

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

MAIKON RICHER DE AZAMBUJA PEREIRA

**POTENCIAL DE *Pseudomonas* E *Trichoderma* COMO AGENTES DE
BIOCONTROLE DA BRUSONE DO TRIGO**

Ilha Solteira
2022

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO

Maikon Richer de Azambuja Pereira

Potencial de *Pseudomonas* e *Trichoderma* como agentes de biocontrole da brusone do trigo

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – Unesp como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Sistemas de Produção.

Paulo Cezar Ceresini
Orientador

Silvino Intra Moreira
Coorientador

Ilha Solteira
2022

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

P436p Pereira, Maikon Richer de Azambuja.
Potencial de *Pseudomonas* e *Trichoderma* como agentes de biocontrole da
brusone do trigo / Maikon Richer de Azambuja Pereira. -- Ilha Solteira: [s.n.],
2022
66 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de
Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Sistemas de Produção, 2022

Orientador: Paulo Cezar Ceresini
Coorientador: Silvino Intra Moreira
Inclui bibliografia

1. Biocontrole. 2. Brusone do trigo. 3. Antagonista. 4. *Pseudomonas*. 5.
Trichoderma. 6. Formulação.


Raiane da Silva Santos

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Ilha Solteira

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: *Potencial de **Pseudomonas** e **Trichoderma** como agentes de biocontrole da brusone do trigo*

AUTOR: MAIKON RICHER DE AZAMBUJA PEREIRA

ORIENTADOR: PAULO CEZAR CERESINI

COORIENTADOR: SILVINO INTRA MOREIRA

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

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

Dr. FELIPE RAFAEL GARCÉS FIALLOS (Participação Virtual)
Facultad de Ingeniería Agronómica e Instituto de Posgrado / Universidad Técnica de Manabí (UTM) - Ecuador

Prof. Dr. MARCELO CARVALHO MINHOTO TEIXEIRA FILHO (Participação Virtual)
Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

Ilha Solteira, SP, Brasil / Portoviejo, Manabí, Ecuador / 04 de abril de 2022.

DEDICATÓRIA

A minha mãe por estar sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Sou grato a Deus por ter me dado a oportunidade de cursar e concluir o mestrado acadêmico mesmo em meio a pandemia do COVID-19, sendo esse um degrau muito importante na vida de um profissional no cenário atual.

Aos meus familiares, minha mãe Márcia Azambuja, minha irmã Aline Azambuja Malta, meu cunhado Eduardo Malta e minha sobrinha Julia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº: 2020/01675-5, pelo apoio financeiro e concessão de bolsa para o desenvolvimento dessa pesquisa.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Ilha Solteira, e aos professores do curso de pós-graduação em sistemas de produção (PPGA).

Ao meu orientador professor Dr. Paulo Cