* por hectare chegaram a ser 120% maiores do que o tratamento controle, assim como para os carotenoides (106%), que são fotoprotetores e diminuem o estresse causado pelo excesso de radiação solar, melhorando a eficiência fotossintética. Com as análises bioquímicas e biométricas, o autor demonstrou a capacidade do *T. atroviride* atuar na promoção de crescimento para a cultura do feijoeiro. Fato este também constatado no presente estudo para os componentes de produção.

Para testar o efeito dos tratamentos sobre a qualidade fisiológica de sementes, após a colheita, foram realizados os testes de emergência a campo, índice de velocidade de emergência e teste padrão de germinação, comprimento e massa de plântulas, envelhecimento acelerado e condutividade elétrica. Nota-se que a aplicação de Ni não teve efeito significativo para as variáveis analisadas. Os isolados de *Trichoderma* apresentaram diferenças significativas para os parâmetros analisados com exceção à emergência a campo, IVE e massa seca de plântulas. Observou-se

apenas a interação significativa entre os fatores para a condutividade elétrica (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de variância para germinação final (GF), primeira contagem da germinação (PG), emergência a campo (EM), índice de velocidade de emergência (IVE), comprimento de planta (CP), massa seca de planta (MSPA), envelhecimento acelerado (EA), plântulas normais na primeira contagem do envelhecimento acelerado (PEA) e condutividade elétrica (CE) em soja submetida a aplicação de níquel e *Trichoderma* sp.. UNESP, Ilha Solteira - SP.

FV	GL	Quadrados médios								
		GF	PG	EM	IVE	CP	MSPA	EA	PEA	CE
Níquel (Ni)	1	12,10 ^{ns}	78,40 ^{ns}	2,50 ^{ns}	0,03 ^{ns}	12,00 ^{ns}	1210,00 ^{ns}	36,10 ^{ns}	4,90 ^{ns}	108,17 ^{ns}
Tricho(T)	4	26,75*	280,75**	63,65 ^{ns}	1,22 ^{ns}	162,03**	458,75 ^{ns}	40,65*	222,75*	709,38**
Ni x T	4	2,85 ^{ns}	37,65 ^{ns}	158,75 ^{ns}	1,67 ^{ns}	61,84 ^{ns}	41,25 ^{ns}	3,85 ^{ns}	53,15 ^{ns}	842,17**
Erro	30	8,77	24,53	85,30	0,81	46,59	365,00	14,43	71,23	72,86
Média geral	-	94,25	80,00	92,65	5,53	88,15	159,00	92,35	78,75	90,01
CV (%)	-	3,14	6,19	9,97	16,24	7,74	12,02	4,11	10,72	9,48

*, **, ^{ns} significativo à $P < 0,05$; $P < 0,01$ e não significativo, respectivamente.

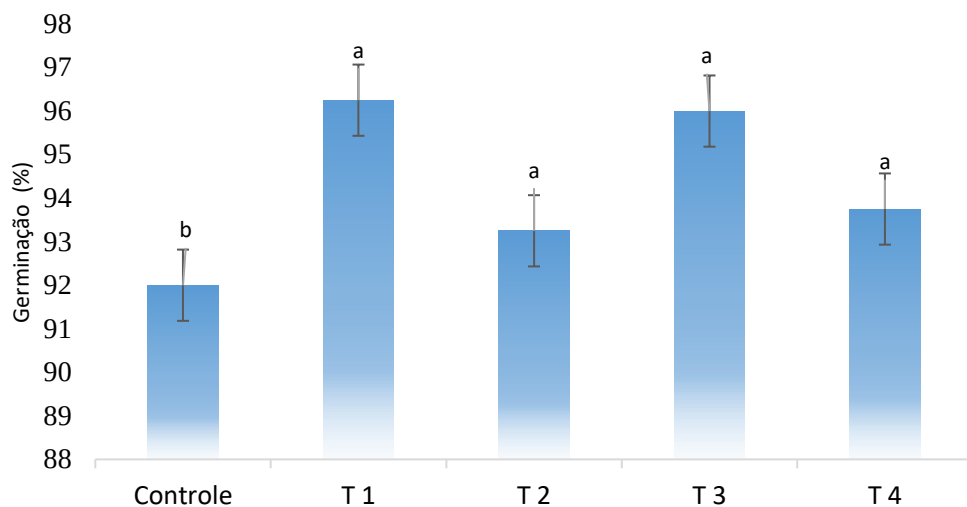
Fonte: própria autora

No que se refere às características de vigor das sementes, nota-se que a germinação foi influenciada pelos isolados de *Trichoderma* sp. utilizados, tendo efeito positivo sobre a germinação (Tabela 3 e Figura 5). Na Figura 5, nota-se que os isolados de *Trichoderma* sp. T1 e T3 foram os que apresentaram maior percentagem de sementes germinadas, correspondendo a 96,25 e 96,0%, respectivamente, diferindo estatisticamente dos demais. A primeira contagem da germinação é considerada um teste de vigor e junto com o envelhecimento acelerado são muito usados para separar lotes de sementes em função do vigor. A quantidade de plântulas normais da primeira contagem da germinação pode ser vista na Figura 7.

Diniz *et al* (2006) obteve resultados semelhantes, onde a aplicação de *T. viride* melhorou o vigor das sementes de alface nos testes de germinação, massa seca de plântulas e IVE. Em sementes de canola, os efeitos foram benéficos para o vigor e germinação (MIGLIORINI *et al.*, 2012), sendo observado o mesmo comportamento com o uso de *Trichoderma* em sementes de milho (JUNGES *et al.*, 2014). Em testes de emergência, as sementes de soja que receberam *Trichoderma* se destacaram (FERRARESI *et al.*, 2017)

A aplicação de Ni não influenciou de maneira significativa a emergência, o índice de velocidade de emergência (IVE), a germinação e nem o número de plântulas normais (Tabela 3, Figuras 5 e 7).

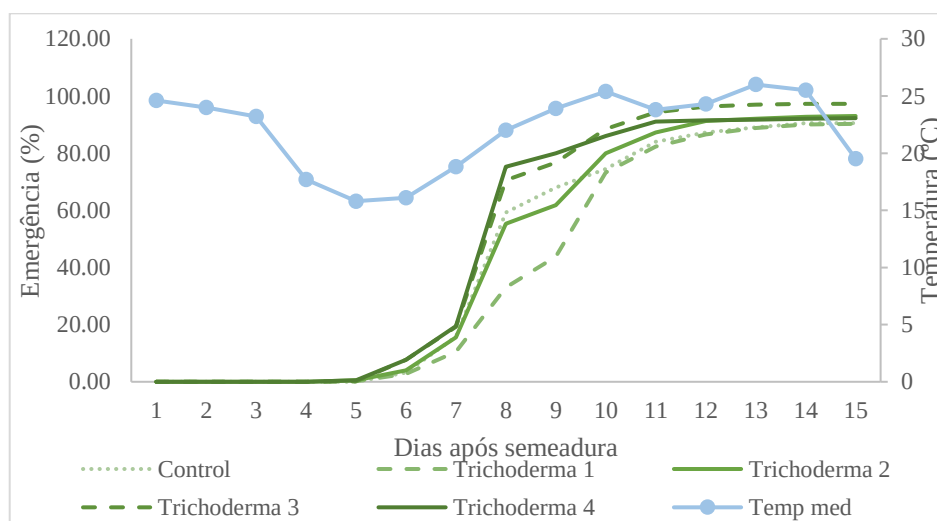
Figura 5. Germinação de sementes de soja após aplicação de *Trichoderma* spp. via foliar. UNESP, Ilha Solteira-SP.



Fonte: própria autora

A porcentagem da emergência de plântulas a campo em função da temperatura e do número de dias transcorridos se encontram apresentados na Figura 6. Os baixos valores de emergência até o sexto dia se devem pela baixa na média diária da temperatura, o que levou ao atraso na emergência. Temperaturas mais baixas provocam efeito direto no metabolismo das sementes durante o processo de protusão da raiz primária, fazendo com que a plântula leve maior tempo para romper a barreira superficial de solo (KRZYŻANOWSKI, 2018).

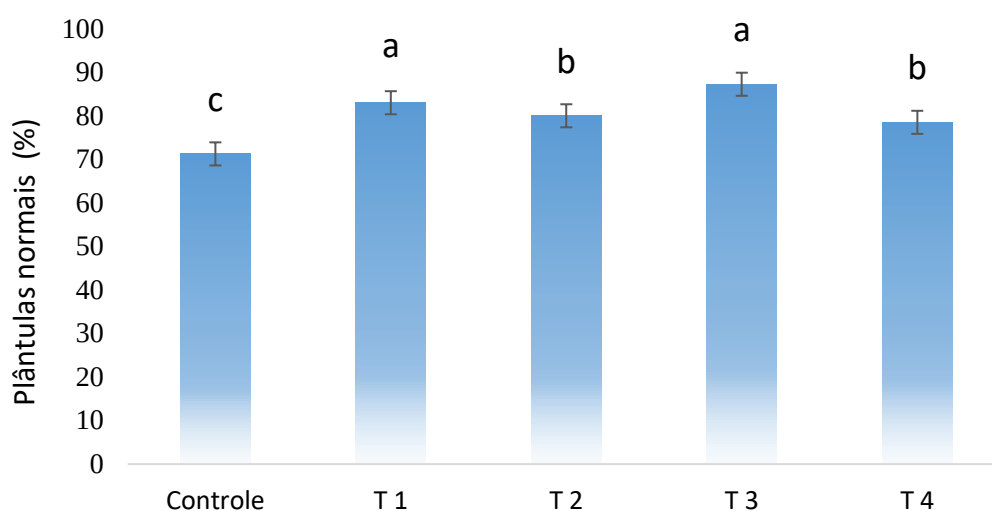
Figura 6. Emergência de plântulas de soja, em função da temperatura diária, após aplicação de isolados de *Trichoderma* spp. e via foliar. UNESP, Ilha Solteira – SP.



Fonte: própria autora

Os isolados de *Trichoderma* sp. que proporcionaram maior número de plântulas normais na primeira contagem da germinação foram o T3 e o T1, correspondendo a percentuais de 87,25 e 83,0%, diferindo dos demais (Figura 7).

Figura 7. Porcentagem de plântulas normais na primeira contagem da germinação após aplicação de isolados de *Trichoderma* sp. via foliar. UNESP, Ilha Solteira - SP.



Fonte: própria autora

Esse resultado demonstra a capacidade das cepas do bioagente em melhorar a sanidade das sementes, tendo assim atuado no controle de patógenos que se alojam na semente, e que posteriormente poderiam prejudicar o processo de

germinação. Plantas com valores elevados na primeira contagem da germinação são consideradas de alto vigor e normalmente apresentam alto desempenho no desenvolvimento inicial (HENNING, 2010).

O teste de Germinação não foi capaz de detectar diferenças entre as sementes tratadas com as cepas de *Trichoderma*, apenas separou o controle dos demais tratamentos. Desta forma, ressalta-se a importância da realização do teste de primeira contagem de plântulas normais para verificar sementes de alto vigor.

Hofs *et al.* (2004) constataram que a utilização de sementes de elevada qualidade fisiológica promove aumento de rendimento próximo a 10%, ao passo que, o uso de sementes de baixo vigor levou à desuniformidade na maturação e redução na massa de mil sementes para o arroz irrigado.

No gráfico, pode-se observar que o controle apresenta o vigor mais baixo, seguido do *Trichoderma* comercial (T4) e do T2.

A aplicação de Ni não influenciou de maneira significativa a emergência, o índice de velocidade de emergência (IVE), a germinação e nem o número de plântulas normais da primeira contagem da germinação (Tabela 3, Figuras 5 e 7).

Rodak *et al.* (2015) também não encontraram diferença entre os tratamentos com aplicação de níquel e sugerem que o teor de Ni, presente nas sementes, seja suficiente para suprir a necessidade da planta, visto que o Ni e Mo são exigidos em quantidades mínimas (CATALDO *et al.*, 1978; BROWN *et al.*, 1987).

Em outros trabalhos a aplicação foliar de níquel não propiciou acréscimo aos componentes de produção da soja, sendo recomendado aplicação no solo (ALOVISI *et al.*, 2011). Contudo, Oliveira (2018) constatou aumento de 3% no teor de proteína nos grãos de soja com a aplicação foliar de Ni. Este enriquecimento no conteúdo proteico é desejável, tanto para o consumo humano quanto para a produção de ração para animal, melhorando o valor nutritivo do grão.

Franco (2015) destaca a importância do níquel na fixação biológica de N e sua eficácia no tratamento de sementes, enquanto Levy (2013) alerta sobre o acúmulo de níquel nas sementes. As doses utilizadas no tratamento de sementes foram tóxicas e impediram o desenvolvimento da cultura (LEVY, 2013).

Alguns estudos apontam ganho na estatura de plantas e em número de vagens por planta de soja com a utilização de Ni, indicando ação como promotor de crescimento por sua ação no metabolismo do nitrogênio. Esta ação pode ser

constatada em estudos com outras plantas, Neves *et al.* (2007) verificaram a ação deste elemento sobre o crescimento de umbuzeiro cultivado em solução nutritiva.

Em relação aos testes de vigor de comprimento de plântulas, massa seca de plântulas, envelhecimento acelerado e condutividade elétrica (Tabela 3), percebe-se que o fator Ni não teve influência sobre estas variáveis, assim como, também foi verificada a interação entre os fatores Ni e *Trichoderma* apenas para o teste de condutividade elétrica. Já para *Trichoderma*, verificou-se o seu efeito sobre o comprimento de plântulas e os testes de envelhecimento acelerado e condutividade elétrica.

Slusarz (2022), avaliando a influência de micronutrientes e bioestimulantes sobre a qualidade de sementes de soja, não encontrou efeitos positivos de aminoácidos, Zn, Bo, Co e Mo, nem mesmo de bioestimulante usados. No presente estudo com Ni, também não foi constatado efeito positivo sobre a qualidade fisiológica das sementes de soja. Já Lavres, Castro Franco, e de Sousa Câmara (2016) obtiveram incremento na porcentagem germinativa com o uso do Ni em sementes de soja.

No nosso experimento apesar deste efeito não ser observado para o Ni, os tratamentos com os isolados de *Trichoderma* se mostraram uma boa alternativa para obtenção de sementes com alto vigor, visto que os melhores resultados obtidos foram dos tratamentos inoculados com o bioagente. Chagas Junior *et al.* (2019) também observaram os efeitos na promoção de crescimento e na qualidade fisiológica das sementes com aplicação de *Trichoderma* na cultura da soja.

Verificou-se que, nos tratamentos com pulverização dos isolados de *Trichoderma* sp. T4 e T1 via foliar, as sementes originaram plântulas de maior estatura, com 93,52 e 92,24 mm, respectivamente, diferindo dos demais (Figura 8). Esse fato se deve à produção de metabólitos secundários pelos isolados de *Trichoderma* spp..

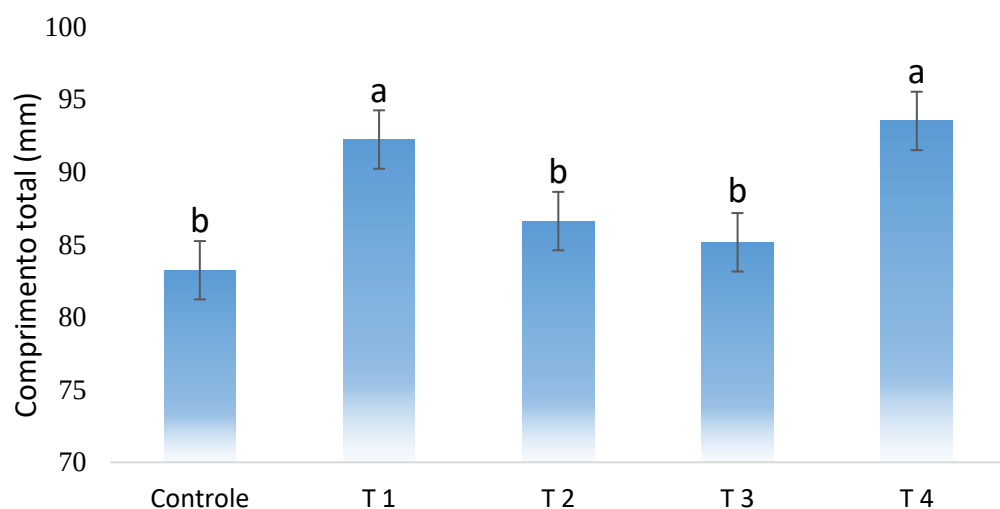
A qualidade fisiológica das sementes é reflexo do estado nutricional da planta mãe e de outros fatores bióticos (patógenos) e abióticos, seja no campo e/ou no armazenamento destas (KRZYŻANOWSKI, 2018). Pode-se observar que a aplicação do isolado T1 originou sementes mais pesadas (Figura 4). Este fato está diretamente relacionado ao acúmulo de nutrientes na fase de enchimento de grãos. Sementes mais pesadas geralmente geram plantas com maior vigor, justamente por

apresentarem maior aporte de nutrientes para que a plântula se desenvolva até que o processo fotossintético e o sistema radicular se desenvolvam e a plântula seja autossuficiente. Dessa maneira, esta reserva de proteínas, aminoácidos e carboidratos acumuladas nas sementes durante a sua formação é essencial para o estabelecimento de plântulas normais e vigorosas.

Vanzolini *et al.* (2007) também verificaram que lotes com sementes de maior massa, apresentavam maior desempenho no teste de matéria seca após germinação em areia, pois possuíam mais reservas e as transferiam ao eixo embrionário de forma mais eficiente. Da mesma forma foi observado para o comprimento de plântulas.

Henning (2005) verificou que o comprimento de plântulas é um teste que consegue separar lotes de sementes com maior vigor e destaca a importância de um rápido desenvolvimento inicial das plantas a campo. Plantas bem estabelecidas conseguem competir melhor por luz, água e nutrientes, visto que as de menor vigor serão dominadas. Além da vantagem de formar um estande homogêneo, sementes com alto vigor apresentam rápido desenvolvimento inicial, sombreando o solo, o que evita que plantas daninhas se estabeleçam nas entrelinhas.

Figura 8. Comprimento de plântulas de soja após aplicação de isolados de *Trichoderma* sp. via foliar. UNESP, Ilha Solteira - SP.



Fonte: própria autora

Em relação ao teste de envelhecimento acelerado (Figuras 9 e 10), os menores valores da primeira contagem (Figura 10) foram observados no tratamento testemunha e no *Trichoderma* 4 (produto comercial). Percebe-se que, de maneira geral, em todos os tratamentos que as sementes apresentaram porcentagem germinativa elevada, após a submissão ao teste de envelhecimento acelerado, os valores foram todos superiores a 89%.

Este resultado indica a ótima qualidade de sementes após o estresse por alta temperatura e umidade relativa, que em condições tropicais torna-se ainda mais importante, pois o desgaste das sementes durante o armazenamento inadequado ao longo do tempo é ainda mais severo (LOURENÇO, 2018; LOURENÇO, 2022).

O teste de envelhecimento acelerado é um dos mais utilizados para demonstrar características de vigor das sementes e determinar o prazo que estas poderão ficar armazenadas, sua viabilidade/longevidade (MARCOS FILHO, 1999). Neste teste, as sementes são expostas a uma condição de estresse (alta temperatura e umidade) por 48 ou 72h e após isso são colocadas para germinar.

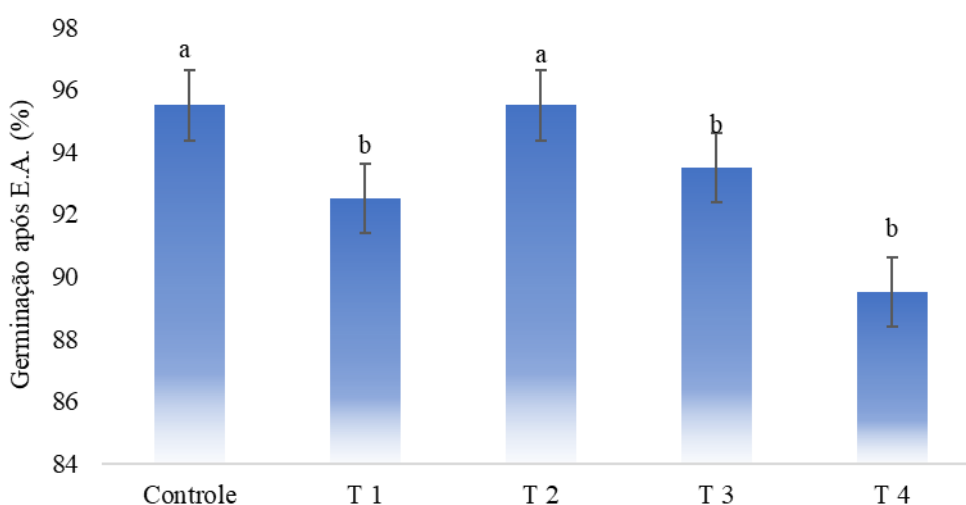
O controle e o tratamento TC apresentaram os maiores valores para a germinação final após a exposição ao envelhecimento acelerado por 48h. No entanto, quando avaliamos o número de plântulas normais na primeira contagem (Figura 10), os três isolados de *Trichoderma* apresentaram valores superiores à testemunha e ao tratamento comercial. Este é um dos testes de vigor de maior credibilidade, validado por diversos pesquisadores (OHLSON, 2010a; OHLSON, 2010b; RODO, 2000; LOURENÇO, 2018; MARCOS FILHO, 1999) e muito usado por empresas produtoras de sementes por ser de baixo custo e obter respostas rápidas. Outra vantagem relacionada ao teste é a seleção de cultivares para clima quente, visto que sementes com boa germinação, nestas condições, podem ser cultivadas em ambientes quentes e úmidos.

As sementes de soja, em nosso estudo, apresentaram diferença nos valores de massa de 100 grãos, o que infere que tenham tamanhos diferentes. O isolado de *Trichoderma* 3 apresentou valores no teste de envelhecimento acelerado com percentuais elevados de plântulas normais na primeira contagem, embora tenha sido o de menor massa de mil grãos. Marcos Filho, Novembre e Chamma (2000) afirmam que sementes pequenas possuem menor vigor e obtiveram os piores valores com relação ao envelhecimento acelerado.

No presente estudo, os dados mostraram alto desempenho no teste de envelhecimento para todos os tratamentos, independente do peso ou tamanho das sementes. Cabe ressaltar que os isolados nativos de *Trichoderma* (T1, T2 e T3) apresentaram valores superiores e diferentes estatisticamente do *Trichoderma* comercial (T4) e do tratamento controle.

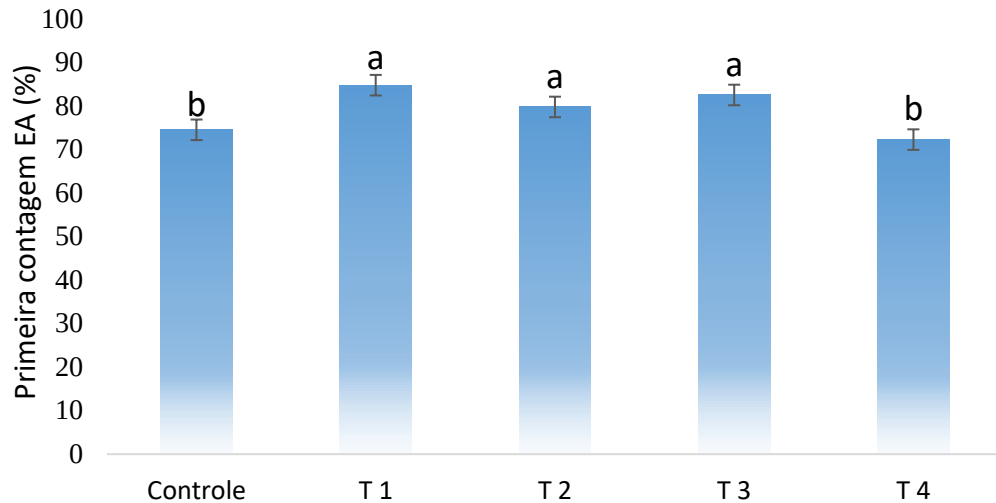
Ohlson (2010) concluiu em seu estudo que sementes de soja de alto vigor possuem maiores teores de proteínas, amido e açúcares solúveis, e maior capacidade de mobilização de reservas na germinação. O que, em nosso estudo, foi constatado através do melhor desempenho dos isolados nos testes de primeira contagem da germinação, resultando em plântulas de soja com melhor desempenho inicial, comprovado pelo teste de comprimento de plântulas.

Figura 9. Número de plântulas normais da germinação final no teste de envelhecimento acelerado, oriundas de sementes após aplicação de isolados de *Trichoderma* sp. via foliar. UNESP, Ilha Solteira - SP.



Fonte: própria autora

Figura 10. Número de plântulas normais de soja na primeira contagem da germinação no teste de envelhecimento acelerado, oriundas de sementes após aplicação de isolados de *Trichoderma* sp. via foliar. UNESP, Ilha Solteira - SP.



Fonte: própria autora

Analisando o desdobramento da interação entre Ni e *Trichoderma* para a variável condutividade elétrica (Tabela 4), verifica-se que ocorreu diferença entre a ausência e a presença de Ni apenas no controle e no isolado 1 do *Trichoderma*, com piores resultados na presença do Ni no tratamento controle. Já para o isolado 1, os piores resultados foram verificados na ausência.

Avaliando os isolados de *Trichoderma* e controle na ausência de Ni, verifica-se que o *Trichoderma* T4 (produto comercial) foi o que apresentou os piores resultados, sendo inferior aos demais. Para este isolado, na presença de Ni, ocorreu a maior taxa de condutividade, indicando maior deterioração das membranas celulares das sementes.

Tabela 4. Desdobramento da interação para o teste de condutividade elétrica, UNESP, Ilha Solteira -SP.

Níquel	Controle	<i>Trichoderma</i> sp.			
		T 1	T 2	T3	T 4
Ausência	74,61 bC	94,47 aB	82,11 aC	81,77 aC	108,88 aA
Presença	110,94 aA	78,71 bC	90,94 aB	77,32 aC	100,38 aA

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna (Níquel) e maiúscula na linha (*Trichoderma*) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott à $P < 0,01$.

Fonte: própria autora

O teste de condutividade elétrica é bastante utilizado por ser de resultado rápido e de baixo custo. Todavia, cada espécie e/ou cultivar apresentam valores diferentes, de forma que é preciso conhecer os valores padrão da cultivar utilizada para validar o teste. Tem sido muito usado por empresas produtoras de semente para separar lotes por vigor, assim como o teste de envelhecimento acelerado.

Entretanto, neste estudo ficou evidenciado que não devemos fazer uso de um único teste de vigor. Se considerássemos apenas o teste de condutividade elétrica, o Tratamento com T1, que se destacou como de alto vigor nos testes (germinação e primeira contagem da germinação, emergência, comprimento de plântulas, e envelhecimento acelerado) seria subjugado como de baixo vigor.

Embora todos os isolados tenham propiciado elevação do vigor das sementes de soja, destacamos aqui o isolado T1, que apresentou desempenho superior quanto a massa de 1000 grãos, primeira contagem da germinação e comprimento de plântulas, que por sua vez, foram os testes mais sensíveis para separar os diferentes níveis de vigor das sementes sob os tratamentos com o Ni e *Trichoderma* sp.

A aplicação de *Trichoderma*, na fase de enchimento de grãos, promoveu incremento em um ou mais componentes de produção, além de aumentar o vigor das sementes produzidas.

Hoje tem sido uma prática relativamente comum fazer aplicação de bioagentes no final do ciclo das culturas para que a palhada a ser incorporada não se constitua em fonte de inóculo de doenças que afetarão a próxima cultura. O uso de *Trichoderma* para erradicar escleródios é comprovadamente eficiente para o controle de mofo branco (MEYER, 2019; BRAÚNA, 2011; GÖRGEN, 2009).

Quando adicionamos *Trichoderma* ao final do ciclo da cultura, além de controlar patógenos de solo, este auxilia no processo de quebra da matéria orgânica, através

da produção de enzimas celulolíticas, e acelera o processo de mineralização da matéria orgânica, disponibilizando nutrientes para a cultura que será implantada.

Além disso, o aumento da população de microrganismos benéficos no solo fará com que as sementes encontrem ao germinar um ambiente rizosférico favorável ao bom desenvolvimento da plântula, facilitando a interação planta microrganismo, no caso *Trichoderma*.

Por isso, recomendamos novos estudos que investiguem a ação de microrganismos aplicados e seus benefícios às culturas subsequentes, a necessidade de reaplicação destes e o impacto da inundação de *Trichoderma* sobre a comunidade edáfica.

3.4. Conclusões

A aplicação de Ni não ocasiona interferência no desenvolvimento vegetativo, produtivo e na qualidade fisiológica das sementes.

Os isolados de *Trichoderma* nativos de agroecossistemas amazônicos influenciam as variáveis estudadas, relacionadas aos componentes de produção da soja, sendo considerados promotores de crescimento para esta cultura.

Todos os isolados estudados promovem ganho de rendimento para a cultura da soja e aumentam o desempenho das sementes nos testes de vigor, indicando que a aplicação em R5 favorece o desenvolvimento da soja.

O isolado T1 propicia melhor desempenho em plantas de soja BMX potência, evidenciado nos testes de massa de 1000 grãos, na primeira contagem da germinação e no comprimento de plântulas.

A aplicação de *Trichoderma* via foliar, em plantas em estágio R5, origina sementes com alto desempenho com relação aos parâmetros fisiológicos avaliados, independente da presença do Ni.

A aplicação de *Trichoderma*, na fase de enchimento de grãos, gera incremento em um ou mais componentes de produção, além de elevar o vigor das sementes produzidas.

REFERÊNCIAS

- ALOVISI, A. M. T.; MAGRI, J.; DUTRA, J. E.; MAGRI, E.; DOS SANTOS, M. J. G.; ALOVISI, A. A. Adubação foliar com sulfato de níquel na cultura da soja. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, Campo Grande, MS, v. 15, n. 2, p. 25-32, 2011.
- AVNI, A., *et al.* Induction of Ethylene Biosynthesis in *Nicotiana tabacum* by a *Trichoderma viride* Xylanase Is Correlated to the Accumulation of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid (ACC) Synthase and ACC Oxidase Transcripts. **Plant Physiology**, Rockville, v. 106, n. 3, p. 1049-1055, 1994.
- BEZERRA, M. C. L., *et al.* Redução de fungos e qualidade fisiológica de sementes de milho inoculadas com *Trichoderma harzianum*. **Nativa**, Cuiabá, v. 10, n. 1, p. 69-73, 2022.
- BONONI, L. **Bioprospecção de *Trichoderma* spp. envolvidas na solubilização de fosfato e no controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja**. 2020. 135 f. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo- USP, São Paulo, 2020.
- BONONI, L., *et al.* Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. **Scientific Reports**, London, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020.
- BRAND, S. C., *et al.* Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de soja submetidas a tratamento com bioprotetor e fungicida. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 31, p. 87-94, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF, 2009.
- BRAÚNA, L. M. **Controle biológico do mofo branco por isolados de *Trichoderma* nas culturas de soja e feijão comum**. 2011. 82 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)—Universidade de Brasília, Brasília, 2011.
- BROTMAN, Y. *et al.* *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. **PLoS pathogens**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e1003221, 2013.
- BROWN, P. H.; WELCH, R. M.; CARY, E. E.; CHECKAI, R. T. Micronutrients: beneficial effects of nickel on plant growth. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 10, n. 9-16, p. 2125-2135, 1987.
- BROWN, P. H., *et al.* Nickel: A micronutrient essential for higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, n. 3, p. 801-803, 1987.
- CARGNELUTTI, D. *et al.* Soluções tecnológicas emergentes para uma agricultura sustentável: microrganismos eficientes. In: GARCÍA, L. M. H. **Agroecologia: princípios e fundamentos ecológicos aplicados na busca de uma produção sustentável**, Canoas: Mérida Publishers: 2021. p. 31-62.

CARILLO, P., *et al.* Application of *Trichoderma harzianum*, 6-Pentyl- α -pyrone and Plant Biopolymer Formulations Modulate Plant Metabolism and Fruit Quality of Plum Tomatoes. **Plants** v. 9, 2020.

CATALDO, D. A.; GARLAND, T. R.; WILDUNG, R. E.; DRUCKER, H. Nickel in plants: II. Distribution and chemical form in soybean plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 62, n. 4, p. 566-570, 1978.

CHAGAS, L. F. B.; JUNIOR, A. F. C.; FIDELIS, R. R.; DE CARVALHO FILHO, M. R.; DE OLIVEIRA MILLER, L. *Trichoderma asperellum* efficiency in soybean yield components/Eficiência de *Trichoderma asperellum* nos componentes de produção de soja em campo. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v. 8, n. 1, p. 165, 2017a.

CHAGAS, L. F. B.; JUNIOR, A. F. C.; SOARES, L. P.; FIDELIS, R. R. *Trichoderma* na promoção do crescimento vegetal. **Journal of neotropical agriculture**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 97-102, 2017b.

CHAGAS JUNIOR, A. F. *et al.* *Trichoderma asperellum* (UFT201) functions as a growth promoter for soybean plant. **African Journal of Agricultural Research**, Sapele, v. 14, n. 33, p. 1772-1777, 2019.

CHAGAS JUNIOR, A. F. *et al.* Eficiência de *Trichoplus* (*Trichoderma asperellum*) como promotor de crescimento vegetal em soja em campo no cerrado. **Research, Society and Development**, Itabira, v. 11, n. 5, p. e16111527970-e16111527970, 2022.

CHAGAS JUNIOR, A. F. C *et al.* Eficiência de *Trichoplus* (*Trichoderma asperellum*) como promotor de crescimento vegetal em soja em campo no cerrado. **Research, Society and Development**, Itabira, v. 11, n. 5, p. e16111527970-e16111527970, 2022.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A., *et al.* Interactions of *Trichoderma* with plants, insects, and plant pathogen microorganisms: chemical and molecular bases. **Co-evolution of secondary metabolites**, San Rafael, p. 263-290, 2020.

DINIZ, K. A.; *et al.* Incorporação de microrganismos antagônicos, aminoácidos, micronutrientes e reguladores de crescimento em sementes de alface pela técnica da peliculização. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 28, n. 3, p. 37-43, 2006.

ESPARZA-REYNOSO, S., *et al.* **Role of Volatile Organic Compounds in Establishment of the *Trichoderma***: plant Interaction. *Plant Relationships: Fungal-Plant Interactions*. B. Scott and C. Mesarich. Cham, Springer International Publishing, p. 239-252, 2023

FARIA, A. Y. K. *et al.* Qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro submetidas a tratamentos químico e biológico. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 25, p. 121-127, 2003.

FERRARESI, S. T.; ALCAMIM, T. G.; ZORZZI, I. C.; LOCATELLI, N.; DALACOSTA, S. M. M.; POSSENTI, J. C. Efeito de produtos biológicos e bioestimulantes no desenvolvimento inicial de plântulas de soja. *In*: CONGRESSO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA UTFPR-DV, 2017, [s. l.]. **Anais [...]** [S. l.: s. n.], 2017.

FIORENTINO, N., *et al.* Trichoderma-Based Biostimulants Modulate Rhizosphere Microbial Populations and Improve N Uptake Efficiency, Yield, and Nutritional Quality of Leafy Vegetables. **Front Plant Sci**, Lausanne, v. 9, 2018.

GARNICA-VERGARA, A., *et al.* The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. **New Phytologist**, Chichester, v. 209, n. 4, p. 1496-1512, 2016.

GÖRGEN, C. A., *et al.* Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 44, p. 1583-1590, 2009.

GRAHAM, R. D., *et al.* **A role of nickel in the resistance of plants to rust**. Australian Agronomy Conference. Hobart: Australian Society of Agronomy, 1985.

HENNING, F. A., *et al.* Composição química e mobilização de reservas em sementes de soja de alto e baixo vigor. **Bragantia**, Campinas, v. 69, p. 727-734, 2010.

HENNING, A. A. Patologia e tratamento de sementes: noções gerais. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, 2005.

HÖFS, A., *et al.* Efeito da qualidade fisiológica das sementes e da densidade de semeadura sobre o rendimento de grãos e qualidade industrial em arroz. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 26, p. 55-62, 2004.

HOWELL, C. R. Effect of seed quality and combination fungicide-*Trichoderma* spp. seed treatments on pre-and postemergence damping-off in cotton. **Phytopathology**, St. Paul, v. 97, n. 1, p. 66-71, 2007.

HUNGRIA, M., *et al.* A inoculacao da soja. **Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 1997.

HUNGRIA, Mariangela *et al.* Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and soil**, Dordrecht, v. 331, p. 413-425, 2010.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, Heidelberg, v. 49, n. 7, p. 791-801, 2013.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **Embrapa Soja-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2015.

JUNGES, E.; BASTOS, B. O.; TOEBE, M.; MULLER, J.; PEDROSO, D. C.; MUÑIZ, M. F. B. M. B. Restrição hídrica e peliculização na microbiolização de sementes de milho com *Trichoderma* spp. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v. 5, n. 1, p. 18-25, 2014.

KRZYZANOWSKI, F. C., *et al.* A alta qualidade da semente de soja: fator importante para a produção da cultura. **Circular técnica**, [s. l.], v. 136, n. 1, 2018.

LAVRES, J., *et al.* Soybean seed treatment with nickel improves biological nitrogen fixation and urease activity. **Frontiers in Environmental Science**, Lausanne, v. 4, p. 37, 2016.

LEVY, C. D. C. B. **Níquel em soja: doses e formas de aplicação**. 2013. 110 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Sub Tropical) – Instituto Agrônômico de Campinas (IAC) 2013.

LIMA, R. E., *et al.* Qualidade de sementes de soja após a inoculação de biológicos em campo. **Research, Society and Development**, Itabira, v. 10, n. 4, p. e52710414419-e52710414419, 2021.

LOHMANN, T. R., *et al.* Seleção o de isolados de *Trichoderma* spp. para controle de *Sclerotium rolfsii* em soja. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 2, n. 2, 2007.

LOURENÇO, F. M. D. S. **Metodologia do teste de envelhecimento acelerado em sementes de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e mini tomate (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*)**. 2018. 44 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2018.

LOURENÇO, F. M. d. S. L., *et al.* Desempenho e vigor de plântulas em período pós-tratamento químico e biológico de sementes de soja. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 134-153, 2022.

LUCON, C. M. M. Promoção de crescimento de plantas com o uso de *Trichoderma* spp. **São Paulo: Instituto Biológico/Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal**, 2009.

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

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. [S. l.: s. n.], 1999.

MARCOS FILHO, J., *et al.* Tamanho da semente e o teste de envelhecimento acelerado para soja. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, p. 473-482, 2000.

MARENCO, R. A. e N. F. LOPES. **Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. [S. l.: s. n.], 2005.

MARSCHNER, H. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. [S. l.]: Academic press, 2011.

MEYER, M. C., *et al.* **Avaliação à campo de Trichoderma em mofo-branco**. [S. l.: s. n.], 2019.

MIGLIORINI, P.; KULCZYNSKI, S. M.; SILVA, T.; BELLÉ, C.; KOCH, F. Efeito do tratamento químico e biológico na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de canola. **Enciclopédia Biosfera**, [s. l.], v. 8, n. 15, p. 201-209, 2012.

MILANESI, P. M., *et al.* Detecção de *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. e antagonismo de *Trichoderma* sp. em soja sob plantio direto. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 1, n. 34, p. 3219-3233, 2013.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p. 49-85.

NEVES, O. S. C.; FERREIRA, E. V. D. O.; CARVALHO, J. G. D.; SOARES, C. Adição de níquel na solução nutritiva para o cultivo de mudas de umbuzeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 31, n. 03, p. 485-490, 2007.

OHLSON, O. d. C., *et al.* Teste de envelhecimento acelerado em sementes de trigo. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 32, p. 118-124, 2010.

OLIVEIRA, C.; MEERT, L.; HANEL, A.; RAMOS, M.; KRENSKI, A. **Aplicação foliar de Nitrogênio, Enxofre, Molibdênio e Níquel e seus efeitos sobre as características agronômicas e teor de proteína da soja**. [S. l.], 2018. v. 7.

OLIVEIRA, A. G.; CHAGAS JÚNIOR, A. F.; SANTOS, G. R.; MILLER, L. O.; CHAGAS, L. F. B. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 149-155, 2012.

PERES, W. M. **Uso de Trichoderma atroviride na cultura do feijoeiro**. 2022. 101 f. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista- UNESP, Ilha Solteira, 2022.

PERINI, L. J., *et al.* Componentes da produção em cultivares de soja com crescimento determinado e indeterminado. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 2531-2543, 2012.

PESKE, S. T., *et al.* Produção de sementes. **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**, [s. l.], v. 3, p. 13-104, 2012.

PII, Y., *et al.* Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. **Biology and Fertility of Soils**, Heidelberg, v. 51, n. 4, p. 403-415, 2015.

REIS, A. d., *et al.* Papel fisiológico do níquel: essencialidade e toxidez em plantas. **Informações agronômicas**, [s. l.], v. 147, p. 10-24, 2014.

RIBAS, P. P. *et al.* Potencial in vitro para solubilização de fosfato por *Trichoderma* spp. **Revista Brasileira de Biociências: Brazilian Journal of Biosciences**, Porto Alegre, v. 14, n. 2 (abr./jun. 2016), p. 70-75, 2016.

RIBAS, P. P. R., *et al.* Caracterização de isolados de *Trichoderma* e seu potencial para o controle biológico de patógenos do feijoeiro in vitro. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 20, n. 1/2, p. 94-103, 2014.

RIBAS, P. P.; RECH, R.; DOS SANTOS MATSUMURA, A. T.; VAN DER SAND, S. T. Potencial in vitro para solubilização de fosfato por *Trichoderma* spp. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 14, n. 2, 2016.

RODAK, B. W.; DE MORAES, M. F.; OLIVEIRA JUNIOR, A. D.; FREITAS, D. S.; GUILHERME, L. R. G. Adubação com níquel na soja: teores nos grãos e produtividade. In: Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso (ALICE), 2015. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 2015, Natal. **Anais [...]** Natal: [s. n.], 2015.

RODO, A. B., *et al.* Metodologia alternativa do teste de envelhecimento acelerado para sementes de cenoura. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, p. 289-292, 2000.

SÁ, M. d. Importância da adubação na qualidade de sementes. In: **Importância da adubação na qualidade dos produtos agrícolas**. São Paulo: Ícone: 1994. p. 65-98,

SCHUCH, L. O. B., *et al.* Qualidade fisiológica da semente e desempenho de plantas isoladas em soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 31, p. 144-149, 2009.

SEREGIN, I.; KOZHEVNIKOVA, A. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 53, n. 2, p. 257-277, 2006.

SILVA, F. F. d., *et al.* Emergência e análise ultraestrutural de plântulas de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* sob efeito da aplicação de *Trichoderma harzianum*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 43, p. 41-45, 2017.

SLUSARZ, G. M. **Há interferência das aplicações de micronutriente e bioestimulantes para as sementes da soja?** [S. l.: s. n.], 2022

STRAHL, M. A., *et al.* Qualidade fisiológica de sementes de canola (*Brassica napus* L.) submetidas a microbiolização com *Trichoderma* spp. **Científica**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 75-79, 2021.

TRIBONI, Y. d. B. **Controle biológico com *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. para o tratamento de sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merril.]**, 2021. 55 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2021.

URETA, A.-C., *et al.* Rhizobium leguminosarum biovar viciae symbiotic hydrogenase activity and processing are limited by the level of nickel in agricultural soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 11, p. 7603-7606, 2005.

USDA, U. S. D. O. A. World agricultural supply and demand estimates. **World Agricultural Supply and Demand Estimates**, Washington, v. 577, n. 40, 2022

VANZOLINI, S., *et al.* Teste de comprimento de plântula na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 29, p. 90-96, 2007.

VARGAS, M.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. *In*: VARGAS, M.; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos cerrados**. Brasília, DF: EMBRAPA, 1997.

VEJAN, P., *et al.* Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability: a review. **Molecules**, Basel, v. 21, n. 5, p. 573, 2016.

VIEIRA, E. L. e CASTRO, P. R. C. Ação de stimulate no desenvolvimento inicial de plantas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 3., 2001, Campo Grande. **Anais [...]** [S. l.: s. n.], 2001.

VINALE, F., *et al.* Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. **FEMS microbiology letters**, Oxford, v. 347, n. 2, p. 123-129, 2013.

WELLS, M. L. and B. W. Wood. Foliar boron and nickel applications reduce water-stage fruit-split of pecan. **HortScience**, Alexandria, v. 43, n. 5, p.1437-1440, 2008.

ZUFFO, A. M., *et al.* Bradyrhizobium spp. inoculation associated with nitrogen application enhances the quality of soybean seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 45, 2021.

4 **CAPÍTULO III: Biocontrole da síndrome da morte súbta e promoção de crescimento por *Trichoderma* na soja**

RESUMO

A podridão vermelha da raiz em plantas de soja, também chamada de morte súbita, agrava-se no florescimento, levando a planta a abortar flores e vagens, causando muitos prejuízos ao agricultor, principalmente pelo fato de não ter controle químico eficiente para esta enfermidade. Tendo em vista a importância da cultura e a escassez de estudos que possam solucionar o problema, o presente estudo avaliou, in vitro e in vivo, a capacidade de três isolados de *Trichoderma* em controlar o fungo *Fusarium solani* f.sp. *glycines*. No screening in vitro foi selecionado o isolado TQ que, em confronto com o patógeno, reduziu a taxa de crescimento deste de 0,18 mm h⁻¹ para 0,09 mm h⁻¹ e obteve nota 1 na escala de Bell, onde o antagonista aos sete dias havia colonizado toda a placa. O experimento in vivo foi desenvolvido em casa de vegetação com controle de umidade, temperatura e regime hídrico. Para os parâmetros biométricos e fisiológicos, notou-se que os tratamentos com o TQ produziram plantas com maior parte aérea e maior massa de raiz, maior teor de clorofilas, carotenos e açúcares, além de manter suas folhas mais verdes e túrgidas, como pode ser constatado em microscopia eletrônica de varredura. Plantas que receberam patógeno e antagonista mantiveram valores iguais aos de plantas saudas para os parâmetros avaliados.

Palavras-chave: controle biológico; podridão vermelha da raiz; fitopatógenos; proteção de plantas.

Biocontrol of sudden death syndrome and growth promotion by *Trichoderma* in soybean

ABSTRACT

Red root rot in soybean plants, also called sudden death, worsens during flowering, leading the plant to abort flowers and pods, causing much damage to the farmer, mainly due to the lack of efficient chemical control for this disease. Bearing in mind the importance of culture and the scarcity of studies that can solve the problem, the present study evaluated, in vitro and in vivo, the ability of three *Trichoderma* isolates to control the fungus *Fusarium solani* f.sp. *glycines*. In the in vitro screening, the TQ isolate was selected, which, when confronted with the pathogen, reduced its growth rate from 0.18 mm h⁻¹ to 0.09 mm h⁻¹ and obtained a score of 1 on the Bell scale, where the antagonist at seven days had colonized the entire plate. The in vivo experiment was carried out in a greenhouse with controlled humidity, temperature and water regime. For the biometric and physiological parameters, it was noted that the treatments with TQ produced plants with greater aerial part and greater root mass, greater content of chlorophylls, carotenes and sugars, in addition to keeping their leaves greener and more turgid, as can be seen. observed in scanning electron microscopy. Plants that received pathogen and antagonist maintained values equal to those of healthy plants for the evaluated parameters.

Key words: biological control; red root rot; phytopathogens; plant protection.

4.1 Introdução

O Brasil tornou-se um dos maiores consumidores de defensivos agrícolas do mundo, ultrapassando os Estados Unidos da América. Embora o uso de pesticidas seja uma prática antiga, seu uso foi intensificado após a Segunda Guerra Mundial (PELAEZ, 2010). Os impactos ambientais advindos do uso de agrotóxicos são extensos: existem problemas relacionados à deriva destes produtos, contaminação dos solos, ar, água e alimentos. Além disso, muitas vezes, não atuam de forma efetiva somente sobre o microrganismo alvo e acabam comprometendo a biodiversidade (MORILLO, 2017).

A intoxicação das pessoas que aplicam estes produtos ou das que se alimentam com produtos contaminados ou ainda aquelas que vivem em áreas agrícolas e respiram o ar contaminado pela deriva na aplicação dos pesticidas é um fato relevante e preocupante. Existem estudos que comprovam a presença de até seis moléculas de agrotóxicos no leite materno (MENCK *et al.*, 2014).

A sustentabilidade do manejo de doenças de plantas, especialmente para culturas amplamente distribuídas pelo país como a de soja, depende da integração de diferentes ferramentas de controle. Várias são as doenças que acometem a cultura da soja, destacando-se os patógenos *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, nas fases de pré e pós-emergência, doenças de parte aérea causadas por diversos fungos como *Corynespora cassiicola*, *Cercospora sojina*, *Phakopsora pachyrhizi*, causadores de manchas foliares, bem como, *Colletotrichum truncatum* e *Macrophomina phaseolina* que acometem à cultura na fase reprodutiva (GODOY *et al.*, 2021, CRUCIOL; COSTA, 2017, SOUSA *et al.*, 2016; TONGON; KASEM, 2016).

Dentre as várias doenças fúngicas que afetam a cultura da soja, destaca-se a podridão vermelha da raiz (PVR), também conhecida como morte súbita, cujos agentes etiológicos são os fungos *Fusarium solani* f. sp. *glycines*; *Fusarium tucumaniae*; *Fusarium brasiliense* e *Fusarium virguliforme* (AOKI e SCANDIANI, 2005; NAVI; YANG, 2016; FREITAS *et al.*, 2004; HENNING *et al.*, 2014).

Nos Estados Unidos da América, o agente causal da SDS é em sua maioria o *Fusarium virguliforme*. O SDS foi relatado em vinte e um estados dos EUA e é conhecido por ocorrer na África, América do Norte e América do Sul. Nos EUA, Navi e Yang (2016), relatam que no período de 1988 a 2010, as perdas devido ao SDS

foram estimadas em mais de US\$ 3,0 bilhões e há relatos de perdas de 80% na produtividade (FREITAS *et al.*, 2004).

Essa doença tem causado reduções de produtividade de grãos em todos os países que se destacam na produção desta oleaginosa, gerando grandes prejuízos. No Brasil, está amplamente disseminada em todas as regiões produtoras. Na América do Sul, a SDS também ocorre na Argentina, outro grande produtor de soja. (WRATHER J.A. *et al.* 1994., EMBRAPA SOJA, 2006; HENNING *et al.*, 2014).

A doença causa redução significativa na nodulação e perda de massa radicular. Os sintomas na parte aérea incluem clorose internerval, necrose foliar e desfolha prematura. Os sintomas foliares desenvolvem-se, com alta taxa de progresso, geralmente durante o estágio reprodutivo da soja (GIBSON *et al.*, 1994; HENNING *et al.*, 2014).

Até o momento, não existe controle químico adequado para a síndrome da morte súbita da soja. Os sintomas foliares da PVR iniciam-se entre duas a três semanas antes da floração e se estendem até o período de enchimento de grãos, quando normalmente é observada a morte da planta (RUPE e GBUR, 1995). Em plantas severamente afetadas, a desfolha ocorre prematuramente causando abortamento de vagens (ROY *et al.*, 1989; RUPE, 1989; LUO *et al.*, 1999; LUO *et al.*, 2000).

O gênero *Trichoderma* é formado por um grande número de cepas fúngicas que atuam como agentes de controle biológico (BCAs) e cujas propriedades antagônicas se baseiam na ativação de mecanismos muito diversos. Podem exercer o biocontrole de fungos fitopatogênicos indiretamente, competindo por espaço e nutrientes, modificando as condições ambientais, promovendo o crescimento das plantas e ativando seus mecanismos de defesa, por produção de antibióticos ou por confronto direto (micoparasitismo).

Várias espécies de *Trichoderma* têm sido usadas para formulação de produtos biológicos comercializados mundialmente. Esse fato é devido à facilidade de multiplicação destes microrganismos e sua capacidade de produzir diversas substâncias com atividade contra fitopatógenos e também, substâncias de interesse vegetal, como fitormônios e solubilizadores minerais, que contribuem no seu desenvolvimento, além de muitas cepas atuarem como elicitoras na promoção da defesa vegetal e indutores de resistência.

Estes mecanismos podem atuar de forma coordenada e sua importância nos processos de biocontrole depende da cepa de *Trichoderma*, do fungo a que antagoniza, do tipo de cultivo e das condições ambientais, por exemplo: disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura ou concentração de ferro. A ativação de cada um dos mecanismos implica na produção de metabólitos e compostos específicos, tais como: fatores de crescimento de plantas, enzimas hidrolíticas, sideróforos, antibióticos e permeases de carbono e de nitrogênio (BETTIOL *et al.*, 2009).

Diante da ineficácia do uso de fungicidas para o controle da síndrome da morte súbita da soja, discutida por Henning *et al.* (2014), a utilização de agentes de biocontrole e de outros produtos considerados alternativos pode contribuir para o desenvolvimento vegetal com ganho na produtividade, por promover crescimento de plantas.

Desta forma, o uso de microrganismos (fungos filamentosos, leveduras, bactérias), apresenta-se como uma ferramenta inteligente para a redução e/ou eliminação do uso de agroquímicos contra fitomoléstias, especialmente para fungos de solo onde a ação dos químicos tem baixa ou nenhuma eficiência (DAVID *et al.*, 2018).

Considerando as possibilidades atribuídas à versatilidade do controle biológico e a necessidade de desenvolvimento de novas ferramentas de controle de fitopatógenos, o presente estudo avaliou a aptidão de 3 isolados de *Trichoderma* quanto à capacidade de biocontrole de *Fusarium solani* f. sp. *Glycines* in vitro e in vivo, bem como a promoção de crescimento em plantas de soja.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Teste de antagonismo in vitro

O experimento foi desenvolvido no delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo os tratamentos compostos por três isolados de *Trichoderma* juntamente com *Fusarium solani* na mesma placa e o tratamento testemunha contendo somente o isolado de *F. solani* na placa. Os isolados de *Trichoderma* sp. foram obtidos da micoteca do Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da

Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), Campus de Alta Floresta- MT e o de *F. solani* f. sp. *glycines*, em plantas de soja com sintomas da síndrome da morte súbita na região de Ilha Solteira– SP.

Discos de micélio com 5,0 mm de diâmetro, retirados das bordas de colônias dos isolados de *Trichoderma* sp. e *F. solani*, ambos com cinco dias de crescimento em Batata Dextrose Ágar (BDA), a 25°C, foram transferidos assepticamente para placas de Petri contendo o meio de cultura BDA. Em cada placa de Petri, foram colocados dois discos de micélio, sendo um de isolado de *Trichoderma* e outro de *Fusarium*, em posições opostas e a uma distância de 70 mm um do outro e a 5,0 mm da borda da placa. Nas placas do tratamento testemunha, foi colocado somente um disco de inóculo de *Fusarium*. As placas foram incubadas em câmaras de germinação do tipo B.O.D. à temperatura de 25°C, em regime escuro, por período de sete dias.

As medições do crescimento das colônias foram feitas com paquímetro digital e expressos em mm, diariamente, após a montagem do teste até o momento em que as colônias se encontraram (antagonista e patógeno), medindo-se o seu raio a partir do centro do disco de micélio original dos respectivos fungos em direção ao centro da placa, sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade.

As características de crescimento das colônias, ao 7º dia da montagem do teste, foram também avaliadas segundo a escala proposta por Bell *et al.* (1982) em que: 1) o antagonista cresce por toda a placa de Petri; 2) o antagonista cresce sobre 2/3 da placa; 3) o antagonista e patógeno crescem até metade da placa; 4) o patógeno cresce sobre 2/3 da placa e 5) o patógeno cresce por toda a placa de Petri. Para avaliar o potencial de controle de *Fusarium solani* por *Trichoderma* spp., calculou-se o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) expresso em mm, onde se comparou o crescimento diário do patógeno sozinho na placa, com o crescimento em cultura pareada com o antagonista (em mm por hora).

4.2.1.2 Cultivo pareado para obtenção das fotomicrografias em microscópio eletrônico de varredura (MEV)

Verificação da ação de *Trichoderma* como hiperparasita através de testes de cultura dupla em placa e obtenção imagens de microscopia eletrônica de varredura.

Discos de meio BDA (5 mm de diâmetro) foram retirados da extremidade de colônias em crescimento ativo de culturas frescas das *Trichoderma atroviride* e *Fusarium solani* e colocados na superfície de placas contendo meio SNA. As placas foram incubadas a 28°C e após 48 h de contato, amostras de micélio da região de interação foram coletadas e examinadas por MEV. Posteriormente, ao serem retiradas da região de interação de cultura dupla foram fixadas por 2 h a 4°C em 2% (v/v) de glutaraldeído e 2% (w/v) de tetróxido de ósmio no mesmo tampão. Em seguida, lavadas com tampão e desidratadas em 30-100% (v/v) de álcool, ponto crítico seco em CO₂ seguido de banho de ouro.

4.2.2. Identificação das espécies de *Trichoderma* spp.

A análise de características morfológicas e culturais podem não ser suficientes para uma caracterização precisa das espécies de *Trichoderma*. Desta forma, optou-se por realizar a identificação molecular destes isolados, sendo que a extração de DNA de cada isolado foi realizada a partir de micélio produzido em meio líquido Batata-Dextrose.

As amostras de DNA genômico foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com os oligonucleotídeos iniciadores universais ITS4 e ITS5, fator de elongação 1- α EF1 e TEF1, Tri-actin e o produto gerado foi sequenciado. O sequenciamento foi realizado pela UNESP- Jaboticabal. As sequências obtidas foram comparadas com a sua fita complementar e em alguns casos foi gerada uma sequência de consenso processada pelo programa Geneious (Drummond *et al.*, 2006) e submetidas à comparação com outras já depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para identificação das espécies conforme a similaridade genética.

4.2.3 Biocontrole da síndrome da morte súbita da soja in vivo.

O estudo foi realizado em casa de vegetação na Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (UNESP), Ilha Solteira, São Paulo, Brasil. A temperatura e umidade relativa do ar foram ajustadas para 28°C e 68%, respectivamente, e mantidas assim durante a condução do experimento. Foram utilizados vasos de 0.8 litros

preenchidos com substrato comercial Basaplant® para colocar 4 sementes por vaso e após a emergência realizou-se o desbaste deixando apenas 2 plantas por vaso.

O experimento foi disposto em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com 4 repetições, sendo 3 tratamentos de inoculação: (T) *Trichoderma* sp., (T+F) *Trichoderma* sp. + *F. solani*, e (F) *F. solani*. A inoculação dos microrganismos foi realizada aos 15 dias após semeadura (DAS), no estágio fenológico V₃ (estádio caracterizado por apresentar a 2ª folha trifoliolada completamente desenvolvida). O agente de biocontrole *Trichoderma atroviride* foi inoculado no substrato com o auxílio de um borrifador, sendo aplicado 3 mL de uma suspensão de conídios com concentração de 5.0×10^{-8} UFC mL⁻¹.

O patógeno *Fusarium solani* f.sp. *glycines* foi inoculado por meio de um veículo sólido (arroz autoclavado), sendo 1 grão de arroz colonizado pelo patógeno depositado sobre o substrato em contato com a haste das plantas logo após a inoculação do substrato com *Trichoderma atroviride*, tratamento (T+F). Foram feitas inoculações apenas com o fungo antagonista (*Trichoderma*) sendo chamado de tratamento (T) e em outro tratamento as plantas de soja foram inoculadas apenas com o patógeno *F. solani* f. sp. *glycines*, tratamento (F). O fungo antagonista utilizado nesta etapa foi o isolado que apresentou os melhores resultados de controle in vitro.

Aos 45 dias após a emergência, as plantas foram coletadas para a avaliação sintomatológica, crescimento, determinação de pigmentos fotossintéticos, síntese de ureídeos, açúcares, nitrato, amônia e avaliação do estado nutricional das plantas. O experimento foi repetido por duas vezes, em anos consecutivos, para confirmação dos resultados. As análises bioquímicas foram realizadas no mesmo estágio de desenvolvimento, porém, foram utilizados vasos de maior capacidade para conduzir o experimento até final do ciclo para verificação dos sintomas.

4.2.4. Avaliação dos parâmetros fisiológicos, biométricos e nutricionais das plantas de soja

4.2.4.1. Pigmentos fotossintetizantes

Os teores de clorofilas “a”, “b” e “total”, carotenoides e feofitinas “a”, “b” e “total” foram determinados utilizando-se o método espectrofotométrico, proposto por

Lichtenthaler (1983), com material vegetal fresco acondicionado em extrato de acetona 80%.

4.2.4.2. Ureídeos, açúcares totais e sacarose

Para análise de ureídeos, sacarose e açúcares totais, o material foi extraído de acordo com método descrito por Bieleski & Turner (1966). Foi pesado aproximadamente 1 g de material vegetal fresco (folhas) e macerado em almofariz de porcelana com adição de 10 mL de solução MCW em tubos falcon de 15 mL. A mistura foi homogeneizada em vortex e depois centrifugada em centrífuga refrigerada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida, para cada 4 mL de sobrenadante foi adicionado 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água ultrapura. Após separação de fases, realizou-se a determinação de açúcares totais, sacarose e ureídeos com extração da fase hidrossolúvel.

4.2.4.2.1. Determinação de açúcares

Para quantificação de açúcares totais (DUBOIS *et al.*, 1956), adicionaram-se a 50 µL extrato vegetal, 450 µL de água ultra pura. Posteriormente, foram acrescentados 500 µL de fenol 5% e 2 mL de H₂SO₄ concentrado. A mistura foi homogeneizada em vortex e após resfriar à temperatura ambiente, foi realizada leitura de absorbância em espectrofotômetro a 490 nm. A concentração dos açúcares totais nas folhas foi determinada com base em curva de sacarose e os resultados expressos em mg g⁻¹ de Massa Fresca (MF).

Para determinação de sacarose (VAN HANDEL, 1968), adicionaram-se 100 µL do extrato vegetal, 450 µL de água ultra pura, em seguida, mais 500 µL de KOH 30% e 2 mL de H₂SO₄ concentrado. A mistura foi homogeneizada em vortex aquecida a seco a 100°C durante 10 minutos. Após resfriar à temperatura ambiente, foi realizada leitura de absorbância em espectrofotômetro a 490 nm. A quantificação da concentração de sacarose nas folhas foi determinada com base em curva de sacarose. Os resultados foram expressos em mg g⁻¹ MF.

4.2.4.2.2. Nitrato e amônio

Da fase hidrossolúvel da extração em MCW, determinaram-se os teores de nitrato (NO_3) em ácido salicílico a 5% e H_2SO_4 — conforme metodologia proposta por Cataldo *et al.* (1975)— e amônio (NH_4) em solução de fenol com nitroprusinato de sódio e solução fosfato ($\text{NaOH} + \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{NaOCl}$), seguindo a metodologia proposta por McCullough (1967).

4.2.4.2.3. Ureídeos

A quantificação dos ureídeos foi determinada de acordo com Vogels e Van Der Drift (1970). Em tubos de ensaio, foram adicionados 250 μL de extrato da porção hidrossolúvel, 20 μL de fenilhidrazina 0,33%, 0,125 mL de H_2O e 250 μL de NaOH 0,5 M. O material foi aquecido a seco a 100°C durante 8 minutos. Posteriormente, resfriado a temperatura ambiente, adicionaram-se 250 μL de HCl 0,65 N aos tubos e novamente ocorreu aquecimento a 100°C por 4 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, mais 250 μL de tampão fosfato de potássio pH 7,0 0,4 M e 250 μL de fenilhidrazina 0,33% foram acrescentados. Após 5 minutos em temperatura ambiente e 5 minutos em gelo, acrescentaram-se 1,25 mL de HCl concentrado gelado e 250 μL de ferrocianeto de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) 1,65%. Depois de 15 minutos, o material foi homogeneizado em vortex e a leitura realizada em 535 nm (absorbância) em espectrofotômetro. A concentração de ureídeos foi determinada com base em curva padrão de alantoína. Os resultados foram expressos em mmol g^{-1} MF (massa fresca).

4.2.4.3. Avaliações biométricas

Aos 45 dias após a semeadura, o material vegetal foi colhido para obtenção dos dados de comprimento e peso das plantas.

Quanto aos parâmetros biométricos, avaliou-se o comprimento da parte aérea e das raízes com auxílio de uma trena e os valores foram anotados em cm. Após a obtenção das medidas, as plantas foram seccionadas e secas em estufa de ventilação forçada a 65°C até obtenção de peso constante. O peso de fitomassa seca da parte aérea e das raízes foi determinado em balança de precisão após secagem.

4.2.4.4 Análise química do material vegetal

Após a obtenção das massas secas, o material vegetal foi moído para determinação dos teores foliares de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), boro (B), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn), em concordância com a metodologia proposta por Van Raij *et al.* (1996).

4.2.5. Aspecto geral das plantas

Ao final do experimento, as plantas foram observadas e fotografadas (45 dias após emergência). Observou-se a existência de lesões no colo e raízes promovidas pelo *Fusarium solani*, bem como o aspecto geral da planta, como coloração, sintomas de murcha, abortamento de flores e senescência precoce (desfolha). Na réplica do experimento, alguns vasos foram mantidos até o final do ciclo da soja para observar as lesões provocadas nos caules e raízes de plantas em estágio reprodutivo.

4.2.5.1. Avaliação em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O material vegetal das folhas e raízes foi fixado em Karnovsky FAA modificado (glutaraldeído 2.5%, formaldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0.05 M, pH 7.2), pós-fixado com tetróxido de ósmio (OsO_4) e desidratados em soluções crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). Posteriormente, os cortes foram montados em um suporte metálico sobre uma fita adesiva e o material levado à secagem ao ponto crítico com CO_2 líquido (Balzers CPD 030) e, em seguida, ao metalizador (MED 010 da Balzers) para cobertura da superfície com uma fina camada de ouro e examinados em microscópio eletrônico de varredura (EVO-LS15-ZEIS).

4.2.6. Análise estatística dos resultados

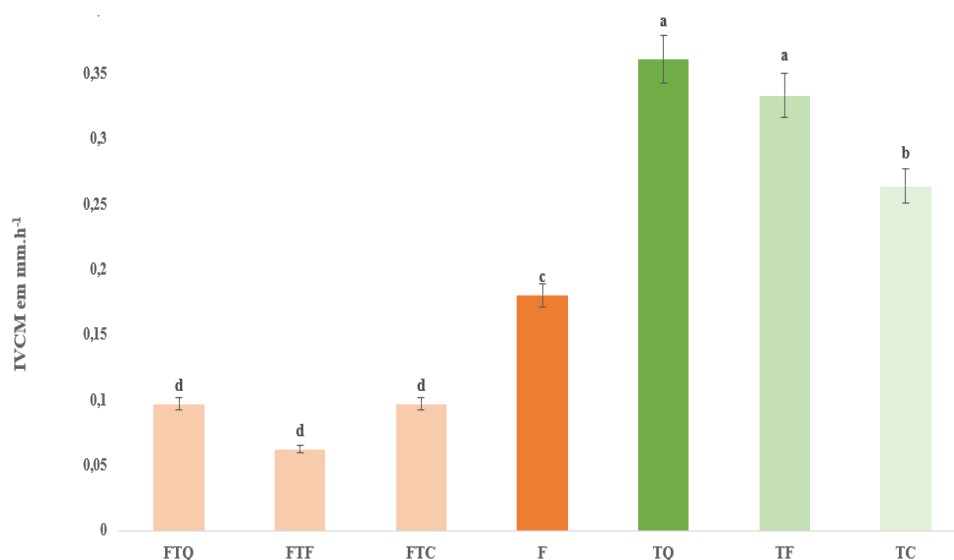
Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk (1965) ($p < 0.05$), sendo os considerados normais, expostos à análise de variância pelo teste F ($p < 0.05$) e, quando significativos, compararam-se as médias entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0.05$) e a análise de correlação de Pearson

($p < 0.05$), a fim de constatar dentre os atributos biométricos, metabólicos ou nutricionais aqueles que se correlacionaram diretamente entre si. O experimento foi repetido duas vezes e os dados combinados, a análise estatística determinou a homogeneidade da variância ($p \leq 0,05$).

4.3 Resultados

No ensaio *in vitro* com os 3 isolados de *Trichoderma* confrontados com o *Fusarium solani* f. sp. *glycines* e o *F. solani* sozinho, verificou-se que o índice de velocidade de crescimento micelial do *Fusarium* foi reduzido na presença dos antagonistas, como pode ser observado na Figura 1. O *Fusarium* obteve os maiores valores de crescimento em cultivo isolado $0,18 \text{ mm h}^{-1}$, diferindo estatisticamente dos tratamentos de cultivo pareado onde os valores de IVCM não diferiram entre si apresentando em média IVCM de $0,08 \text{ mm h}^{-1}$.

Figura 1. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Fusarium solani* f. sp *glycines* sozinho e com isolados de *Trichoderma* em meio de cultivo BDA. UNESP, Ilha Solteira – SP.

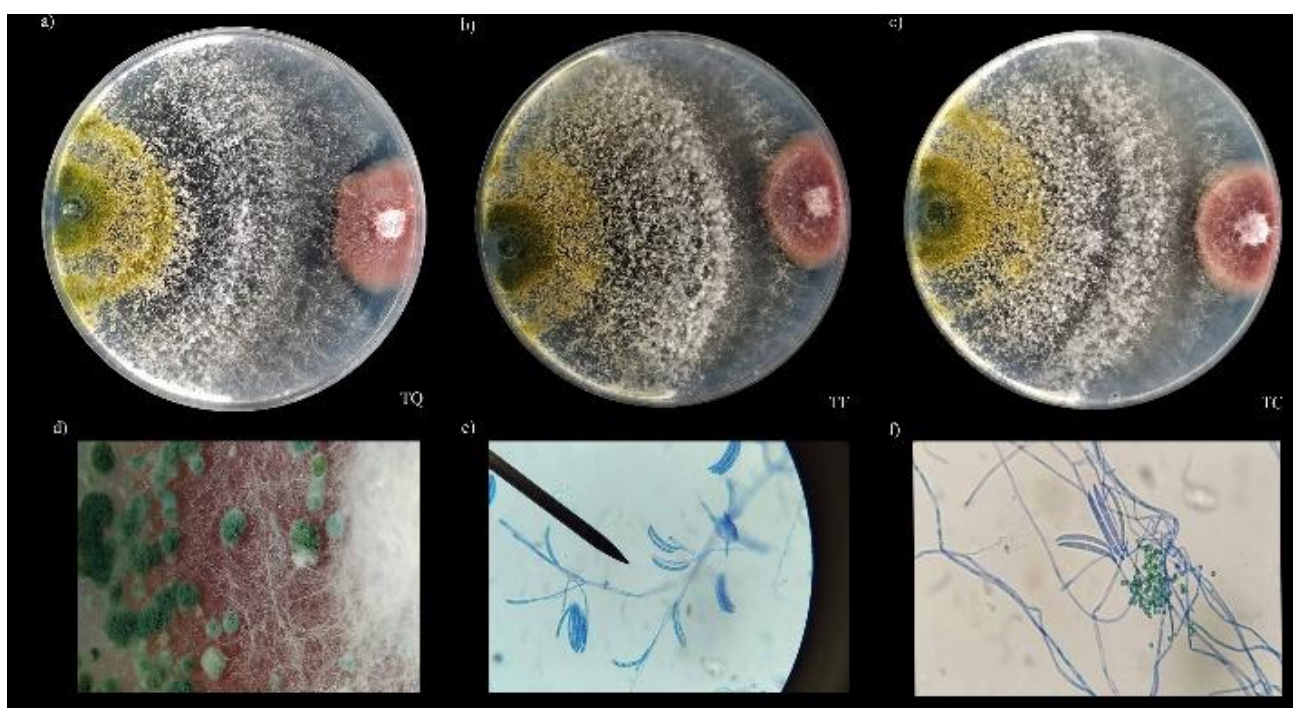


Fonte: própria autora

Pode-se verificar o antagonismo dos isolados de *Trichoderma* em relação ao *Fusarium solani* (Figuras 2 A, B e C) após 72 horas de inoculação e os detalhes da área de confronto em microscópio (Figura 2D) e fiálides e macronídeos de *Fusarium*

solani (Figura 2E) e também a interação das hifas de *Trichoderma* e *F. solani* (Figura 2F).

Figura 2. Confronto em placas entre *Trichoderma* isolados TQ (a), TF (b) e TC (c) (esquerda) e *Fusarium solani* f. sp. *glycines* (direita), após 72h de incubação. Detalhe da área de confronto em microscópio estereoscópio 25x (d), fiálides e macroconídios de *Fusarium solani* f. sp. *glycines* 100x (e), Interação das hifas de *Trichoderma* e *F. solani* (f) , UNESP, Ilha Solteira-SP.



Fonte: própria autora

Aos 7 dias foi realizada a avaliação qualitativa dos dados de crescimento, na qual pode ser constatada a esporulação de 2 isolados de *Trichoderma* sobre a colônia de *Fusarium*, de forma que este ocupou a totalidade da mesma, recebendo a nota 1, que indica que o antagonista ocupa toda a placa; já o isolado TF recebeu nota 2, conforme escala de notas de Bell *et al.* (1982) (Figura 3).

Os três isolados de *Trichoderma* foram sequenciados e apresentaram similaridade acima de 98% ao *Trichoderma atroviride*, que é conhecido por seu potencial de biocontrole devido à produção de enzimas capazes de degradar a parede celular de fitopatógenos.

Figura 3. a) Aspecto da placa de cultivo aos 7 dias de crescimento evidenciando o crescimento do *Trichoderma* sobre toda a placa. B) Imagem da zona de crescimento de *T. atroviride* em microscópio estereoscópio evidenciando a secreção de gotículas de metabólitos. c) Fotomicrografia mostrando conidióforo de *Trichoderma atroviride*, UNESP, Ilha Solteira-SP.

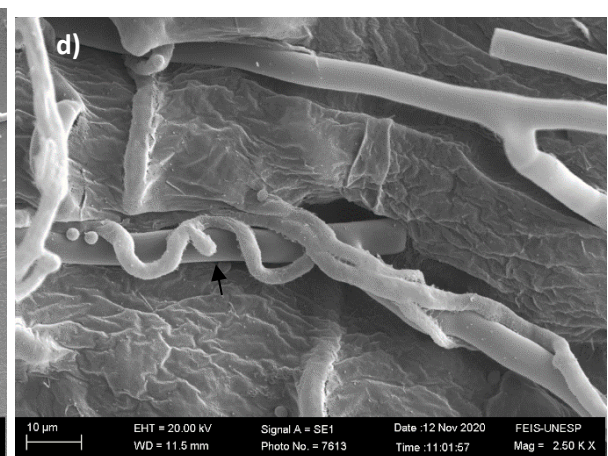
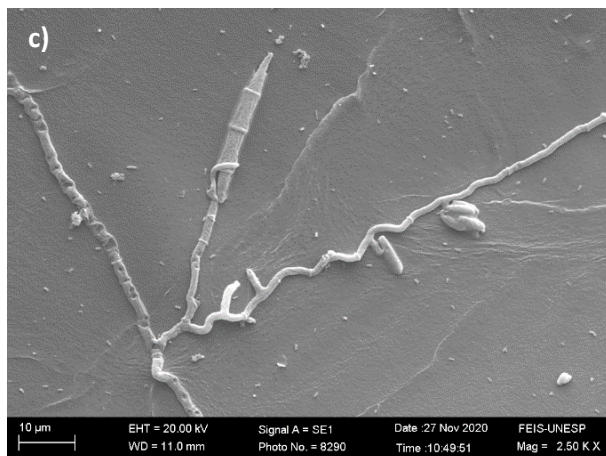
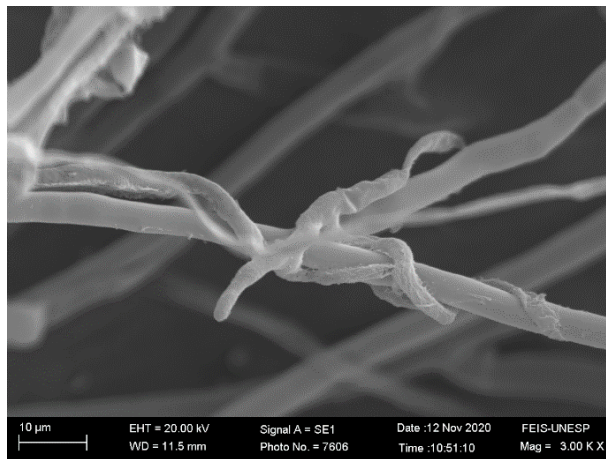
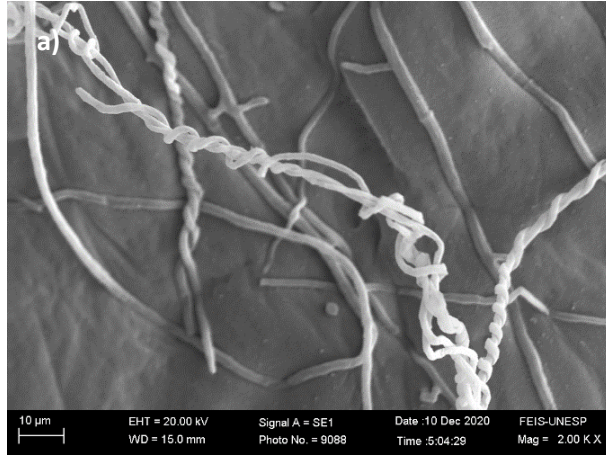


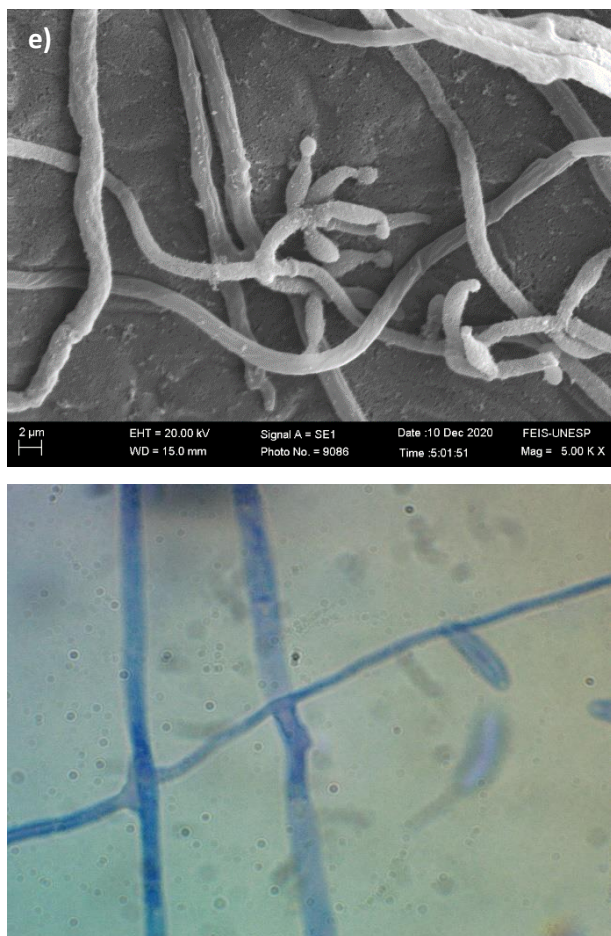
Fonte: própria autora

A figura 3 mostra a capacidade competitiva do *Trichoderma* que ocupou rapidamente toda a placa, restringindo o crescimento do patógeno. Pode-se observar gotículas de coloração verde escura (metabólitos) sobre o micélio de *Trichoderma* (Fig 3 a e b).

Através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), demonstrou-se a atuação de *T. atroviride* como hiperparasita de *Fusarium* (Figura 4). Na figura 4 a e b, a hifa do *Trichoderma* se enrola sobre a hifa de *Fusarium*; na 4c, evidencia hifas de *Trichoderma* sobre macroconídio de *F.solani*; na 4d e 4f (microscópio óptico 400x), a seta indica formação de apressório para adesão e penetração no patógeno; e na 4e, observam-se hifas *Trichoderma atroviride*, conidiófoto e conídios crescendo sobre hifas de *Fusarium* (região de pareamento das colônias em ágar batata dextrose).

Figura 4. Imagens de microscopia eletrônica de varredura evidenciando estratégias de biocontrole, a, b, c e d; na figura e, observa-se a morfologia fúngica do *Trichoderma atroviride* na zona de pareamento de culturas crescendo sobre *F.solani*; na f, lâmina evidenciando a aderência da hifa de *Trichoderma* sobre *Fusarium* sob o aumento de 400x coradas com azul de algodão com lactofenol.





Fonte: própria autora

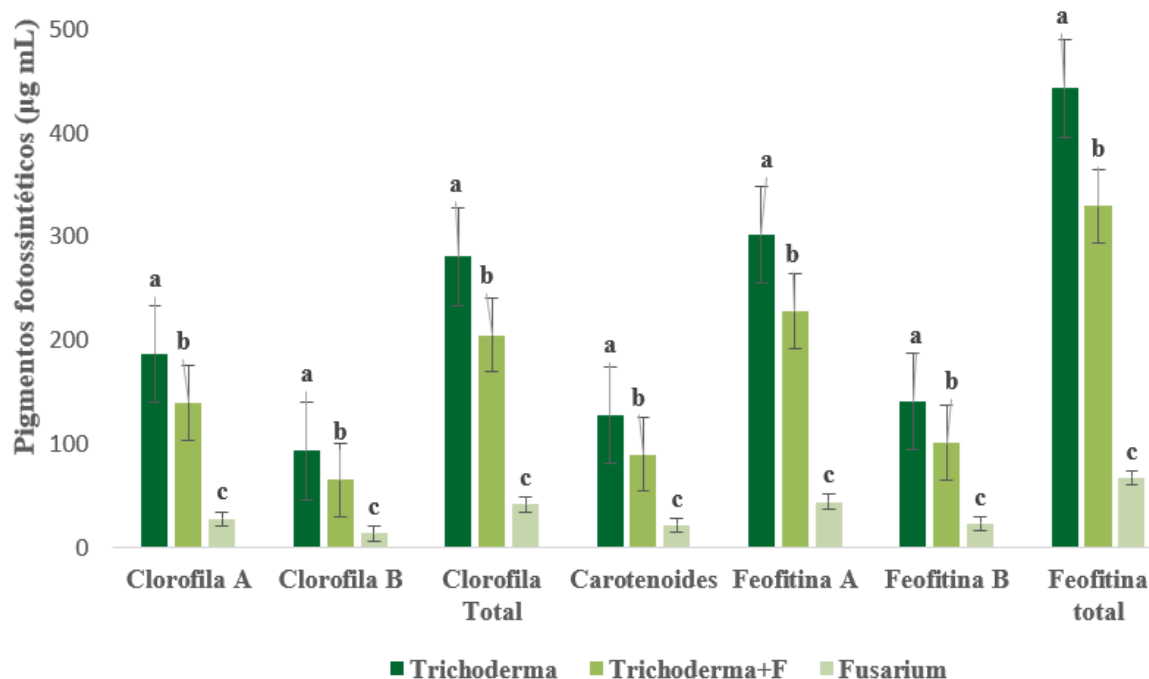
As análises bioquímicas do material fresco das plantas de soja foram realizadas 15 dias após as inoculações, ou seja, 30 dias após a semeadura (DAS).

Com relação aos pigmentos fotossintéticos, os valores diferiram estatisticamente a 5% de probabilidade. Plantas inoculadas com *Trichoderma* apresentaram as maiores concentrações de pigmentos, seguidas das inoculadas com patógeno e antagonista e as inoculadas somente com *Fusarium solani*, os menores valores (Figura 5), contendo, respectivamente, 28,02 e 13,80 $\mu\text{mol ml}^{-1}$ de clorofila a e b, bem como, indicando queda dos teores de pigmentos fotossintéticos quando comparados ao tratamento controle com inoculação de *Trichoderma* (T). Neste tratamento, observaram-se 182,80 e 93,42 $\mu\text{mol ml}^{-1}$ de clorofila a e b, respectivamente.

Com a inoculação de *Trichoderma* sp. em plantas infectadas por *Fusarium solani* (T+F), observou-se (Figura 5) um reestabelecimento dos teores de clorofila, com valores de 142,98 e 65,43 μgml^{-1} de clorofila a e b, respectivamente. Tais resultados se repetiram em relação aos teores de carotenoides e feofitinas nestes

tratamentos, na qual T+F apresentou 89,66 e 323,9 $\mu\text{mol ml}^{-1}$, respectivamente, inferiores apenas aos valores encontrados no tratamento controle (T), com 127,82 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e 445,81 $\mu\text{mol ml}^{-1}$, respectivamente.

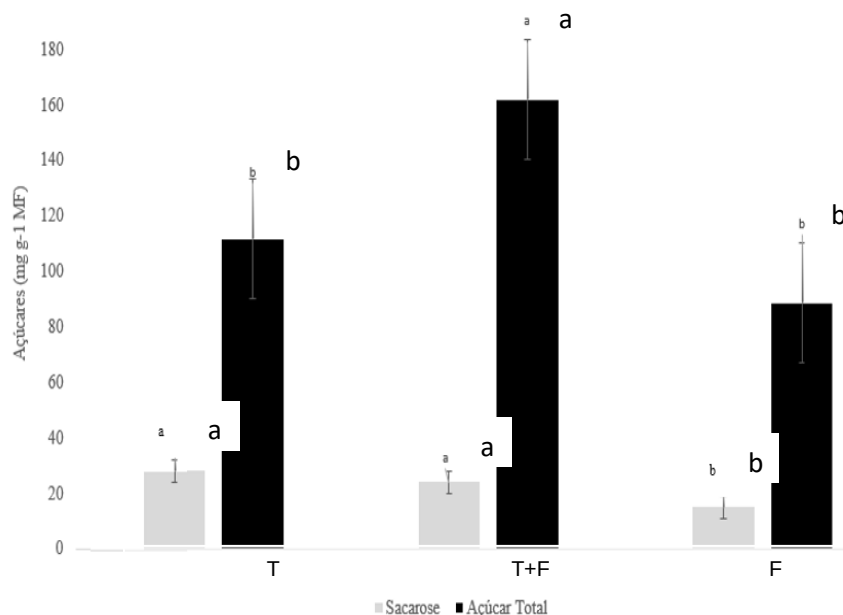
Figura 5. Teores de clorolila a, b e total, caroteno e feofitinas a, b e total em folhas de soja inoculadas com *Trichoderma*, *Trichoderma* + *Fusarium* e *Fusarium*. UNESP, Ilha Solteira-SP.



Fonte: própria autora

Para o parâmetro sacarose, a maior média foi verificada no tratamento com a inoculação do *Trichoderma*, o qual diferiu apenas do tratamento com inoculação somente com *Fusarium* (Figura 6). Já para o açúcar total, a maior média foi verificada no tratamento com a inoculação de *Trichoderma* + *Fusarium solani*, sendo esse superior aos tratamentos com a inoculação individual de *Trichoderma* ou *Fusarium*.

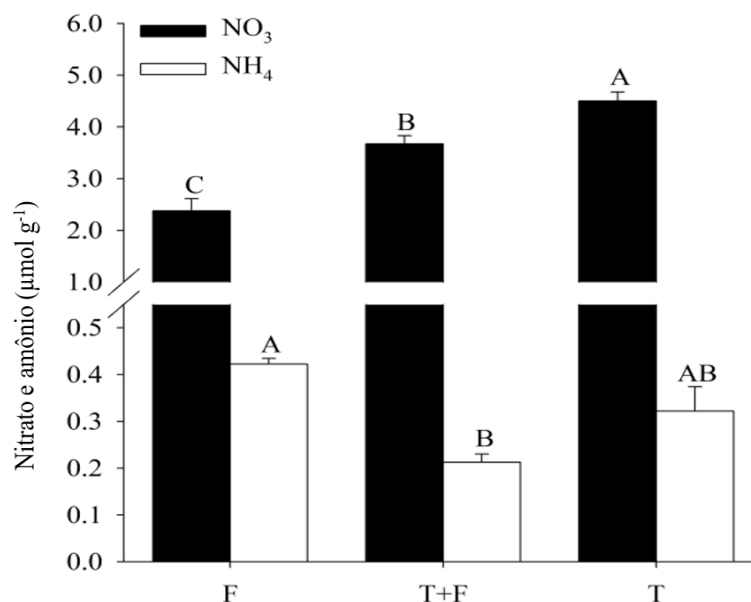
Figura 6. Concentração de açúcar total e sacarose em plantas de soja inoculadas com *Trichoderma* (T), *Trichoderma* + *Fusarium* (T+F) e *Fusarium* (F), UNESP, Ilha Solteira-SP.



Fonte: própria autora

Os teores de nitrato (NO_3) apresentaram diferenças entre os tratamentos, observando-se valor mais elevado para as plantas inoculadas com *Trichoderma* e os mais baixos para as inoculadas com o patógeno. Constatou-se acúmulo de até $4.50 \mu\text{mol g}^{-1}$ de NO_3 em plantas de soja inoculadas com *Trichoderma atroviride* (T). Enquanto o tratamento com *Fusarium solani* (F) apresentou $2,37 \mu\text{mol g}^{-1}$ (Figura 7). Em relação à concentração de amônio (NH_4), observou-se a maior concentração ($0.450 \mu\text{mol g}^{-1}$) em plantas infectadas por *Fusarium solani* (F), seguidas dos tratamentos T e T+F com 0.32 e $0.21 \mu\text{mol g}^{-1}$, respectivamente. O tratamento controle (T) não diferiu estatisticamente dos demais (Figura 7).

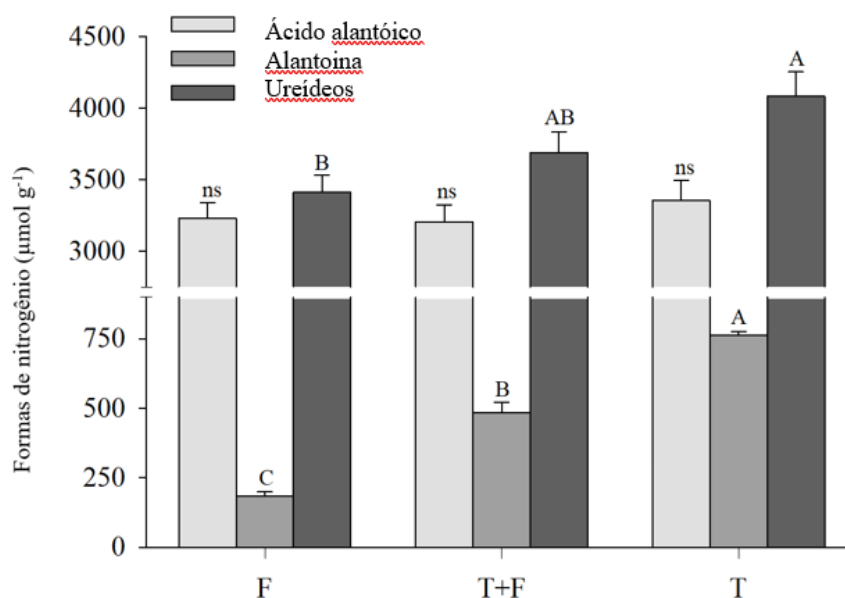
Figura 7. Determinação de teores de nitrato e amônio em plantas de soja inoculadas com *Trichoderma*, *Trichoderma* + *Fusarium* e *Fusarium*, UNESP, Ilha Solteira-SP.



Fonte: própria autora

Os valores de alantoína e ureídeos diferiram entre os tratamentos com *Trichoderma* em relação ao inoculado com *Fusarium*. Contudo, para ácido alantoico não houve diferença significativa entre os tratamentos. As análises dos compostos nitrogenados mantiveram o mesmo padrão observado para o nitrato, sendo os teores mais elevados de ureídeos encontrados em plantas de soja tratadas com *Trichoderma* (T), com média de 4084.06 $\mu\text{mol ml}^{-1}$, seguido dos demais tratamentos, T+F e F, com 3689.19 e 3411.72 $\mu\text{mol ml}^{-1}$, respectivamente. Foi determinado 761.71 $\mu\text{mol ml}^{-1}$ de alantoína em plantas do tratamento controle (T) inoculadas com *Trichoderma* e apenas 183.24 $\mu\text{mol ml}^{-1}$ de alantoína em plantas infectadas por *Fusarium solani* (F) (Figura 8).

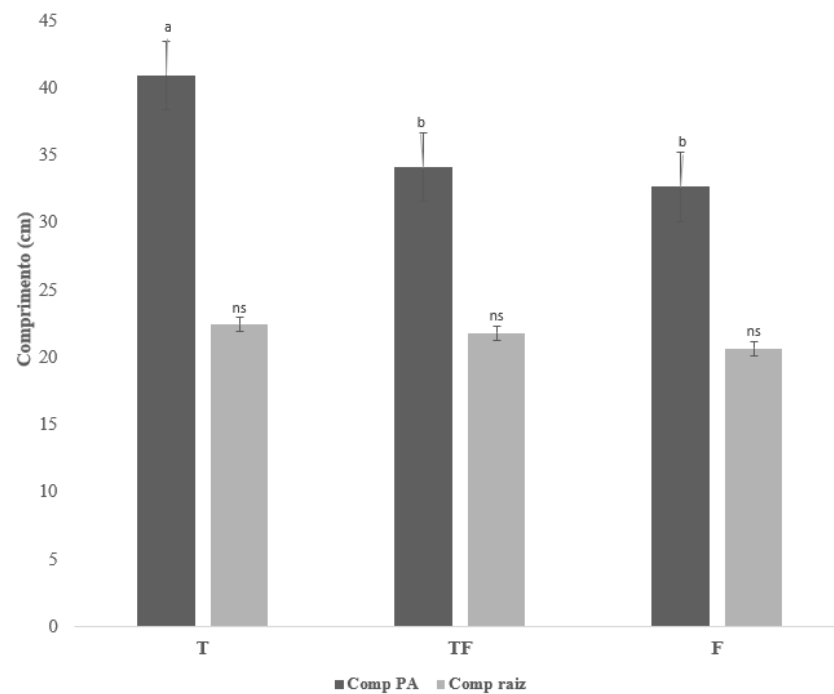
Figura 8. Teores de ácido alantóico, alantoina e ureídeos presentes em plantas de soja tratadas com *Trichoderma*, *Trichoderma* + *Fusarium* e *Fusarium*. UNESP, Ilha Solteira-SP.



Fonte: própria autora

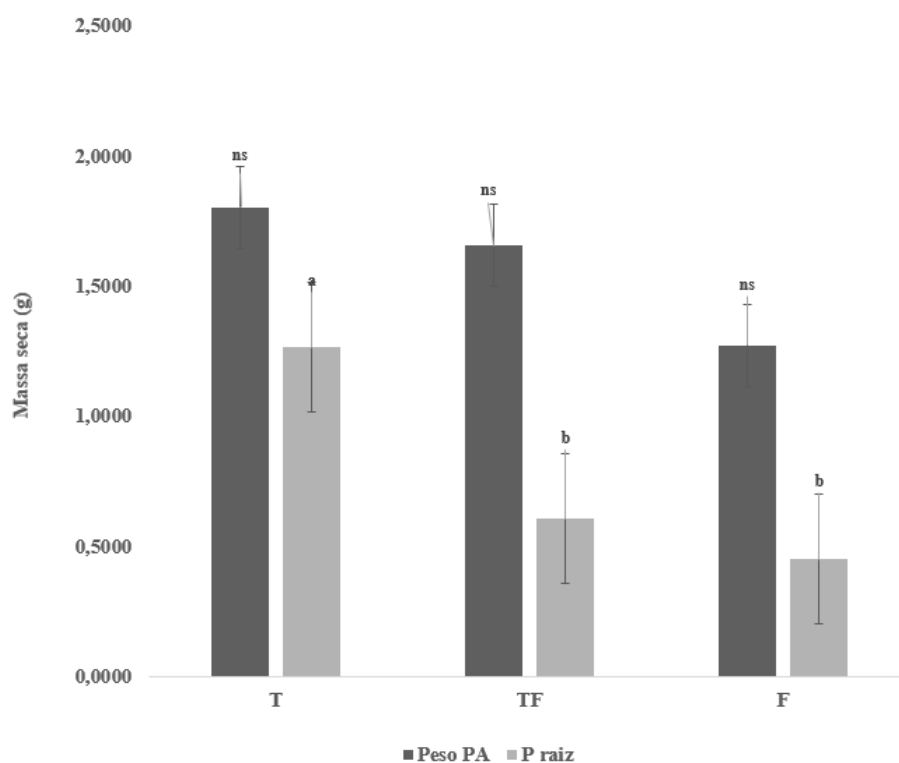
Os dados biométricos foram obtidos ao final do experimento in vivo (aos 45 dias). As plantas que receberam apenas o *Trichoderma* (T) obtiveram o melhor desempenho com relação ao comprimento de parte aérea com média de 40,88 cm, seguidas do tratamento (T+F) com 34,4 cm e (F) com 32,6 cm, mas para as raízes não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 9). Para a massa seca, (Figura 10) houve diferença apenas para o peso das raízes que variou de 1,26 g para o tratamento (T) e 0,6 g para (T+F) e 0,4 g para as inoculadas com o patógeno (F).

Figura 9. Comprimento de parte aérea e raízes de plantas de soja aos 45 dias, inoculadas com *Trichoderma*, *Trichoderma* + *Fusarium* e *Fusarium*. UNESP, Ilha Solteira-SP.



Fonte: própria autora

Figura 10. Massa seca de parte aérea e de raízes de plantas de soja aos 45 dias inoculadas com *Trichoderma*, *Trichoderma* + *Fusarium* e *Fusarium*. UNESP, Ilha Solteira-SP.

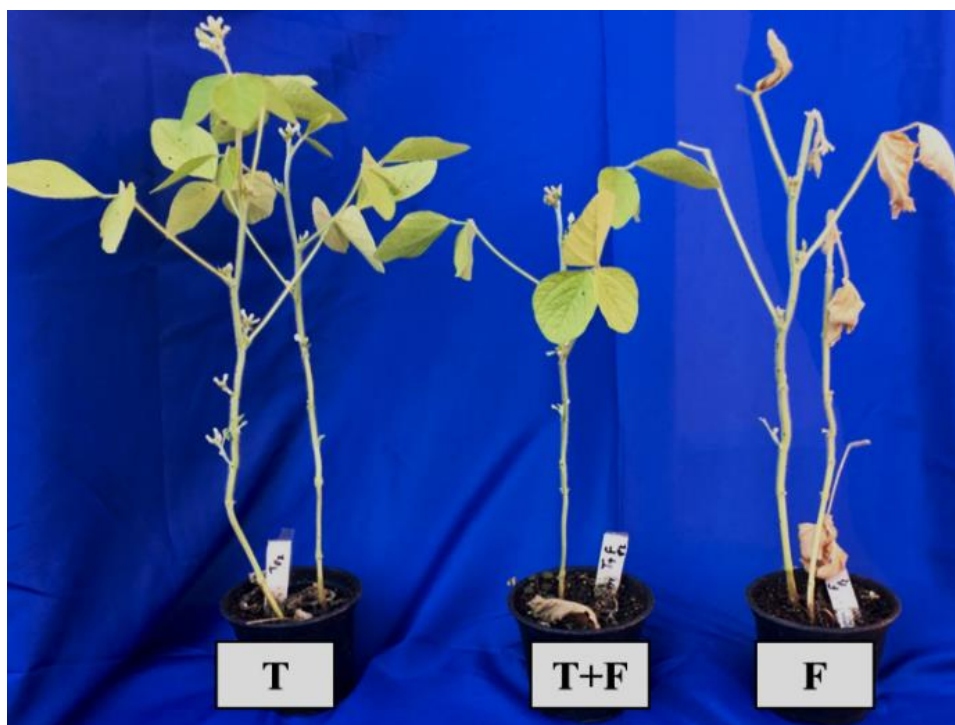


Fonte: própria

autora

Na Figura 11, destaca-se o desenvolvimento da parte aérea, na qual notam-se diferenças quanto à coloração das folhas, altura das plantas de soja no experimento 1 (2018). Já na figura 12, observa-se o estado geral das plantas inoculadas com *Trichoderma* têm melhor desenvolvimento quando comparadas às não inoculadas, mesmo sem a inoculação de patógeno. Na figura 12 (b), as plantas inoculadas com *Fusarium* apresentam o início dos sintomas foliares, demonstrando clorose e tamanho reduzido quando comparado às plantas inoculadas com ambos os fungos, ou seja, antagonista e patógeno (T+F). A diferença é ainda mais nítida quando comparadas plantas contaminadas com *Fusarium* (F) com as que receberam apenas *Trichoderma* (T).

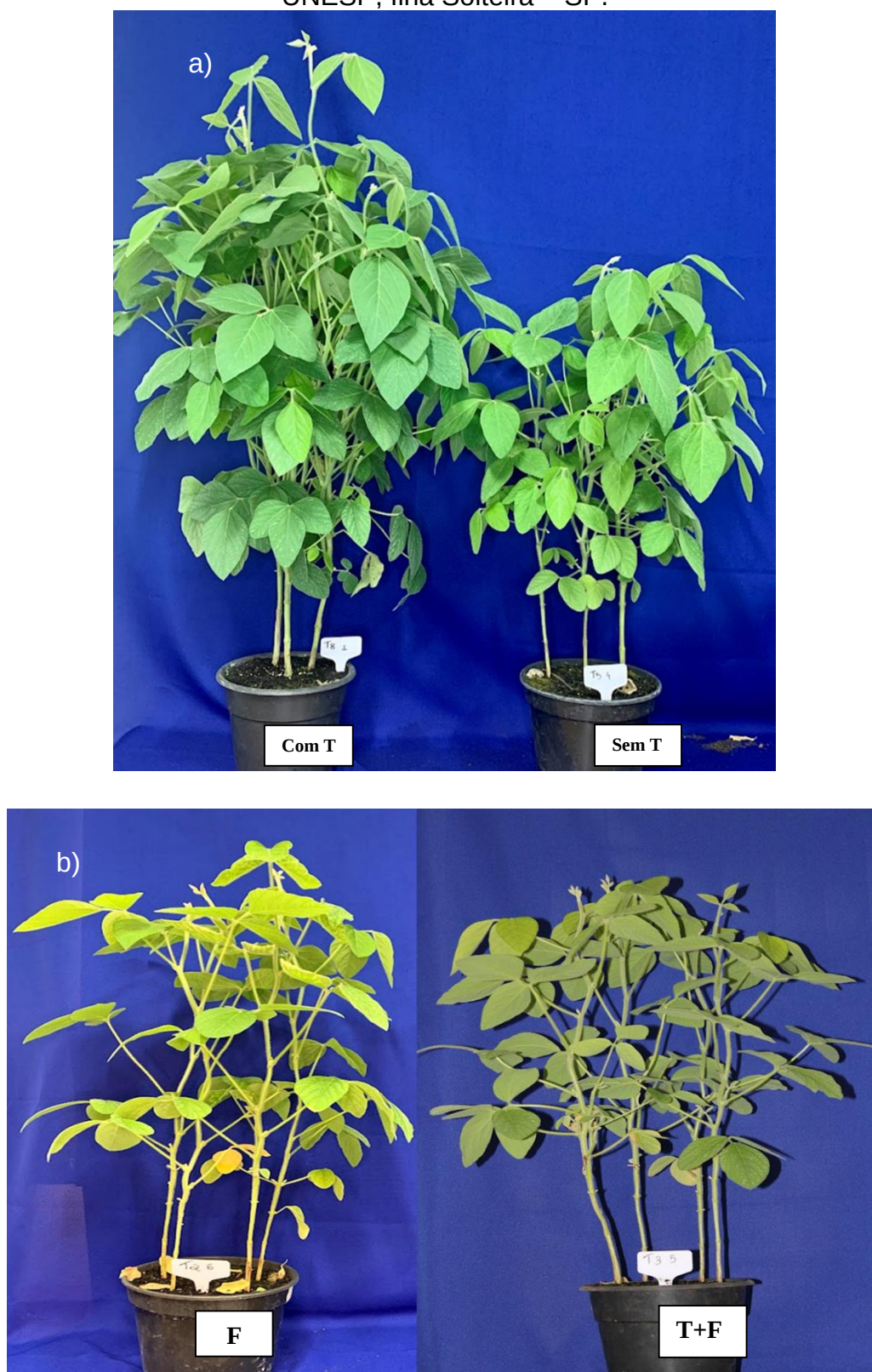
Figura 11. Observação do aspecto geral das plantas de soja tratadas com *Trichoderma*, *Trichoderma* + *Fusarium* e *Fusarium* aos 45 dias de cultivo (2018). UNESP, Ilha Solteira – SP.



Fonte: própria autora

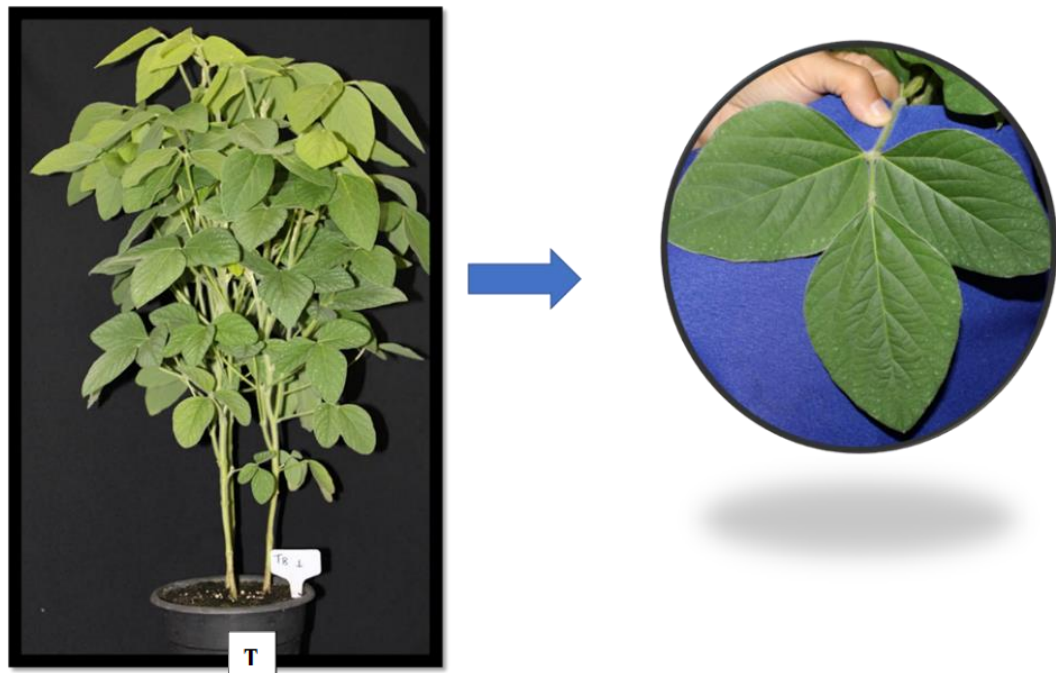
A figura 13 mostra o vaso com plantas de soja inoculadas apenas com o bioagente *Trichoderma atroviride*, onde se destaca a intensidade do verde no trifólio. O aspecto do trifólio, quando comparado ao de plantas que receberam apenas *Fusarium* (Figura 13), demonstra maior área foliar e maior quantidade de pigmentos fotossintetizantes. O Trifólio de plantas sintomáticas (SDS) apresenta folhas do tipo carijó, com cloroses que evoluem para necrose e abscisão. Em vários trifólios, observam-se apenas 1 ou 2 folhas devido aos sintomas da morte súbita da soja.

Figura 12. Aspecto geral de plantas de soja aos 55 dias de cultivo: a) planta de soja com *Trichoderma* (com T) e sem inoculação de *Trichoderma* (sem T); b) aspecto geral de planta de soja inoculada com *Fusarium* (F) e *Trichoderma*+ *Fusarium* (TF) UNESP, Ilha Solteira – SP.



Fonte: própria autora

Figura 13. Observação do aspecto geral das plantas de soja tratadas com *Trichoderma* (T) evidenciando o aspecto sadio e a tonalidade do trifólio aos 55 dias de cultivo. UNESP, Ilha Solteira-SP.



Fonte: própria autora

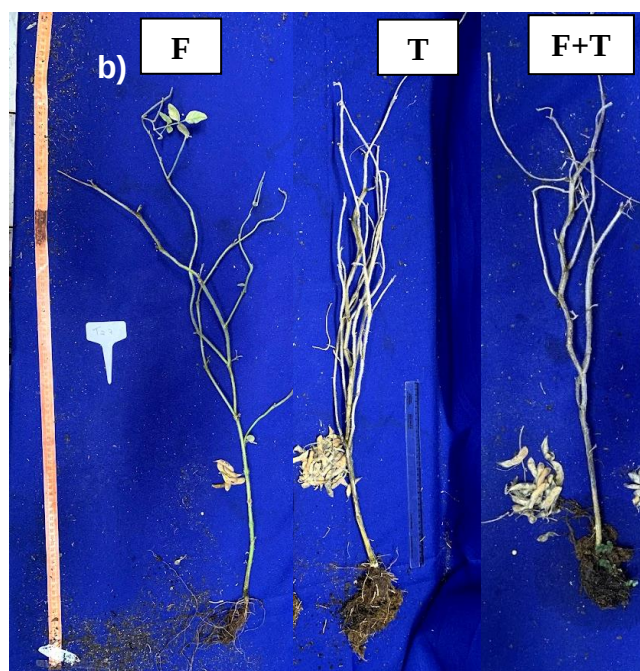
Figura 14. Observação do aspecto geral das plantas de soja inoculadas com *Fusarium* exibindo sintomas de SDS, com destaque ao tamanho reduzido dos folíolos e clorose (início dos sintomas foliares) aos 55 dias de cultivo. UNESP, Ilha Solteira- SP.



Fonte: própria autora

Na avaliação final, fica nítida a diferença principalmente quanto ao volume de raízes e o tamanho das plantas sob os tratamentos com *Fusarium* e os que receberam *Trichoderma atroviride* (Figura 15 a e b). Na figura b (plantas no final do ciclo) exibem diferenças não só com relação ao tamanho de parte aérea ou raiz, mas demonstra o comprometimento da doença sobre a produção da planta gerando uma quantidade de vagens bastante reduzida quando comparado aos demais tratamentos.

Figura 15. a) Obtenção dos dados biométricos das plantas de soja tratadas com *Trichoderma*, *Trichoderma* + *Fusarium* e *Fusarium* aos 45 dias de cultivo 2018. B) Biometria soja 2020. UNESP, Ilha Solteira – SP.



Fonte: própria autora

Na Figura 16, pode-se observar um dos sintomas da podridão vermelha da raiz (PVR) ou Morte súbita da soja (SDS), que é a lesão no colo da planta mostrando a coloração avermelhada.

Figura 16. Exibição de sintomas de SDS em caule de soja ao final do ciclo. UNESP, Ilha Solteira- SP.

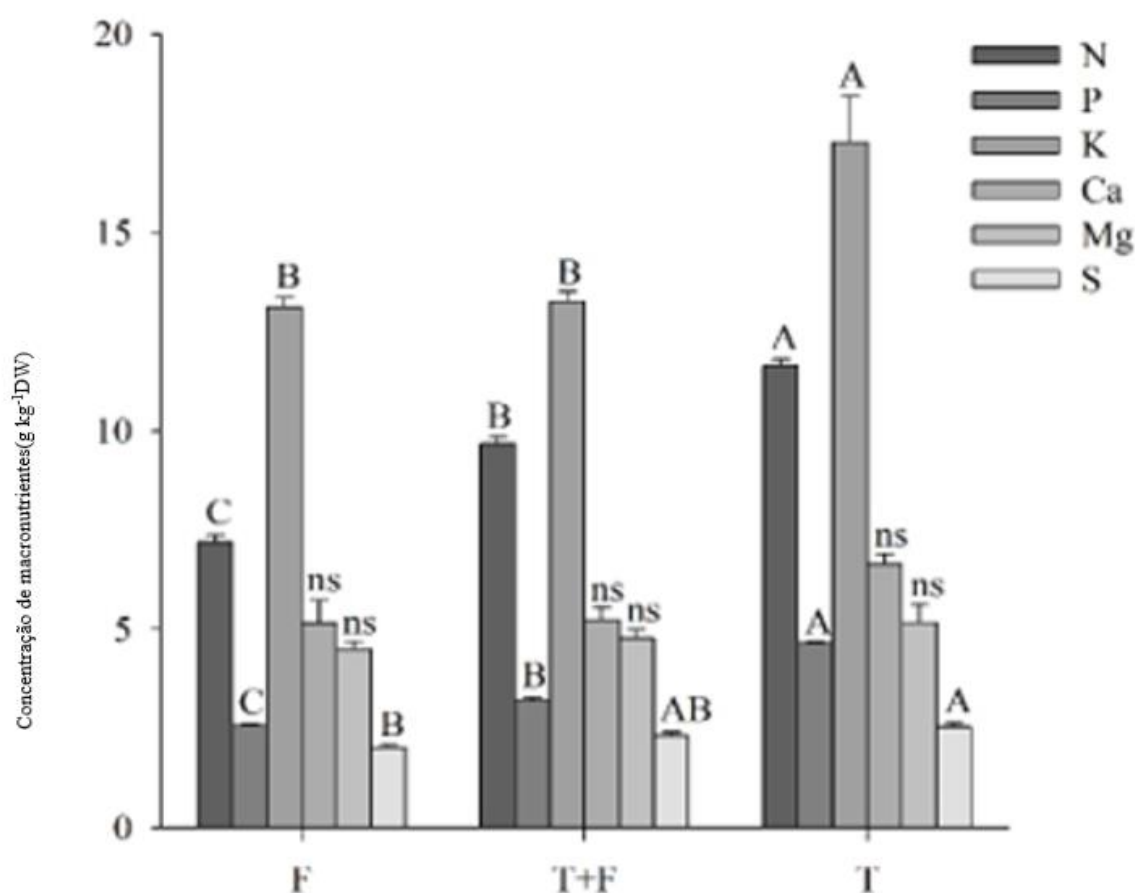


Fonte: própria autora

Na caracterização dos teores foliares de macro e micronutrientes da soja, empregou-se a classificação proposta por Van Raij *et al.* (1996). Para tanto, observou-se que, após 15 dias das inoculações de *Trichoderma spp.* e *Fusarium solani*, houve diferença na condição nutricional da soja sobre os teores de N, P, K, S e Cu (Figuras 16 e 17).

Figura 17. Análise foliar para macronutrientes em plantas de soja tratadas com *Trichoderma*, *Trichoderma* + *Fusarium* e *Fusarium* aos 45 dias de cultivo. UNESP, Ilha Solteira- SP.





Fonte: própria autora

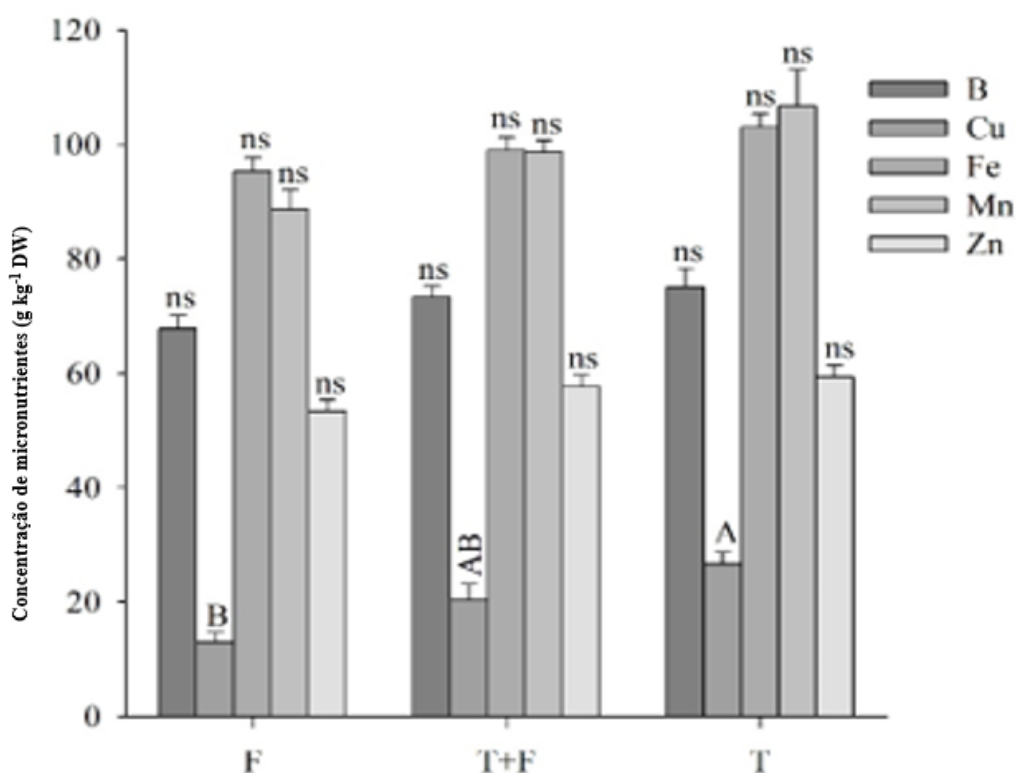
Os teores foliares de N seguiram um padrão cumulativo nos tratamentos que receberam *Trichoderma*, *Trichoderma* + *Fusarium* e *Fusarium*, com respectivas concentrações de 9,66 e 11,64 g kg⁻¹, quando comparados ao tratamento F que apresentou 7,18 g kg⁻¹ (Figura 17).

Quanto aos teores foliares de K, estes não diferiram estatisticamente entre os tratamentos F e T+F, com valores de 13,11 e 13,26 g kg⁻¹, respectivamente, ficando abaixo da faixa de suficiência que é de 17 a 25 g kg⁻¹. O tratamento controle (T), mostrou-se adequado quanto ao teor de K, com 17,27 g kg⁻¹.

Dentre os macronutrientes foliares, o P e o S foram os menos absorvidos pelas plantas, sendo as maiores concentrações observadas no tratamento T, com 4,65 e 2,53 g kg⁻¹, respectivamente (Figura 17). Nestas condições, houve acúmulo de P de até 2,08 g kg⁻¹ e S de 0,52 g kg⁻¹, quando comparado ao tratamento F. O tratamento T+F não difere estatisticamente de T e F quanto ao teor de S. Os teores foliares de Ca e Mg não diferiram estatisticamente entre os tratamentos propostos.

Quanto aos micronutrientes foliares, o teor de Cu foi maior no tratamento controle (T), com valores de 26,67 mg kg⁻¹ (Figura 18). Nos demais tratamentos, observou-se que a aplicação de *Trichoderma* em plantas infectadas por *Fusarium solani*, tratamento T+F obteve maior acúmulo de Cu, 20,33 mg kg⁻¹, quando comparada ao tratamento com o patógeno (F), que apresentou 13 mg kg⁻¹.

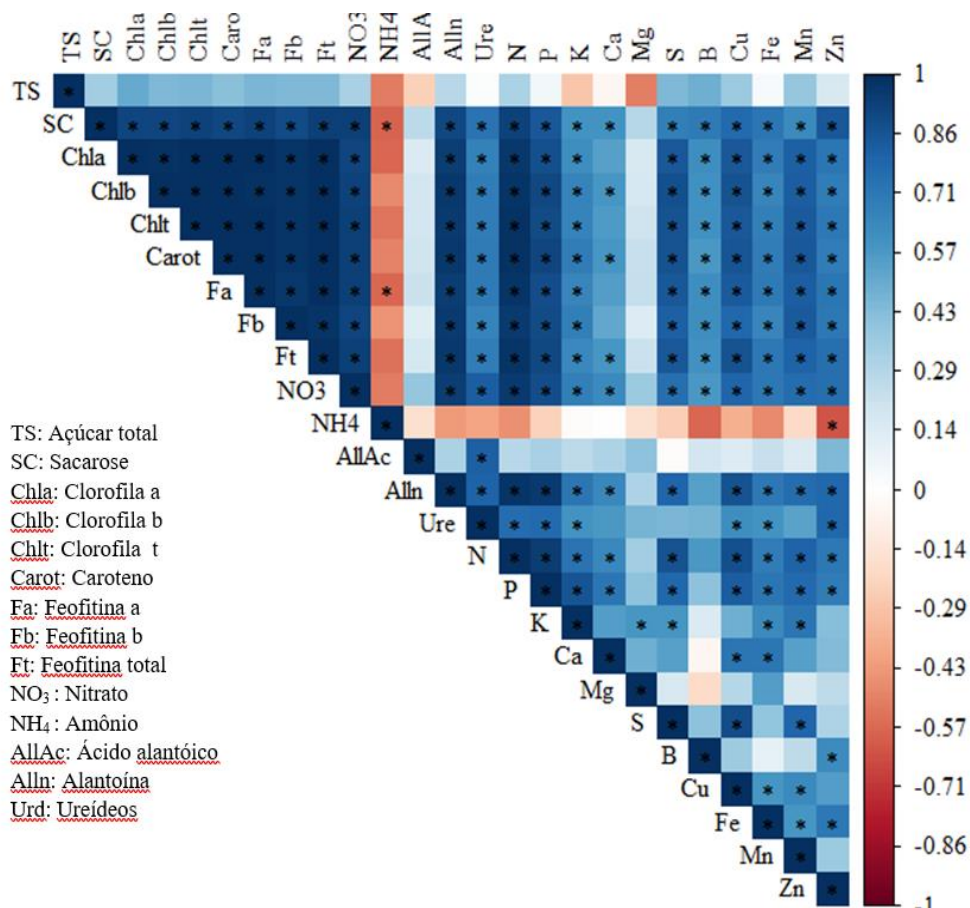
Figura 18. Análise foliar para micronutrientes em plantas de soja tratadas com *Trichoderma*, *Trichoderma* + *Fusarium* e *Fusarium* aos 45 dias de cultivo. UNESP, Ilha Solteira- SP.



Fonte: própria autora

Observou-se moderada correlação com coeficientes de Pearson entre 0.55* e 0.70* para a maioria das variáveis analisadas: pigmentos, carboidratos, nutrientes e parâmetros biométricos (Figura 19). Apenas o teor de NH₄ foi negativamente correlacionado com sacarose (-0.584*), feofitina a (-0.578*) e zinco (-0.62*). Fortes correlações, com coeficientes acima de 0.99*, foram observadas entre os pigmentos fotossintéticos, clorofilas a, b e total, feofitina a, b e total, e carotenoides.

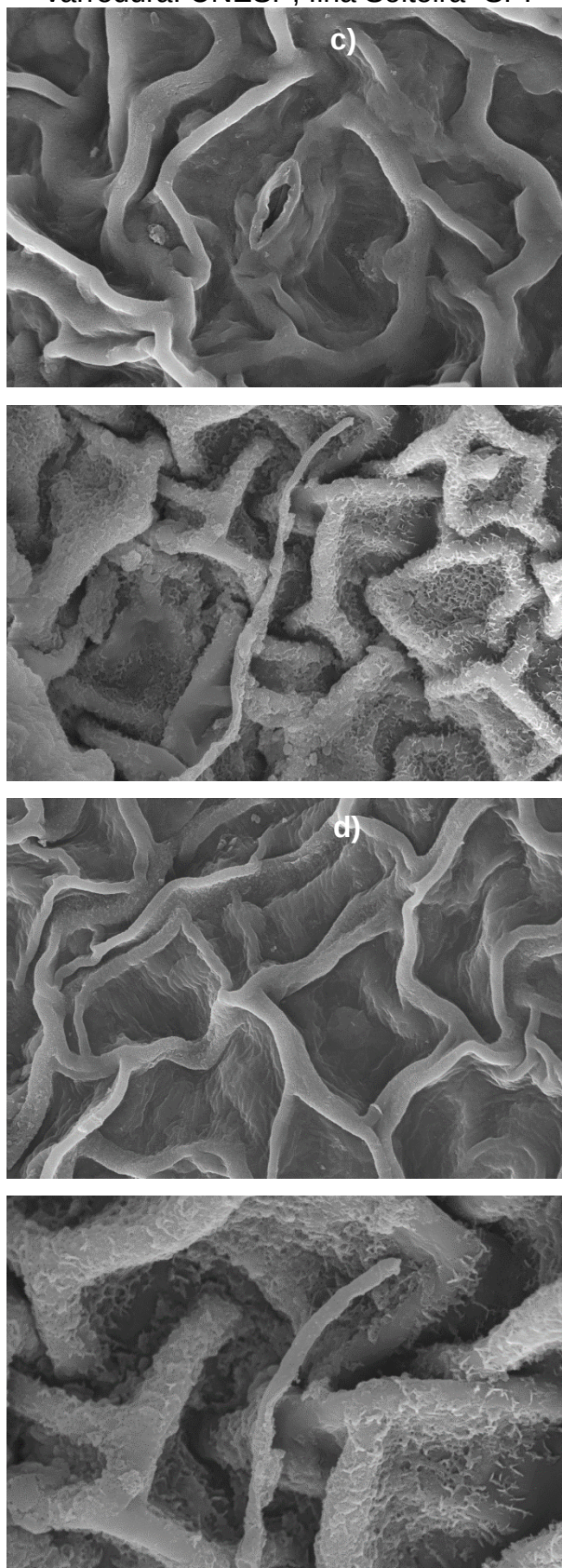
Figura 19. Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre as variáveis analisadas para plantas de soja tratadas com *Trichoderma*, *Trichoderma* + *Fusarium* e *Fusarium* aos 45 dias de cultivo. UNESP, Ilha Solteira - SP.



Fonte: própria autora

O aspecto das células epidérmicas das folhas de soja pode ser observado nas fotomicrografias, sendo que em (a) apresentaram aspecto saudável e túrgidas; em (b) não foram observados danos à membrana; no entanto, em (c e d), a superfície apresentava sinais de desidratação (Figura 20).

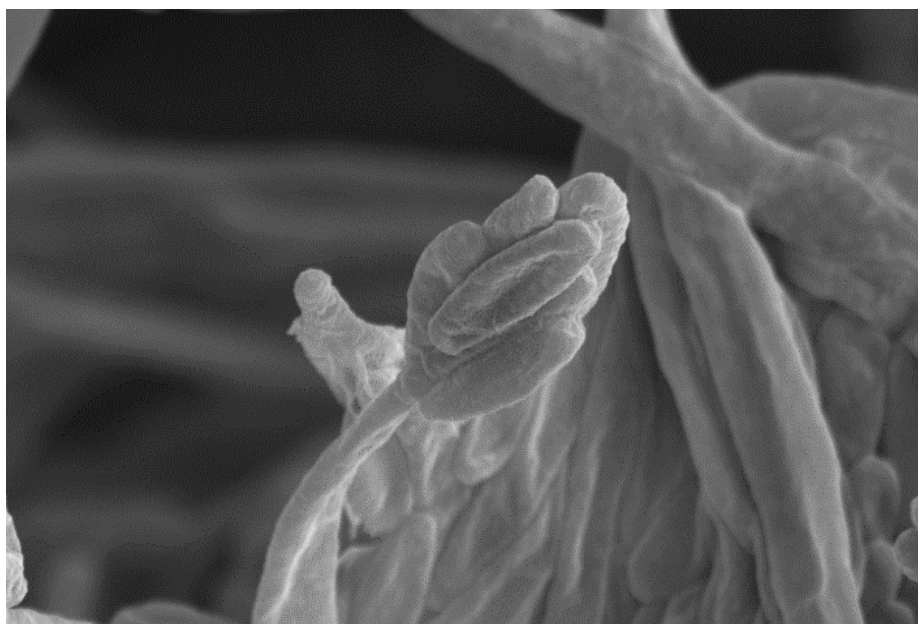
Figura 20. Aspecto das folhas de soja tratadas com *Trichoderma* (A), *Trichoderma* + *Fusarium* (B) e *Fusarium* (C e D) visualizadas em microscópio eletrônico de varredura. UNESP, Ilha Solteira- SP.



Fonte: própria autora

Ao encerrar o experimento de casa de vegetação, foi realizado o cultivo de fragmentos das plantas de soja com o intuito de comprovar a presença do patógeno em plantas sintomáticas. Como pode ser observado na Figura 21, foi recuperado o *Fusarium* a partir de raízes infectadas artificialmente.

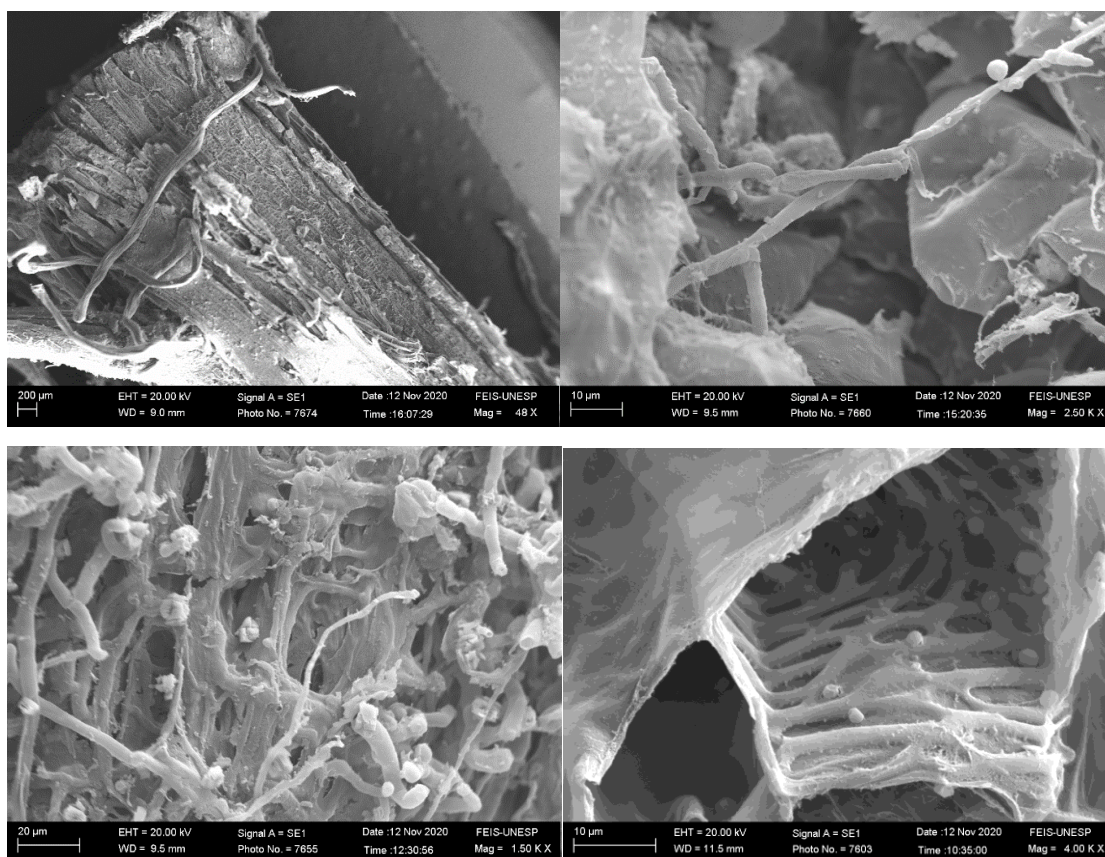
Figura 21. Caracterização morfológica de *Fusarium solani* f. sp. *glycines* presente nas raízes da soja, visualizadas em microscópio eletrônico de varredura evidenciando as fiálides e formação de falsas cabeças. UNESP, Iha Solteira – SP.



Fonte: própria autora

Para verificar a competência endofítica de *Trichoderma atroviride* em raízes e folhas de soja, foram preparados cortes do tecido da planta inoculada com *Trichoderma* e analisados em MEV. Como pode ser observado na figura 22, o *Trichoderma* foi capaz de estabelecer relação endofítica com a planta de soja, sendo resgatado nas raízes (tanto interna quanto externamente) e no tecido foliar, tanto em plantas inoculadas apenas com *Trichoderma* quanto nas que receberam o antagonista e o patógeno.

Figura 22. Hifas de *T. atroviride* em tecido radicular de soja (a). Hifas e esporos de *Trichoderma atroviride* em vasos lenhosos de pecíolo de soja. UNESP, Ilha Solteira- SP.



Fonte: própria autora

4.4 Discussão

O experimento in vitro revelou o potencial dos isolados de *Trichoderma* em controlar *Fusarium solani* f. sp. glycines. Dois isolados receberam nota máxima (1) pela escala de notas de Bell *et al.* (1982). Contudo, optou-se por prosseguir os demais testes a campo e casa de vegetação com o isolado TQ. A nota 1, nesta escala, é atribuída quando o antagonista ocupa a totalidade da placa. Isto indica que estes isolados têm boa capacidade de competição.

Outro fator importante é sua ação fungistática através da produção de metabólitos, voláteis ou não, e a produção de enzimas capazes de degradar a parede celular dos patógenos (GÓMEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2018). Desta forma, o isolado que apresentou a maior taxa de inibição ao patógeno foi o TF, indicando a liberação de

metabólitos capazes de diminuir a velocidade de crescimento micelial tendo sua ação fungistática comprovada.

Deve ser ressaltado que *Fusarium* também é capaz de produzir substâncias fungistáticas que podem inibir o crescimento de outros fungos ou mesmo impedir ou diminuir a taxa de germinação de esporos destes. Estudos demonstram que eles agem competindo por locais de infecção e por nutrientes, e ainda por indução de resistência (MANDEEL; BAKER, 1991; SILVA; BETTIOL, 2005).

O secretoma de *Trichoderma* foi estudado por diversos autores, uma das substâncias secretadas que afeta diretamente a capacidade de inibição de fitopatógenos são os compostos voláteis (VOCs). Como o próprio nome diz, são voláteis, portanto, em caso de experimento em placas, ele atua sobre a inibição do crescimento micelial do patógeno, mesmo antes do encontro das hifas (GARNICA-VERGARA *et al.* 2016; ESPARZA-REYNOSO; PELAGIO-FLORES; LÓPEZ-BUCIO, 2023), antibióticos (VINALE *et al.*, 2008) e sideróforos (VINALE *et al.*, 2013). Estes são capazes de quelar o Fe, limitando o desenvolvimento do patógeno e, em contrapartida, facilitam a absorção deste elemento pelas plantas, de forma que atuam na promoção de crescimento vegetal. Ferreira *et al.* (2022) estudando a capacidade de inibição *in vitro* de *Fusarium* por *Bacillus*, constatou que este microrganismo reduziu o crescimento micelial e a germinação de conídios de *F. verticillioides* em 62,1% e 57,5%, respectivamente, e atribuiu o controle à produção de metabólitos pelo biocontrolador.

Visconti, Bettiol e Morandi (2010) atribuíram a eficiência do biocontrole à ação dos microrganismos sobre a produção de sideróforos, metabólitos voláteis e/ou pelo mecanismo de antibiose, os quais afetaram a germinação de conídios dos fungos estudados, dentre eles, o *Fusarium*.

Em nosso estudo, o *Trichoderma* foi capaz de diminuir o ritmo de crescimento de *Fusarium*, mesmo antes do encontro das hifas, demonstrando que além da ação de competição por espaço e nutrientes, liberou metabólitos de ação fungistática. Na figura 4, pode ser observada outra estratégia de ação para o biocontrole, que é o enrolamento da hifa de *Trichoderma* sobre a hifa do fungo oponente, podendo haver o estrangulamento da hifa aprisionada e sua degradação. Também pode ser observada a formação de uma barreira densa em micélio e em seguida uma área sem crescimento (antibiose). Na fotomicrografia, figura 4c, pode-se observar um conídio

de *Fusarium* sendo capturado pela hifa de *T.atroviride*, que além de secretar substâncias que podem inibir a germinação de esporos, estes podem ainda predá-los.

Como foi dito, o gênero *Fusarium* também possui habilidades de defesa bastante eficientes, secretando metabólitos que, muitas vezes, paralisam o ataque de *Trichoderma* ou mesmo degradam as hifas do antagonista como descrito por Moreno-Ruiz *et al.* (2021). Desta forma, boa parte da capacidade de *T.atroviride* ser efetivo no biocontrole está na sua própria defesa. Substâncias, como as hidrofobinas, servem tanto para a adesão às raízes e às hifas de fungos oponentes quanto como uma barreira que impede a ação de metabólitos dos fungos desafiadores em degradar sua hifa (ESPARZA-REYNOSO; PELAGIO-FLORES; LÓPEZ-BUCIO, 2023; GUZMÁN-GUZMÁN *et al.*, 2017).

A percepção de raízes de plantas e/ou fungos fitopatogênicos é de extrema importância para o sucesso do biocontrole. A habilidade em perceber a presença do fungo presa se deve ao quimiotropismo como descrito por Moreno-Ruiz *et al.* (2020) Quando o *Trichoderma* percebe a presença da presa, resulta em alterações transcricionais, incluindo o aumento da expressão de enzimas de degradação da parede celular, e intensifica a liberação de compostos da parede celular do patógeno que funcionam como quimioatraentes para guiar o micoparasita até sua presa. Pode intensificar a velocidade de crescimento em direção ao oponente. Neste momento, também são secretadas proteases que têm a ação de inativar o ataque do patógeno.

Em nosso estudo, percebemos a capacidade de atração das hifas de *Trichoderma* por hifas e macroconídios de *Fusarium*, como pode ser observado na figura 4. Após o encontro entre as hifas, o *Trichoderma* se adere à hifa do patógeno. Esta ação é mediada por hidrofobinas que têm o papel de aderência e, ao mesmo tempo, proteção da integridade da própria hifa. Em sequência, inicia-se o enrolamento das hifas e a secreção de enzimas líticas como quitinases e a emissão de estruturas semelhantes a apressórios que promoverão o ataque sobre o patógeno.

A produção dos metabólitos secundários varia entre as espécies de *Trichoderma* e incluem compostos como pironas, terpenoides, esteroides, gliotoxinas, glivirinas, e “peptaibols” como os peptídeos antibióticos (SHI *et al.* 2012; BENÍTEZ *et al.* 2004).

É vasta a quantidade de substâncias que podem ser secretadas (desde substâncias antibióticas como o 6PP, sideróforos, enzimas líticas e hormônios) por

Trichoderma spp.. Na figura 3, podem ser visualizadas várias gotículas verdes sobre o micélio. Estas são gotículas de metabólitos secundários secretados por *T. atroviride*.

Dentre as substâncias que tornam o *Trichoderma* competente para estabelecer relação endofítica com a planta estão proteínas especiais, chamadas de hidrofobinas. Estas substâncias têm papel importante na aderência e fixação da hifa de *Trichoderma* à raiz da planta (ABDELKHALEK *et al.*, 2022; RODRIGUES; MAY; MIO; SOCCOL, 2023).

Embora os isolados utilizados no presente estudo tenham sido considerados da mesma espécie pela caracterização molecular, o comportamento destes divergiu quanto as estratégias de controle do *Fusarium solani*. O isolado TF apresentou rápido crescimento, não diferindo do TQ. Contudo, ao se encontrarem, as colônias do antagonista e patógeno promoveram a formação de uma linha densa que funcionou como uma barreira impedindo o avanço do TQ sobre sua colônia. Mesmo após a produção de esporos do *Trichoderma*, a colônia já estabelecida do *Fusarium*, não diminuiu de tamanho após 15 dias de cultivo.

Os isolados TQ e TC obtiveram bom IVCM, sendo o TC um pouco mais lento, diferindo estatisticamente dos demais. Todavia, no terceiro dia, já havia encontrado e avançado sobre a colônia de *Fusarium*. Assim, os isolados de *Trichoderma* podem ser considerados hiperparasitas e produtores de enzimas hidrolíticas, em especial, as proteases, quitinases e celulasas (ZHANG *et al.*, 2015; VINALE *et al.*, 2008).

A produção de enzimas por *Trichoderma* tem sido amplamente estudada, algumas delas têm grande potencial de aplicação industrial, como na produção de álcool de 2ª geração (RIBEIRO, 2010).

Nas imagens de microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varredura, evidenciaram-se algumas das estratégias de micoparasitismo do *Trichoderma* sobre *Fusarium*, como a secreção de metabólitos secundários, tais quais, as hidrofobinas, quimiotropismo, enovelamento de hifas e emissão de apressórios (Figuras 3, 4 e 22).

Ao final do experimento, notou-se que as plantas de soja inoculadas com *Trichoderma* apresentaram folhas mais verdes; fato este comprovado pelos teores de clorofila encontrados, maior estatura, maior massa de raiz e parte aérea, teores de açúcares e compostos nitrogenados elevados. Pode-se dizer que plantas inoculadas com *Trichoderma* apresentaram melhor estado nutricional e fisiológico, portanto, saudáveis.

Shaw *et al.* (2016) investigaram a reprogramação transcricional em uma cepa de *T. hamatum* durante seu antagonismo com o patógeno de solo *S. sclerotiorum* e verificaram que o biocontrole *T. hamatum* sobre *S. sclerotiorum* não apenas anulou a patogênese pós-emergência da alface, mas, também, aumentou ainda mais a promoção do crescimento da alface em comparação aos tratamentos que receberam apenas *Trichoderma*. A presença do patógeno estimulou a tripartite onde a composição química dos exudatos das plantas com e sem *Trichoderma* são diferenciadas, de forma que a planta fornece ao *Trichoderma* sacarose e outros compostos que favorecem sua atuação no biocontrole e a produção de metabólitos que melhoram a eficiência do uso de nutrientes e promovem o crescimento.

Desta maneira, entende-se que o secretoma de *Trichoderma* se molda em função de estímulos externos, como quando é desafiado por fitopatógenos (STUDHOLME *et al.*, 2013). Em nosso estudo, a promoção de crescimento foi estimulada em plantas com e sem o patógeno, sobressaindo seus efeitos nas plantas sem o patógeno.

As plantas inoculadas com antagonista e patógeno obtiveram valores próximos à normalidade, sendo superiores aos apresentados por plantas inoculadas apenas com patógeno; já as plantas que receberam apenas *Fusarium* começaram a apresentar os sintomas da doença, assim que entraram no estágio reprodutivo, apresentando os menores teores de pigmentos fotossintéticos, açúcares, compostos nitrogenados e nutrientes, além da exibição de clorose e desidratação, como pode ser observado nas figuras 11, 12, 13, 14, 15 e 16.

No experimento em casa de vegetação, 15 dias após a inoculação dos microrganismos, foram coletadas folhas para realização dos ensaios bioquímicos. Nesta etapa, foi possível observar a diferença visual entre os tratamentos referentes à tonalidade das folhas e à altura das plantas. De acordo com Peltier e Thibault (1983), em tecidos fotossintetizantes, o amônio pode desacoplar o transporte de elétrons da fotofosforilação e isto justificaria a redução nas taxas de fotossíntese líquida em plantas. Na análise foliar, o nosso tratamento F apresentou valores elevados de amônio.

As variações dos teores de clorofila, em função dos tratamentos propostos, podem ser justificadas por estarem iniciando a manifestação dos sintomas como clorose e manchas necróticas internervais no limbo foliar das plantas de soja

infectadas por *Fusarium solani* (Figura 5, 13 e 14). Devido à fragilidade do sistema radicular destas plantas, pressupõe-se que a absorção de água e nutrientes foi prejudicada.

A Síndrome da morte súbita da soja (SDS) possui como características a modificação e o comprometimento da arquitetura da raiz, diminuindo a capacidade de absorção de água e nutrientes. Em contrapartida, plantas tratadas com *Trichoderma* apresentaram maior volume de raízes, bem como o aumento da eficiência do uso de nutrientes pelas plantas (NUE).

O *T. atroviride* tem demonstrado atuar como bioestimulante de plantas devido à sua capacidade de estimular NUE e, conseqüentemente, aumentar o vigor e a tolerância das plantas a estresses abióticos, o que pode ser observado nas figuras 12 e 13, (MACÍAS-RODRÍGUEZ *et al.* 2018; CARILLO *et al.*, 2020).

Tanto no primeiro quanto segundo experimento, as plantas de soja que receberam *Trichoderma* apresentaram notoriamente coloração mais verde, mais robustas e com o sistema radicular bem desenvolvido. Desta forma, além do controle do patógeno, observa-se a atuação como promotor de crescimento, onde a interação *Trichoderma* soja promoveu aumento da área de superfície e da extensão da raiz no ambiente do solo, melhorando a assimilação de nutrientes de forma semelhante aos fungos micorrízicos. Segundo Azarmi, Hajieghrari e Giglou (2011), são capazes de remodelar a expressão gênica e os processos metabólicos nas raízes e brotos das plantas, podendo aumentar diretamente a absorção de elementos (Ca, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn) nas raízes, sendo estes metabólitos responsáveis pela estimulação direta do crescimento e desenvolvimento radicular e, por consequência, da parte aérea.

O decréscimo dos teores de clorofilas, carotenoides e o aumento dos teores de feofitinas (clorofila oxidada) em plantas do tratamento F, em relação ao tratamento controle (T), caracterizam a condição de estresse das plantas, que, conseqüentemente, resultou na exibição dos sintomas de amarelecimento e murcha, devido ao comprometimento do sistema radicular, seguida das alterações epidérmicas, observadas nas fotomicrografias obtidas em MEV (Figura 20).

As análises das concentrações de pigmentos fotossintéticos, no tratamento que recebeu patógeno e antagonista (T+F), revelaram ainda que o *Trichoderma* restabeleceu os teores de pigmentos das plantas de soja aos de plantas saudáveis. Este fato foi observado por outros autores onde muitas vezes o tratamento que recebeu

ambos (patógeno e antagonista) não expressaram sintomas e mantiveram todos os valores iguais ou melhores ao controle (não infectado).

Os teores de carotenoides e feofitinas a, b e total foram reestabelecidos a valores próximos do tratamento controle (T). Zhang *et al.* (2017) constataram maior teor de clorofila total em plantas de soja inoculadas com *Trichoderma harzianum*, quando comparadas ao tratamento controle (sem inoculação) de plantas infectadas com *Fusarium oxysporum*. Os autores atribuíram tal resultado à diminuição do estresse oxidativo, induzido por *Trichoderma harzianum* e a promoção do crescimento da soja, que foi maior quando comparado às plantas sem inoculação e não infectadas pelo patógeno, assim como observado no presente estudo.

Os resultados obtidos apontaram teores de clorofila total na ordem de 7,30 e 5,20 mg g⁻¹ para os respectivos tratamentos. John *et al.* (2010) constataram que plantas inoculadas com os patógenos *Fusarium* e *Pythium*, quando inoculadas com *Trichoderma* tinham os valores das análises bioquímicas superiores aos encontrados para as plantas sadias, porém não inoculadas (tratamento controle), corroborando com nosso estudo. Os valores encontrados por John *et al.* (2010) para clorofila e carotenos seguem o padrão encontrado em nosso estudo, onde a testemunha apresentou teores de 10,82 mg/g DW para clorofila e 4,0 mg/g DW, *Trichoderma* 13,84 - 5,00, *Fusarium* 11,45 - 3,67, *Pythium* 7,59 - 2,69, T+F (*Trichoderma* + *Fusarium*) 11,98 - 4,02 e T+P *Trichoderma* + *Pythium* 10,98 - 3,97 mg/g DW, respectivamente.

Borgognone *et al.* (2013) observaram, em seus estudos, que a toxidade do amônio está associada à taxas reduzidas de fotossíntese líquida. Este fato foi comprovado em nosso estudo, no qual o tratamento F apresentou menores taxas de clorofilas e, conseqüentemente, menor quantidade de fotoassimilados, maior acúmulo de amônio e menor crescimento vegetal.

Carillo *et al.* (2020) relatam que o uso de *Trichoderma* e/ou seus metabólitos confere proteção contra fatores bióticos e melhora a qualidade dos frutos, aumentando o teor de licopeno, um importante composto antioxidante em tomates. O teor deste antioxidante aumentou significativamente após o tratamento com *Trichoderma* (+49%), em comparação com o controle. Além de aumentaram significativamente o conteúdo de asparagina (+37%), GABA (+87%) e MEA (+102%) sobre o controle. Os autores afirmam, ainda, que a síntese desses compostos fez com que as plantas de tomate fossem capazes de reutilizar os aminoácidos fotorrespiratórios e amônio para

produzir metabólitos úteis e reduzir a pressão da fotorrespiração no metabolismo da planta, otimizando assim a fotossíntese e o crescimento.

As vantagens da aplicação de *Trichoderma* não se restringiram ao aumento de produtividade e diminuição do estresse da planta. Esses metabólitos aumentaram o valor nutricional do tomate, visto que o licopeno possui propriedades benéficas à saúde humana. De fato, qualquer fator prejudicial à produção de pigmentos fotossintéticos levará à diminuição dos teores de carboidratos na planta. Os carboidratos são o repositório principal da energia fotossintética, compreendem os polissacarídeos, como, por exemplo, a lignina e celulose, que são compostos estruturais importantes para as plantas (EL-GHAMRY *et al.*, 2009).

Para tanto, observou-se, em nosso estudo, uma tendência do teor de clorofila total e carotenoides serem maiores em plantas inoculadas com *Trichoderma atroviride*, mesmo naquelas infectadas por *Fusarium solani* (T+F), aumentando a concentração total de açúcares solúveis quando comparadas ao tratamento F. Isso ocorreu, possivelmente, pela indução de resistência à podridão vermelha das raízes ou como também é chamada, síndrome da morte súbita da soja. Morkunas *et al.* (2005) e Morkunas *et al.* (2011) relataram, em seus estudos, que genes que codificam enzimas da via fenil-propanoide podem ser induzidos por carboidratos solúveis, tais como glicose e sacarose, que, neste caso, foram consideradas moléculas sinalizadoras.

O metabolismo fenil-propanoide gera uma enorme variedade de metabólitos secundários, com base nos poucos intermediários da via shikimato como unidade central, compostos como alcaloides, ligninas e suberinas, que são produzidos e metabolizados para o mecanismo de defesa, tendo como precursores, os açúcares solúveis.

Dentre os metabólitos produzidos por *Trichoderma atroviride* temos o 6PP (6-pentil- α -pirona) que confere aroma de coco à cultura. Nosso isolado apresenta este odor característico. O 6-PP é uma lactona insaturada com uma massa molecular de 166 Da, caracterizada pela primeira vez por Collins e Halim (1972) e identificada como um dos principais compostos bioativos de várias espécies de *Trichoderma*, dentre elas o *T. atroviride* (STRACQUADANIO *et al.*, 2020; RAMOS; FIAUX; LEITE, 2008; GARNICA-VERGARA *et al.*, 2016; DEGANI *et al.*, 2021).

Salwan e Sharma (2019) apontam forte correlação entre as espécies produtoras de 6pp e sua efetividade no biocontrole, visto que este metabólito exibe múltiplas ações, como inibição do crescimento do micélio, germinação de esporos e pigmentação de fungos fitopatogênicos (SALWAN; RIALCH; SHARMA, 2019). Este metabólito também reduz a produção da micotoxina desoxinivalenol por *Fusarium graminearum* e ácido fusárico por *Fusarium moniliform* (DEGANI *et al.*, 2021).

A atividade antibiótica *in vitro* dos metabólitos secundários produzidos pelas cepas de *Trichoderma atroviride* foi estudada por Vinale *et al.* (2008). Segundo os autores, o 6PP isolado do *T. atroviride* não apresentou atividade antibiótica específica, pois inibiu completamente o crescimento dos patógenos teste, quando aplicado na concentração de 100 mg L⁻¹.

O estudo do efeito dos metabólitos secundários de *Trichoderma*, na severidade de doenças de plantas, com aplicação do fungo antagonista em conjunto ou de forma isolada, 3 h antes da inoculação do patógeno com 6pp impediu o crescimento fúngico em até 100%. As plantas que receberam doses de 6pp mostraram-se mais vigorosas, melhor nutridas, com maior estatura, promovendo também maior massa de raiz. Os autores concluíram que 6pp age como uma auxina e/ou estimula a planta a sintetizá-la. Além disso, os experimentos realizados por Vinale (2008) e em nossos laboratórios, mostraram que as plantas tratadas com 6PP (Vinale *et al.* 2008) ou com *Trichoderma atroviride* (PERES, 2022; FIORENTINO *et al.*, 2018; MARRA *et al.*, 2019) eram muito mais desenvolvidas e vigorosas do que as testemunhas, como ocorreu em nosso estudo (Figura 12).

Os resultados relatados por Vinale (2008) indicaram claramente que alguns metabólitos secundários de *Trichoderma* estão diretamente envolvidos nas interações Trichoderma-planta, e, particularmente, que o composto 6PP pode ser considerado como um composto semelhante à auxina e/ou pode atuar como um indutor de auxina.

Hermosa *et al.* (2013) descrevem que, no processo de interação planta-Trichoderma, o *T. atroviride* acumula proteínas cerato-plataninas Epl1 em suas hifas, durante a colonização das raízes e estas atuam como indutores de resistência (ISR), pela via do ácido jasmônico.

A identificação de novos efetores moleculares pode apoiar a aplicação de novos biopesticidas e biofertilizantes, baseados em metabólitos de *Trichoderma*, para serem usados no lugar dos microrganismos vivos como elicitores de mecanismos de

defesa e estimulantes de crescimento de plantas. Os teores de ureídeos em plantas inoculadas com *Trichoderma atroviride*, T e T+F, foram maiores em comparação às aquelas infectadas por *Fusarium solani* (F). Este aumento se deu exclusivamente pela produção de alantoína, uma vez que a concentração de ácido alantóico não diferiu estatisticamente entre os tratamentos propostos.

Estes resultados são justificados pela alantoína ser o primeiro composto nitrogenado formado para o transporte de N em plantas leguminosas (COLLIER; TEGEDER, 2012). A alantoína é sintetizada nos peroxissomos a partir do ácido úrico, enquanto o ácido alantóico, no retículo endoplasmático, a partir da alantoína. Estes compostos são liberados no xilema e transportados para a parte aérea das plantas, onde são rapidamente catabolizados a amônio (N-NH_4). Este mecanismo das plantas leguminosas tropicais, como soja e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), tem por finalidade evitar a toxicidade do amônio antes de serem transportadas.

Segundo Krishnan *et al.* (2011), o teor relativo de ureídeo (alantoína e ácido alantóico) pode ser usado como um indicador confiável da qualidade de fixação biológica do nitrogênio na soja. Pelos resultados obtidos, pressupõe-se que a alantoína seja o composto mais afetado, dentre as formas de ureídeos nessa cultura, em condições de estresse planta-patógeno.

Constatou-se que a absorção de NO_3 em plantas do tratamento F, infectadas por *Fusarium solani*, foi prejudicada. Seus teores foram menores aos obtidos em plantas do tratamento controle (T), no qual observou-se a integridade de raízes, com efeito direto no mecanismo de absorção de íons. As plantas de soja podem absorver o nitrogênio do solo na forma catiônica de amônio (NH_4) ou como ânion nitrato (NO_3), ou até mesmo utilizar o N atmosférico (N_2), através da fixação biológica por *Bradyrhizobium japonicum*.

Essas fontes de N, provenientes do solo, são assimiladas em aminoácidos, via enzima nitrato redutase e nitrito redutase. A atividade destas enzimas está correlacionada ao fornecimento de NO_3 à planta (HUNTER, 1983). Embora os microrganismos nas raízes da soja sejam ativos na fixação do nitrogênio, eles são afetados severamente pela acidez e toxicidade de Al no solo, ou por patógenos radiculares.

Os teores de NH_4 , em plantas dos tratamentos *Trichoderma*, *Trichoderma* + *Fusarium* e *Fusarium*, não seguiram o mesmo padrão de acúmulo, como observado

para NO_3 . Pressupõe-se, pelos resultados obtidos, que plantas do tratamento F não apresentaram incorporação de íons NH_4 em moléculas orgânicas. Isso se deu pelos tratamentos T+F e T, os quais apresentaram baixos teores de NH_4 quando comparados ao tratamento F. Tal fato pode ser justificado por uma desordem fisiológica. Valores elevados de amônio são indesejados, uma vez que se torna tóxico para a planta, por isso são convertidos rapidamente em outras formas de N menos tóxicas. A soja e outras leguminosas têm nos ureídeos uma forma de transporte mais eficaz para o N, resultante da fixação biológica nas raízes.

Deve-se ressaltar que a toxicidez por excesso de NH_4 pode causar alterações no pH intracelular, no equilíbrio osmótico, no metabolismo de fitormônios, que por si só, já fazem com que a planta exiba parte dos sintomas observados em nosso estudo. O excesso de íons amônio, induz a deficiência de nutrientes minerais, seja pela redução do sistema radicular ou pela inibição da absorção de cátions (K^+ , Mg^{2+} ou Ca^{2+}) e consequentes alterações no balanço iônico da planta (ESTEBAN *et al.*, 2016; GERENDÁS *et al.*, 1997).

Na presente pesquisa, constatou-se que de fato houve menor assimilação do K nas plantas de soja que receberam *Fusarium*. Este também foi o tratamento com maior concentração de amônio, elemento que se torna tóxico em altas concentrações nos tecidos vegetais (normalmente é convertido em formas menos tóxicas de N), além de ativar o gatilho das espécies reativas de oxigênio (ROS), pois ocorre elevação dos teores de O_2 e H_2O_2 , induzindo a peroxidação lipídica e queda dos teores das clorofilas e de carotenoides (WANG *et al.* 2010), menores taxas fotossintéticas (SHENGQI *et al.*, 2012; BORGOGNONE *et al.*, 2013), ocasionando diminuição do crescimento, clorose e necrose foliar, coloração marrom do sistema radicular e do caule (ESTEBAN *et al.*, 2016; WONG, 2005).

Os sintomas descritos por Esteban *et al.* (2016) coincidem com os encontrados em nossos experimentos onde os tratamentos com o patógeno apresentaram alta concentração de amônio nas folhas e menores teores de pigmentos fotossintetizantes e carotenoides, coloração marrom no sistema radicular, além de clorose nas folhas e tamanho reduzido, quando comparado aos tratamentos que receberam *Trichoderma atroviride*, demonstrando a capacidade deste em atuar na redução dos sintomas melhorando a tolerância ao amônio.

Há relatos da ação de *Trichoderma* como um atenuador do estresse oxidativo em plantas (GULER *et al.*, 2016), sendo capaz de melhorar a tolerância a diversos tipos de estresses bióticos (BRUNNER *et al.*, 2003; SALAS-MARINA *et al.*, 2011) e abióticos como estresse hídrico (MASTOURI; BJÖRKMAN; HARMAN, 2012), salino (BROTMAN *et al.*, 2013), a elementos tóxicos como metais pesados (ZAFAR, AQIL e AHMAD, 2007; CHANG *et al.*, 2016) e/ou amônio que causariam desordem metabólica comprometendo o desenvolvimento das plantas.

Plantas acometidas por fungos fitopatogênicos naturais do solo, geralmente, apresentam algum tipo de desordem nutricional. Tal afirmação comprova as deficiências nutricionais obtidas em plantas de soja infectadas por *Fusarium solani* (F). Os teores foliares de N, P, K, S e Cu estiveram abaixo das respectivas faixas de suficiência, bem como em relação aos tratamentos com *Trichoderma* sp.. Sabe-se da importância das adubações de K e P para o cultivo da soja em solos brasileiros. A deficiência destes nutrientes está associada à regulação osmótica das plantas, tem efeito direto nas trocas gasosas e integridade celular, e também contribui como agente estrutural de moléculas e membranas, bem como, possui potencial redox em processos metabólicos. Os resultados das concentrações foliares de K e P podem justificar as variações da taxa de pigmentos fotossintetizantes e carboidratos no tratamento proposto, na qual foi constatada clorose internerval nas folhas do tratamento F.

Segundo StClair e Lynch (2005), plantas submetidas ao estresse patogênico severo podem apresentar competição ou inibição na absorção de íons como Mg, Ca, K e Fe. Contudo, os tratamentos propostos não foram preponderantes frente aos acúmulos foliares de Ca, Mg, B, Fe, Mn e Zn (Figuras 17 e 18). Apenas para os teores de Cu, observou-se que plantas submetidas ao estresse patogênico apresentaram competição no acúmulo deste nutriente. Kothari *et al.* (1990) verificaram o efeito de micorrizas vesicular-arbusculares sobre a absorção de micronutrientes por *Zea mays* L. e, constatou teores mais altos de Cu nas plantas em decorrência do transporte pelas hifas, teores mais baixos de Mn em decorrência da diminuição da redução microbiana e teores mais baixos de Fe e B em decorrência da inibição do crescimento radicular (menos raízes laterais).

Zambolim, Ventura, e Zanão-Jr (2012) descrevem o papel do cobre no metabolismo vegetal, principalmente quando acometido por patógenos. O Cu é

componente ou ativador de enzimas de oxirredução em processos como fotossíntese, respiração e desintoxicação de radicais superóxido e de produção de lignina. Plantas deficientes em Cu podem apresentar menor produção de lignina, ficando, portanto, mais vulneráveis ao desenvolvimento de doenças. Já foi demonstrado a competência rizosférica de *T. atroviride* e assim como citado para as micorrizas, podem colonizar as raízes, envolvendo-as externamente e/ou como endofítico, como o demonstrado por diversos autores (BENÍTEZ *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2017; BEZERRA *et al.*, 2022; BEZERRA *et al.*, 2019; POMELLA; RIBEIRO, 2009).

Benitez *et al.* (2004) classificam a interação entre *Trichoderma* spp. e planta como de simbiose, a qual se dá pela colonização da superfície externa das raízes, estendendo-se pelo rizoplane e com capacidade de penetração na epiderme radicular. A figura 22 demonstra a colonização dos tecidos de soja por *T atroviride*.

A redução na massa de raiz, somada aos danos celulares causados a estas, deixam as plantas mais vulneráveis ao estresse hídrico, por exemplo, e diminuiu a eficiência de absorção de nutrientes, podendo comprometer a nodulação e a fixação biológica de nitrogênio. As alterações se iniciam nas taxas fotossintéticas e, por consequência, vão afetando todos os outros parâmetros bioquímicos que resultarão em plantas menos desenvolvidas (figura 15, a e b) e com nutrição comprometida devido à baixa eficiência na absorção radicular de forma geral.

Apesar de não ter apresentado diferença entre os tratamentos quanto ao comprimento da raiz, é relatado que *T. atroviride* e outras espécies de *Trichoderma* modulam a arquitetura radicular, com aumento de raízes laterais, ampliando a eficiência na absorção de água e nutrientes.

Diversos autores atribuem ao *T. atroviride*, a capacidade de promoção de crescimento, principalmente, por melhorar a absorção e a eficácia no uso de nutrientes (NUE), aumentando o vigor e diminuindo estresses abióticos (CARILLO *et al.*, 2020; FIORENTINO *et al.*, 2018; SALWAN; RIALCH; SHARMA, 2019).

Assim como em nosso estudo, Salwan, Rialch, and Sharma (2019) observaram aumento da biomassa, da parte aérea, da raiz, da produção de raízes laterais e do teor de clorofila, o que sugere, fortemente, que a produção de voláteis pelo fungo influenciou os parâmetros analisados. Cepas de *Trichoderma* *T. virens* Gv29.8, *T. atroviride* IMI206040, *T. atroviride* LU132 e *T. asperellum* LU1370, demonstraram promover o crescimento da planta através da produção de voláteis.

Plantas inoculadas com *Trichoderma* na ausência de patógeno apresentaram maior massa seca de raízes (figura 10), sendo que o volume de raízes neste tratamento era visivelmente superior. Além disso, alguns isolados podem apresentar produção de substâncias de interesse vegetal, como fitormônios (VINALE *et al.*, 2008) e solubilizadores minerais (BONONI *et al.*, 2020), que contribuem no seu desenvolvimento, justificando o melhor estado nutricional (FIORENTINO *et al.*, 2018) e seu desempenho superior frente aos demais tratamentos.

Nossas cepas de *Trichoderma atroviride* demonstraram, em ensaios de laboratório, atividade celulolítica, quitinolítica, capacidade de produção de sideróforos, disponibilização de fósforo, produção de hormônios AIA e indução de fitoalexinas.

Carillo *et al.* (2020) relatam que *Trichoderma atroviride* têm demonstrado atuar como bioestimulante de plantas, atribuídos à sua melhora na absorção de elementos como Ca, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn nas raízes. Os metabólitos secretados também são responsáveis pela estimulação direta do crescimento e desenvolvimento radicular, aumentando, assim, a área de superfície e a extensão da raiz no ambiente do solo, o que melhora a NUE, usando mecanismos semelhantes aos de outros microrganismos benéficos, como fungos micorrízicos e rizobactérias promotoras do crescimento de plantas.

Fiorentino *et al.* (2018) constataram que plantas cultivadas em doses subótimas de nutrientes, em especial o N, quando inoculadas com *Trichoderma*, apresentavam melhora na eficiência do uso do nitrogênio, indicando inclusive que o uso de *Trichoderma* melhorou o valor nutricional do alface enquanto que Carillo *et al.* (2020) observou o mesmo comportamento para a cultura do tomate, onde frutos de plantas que receberam *Trichoderma* apresentaram melhor valor nutricional. Peres (2022) relata melhora na qualidade fisiológica e nutricional em sementes de feijão, principalmente, com relação ao teor de proteínas. Em nosso estudo, a análise nutricional das folhas de soja indicaram aumento na assimilação de N, P, K, S e Cu nas plantas tratadas com *Trichoderma*, demonstrando que no uso de microrganismos promotores de crescimento, pode não só melhorar a absorção e uso destes elementos, como enriquecer os alimentos em termos de nutricionais.

Marra *et al.* (2019) foram os primeiros a relatar o aumento da qualidade dos grãos de soja, sob influência de *Trichoderma*, quanto ao teor de lipídeos em sementes colhidas. Este fator é altamente desejável quando se tratam de sementes de

oleaginosas como a soja. Em seus estudos com *T. harzianum* e/ou seus metabólitos, observaram ganhos de rendimento de até 39%, bem como um aumento no conteúdo mineral da soja, além de ter elevado o teor de ácidos graxos (oleico, linolênico, 11-eicosenoico e esteárico).

A utilização de *Trichoderma*, como promotor de crescimento de plantas, pode ser uma excelente estratégia, uma vez que ele tem a capacidade de auxiliar e potencializar a absorção de macro e micronutrientes, influenciando diretamente na produtividade e nos teores nutricionais das plantas. Por isso, sugerimos estudos, não só quanto ao aumento na produtividade das culturas, mas também com relação ao valor nutricional do produto gerado (grãos, frutos ou folhas). Bem como, acreditamos que o uso de *Trichoderma* na agricultura possa ser uma solução verde que contribuirá com a redução de uso de agroquímicos, como os fertilizantes e defensivos agrícolas, visto sua múltipla aptidão.

4.5. Conclusões

O presente estudo demonstra a eficiência de *Trichoderma* como agente de biocontrole contra *Fusarium solani*, causador da síndrome da morte súbita da soja. Fato demonstrado no experimento de confronto direto em placas e confirmado em ensaio, em casa de vegetação, onde plantas inoculadas com *Trichoderma* e o patógeno não exibiram os sintomas da doença.

Plantas inoculadas com *Trichoderma* apresentam melhor estado nutricional, maior comprimento de parte aérea e maior massa de raízes.

Ainda, é possível verificar a promoção do crescimento das plantas de soja, por meio dos parâmetros bioquímicos avaliados, principalmente, com relação aos teores de açúcares e pigmentos fotossintéticos, que resultarão em plantas maiores, indicando sua ação benéfica sobre o crescimento vegetal.

4.6. Agradecimentos

À Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT por ter proporcionado o afastamento para a qualificação a nível de doutorado;

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Ilha Solteira pelo acolhimento no Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

REFERÊNCIAS

- ABDELKHALEK, A., *et al.* Trichoderma hamatum Strain Th23 Promotes Tomato Growth and Induces Systemic Resistance against Tobacco Mosaic Virus. **Journal of Fungi**, Basel, v. 8, n. 3, p. 228, 2022.
- 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**, Oxford, v. 46, p. 162-83. 2005.
- AZARMI, R., *et al.* Effect of Trichoderma isolates on tomato seedling growth response and nutrient uptake. **African Journal of Biotechnology**, Sapele, v. 10, n. 31, p. 5850-5855, 2011.
- BELL, D. K. *et al.* Antagonismo in vitro de espécies de Trichoderma contra seis patógenos fúngicos de plantas. **Fitopatologia**, [s. l.], v. 72, n. 4, pág. 379-382, 1982.
- BENÍTEZ, T. *et al.* 2004. Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. **International microbiology**, Basel, v. 7, p. 249-60, 2004.
- BETTIOL, W. M. A. B. *et al.* **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 341 p.
- BEZERRA, G. de A. *et al.* Identificação e seleção de espécies de Trichoderma spp. endofíticos de bromélias de restingas como agentes de biocontrole da fusariose em frutos de abacaxi. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 45, p. 172-78, 2019.
- BEZERRA, M. C. L. *et al.* Redução de fungos e qualidade fisiológica de sementes de milho inoculadas com Trichoderma harzianum. **Nativa**, Cuiabá, v. 10, p. 69-73, 2022.
- BONONI, L. **Bioprospecção de Trichoderma spp. envolvidas na solubilização de fosfato e no controle biológico de Sclerotinia sclerotiorum em soja**. 2020. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020.
- BONONI, L. *et al.* Phosphorus-solubilizing Trichoderma spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. **Scientific Reports**, London, v. 10, p. 1-13, 2020.
- BORGOGNONE, D. *et al.* Effect of nitrogen form and nutrient solution pH on growth and mineral composition of self-grafted and grafted tomatoes. **Scientia horticulturae**, Amsterdam, v. 149, p. 61-69, 2013.
- BROTMAN, Y., *et al.* Trichoderma-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. **PLoS pathogens**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e1003221, 2013.

BRUNNER, K. *et al.* The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. **Current genetics**, New York, v. 43, p. 289-95, 2003.

CABRAL, N. M. T. Teores de nitrato (NO₃⁻) e amônio (NH₄⁺) nas águas do aquífero Barreiras nos bairros do Reduto, Nazaré e Umarizal-Belém/PA. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 1804-08, 2007.

CARILLO, P. *et al.* Application of *Trichoderma harzianum*, 6-Pentyl- α -pyrone and Plant Biopolymer Formulations Modulate Plant Metabolism and Fruit Quality of Plum Tomatoes. **In Plants**, [s. l.], v. 2, p. 1-15, 2020.

CHANG, F. *et al.* Discrepant hexavalent chromium tolerance and detoxification by two strains of *Trichoderma asperellum* with high homology. **Chemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 298, p. 75-81, 2016.

COLLIER, Ray; TEGEDER, Mechthild. Os transportadores de ureídeo de soja desempenham um papel crítico no desenvolvimento de nódulos, função e exportação de nitrogênio. **The Plant Journal**, Chichester, v. 72, n. 3, pág. 355-367, 2012.

COLLINS, R. P. e HALIM, A. F. 1972. Characterization of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma viride*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 20, p. 437-38, 1972.

CRUCIOL, G. C. D. *et al.* Influence of *Macrophomina phaseolina* inoculation methodologies on the performance of soybean cultivars. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 43, n. 4, p. 337-343, 2017.

DAVID, G. Q., *et al.* (2018). Rhizoctonia como fitopatógeno no agroecossistema brasileiro. *In*: LOPES, Ueder Pedro; MICHEREFF, Sami Jorge. **Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos**. Recife: EDUFRPE, 2018. p. 35-55.

DEGANI; DOR. *Trichoderma* Biological Control to Protect Sensitive Maize Hybrids against Late Wilt Disease in the Field. **Journal of Fungi**, Basel, v. 7, 2021.

DEGANI, O. *et al.* *Trichoderma asperellum* secreted 6-pentyl- α -pyrone to control magnaporthiopsis maydis, the Maize late wilt disease agent. **Biology**, Basel, v. 10, p. 897, 2021.

DRUMMOND, A. J.; HO, S. Y. W.; PHILLIPS, M. J.; RAMBAUT, A. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. **PLoS Biology**. San Francisco, v. 4, p. e88, 2006.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EL-GHAMRY, A. M. *et al.* Ghoneem. 2009. Amino and humic acids promote growth, yield and disease resistance of faba bean cultivated in clayey soil. **Aust. J. Basic & Appl. Sci.**, Jordan, v. 3, n. 2, p. 731-739, 2009.

EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de produção de soja**: região central do Brasil 2007. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. 225 p. (Sistemas de Produção, 11)

ESPARZA-REYNOSO *et al.* Role of volatile organic compounds in establishment of the trichoderma–plant interaction. *In*: SCOTT, Barry; MESARICH, Carl (ed.), **Plant Relationships: Fungal-Plant Interactions** (Springer International Publishing: Cham, 2023).

ESTEBAN, R., CRUZ, A.C., e MORAN, J. F. Mechanisms of ammonium toxicity and the quest for tolerance. **Plant Science**, Shannon, v. 248, p. 92-101, 2016.

FERREIRA, T. C., *et al.* Potencial de *Bacillus* spp. em promover o crescimento e controlar *Fusarium verticillioides* em milho. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 47, p. 195-203, 2022.

FIORENTINO, *et al.* Trichoderma-Based Biostimulants Modulate Rhizosphere Microbial Populations and Improve N Uptake Efficiency, Yield, and Nutritional Quality of Leafy Vegetables. **Front Plant Sci**, Lausanne, v. 9, 2018.

FREITAS, Tânia Márcia de Queiroz; MENEGHETTI, Rosana Ceolin; BALARDIN, Ricardo Silveiro. Dano devido à podridão vermelha da raiz na cultura da soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, p. 991-996, 2004.

GARNICA-VERGARA, A. *et al.* The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ethylene insensitive 2 functioning. **New Phytologist**, Chichester, v. 209, p. 1496-512, 2016.

GERENDÁS, J. *et al.* Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. **Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde**, [s. l.], v. 160, p. 239-51, 1997.

GIBSON, P.T *et al.* Soybean varietal response to sudden death syndrome. *In*: WILKINSON, D. (ed.). *In*: SOYBEAN SEED RESEARCH CONFERENCE, 24., 1994. **Proceedings** [...] Washigton, DC: American Seed Trade Association, 1994. p. 20-40.

GODOY, C. V. *et al.* Eficiência de fungicidas para o controle das doenças de final de ciclo da soja, na safra 2020/2021: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Embrapa, **Circular Técnica**, Brasília, DF, n. 176, 2021.

GÓMEZ-RODRÍGUEZ, E. Y. Histone acetyltransferase TGF-1 regulates *Trichoderma atroviride* secondary metabolism and mycoparasitism. **PLoS One**, San Francisco, v. 13, p. e0193872, 2018.

GULER, N. S. *et al.* *Trichoderma atroviride* ID20G inoculation ameliorates drought stress-induced damages by improving antioxidant defence in maize seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 38, p. 132, 2016.

GUZMÁN-GUZMÁN, P. *et al.* Identification of effector-like proteins in *Trichoderma* spp. and role of a hydrophobin in the plant-fungus interaction and mycoparasitism. **BMC genetics**, London, v. 18, p. 1-20, 2017.

HERMOSA, R., *et al.* The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. **Int. Microbiol**, Basel, v. 16, n. 2, p. 69-80, 2013.

JOHN, R. *et al.* Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. adzuki and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. **Crop protection**, Amsterdam, v. 29, p. 1452-59, 2010.

KOTHARI, S.C. *et al.* Effect of VA mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms on root and shoot morphology, growth and water relations in maize. **New Phytol**, Chichester, v. 116, p. 303-311, 1990.

KRISHNAN H.B. *et al.* Protein and metabolite composition of xylem sap from field-grown soybeans (*Glycine max*). **Planta**, Heidelberg, v. 233, p. 921-931, 2011.

LUO, Y. *et al.* Perda de produtividade da soja pela síndrome da morte súbita em relação à expressão dos sintomas e colonização radicular por *Fusarium solani* f. sp. glicinas. **Doença das plantas**, [s. l.], v. 84, n. 8, pág. 914-920, 2000.

LUO, Y. *et al.* Root colonization of soybean cultivars in the field by *Fusarium solani* f. sp. glycines. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n.12, p.1155-1159, 1999

MACÍAS-RODRÍGUEZ, L. *et al.* *Trichoderma atroviride* promotes tomato development and alters the root exudation of carbohydrates, which stimulates fungal growth and the biocontrol of the phytopathogen *Phytophthora cinnamomi* in a tripartite interaction system. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 94, n. 9, p. f137, 2018.

MANDEEL, Q. e BAKER, R. Mecanismos envolvidos no controle biológico da murcha de *Fusarium* do pepino com cepas de *Fusarium oxysporum* não patogênico. **Fitopatologia (EUA)**, v. 81(4) p. 462-469, 1991.

MARRA, R. *et al.* Application of *Trichoderma* Strains and Metabolites Enhances Soybean Productivity and Nutrient Content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 67, p. 1814-22, 2019.

MASTOURI, F; BJÖRKMAN, T. HARMAN, G. *Trichoderma harzianum* enhances antioxidant defense of tomato seedlings and resistance to water deficit. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 25, p. 1264-71, 2012.

MC CULLOUGH, H. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 17, p. 297-304, 1967

MENCK, V. ; COSSELLA, K. e OLIVEIRA, J. (2015). Resíduos de agrotóxicos no leite humano e seus impactos na saúde materno-infantil: resultados de estudos brasileiros. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 22, p. 608, 2015.

MORKUNAS, I. *et al.* Defesa de tremço induzida por sacarose contra *Fusarium oxysporum*: Acumulação de isoflavonoides estimulada por sacarose como uma resposta de defesa do tremço a *Fusarium oxysporum*. **Plant Physiol. Biochim**, v. 43, p. 363-373, 2005.

MORKUNAS, I *et al.* Cross-talk interactions of sucrose and *Fusarium oxysporum* in the phenylpropanoid pathway and the accumulation and localization of flavonoids in embryo axes of yellow lupine. **J Plant Physiol**, v. 168, p. 424–433, 2011.

MORENO-RUIZ, D., *et al.* Chemotropism Assays for Plant Symbiosis and Mycoparasitism Related Compound Screening in *Trichoderma atroviride*. **Front Microbiol**, v. 11, p. 601251, 2020.

MORENO-RUIZ, D. *et al.* Stress-Activated Protein Kinase Signalling Regulates Mycoparasitic Hyphal-Hyphal Interactions in *Trichoderma atroviride*. **Journal of Fungi**, Basel, v. 7, 2021.

MORILLO, E.; VILLAVARDE, J. Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 586, p. 576-597, 2017.

NAVI, S. S e YANG, X. B. Yang. Sudden death syndrome—a growing threat of losses in soybeans. **CAB Rev**, 11, 2016.

PELTIER, GILLES e THIBAUT, P. Ammonia exchange and photorespiration in *Chlamydomonas*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 71, p. 888-92, 1983.

PERES, W. M. **Uso de Trichoderma atroviride na cultura do feijoeiro**. 2022. 101 f. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista- UNESP, Ilha Solteira, 2022.

POMELLA, A. W. V. e RIBEIRO, R.T. S. Ribeiro. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas—uma visão empresarial, *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**: 239-44, 2009.

RAMOS, A. de S.; FIAUX, S. B. e LEITE, S. G. F. L. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 712-17, 2008.

RAIJ, B van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. (Ed.). Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. Campinas: Instituto Agrônomo, 1996. 285 p. (Boletim técnico, 100).

RIBEIRO, Josefa Angela Batista. **Hidrólise de resíduos lignocelulósicos utilizando Extrato enzimático celulolítico produzido por Trichoderma reesei ATCC 2768**. 2010. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

RODRIGUES, A. O., *et al.* Trichoderma as a powerful fungal disease control agent for a more sustainable and healthy agriculture: recent studies and molecular insights. **Planta**, v. 257 (2), p. 1-15, 2023.

ROY, K. W., D. E. Hershman, J. C. Rupe, and T. S. Abney. Sudden Death Syndrome of Soybean. **Plant Disease**, v. 81, p. 1100-11, 1997.

ROY, KW; LAWRENCE, GW; MCLEAN, KS Isolamento e identificação de Fusarium solani, causador da síndrome da morte súbita da soja. **Diagnóstico da planta Quart**, v. 10, p. 17-27, 1989.

RUPE, J. C.; GBUR, E. E. Effect of plant age, maturity group, and the environment on disease progress of sudden death syndrome of soybean. **Plant Disease**, v. 79, n. 2, p. 139-143, 1995.

SALAS-MARINA, M. A. *et al.* Colonization of Arabidopsis roots by Trichoderma atroviride promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. **European Journal of Plant Pathology**, v. 131, p. 15-26, 2011.

SALWAN, R., RIALCH, N. e SHARMA V. Bioactive Volatile Metabolites of Trichoderma: An overview.' in Harikesh Bahadur Singh, Chetan Keswani, M. S. Reddy, Estibaliz Sansinenea and Carlos García-Estrada (eds.), Secondary, 2019.

SALWAN R, SHARMA V. Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. Microbiol Res. 2020 Jan; v. 231, p. 126374, 2019. Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms. **Discovery and Applications (Springer Singapore: Singapore)**, 2019.

SHAPIRO, S.S. e WILK, M.B. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). **Biometrika**, v. 52, nº 3/4, p. 591-611, 1965.

SHAW, S. *et al.* Transcriptional reprogramming underpins enhanced plant growth promotion by the biocontrol fungus Trichoderma hamatum GD12 during antagonistic interactions with Sclerotinia sclerotiorum in soil. **Molecular plant pathology**, v. 17, p. 1425-41, 2016.

SHENGQI, S. *et al.* Physiological responses of Egeria densa to high ammonium concentration and nitrogen deficiency. **Chemosphere**, v. 86, p. 538-45, 2012.

SHI, M., *et al.* Antimicrobial peptaibols from Trichoderma pseudokoningii induce programmed cell death in plant fungal pathogens. **Microbiology (Reading)**, v. 158, p. 166-175, 2012.

SILVA, F. F da *et al.* Emergência e análise ultraestrutural de plântulas de soja inoculadas com Sclerotinia sclerotiorum sob efeito da aplicação de Trichoderma harzianum. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 43, p. 41-45, 2017.

SILVA, Juliano C. da; BETTIOL, Wagner. Potencial de isolados não patogênicos de *Fusarium oxysporum* para o controle da murcha do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 409-412, 2005.

SOUSA, V.M., Siqueira, C.S., Machado, J.C., 2016. Conventional PCR for detection of 24 *Corynespora cassiicola* in soybean seeds. **J. Seed Sci**, v. 38, p. 85-91.

St.CLAIR, S.B. e LYNCH, J.P. Estimulação de cátion de base de micorrização e fotossíntese de bordo de açúcar em solos ácidos são acoplados por dinâmica de nutrientes foliares. **New Phytologist**, v. 165, p. 581-590, 2005.

STRACQUADANIO, C. *et al.* Antifungal Activity of Bioactive Metabolites Produced by *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma atroviride* in Liquid Medium. **Journal of Fungi**, Basel, v. 6, p. 263, 2020.

STUDHOLME, D. J., *et al.* Investigating the beneficial traits of *Trichoderma hamatum* GD12 for sustainable agriculture—insights from genomics. **Front Plant Sci**, Lausanne, v. 4, p. 258, 2013.

TONGON, R., KASEN, S. Fungal metabolites from *Chaetomium brasiliense* to inhibit *Fusarium solani*. **J. Agric. Technol**, v. 12, p. 1465-1474, 2016.

VAN HANDEL, E. Direct microdetermination of sucrose. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 22, p. 280-283, 1968.

VARGAS, M. A. e M. Hungria (1997). **Biologia dos solos dos cerrados**, EMBRAPA-CPAC Brasília.1997. 524p.

VINALE, F. *et al.* A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 72, p. 80-86, 2008.

VINALE, F. *et al.* Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. **FEMS microbiology letters**, Oxford, v. 347, p. 123-29, 2013.

VISCONTI, A.; BETTIOL, W. e MORANDI, M. A. B. Efeito de hidrolisado de peixe sobre o crescimento micelial e controle de *Cylindrocladium spathiphylli* em espatifilo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, p. 298-308, 2010.

VOGELS, G. D.; VAN DER DRIFT, C. Differential analyses of glyoxylate derivatives. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 33, n. 1, p. 143-157, 1970.

WANG, C. *et al.* Effects of ammonium on the antioxidative response in *Hydrilla verticillata* (Lf) Royle plants. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 73, p. 189-95, 2010.

WRATHER J.A. *et al.* Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994. *Plant disease*, v. 81, p. 107-110, 1994.

WONG, M. **Visual symptoms of plant nutrient deficiencies in nursery and landscape plants**, 2005.

ZAFAR, S.;AQIL, F. e AHMAD, I. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2557-61, 2007.

ZAMBOLIM, L; VENTURA, J. e ZANÃO-JR, L. **Efeito da Nutrição mineral no controle de Doenças de Plantas**, Viçosa: *Editora Independente*, 2012.

ZHANG, X. *et al.* Antibiosis functions during interactions of *Trichoderma afroharzianum* and *Trichoderma gamsii* with plant pathogenic *Rhizoctonia* and *Pythium*. **Functional & Integrative Genomics**, v. 15, p. 599-610, 2015.

ZHANG, Q. *et al.* Filogenômica viral usando um método livre de alinhamento: uma abordagem em três etapas para determinar o comprimento ideal de k-mer. **Scientific Reports**, London, v. 7, p. 40712, 2017.

5 CAPÍTULO IV: Caracterização de isolados de *Trichoderma* prospectados no agroecossistema amazônico e seleção de potenciais agentes de biocontrole e promotores de crescimento de plantas

RESUMO

O modelo de agricultura atual é dependente de defensivos agrícolas e adubos químicos. A demanda por alimentos é cada vez maior. Desta forma, é preciso buscar alternativas para que haja aumento de produtividade e redução no uso de agroquímicos. Desse modo, buscamos no biocontrole, uma solução eficiente e ecologicamente correta para os cultivos em grande escala, como é o caso da soja. Dentro do gênero *Trichoderma*, temos espécies capazes de promover o crescimento de plantas, aumentando a produtividade das culturas e reduzindo a quantidade de adubos químicos, devido à produção de enzimas como a fosfatase (ácida ou alcalina), melhora na absorção e uso dos nutrientes (NUE), produção de sideróforos, disponibilização de Fe para o crescimento vegetal e controle de fitopatógenos de solo, quitinases para atuação como hiperparasitas, celulasas, que permitem a invasão dos tecidos vegetais e a simbiose e, ainda, atuam na indução de resistência, além de habilidades de produção de hormônios vegetais. Assim, o presente estudo pretende selecionar cepas de *Trichoderma* promissoras, com capacidade de promoção de crescimento e controle de fitopatógenos. Para tanto, foram feitos vários testes qualitativos e quantitativos para avaliar o potencial dos isolados no controle biológico e na promoção de crescimento de plantas. Os organismos testados apresentaram eficácia para a maior parte dos testes. Logo, pode-se concluir que os isolados de *Trichoderma* de agroecossistemas amazônicos têm potencial promissor no controle de patógenos, indução de resistência através da produção de gliocinas, faseolinas e deoxiantocianidina, promoção de crescimento demonstrada pela produção de auxinas e solubilização de fosfato.

Palavras-chave: hormônios vegetais, fitoalexinas, micoparasita e simbiontes.

Characterization of isolates of *Trichoderma* prospected in the amazon agroecosystem and selection of potential biocontrol agents and plant growth promoters

ABSTRACT

The current model of agriculture is dependent on pesticides and chemical fertilizers. The demand for food is increasing. Thus, it is necessary to seek alternatives to increase productivity and reduce the use of agrochemicals. In this way, we seek in biocontrol an efficient and ecologically correct solution for large-scale crops, as is the case with soy. Within the genus *Trichoderma*, we have species capable of promoting plant growth, increasing crop productivity and reducing the amount of chemical fertilizers, due to the production of enzymes such as phosphatase (acid or alkaline), improvement in the absorption and use of nutrients (NUE), production of siderophores, availability of Fe for plant growth and control of soil phytopathogens, chitinases to act as hyperparasites, cellulases, which allow the invasion of plant tissues and symbiosis, and also act to induce resistance, in addition to of plant hormone production abilities. Thus, the present study intends to select promising *Trichoderma* strains, capable of promoting growth and controlling phytopathogens. To this end, several qualitative and quantitative tests were carried out to assess the potential of the isolates in biological control and in promoting plant growth. The organisms tested were effective for most of the tests. Therefore, it can be concluded that *Trichoderma* isolates from Amazonian agroecosystems have promising potential in controlling pathogens, inducing resistance through the production of gliocins, phaseolins and deoxyanthocyanidins, promoting growth demonstrated by the production of auxins and phosphate solubilization..

Key words: plant hormones, phytoalexins, mycoparasites and symbionts.

5.1. INTRODUÇÃO

A região amazônica é conhecida por sua riqueza de espécies da flora, fauna e com o microbioma não é diferente. São inúmeras as pesquisas que enaltecem a biodiversidade amazônica (FEARNSIDE, 2021; SOUZA *et al.*, 2019). A maior parte delas, referem-se à macrobiota, como plantas e animais, em virtude da facilidade maior do estudo. No entanto, quando se tratam de seres, os quais não podem ser visualizados a olho nu, como regra geral, o estudo torna-se mais dispendioso e difícil. Somente com o avanço da biotecnologia, podemos ter uma ideia da importância e da diversidade do microbioma (FEARNSIDE, 2021).

O modelo de agricultura em larga escala é baseado no uso de agroquímicos que vão desde a adição de adubos químicos ao uso dos defensivos agrícolas (inseticidas, nematicidas, acaricidas, fungicidas), além do uso de herbicidas para o controle de plantas daninhas. O Brasil se constitui um país agrícola — o maior produtor mundial de soja desde o ano de 2020 —, tendo também o feijão como uma cultura bem estabelecida. Mas, tanto a soja quanto o feijão são acometidos por inúmeras doenças, o que leva os produtores a adotarem o uso de defensivos, muitas vezes usados até como preventivos.

Dessa maneira, muitos dos produtos acabam por não atingir o organismo alvo e podem causar resistência aos patógenos, exigindo o desenvolvimento de novas moléculas (OLIVEIRA *et al.*, 2015). A resistência à fungicidas tem se constituído um problema em diversas culturas, como a do trigo, em que os fungicidas têm baixa ou nenhuma eficiência contra *Pyricularia oryzae*; já nas de soja e feijão, as doenças radiculares são de difícil controle e, na maioria das vezes, o uso de fungicidas para esse fim é ineficaz (POLONI, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2015; DAVID *et al.*, 2018).

O Brasil é também um dos maiores compradores e consumidores de agrotóxicos. Além do grande volume de consumo, nossa legislação ainda permite o uso de produtos proibidos em diversos países, visto que as formulações não são reavaliadas com frequência (FRIEDRICH *et al.*, 2021), o que faz com que usemos moléculas ultrapassadas, que podem causar danos, principalmente, à saúde do trabalhador rural e ao ambiente.

Consequentemente, estudos de produtos alternativos para diminuir o uso de agroquímicos são necessários. Curvo, Pignati e Pignatti (2013) evidenciaram o

aumento do câncer infantil devido ao uso de agrotóxicos ao longo dos anos. O estado do Mato Grosso é considerado o celeiro do Brasil e as cidades com grande atividade agrícola também apresentam um aumento no percentual de crianças acometidas com câncer, principalmente leucemia, na faixa etária de 0 a 19 anos.

Para que seja possível reduzir o consumo de defensivos agrícolas é preciso desenvolver produtos alternativos que ajudem a alcançar altas produtividades e, ainda assim, proteger a saúde humana e o meio ambiente. Estudos demonstram a eficiência de indutores de resistência, uso de microrganismos benéficos, bioestimulantes e o controle biológico (AVNI *et al.*, 1994; BONONI *et al.*, 2020; BRUNNER *et al.*, 2003; CARGNELUTTI *et al.*, 2021; CARILLO *et al.*, 2020; CHAGAS *et al.*, 2017; CHEN, KARUPPIAH e DOU, 2020; PEITER-BENINCA *et al.*, 2021; STANGARLIN *et al.*, 2020).

Tendo em vista a grande demanda por alimentos e a dependência do uso de agroquímicos para alcançar altas produtividades, este estudo pretende selecionar cepas de *Trichoderma* isolados do agroecossistema amazônico, com o intuito de testá-los quanto à solubilização de fosfato e produção de AIA, na promoção de crescimento de plantas e de enzimas ligadas ao biocontrole (quitinases); assim como, a capacidade de indução de resistência em 3 plantas modelo: soja (cotilédones), feijão (hipocótilo) e o sorgo (mesocótilo), induzindo a produção de fitoalexinas.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Obtenção dos isolados de *Trichoderma* spp.

Foram utilizados quatro isolados fúngicos puros nativos do gênero *Trichoderma* (codificados como TC, TF, TM, e TQ), todos coletados em agroecossistemas amazônicos e mantidos na micoteca da Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus de Alta Floresta e o produto comercial de *Trichoderma asperellum* URM 5911 (codificado como TA).

Todos os isolados fúngicos foram multiplicados, por meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), e mantidos em câmara de germinação do tipo BOD a 25°C e fotoperíodo de 12 h. As reativações dos isolados aconteceram sete dias antes dos testes (Informação suplementar IS 1).

5.2.2. Atividade quitinolítica

Conforme descrito por Agrawal e Kotasthane (2012), o meio de detecção da atividade quitinolítica consiste em um meio basal sólido contendo 0,3 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,0 g de KH_2PO_4 , 1,0 g de ácido cítrico monohidratado, 200 μL de Tween80, 4,5 g de quitina coloidal, 0,15 g de púrpura de bromocresol ou vermelho de fenil, 15 g de ágar, ajustando o pH em 4,7 e então autoclavado a 121°C por 15 min. Após a autoclavagem, o meio fundente foi vertido em placas de Petri, inoculado com um disco (6 mm $\varnothing$) do micélio e incubado em BOD a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Por tratamento, foram estabelecidas cinco repetições, conduzidas em delineamento inteiramente casualizado, com repetição para validação dos dados.

Após 5 dias, foi verificada a presença de halos avermelhados ao entorno do crescimento micelial, sendo esse mensurado com o auxílio de régua milimetrada, inferindo assim o diâmetro do halo, indicativo da atividade enzimática quitinase.

5.2.3. Atividade celulolítica

A atividade celulolítica foi determinada, conforme o descrito por Durairaj *et al.* (2017), com modificações. Os isolados foram inoculados em meio de ágar CMC composto por 1,0 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de NaCl, 0,01 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,3 g de $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$, 10 g de CMC (carboximetilcelulose), 15 g de ágar em 1 L de água deionizada, seguido de autoclavagem. Após esse processo, foi realizada a inoculação dos organismos a serem testados e posterior incubação por 72 h a 25°C . Por tratamento, foram estabelecidas cinco repetições, conduzidas em delineamento inteiramente casualizado, com réplica para validação dos dados.

Após a incubação, as placas foram inundadas (5 mL) com 0,1% de vermelho Congo por 20 min e depois com 10 mL de solução salina de NaCl a 1M por 20 min. Em seguida, as placas foram observadas quanto à formação de halos ao redor das colônias, indicativo da degradação da carboximetilcelulose, desencadeados pela celulase.

A atividade hidrolítica da celulase foi estimada semiquantitativamente, usando-se um índice enzimático (IE) que expressa a relação do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia. Desta forma, os isolados que exibiram os maiores IE no meio de crescimento, foram considerados os que possuíam maior atividade enzimática extracelular.

$$(IE = \frac{\text{Ø halo}}{\text{Ø colônia}})$$

5.2.4. Determinação de ácido indol acético (AIA)

Para avaliar o potencial de produção de ácido indol acético (AIA), seguiu-se a base do protocolo de Oliveira *et al.* (2012), na qual os isolados de *Trichoderma* foram cultivados em caldo batata-dextrose (BD) enriquecido com L-Triptofano (0,5 g L⁻¹) disposto em erlenmeyer, seguido de autoclavagem. Posteriormente, foi adicionado em cada erlenmeyer 1 disco (8 mm Ø) de cada isolado fúngico crescido em BDA (7 dias), contendo micélio e esporo. Os frascos foram então incubados sob agitação a 200 rpm a 28 °C na ausência de luminosidade.

As avaliações ocorreram aos 3, 6, 9 e 12 dias, após a incubação. Para análise, retirou-se uma alíquota de 10 mL do material incubado e centrifugou-se a 10000 rpm a 6°C por 15 min. Para a análise colorimétrica de AIA, foram utilizados 0,5 mL do reagente Salkowski (FeCl₃ 0,5 mol L⁻¹ + HClO₄ (35%)) acrescido de 1 mL do sobrenadante, mantidos no escuro por 25 minutos, conforme proposta de Gordon e Weber (1951), sendo utilizadas quatro repetições por isolado, em delineamento inteiramente casualizado.

As leituras do fitormônio foram realizadas em cubeta de quartzo a 530 nm no espectrofotômetro. As concentrações, expressas em µg mL⁻¹ e calculadas a partir de uma curva padrão da forma sintética do hormônio, permitindo determinar a concentração de AIA nas amostras

5.2.5. Solubilização de P

Cultivo em placa para seleção de microrganismos solubilizadores de P (método qualitativo)

Os microrganismos a serem testados foram cultivados em meio Pikovskaya, onde a capacidade de solubilizar o fósforo foi revelada por mudanças na coloração do meio de cultura e formação de precipitados.

Para o preparo de 100 ml do meio de cultura foram usados 0,05g de extrato de levedura; 1,0g de glicose; 0,5g de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 0,05g de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$; 0,02g de KCL; 0,01g de MgSO_4 ; 0,00001g de FeSO_4 ; 0,00001 de MnSO_4 ; 1,5g de ágar e 0,0125g de púrpura de bromocresol. Em um agitador magnético, os componentes foram adicionados um a um a 100 mL de água deionizada, na ordem descrita, e após ajustar o pH para 7,0, esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min.

No centro de cada placa foram adicionados discos contendo micélio e esporo de *Trichoderma* e levados ao BOD a 28°C, por 5 dias, para verificação da habilidade de solubilizar P.

Os candidatos promissores foram selecionados para a etapa quantitativa.

Meio NBRIP (método quantitativo)

O meio líquido NBRIP segue conforme a proposta de Nautiyal (1999), sendo composto por 10 g de glicose, 5 g de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 2,5 g de $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g de KCl, 0,1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dissolvidos em 1 litro de água miliqui e pH ajustado a 7, fracionado em erlenmeyer (250 mL), colocando 100 mL e tampado com gaze e alumínio. Em seguida foi autoclavado por 15 min a 120°C 1 atm.

Após resfriar, foram inoculados 5 discos de micélio (8 mm Ø) em cada erlenmeyer e incubados sob agitação a 160 rpm a 28°C na ausência de luz.

Posteriormente, para as análises foram retiradas alíquotas de 1,5 mL do meio em crescimento, coletadas e centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm, diariamente, por 5 dias. Em eppendorf, foram montadas as reações com 100 µL do reagente de Murphy e Riley (1962) [constituído por 12,5 mL ácido sulfúrico 5M, 3,75 mL da solução de molibdato de amônio, 7,5 mL da solução de ácido ascórbico e 1,25 mL da solução

de tartarato de potássio e antimônio] + 100 µL da amostra sobrenadante + 1,8 mL de água milliqual, realizadas em quatro repetições, todas homogeneizadas e incubadas por 40 minutos para leitura em espectrofotômetro a 725 nm.

Os valores de absorbância foram corrigidos por meio de uma curva padrão de fósforo à base de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) de concentração conhecida, tendo seus valores de solubilização de P expressos em µg mL⁻¹.

Os valores de pH foram acompanhados, ao longo do experimento, decaindo com o decorrer do tempo, demonstrando se tratar de fosfatase ácida.

5.2.6. Indução de resistência

5.2.6.1 Acúmulo de gliceolinas em cotilédones de soja

Para a determinação do acúmulo de gliceolina em cotilédones de soja, adotou-se a proposta de Stangarlin *et al.* (2010), na qual preparou-se uma solução elicitora à base de caldo batata-dextrose estéril, inoculada com um disco (8 mm Ø) do isolado fúngico de *Trichoderma* crescido em BDA (5 dias), contendo micélio e esporo, sendo mantido sob agitação a 160 rpm a 28°C na ausência de luminosidade por 5 dias. Após esse período, uma alíquota de 12 mL foi centrifugada a 10000 rpm a 4°C por 15min e em seguida, o sobrenadante foi filtrado (filtro millipore 0,2 µm). Cotilédones de soja com 9 dias de semeadura em areia autoclavada, livres de injúrias, foram retirados das plântulas e lavados em água destilada, seguido de uma última lavagem em água destilada estéril e mantido sobre papel absorvente estéril em câmara de fluxo laminar.

Na face abaxial do cotilédone foi efetuado um corte superficial em formato de “cunha” com lâmina estéril curvada. Após a retirada da porção superficial, de maneira asséptica, todos os cotilédones, juntos, foram pesados em balança analítica de precisão (5 por placa). Depois, de dispostos sobre placas de Petri— contendo 3 folhas de papel de filtro umedecidos com água destilada esterilizada (4 mL) —. Em seguida, sobre o corte realizado, depositou-se uma gota de 50µL da solução elicitora fúngica ou demais tratamentos compostos por: água destilada estéril (Milliqui) e Acibenzolar-S-Metílico (50 mg p.a./L do produto comercial).

As placas (tampadas, mas não vedadas) foram mantidas aleatorizadas por 20 h em BOD a 26°C, no escuro. Transcorridos o tempo determinado, os 5 cotilédones

foram retirados e depositados em frascos de vidro snap-cap, de 50 mL, contendo 10 mL de água destilada estéril e agitados com por 1 hora a 160 rpm 28°C, na ausência de luminosidade, para a extração da gliceolina.

Na sequência, filtrou-se a solução em papel de filtro Whatman n° 41, realizando a leitura (quatro repetições por tratamento) em cubeta de quartzo a 285 nm em espectrofotômetro. O teor da gliceolina foi obtido pela divisão do valor da absorbância pela massa dos cotilédones, expressos em Abs g⁻¹ mf⁻¹.

5.2.6.2 Acúmulo de faseolinas em hipocótilos de feijão

Preparação elicitora (Meio de cultivo do fungo)

Preparou-se o caldo batata-dextrose e depois de pronto, o meio foi fracionado em erlenmeyers de 125 mL, autoclavados. Após o resfriamento, cada erlenmeyer recebeu 1 disco (8 mm Ø) do isolado de *Trichoderma* crescido em BDA (5 dias).

Os frascos foram mantidos por 7 dias, sob agitação a 160 rpm a 28°C na ausência de luminosidade.

Após, foi transferida uma alíquota de 12 mL para tubos tipo Falcon e centrifugada a 10000 rpm a 4°C por 15min e, em seguida, o sobrenadante foi então filtrado em seringa com filtro millipore 0,2 µm.

Como controles, foram usados água destilada estéril (Milliqui) e Acibenzolar-S-Metílico (50 mg p.a./ L do produto comercial Bion= 0,025 g em 500mL de água)

Preparo dos hipocótilos de feijão

As sementes de feijão foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (1%) por 2 minutos, lavadas em água esterilizada e semeadas em caixas gerbox contendo vermiculita autoclavada e mantidas em incubadora tipo BOD a 25°C por 7 dias no escuro;

Após esse período, foram coletados os hipocótilos, lavados em água estéril e fracionados em segmentos de ± 2,5 cm.

Para montar as placas de petri foram pesados 4 segmentos e dispostos sobre 2 folhas de papel filtro umedecido. Cada fragmento recebeu 250 µL da solução

elicitora. As placas, tampadas e sem vedar foram levadas a BOD a 25°C por mais 48h no escuro.

Transcorrido este período, os fragmentos foram transferidos para frascos snap-cup, contendo 10 mL de etanol 98% e permaneceram por 48h a 4°C, em geladeira, para extrair a faseolina.

Na sequência, foram agitados por 1h a 150 rpm e, em seguida, realizada a leitura em espectrofotômetro a 280 nm.

O teor da faseolina foi obtido, dividindo o valor da absorbância pela massa dos hipocótilos (Abs.gmf^{-1}).

5.2.6.3. Acúmulo de desoxianocianidina em mesocótilos de sorgo

Em erlenmeyers, contendo 120 ml de meio de cultura BD, foi adicionado um disco (8 mm Ø) do isolado fúngico crescido em BDA (5 dias), contendo micélio e esporos e mantidos sob agitação a 170 rpm a 28°C na ausência de luminosidade por 7 dias.

Após esse período, uma alíquota de 12 mL de cada tratamento foi transferida para tubo Falcon de 15mL e centrifugada a 10000 rpm a 4°C por 15min.

Depois de centrifugada, em câmara de fluxo laminar, o sobrenadante foi retirado com pipeta, depositado em seringa de 20mL e filtrado em millipore 0,2 µm.

Como controles (testemunhas) foram usados a água destilada estéril (Milliqui) e o produto comercial Acibenzolar-S-Metílico (50 mg p.a./L do produto comercial Bion® = 0,025 g em 500mL de água).

Preparo dos mesocótilos de sorgo

As sementes de sorgo foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (1%) por 15 min e, em seguida, lavadas em água esterilizada e acondicionadas em rolos de germinação com duas folhas de papel umedecido (dobrada longitudinalmente).

Na sequência, foram dispostas em fileira única, em todo o comprimento da folha, de modo que germinassem ultrapassando as folhas de papel. Os rolos foram mantidos em câmara úmida e incubados em BOD a 28°C por 4 dias.

Após esse período, as plântulas foram expostas à luz, por 4h, com o intuito de paralisar o alongamento dos mesocótilos e em seguida, excisadas 0,5 cm acima do nódulo escutelar (restando apenas a parte aérea – mesocótilo e coleóptilo). Em tubos de ensaio contendo 3 mL de cada tratamento ou água destilada esterilizada (em tréplica), foram adicionados 4 fragmentos e mantidos a 25°C, em câmara úmida, (vedados com filme plástico), sob luz fluorescente por 60h (2,5 dias).

Após transcorridas 60h, os mesocótilos foram removidos dos tubos, tendo 5 mm da extremidade basal, excisada e descartada.

A porção restante (2 a 2,5 cm) foi pesada, cortada em pequenos segmentos e colocada em eppendorf (2mL), contendo 1,4 mL de metanol 80% acidificado* 0,1% (v/v) com HCl (em tréplica).

Os eppendorfs (contendo mesocótilos cortados e metanol) foram mantidos em maceração na geladeira (4°C) por 96h para a extração da fitoalexina desoxianocianidina. A mudança de cor para laranja indica a produção da fitoalexina.

Após esse tempo, o líquido metanólico foi recolhido com pipeta Pasteur e colocado em cubeta para leitura na absorbância de 480 ou 490 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em absorbância por grama de tecido fresco (Abs.gmf⁻¹).

5.2.7. Registro fotográfico das placas de Petri

Todas as fotos contendo placas de Petri foram registradas por meio do protocolo PRHQ, desenvolvido por Rodrigues *et al.* (2022).

5.2.8. Análises estatísticas

Os dados obtidos nos ensaios foram submetidos à análise de variância para verificação da significância e comparação de médias, utilizando-se o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, por meio do programa estatístico Sisvar 5.3 (Ferreira 2014) e as representações gráficas por meio software SigmaPlot.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram executados vários protocolos para identificar as habilidades das cepas de *Trichoderma* em atuar no biocontrole de outros fungos e/ou para a promoção de crescimento de plantas.

Experimento 1 – Atividade quitinolítica

O experimento para verificar a capacidade das cepas de *Trichoderma* em degradarem quitina foi avaliado em função do tamanho da colônia crescida sobre meio contendo quitina. O crescimento e a mudança de coloração do meio de cultivo indicaram a atividade da enzima quitinase.

Fungos micoparasitas devem possuir enzimas capazes de degradar a parede celular de fitopatógenos. Na figura 01, observa-se o crescimento de *Trichoderma atroviride* (TQ), indicando capacidade de degradar quitina coloidal. Esta característica é limitante para a seleção de um hiperparasita.

Figura 1. Atividade quitinolítica de cepas de *Trichoderma* isoladas no agroecossistema amazônico, cultivo em placas. UNESP, Ilha Solteira – SP.



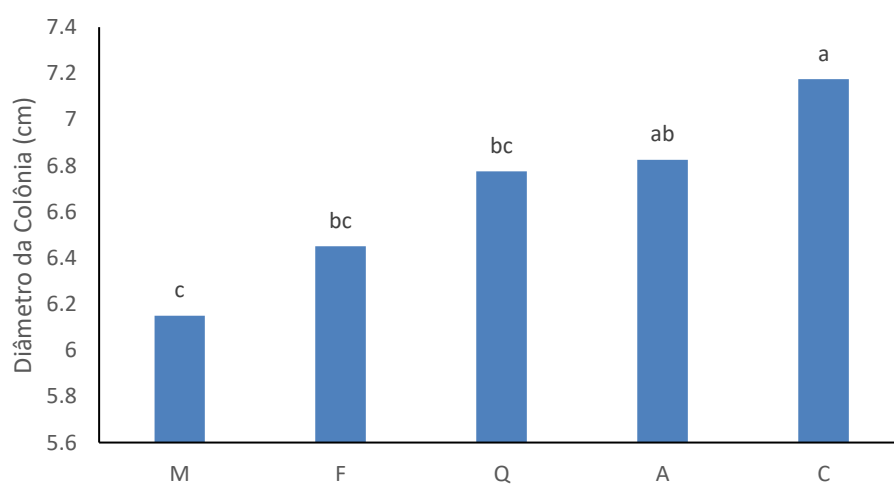


Fonte: própria autora

Todos os isolados demonstraram a capacidade de degradar quitina, com destaque ao isolado TC, que apresentou a maior atividade entre os *Trichodermas* testados.

A capacidade em degradar quitina foi mensurada com base no tamanho da colônia, descontando-se o disco de micélio do inóculo. (Figura 2)

Figura 2. Atividade quitinolítica de cepas de *Trichoderma* isoladas do agroecossistema amazônico. UNESP, Ilha Solteira- SP.



Fonte: própria autora

Experimento 2 – Ação celulolítica

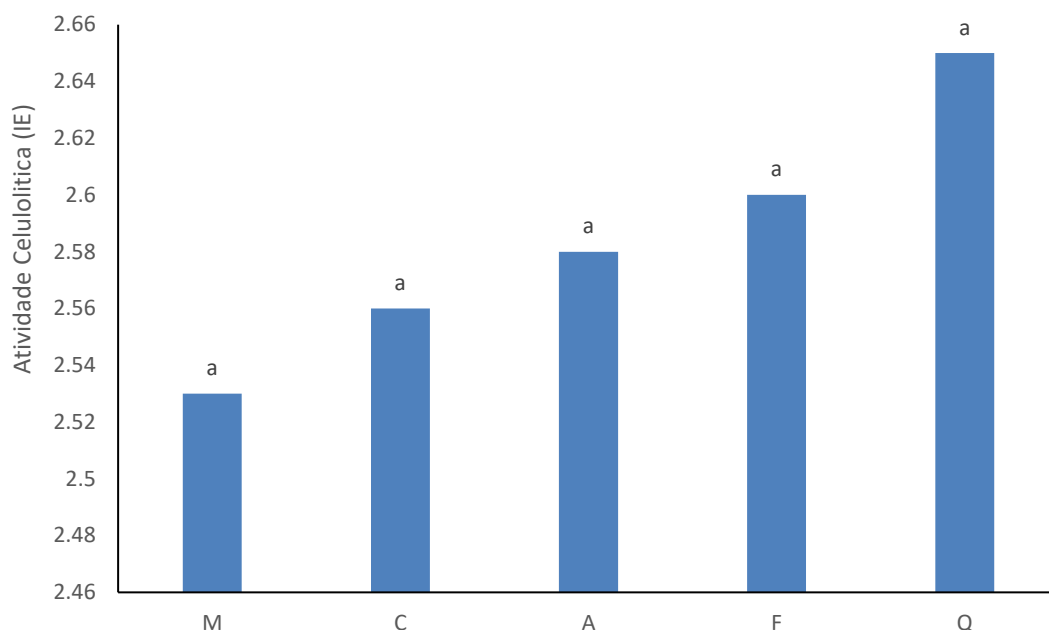
Em meio CMC agarizado, foram colocados para crescer, discos de micélio dos isolados de *Trichoderma*. A reação de degradação da celulose se revelou com adição de corante vermelho congo, após o fungo ter se estabelecido sobre o meio de cultura (72h). O tamanho do halo formado mediu a intensidade da atividade da enzima celulase.

Figura 3. A imagem mostra o isolado TQ crescendo sobre o meio de cultura seletivo rico em compostos de celulose (CMC). A seta indica o tamanho do halo usado para calcular o índice enzimático. UNESP, Ilha Solteira- SP.



Fonte: própria autora

Figura 4. Índice de ação enzimática (IE) de cepas de *Trichoderma*. UNESP, Ilha Solteira- SP.



Fonte: própria autora

Nesta análise, mais uma vez, destacou-se um dos isolados amazônicos, o TQ. A atividade celulolítica está ligada à capacidade do fungo desenvolver relação simbiótica com a planta, visto que ele tem que vencer as barreiras das camadas iniciais da epiderme da raiz para se estabelecer como endofítico (JIMÉNEZ *et al.* 2009; TARTARINE, 2018; PARK *et al.*, 2019; PASCHOLATI, de SOUZA e CARDOSO FILHO, 2019).

O sucesso do bioagente está muito relacionado com sua comunicação com a planta, de forma que, nem todos os fungos com capacidade hiperparasita terão sucesso como endofíticos (MACÍAS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2018).

A relação de simbiose se mostra promissora e duradoura, tendo em vista que o *Trichoderma* pode trazer benefícios como a proteção contra patógenos, principalmente na região da rizosfera (BEZERRA *et al.*, 2022; BRAÚNA, 2011; BROTMAN *et al.*, 2013), induzir resistência (PASCHOLATI, de SOUZA e CARDOSO FILHO, 2019; ESPARZA-REYNOSO, PELAGIO-FLORES e LÓPEZ-BUCIO, 2020) e promover crescimento (CARILLO *et al.*, 2020; CHAGAS *et al.*, 2017; JACQUES *et al.*, 2021; MARRA *et al.*, 2019).

A seleção de um bioagente que possua todos estes atributos aumenta a chance de uma relação duradoura com a planta, diminuindo a necessidade de reaplicações.

No entanto, é preciso salientar que nem todas as cepas de *Trichoderma* estabelecer-se-ão como endofíticos e/ou sobre as raízes, de forma semelhante à micorrizas (endo ou ecto).

Algumas se destacarão quanto à capacidade micoparasítica (DAVID *et al.*, 2018; JOHN *et al.*, 2010; CHAGAS JUNIOR *et al.*, 2022), enquanto outras na solubilização de P (BONONI, 2020; RIBAS *et al.*, 2016), produção de sideróforos (MUKHERJEE *et al.*, 2018; VINALE *et al.*, 2013) e/ou hormônios vegetais (JACQUES *et al.*, 2021; RODRIGUES, MAY de MIO e SOCCOL, 2023; MARTINEZ *et al.*, 2001).

Experimento 3 – Produção de AIA

Considerando o último dia de avaliação (12°), todos os isolados amazônicos foram superiores ao *Trichoderma* comercial. Diversos autores destacam a importância na produção de AIA e o desenvolvimento vegetal (Figuras 5 e 6).

Não é comum encontrar cepas com alta eficiência em produção de AIA, mas os nossos isolados apresentaram valores com 3 dias de cultivo, variando de 3,39 a 7,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$. E, ao final do experimento, com 12 dias, os valores variaram de 32,91 a 38,61 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ou seja, valores muito superiores ao *Trichoderma* comercial que apresentou variação de 1,96 (3 dias) e 24,99 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (12 dias)

Dessa forma, o isolado amazônico de melhor desempenho foi superior, aos 3 dias de cultivo (25,92%), e, ao final do experimento, no 12° dia, (64,72%), indicando que nossos isolados são mais rápidos e eficientes quando comparados ao T. comercial quanto à produção de AIA.

Confrontando os valores obtidos com os de outros autores, como os de Oliveira *et al.* (2012), os resultados foram ainda mais notáveis, pois aos 8 dias, os autores encontraram valores entre 0,4 e 13,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ enquanto que no 9° dia, nossos isolados variaram de 24,07 a 27,16 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Em outro estudo, com 3 dias de crescimento, Abdenaceur *et al.* (2022) verificaram que todos os isolados produziam AIA, mas que as quantidades dependiam de cada cepa, o que também ocorreu em nosso estudo. Eles tiveram resultados variando de 1,30 a 21,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Se considerarmos a produção aos 3 dias, nossos isolados produziram de 3,39 a 7,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Estes resultados mudaram rapidamente, de forma que ao final do experimento, obtivemos como maiores valores o TC (38,61),

seguido do TQ (36,16), valores considerados promissores. (ABDENACEUR *et al.*, 2022)

De acordo com Studholme *et al.* (2013) poucos microrganismos têm habilidades simultâneas para promoção de crescimento vegetal e micoparasitismo e que, apesar de desejável, esta dupla habilidade é rara.

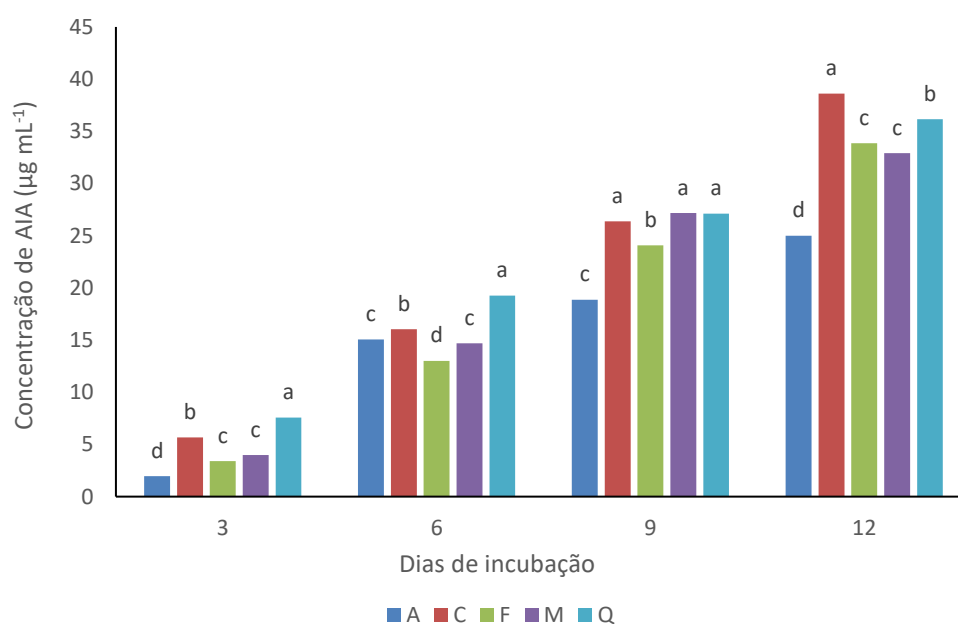
Mesmo sendo uma capacidade rara, os nossos isolados apresentaram dupla competência, isto é, são bons promotores de crescimento (através da produção de AIA e solubilização de fosfatos), e, ao mesmo tempo, destacam-se como hiperparasitas, o que torna o *T. atroviride* (TQ) muito promissor para formulação de produtos, substituindo o uso de insumos químicos e trazendo incremento de produção e controle de patógenos nas culturas.

Figura 5. Tubos contendo as reações que revelam a concentração de ácido indol acético produzidos pelos isolados de *Trichoderma* em diferentes tempos de cultivo. UNESP, Ilha Solteira- SP.



Fonte: própria autora

Figura 6. Concentração de AIA produzido por isolados de *Trichoderma* em diferentes tempos de tempo de incubação. UNESP, Ilha Solteira- SP.

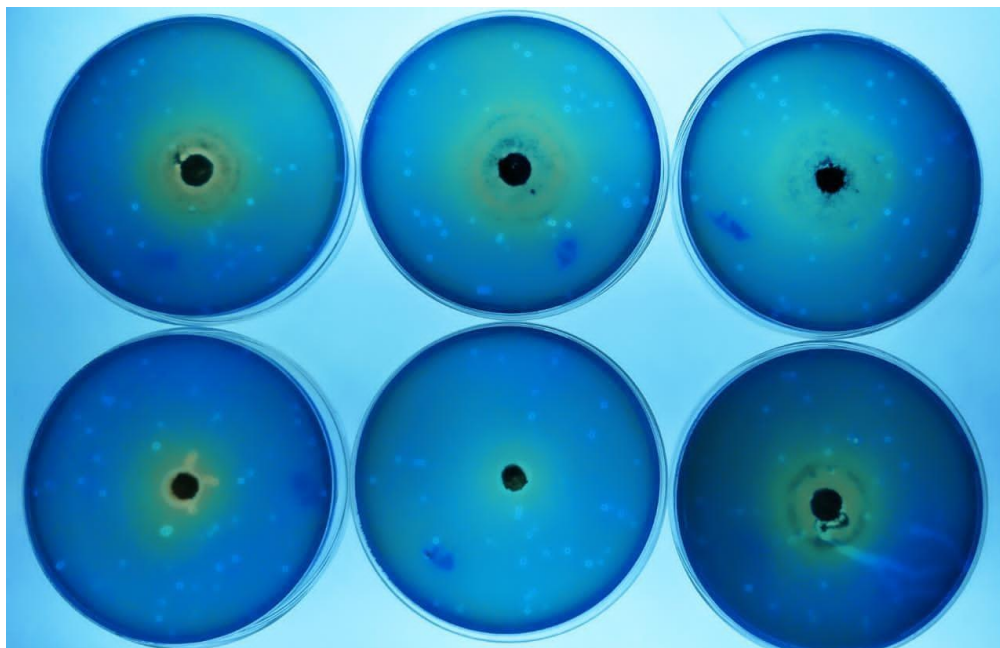


Fonte: própria autora

Experimento 4 - Solubilização de fosfato

Quanto à solubilização de fosfato, na avaliação qualitativa em placas de Petri, todos os isolados demonstraram aptidão, como pode ser observado na figura 7, na qual, a mudança na coloração do meio e a formação de halos indicam a solubilização. Todos os isolados seguiram para etapa de quantificação do P livre.

Figura 7. Imagem mostrando o crescimento dos isolados *Trichoderma* em meio indicador de solubilização de fosfato, onde a alteração da cor do meio indica a liberação de P. UNESP, Ilha Solteira – SP.



Fonte: própria autora

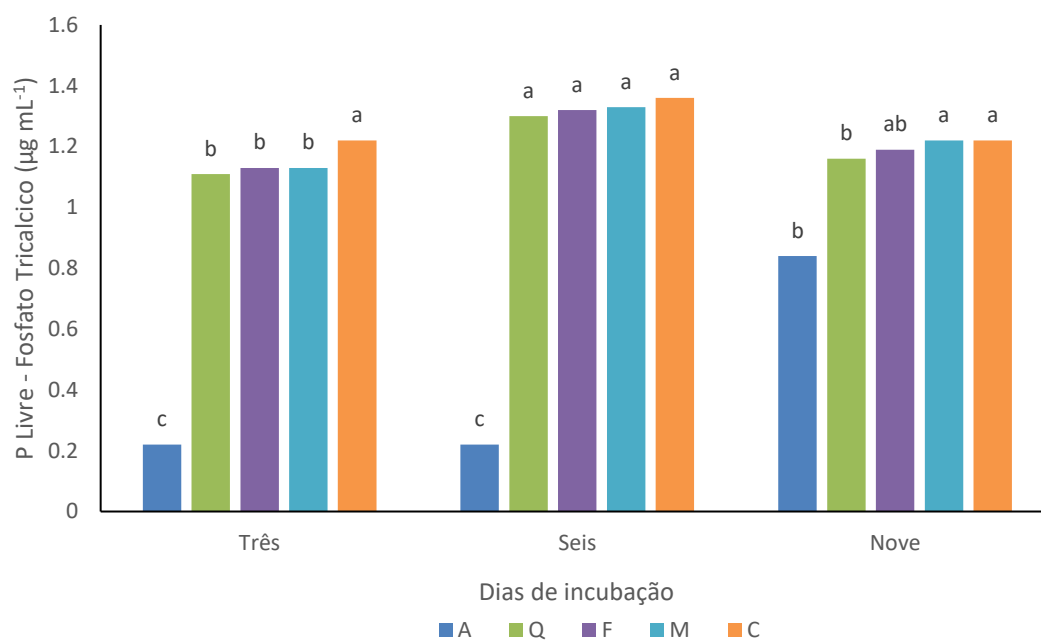
Os isolados amazônicos apresentaram maior capacidade em solubilizar fosfato, em meio NBRIP (Figura 8), que o produto comercial ($0,22 \mu\text{g mL}^{-1}$). No entanto Oliveira *et al.* (2012) apresentaram resultados que variaram de $0,29$ a $8,35 \mu\text{g mL}^{-1}$, no 6° dia, superiores aos obtidos em nosso estudo, que variaram de $1,0$ a $1,36 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 8. Isolados de *Trichoderma* crescendo em meio NBRIP. UNESP, Ilha Solteira- SP.



Fonte: própria autora

Figura 9. Concentração de P Livre em solução com diferentes tratamentos aos três, seis e nove após a inoculação. UNESP, Ilha Solteira- SP.



Fonte: própria autora

Experimento 5 – Acúmulo de fitoalexinas em soja, feijão e sorgo

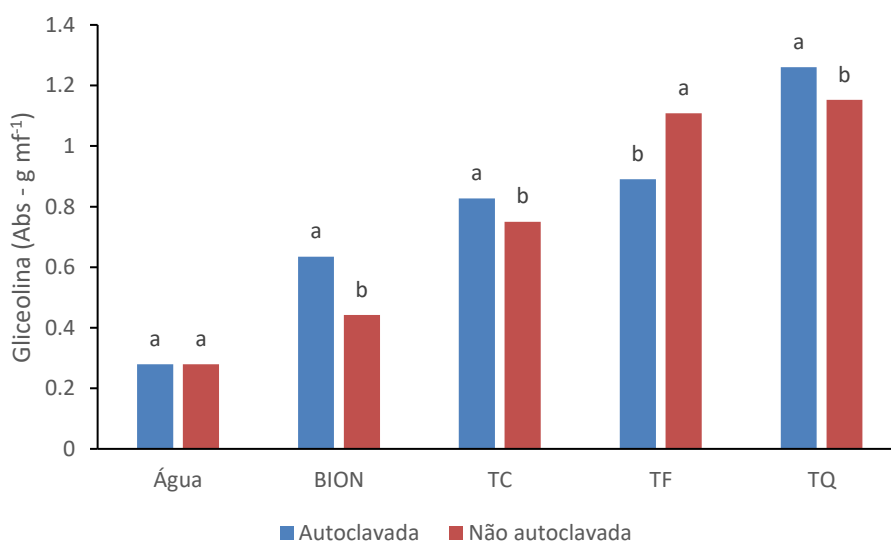
Os isolados foram testados quanto à capacidade de induzir resistência pelo acúmulo de fitoalexinas em 3 biossistemas: cotilédones de soja, hipocótilos de feijão e mesocótilos de sorgo.

No primeiro ensaio, avaliou-se a capacidade dos isolados de *Trichoderma* promoverem acúmulo de gliceolina em cotilédones de soja. A concentração variou com a condição de autoclavado e não autoclavado, prevalecendo a condição autoclavado, com exceção ao TF, que apresentou valores significativamente superiores à condição não autoclavada (Figura 10).

O fato de o tratamento térmico sob pressão propiciar maior elicitação de gliceolina infere que o componente responsável pela indução é termoestável, o que pode ser explicado pela característica destes compostos elicitores, pois são componentes da parede celular. Durante o processo de autoclavagem, estas se quebram e liberam o elicitor.

Bonaldo *et al.* (2005) testaram tempos de autoclavagem e autoclavagem seriada e demonstraram que a molécula elicitora ficava mais evidente após repetidas autoclavagens, ou seja, quando ocorre maior quebra na parede celular das células fúngicas.

Figura 10. Concentração de Gliceolina (Abs – g mf⁻¹) com e sem o uso de autoclave dentro de cada tratamento. UNESP, Ilha Solteira- SP.

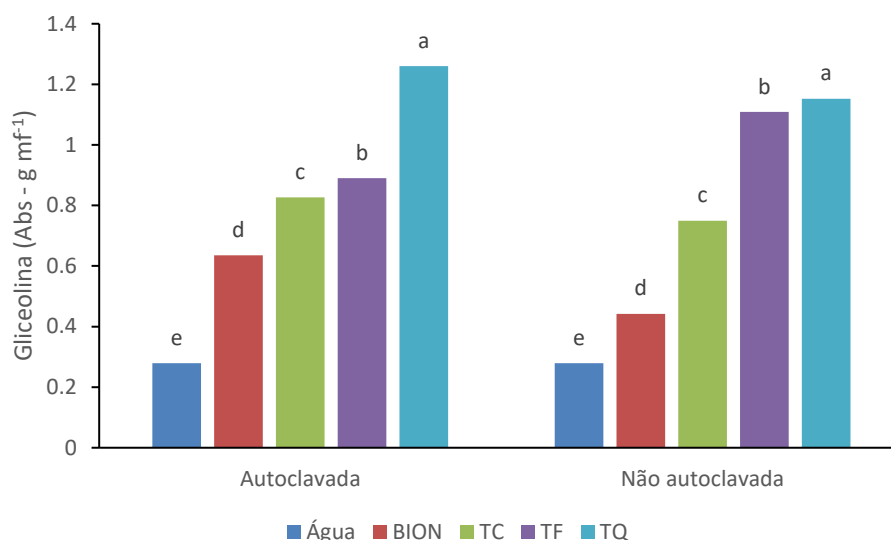


Fonte: própria autora

O isolado TQ destacou-se quanto ao acúmulo de gliceolina, tanto na solução autoclavada quanto não autoclavada. De forma geral, todos os isolados foram superiores ao produto comercial. O ASM, bion® apresentou baixo efeito elicitor em cotilédones de soja quando comparados aos isolados de *Trichoderma* testados.

Meinerz *et al.* (2008) encontraram maior acúmulo de fitoalexinas em sorgo do que nos cotilédones de soja e o indutor acibenzolar-S-metil (Bion) não promoveu indução superior à testemunha água, indicando, possivelmente, pouca atividade nesta rota metabólica para soja, corroborando com os dados encontrados em nosso estudo onde Bion só foi mais eficiente que a água (Figura 11).

Figura 11. Concentração de Gliceolina (Abs – g mf⁻¹) para cada tratamento dentro da condição de autoclavado ou não. UNESP, Ilha Solteira- SP.

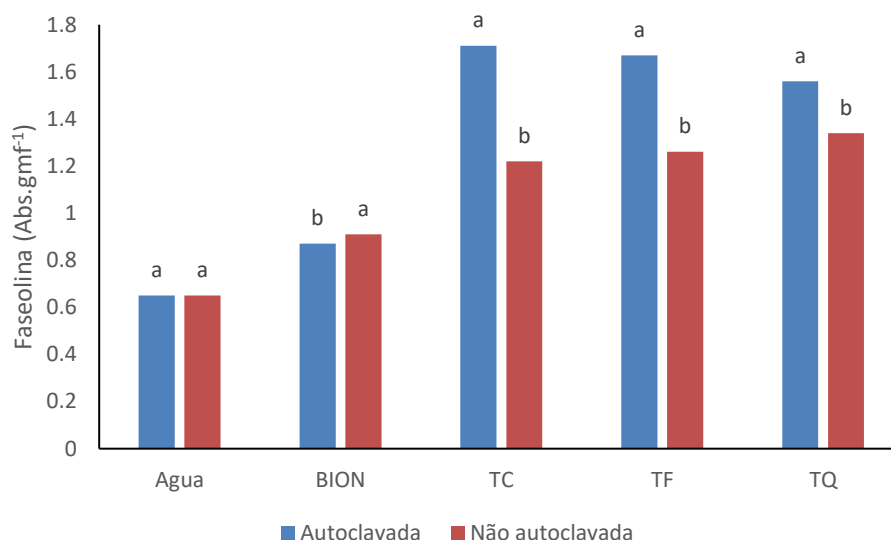


Fonte: própria autora

Continuando as análises, em dicotiledôneas, quanto ao acúmulo de fitoalexinas em hipocótilos de feijão, a condição autoclavada continua proporcionando maior acúmulo de fitoalexinas. Porém, quando analisamos os isolados, dentro da condição de solução autoclavada para gliceolina, o TQ apresenta 1,26 (Abs-gmf-1) nos cotilédones da soja, sendo superior aos demais tratamentos. Para a faseolina, os acúmulos foram superiores para todos os *Trichodermas*. Na condição autoclavada, destacou-se o isolado TC, com 1,71 (Abs-gmf-1); e na condição sem autoclavar, com 1,34 (Abs-gmf-1), foi mantido o TQ como melhor tratamento. Como discutido,

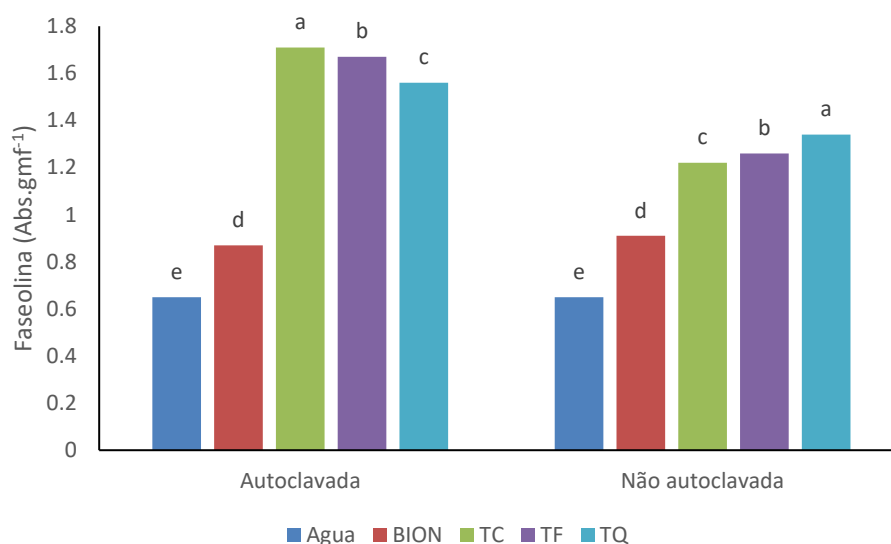
anteriormente, autoclavar quebra a parede celular das células fúngicas liberando os elicitores como constatado por Bonaldo (2005b).

Figura 12. Concentração de Faseolina (Abs – g mf⁻¹) com e sem o uso de autoclave dentro de cada tratamento. UNESP, Ilha Solteira- SP.



Fonte: própria autora

Figura 13. Concentração de Faseolina (Abs – g mf⁻¹) para cada tratamento dentro da condição de autoclavado ou não. UNESP, Ilha Solteira- SP.

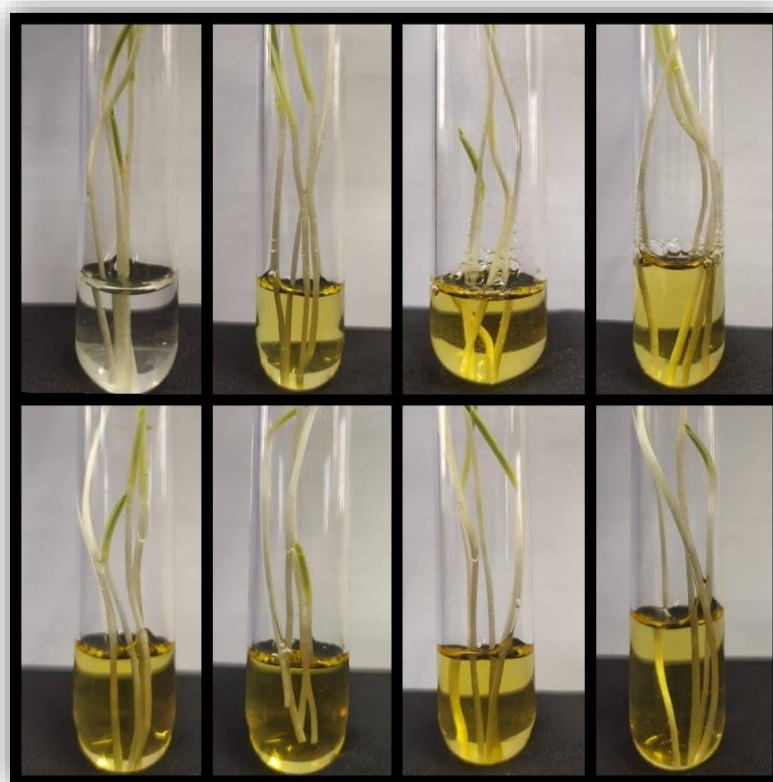


Fonte: própria autora

Analisando a atividade elicitora da fitoalexina desoxiametidina em mesocótilos de sorgo (Figura 14), os acúmulos foram superiores aos de dicotiledôneas.

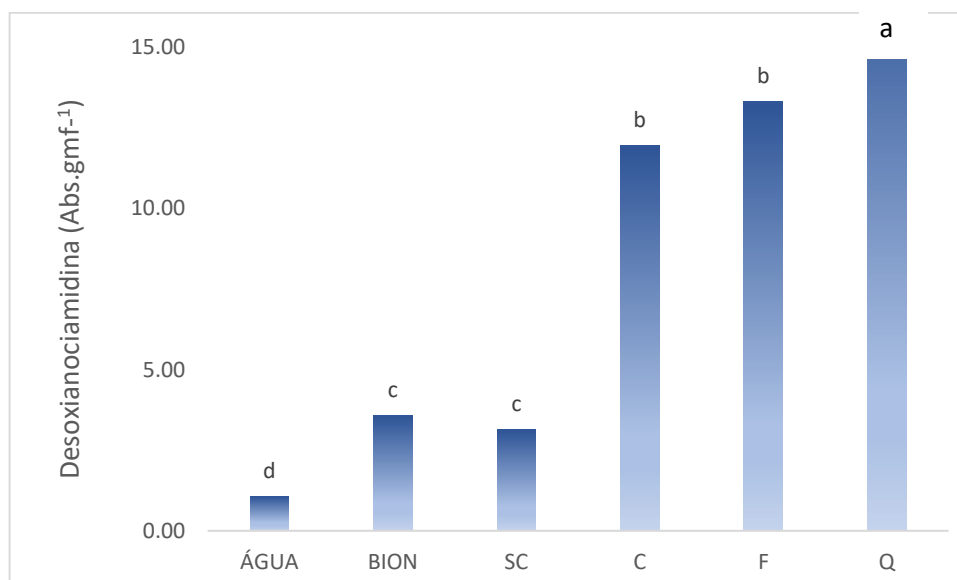
O indutor acibenzolar-S-metil (Bion) igualou-se ao tratamento adicional (*Saccharomyces cerevisiae*), que é considerado um indutor eficiente em diversos estudos (STANGARLIN *et al.*, 2020; ANDRADE *et al.*, 2021; BONALDO, 2005a). Entretanto, neste estudo, apresentou-se superior apenas ao controle negativo (água), tendo o isolado TQ, novamente, destacando-se entre as cepas testadas com um acúmulo de 17,78 (Abs - gm^{-1}).

Figura 14. Mesocótilos de sorgo em solução elicitora proveniente dos isolados de *Trichoderma*. UNESP, Ilha Solteira- SP.



Fonte: própria autora

Figura 15: Acúmulo de desoxiametidina em mesocótilos de sorgo elicitados por cepas de *Trichoderma* tendo a água como controle negativo e o ASM bion e *Saccharomyces cerevisiae* como controles positivos. Unesp, Ilha Solteira- SP.



Fonte: própria autora

5.4. CONCLUSÕES

Os isolados de *Trichodermas* amazônicos se destacam quanto aos atributos relacionados ao biocontrole demonstrado pela produção de quitinases e acúmulo de fitoalexinas (biocontrole e indução de resistência);

Os isolados de *Trichoderma* amazônicos promovem crescimento de plantas, comprovado pela capacidade de solubilização de fosfato e produção de AIA;

O isolado TQ, identificado como *Trichoderma atroviride*, é promissor para formulação de bioprodutos, apresentando atributos relacionados ao biocontrole, através da produção de enzimas quitinolíticas, celulolíticas, indução de resistência e na promoção de crescimento de plantas, por meio da síntese de AIA e solubilização de fosfato.

REFERÊNCIAS

- ABDENACEUR, R. *et al.* Effective biofertilizer *Trichoderma* spp. isolates with enzymatic activity and metabolites enhancing plant growth. **International microbiology**, Basel, v. 25, p. 817-29, 2022.
- AGRAWAL, T. e KOTASTHANE, A.S. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. **SpringerPlus**, v. 1, p. 1-10, 2012.
- ANDRADE, J. *et al.* **Potencial de produtos bióticos e abióticos na indução de resistência à podridão parda em pós-colheita de pêssegos**. Jornada de iniciação científica e tecnológica, 1., 2021.
- AVNI, A. *et al.* Induction of Ethylene Biosynthesis in *Nicotiana tabacum* by a *Trichoderma viride* Xylanase Is Correlated to the Accumulation of 1 Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid (ACC) Synthase and ACC Oxidase Transcripts. **Plant Physiology**, Rockville, v. 106, p. 1049-55, 1994.
- BEZERRA, M. C. L. *et al.* Redução de fungos e qualidade fisiológica de sementes de milho inoculadas com *Trichoderma harzianum*. **Nativa**, v. 10, p. 69-73, 2022.
- BONALDO, S. M. **Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na síntese de fitoalexinas em sorgo, na germinação e formação de apressórios por fungos fitopatogênicos e na proteção de pepino a *Colletotrichum lagenarium* e sorgo a *Colletotrichum sublineolum***. Universidade de São Paulo, 2005a
- BONALDO, S. M. *et al.* **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**, 2005b.
- BONONI, L. **Bioprospecção de *Trichoderma* spp. envolvidas na solubilização de fosfato e no controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja**. Universidade de São Paulo, 2020.
- BONONI, L. *et al.* Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. **Scientific Reports**, London, v. 10, p. 1-13, 2020.
- BRAÚNA, L. M. **Controle biológico do mofo branco por isolados de *Trichoderma* nas culturas de soja e feijão comum**, 2011.
- BROTMAN, Y. *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. **PLoS pathogens**, v. 9, p. e1003221, 2013.
- BRUNNER, K. The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. **Current genetics**, New York, v. 43, p. 289-95, 2003.

CARGNELUTTI, D. *et al.* Soluções tecnológicas emergentes para uma agricultura sustentável: microrganismos eficientes, In: García, LMH **Agroecologia: princípios e fundamentos ecológicos aplicados na busca de uma produção sustentável**. Canoas: Mérida Publishers, 2021. p. 31-62.

CARILLO, P. *et al.* Application of *Trichoderma harzianum*, 6-Pentyl- α -pyrone and Plant Biopolymer Formulations Modulate Plant Metabolism and Fruit Quality of Plum Tomatoes. In **Plants**, [s. l.], v. 2, p. 1-15, 2020.

CHAGAS, L. F. B. *et al.* *Trichoderma asperellum* efficiency in soybean yield componentes. **Comunicata Scientiae**, v. 8, p. 165-69, 2017.

CHAGAS JUNIOR, A. F. *et al.* Eficiência de *Trichoplus* (*Trichoderma asperellum*) como promotor de crescimento vegetal em soja em campo no cerrado. **Research, Society and Development**, v. 11, p. e16111527970-e70, 2022.

CHEN, J.; KARUPPIAH, V. e DOU, K. Chapter 6 - Multiplayer interaction of *Trichoderma* and plant in the induced plant resistance. In: Vijai Kumar Gupta, Susanne Zeilinger, Harikesh Bahadur Singh and Irina Druzhinina (eds.). **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering** (Elsevier), 2020.

CURVO, H.; MEINKE, R.; PIGNATI, W. A. e PIGNATTI, M. G. Morbimortalidade por câncer infantojuvenil associada ao uso agrícola de agrotóxicos no Estado de Mato Grosso, Brasil. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 21, p. 10-17, 2013.

DAVID, G. Q., *et al.* (2018). Rhizoctonia como fitopatógeno no agroecossistema brasileiro. In: LOPES, Ueder Pedro; MICHEREFF, Sami Jorge. **Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos**. 1º. ed. Recife: EDUFRPE, 2018. p. 35-55.

DURAIRAJ, K. *et al.* Potencial para atividade de biocontrole vegetal de cepas isoladas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus stratosphericus* contra patógenos bacterianos que atuam tanto por resistência induzida quanto por antagonismo direto. **Cartas de microbiologia FEMS**, v. 364, n. 23, pág. fnx225, 2017.

ESPARZA-REYNOSO, S.; PELAGIO-FLORES, R. e LÓPEZ-BUCIO. Chapter 3 - Mechanism of plant immunity triggered by *Trichoderma*. In: Vijai Kumar Gupta, Susanne Zeilinger, Harikesh Bahadur Singh and Irina Druzhinina (eds.). **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering** (Elsevier), 2020.

FEARNSIDE, P. M. 2021. The intrinsic value of Amazon biodiversity. **Biodiversity and Conservation**, v. 30, p. 1199-202, 2021

FRIEDRICH, K. *et al.* Situação regulatória internacional de agrotóxicos com uso autorizado no Brasil: potencial de danos sobre a saúde e impactos ambientais. **Cadernos de Saúde Pública**, 37, 2021.

GORDON, S. A.; WEBER, R.P. Estimativa colorimétrica do ácido indolacético. **Fisiologia vegetal**, v. 26, n. 1, pág. 192, 1951.

JACQUES, A. P. *et al.* Isolados nativos de *Trichoderma* spp. como promotor de crescimento na fase inicial da cultura da soja Native isolates of *Trichoderma* spp. as a growth promoter in the initial phase of soybean culture. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, p. 108150-66, 2021.

JIMÉNEZ, C. *et al.* Efecto de la inoculación de dos tipos de semilla de bananos con dos aislados de *Trichoderma atroviride* en fase de vivero sobre el desarrollo de las plantas en campo bajo Sigatoka Negra. **Revista Científica UDO Agrícola**, v. 9, p. 403-13, 2009.

JOHN, R. *et al.* Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. adzuki and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. **Crop protection**, Amsterdam, v. 29, p. 1452-59, 2010.

MACÍAS-RODRÍGUEZ, L. *et al.* *Trichoderma atroviride* promotes tomato development and alters the root exudation of carbohydrates, which stimulates fungal growth and the biocontrol of the phytopathogen *Phytophthora cinnamomi* in a tripartite interaction system. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 94, n. 9, p. 137, 2018.

MARRA, R. *et al.* Application of *Trichoderma* Strains and Metabolites Enhances Soybean Productivity and Nutrient Content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 67, p.1814-22, 2019.

MARTINEZ, C. *et al.* Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, p. 334-44, 2001.

MEINERZ, C.C. *et al.* ,Atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por derivados de avenca (*Adiantum capillus-veneris* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulinia, v. 10, p. 26-31, 2008.

MUKHERJEE, P. K. *et al.* Ferricrocin, the intracellular siderophore of *Trichoderma virens*, is involved in growth, conidiation, gliotoxin biosynthesis and induction of systemic resistance in maize. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Philadelphia, v. 505, p. 606-11, 2018.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. Um método de solução única modificado para a determinação de fosfato em águas naturais. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 27, p. 31-36, 1962.

NAUTIYAL, C. Shekhar. Um meio de crescimento microbiológico eficiente para triagem de microrganismos solubilizadores de fosfato. **FEMS microbiology Letters**, Oxford, v. 170, n. 1, pág. 265-270, 1999.

OLIVEIRA, S. C. Resistência cruzada aos fungicidas IQo azoxistrobina e piraclostrobina no patógeno da brusone do trigo *Piricularia oryzae* no Brasil. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v. 41, p. 298-304, 2015.

OLIVEIRA, A. G. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, [s. l.], v. 7, p. 26, 2012.

PARK, Y. *et al.* Endophytic *Trichoderma citrinoviride* isolated from mountain-cultivated ginseng (*Panax ginseng*) has great potential as a biocontrol agent against ginseng pathogens. **Journal of ginseng research**, Philadelphia, v. 43, p. 408-20, 2019.

PASCHOLATI, S. F.; SOUZA, V. H. M; CARDOSO FILHO, J. A. Indução de resistência por *Trichoderma*. **Trichoderma: uso na agricultura**. Brasília, DF: Embrapa Soja, 2019. v. 1, p. 235-54.

PEITER-BENINCA, C *et al.* Indução de fitoalexinas e atividade de peroxidases em sorgo e soja tratados com extratos de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, p. 285-92, 2021.

POLONI, N. M. **Distribuição generalizada da resistência a fungicidas triazóis e evolução do gene cyp51A em populações de *Pyricularia oryzae* da brusone do trigo no Brasil**. [S. l.: s. n.], 2016.

RIBAS, P. P. *et al.* Potencial in vitro para solubilização de fosfato por *Trichoderma* spp. **Revista Brasileira de Biociências: Brazilian Journal of Biosciences**, Porto Alegre, v. 14, n. 2, p. 70-75, 2016.

RODRIGUES, C.; DAVID, G.Q.; DOS REIS, A. R. Photograph registration of petri dishes in high quality and image editing of microbiological assays. **International Microbiology**, Basel, v. 25, p. 561-570, 2022.

RODRIGUES, A.O, MAY de MIO, L.L. e SOCCOL, C.R. 2023. *Trichoderma* as a powerful fungal disease control agent for a more sustainable and healthy agriculture: recent studies and molecular insights. **Planta**, Heidelberg, v. 257, p. 1-15, 2023.

SOUZA, F. F. C *et al.* Uncovering prokaryotic biodiversity within aerosols of the pristine Amazon forest. **Science of the total environment**, Amsterdam, v. 688, p. 83-86, 2019.

STANGARLIN, J.R. *et al.* Indução de fitoalexinas em soja e sorgo por preparações de *Saccharomyces* *Baccharomyces Boulardii*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 1, 91 - 98, 2010.

STANGARLIN, JR *et al.* Indução de fitoalexinas em soja e sorgo por preparações de *Saccharomyces boulardii*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, p. 91-98, 2020.

STUDHOLME, D. J. *et al.* Investigating the beneficial traits of *Trichoderma hamatum* GD12 for sustainable agriculture—insights from genomics. **Front Plant Sci**, Lausanne, v. 4, p. 258, 2013.

TARTARINE, N. **Celulases de fungos endofíticos: estudo da produção por fermentação submersa e aplicação na sacarificação da palha de cana-de-açúcar**. 2018. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista – Unesp, Araraquara, 2018.

VINALE, F. *et al.* Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. **FEMS microbiology letters**, Oxford, v. 347, p. 123-29, 2013.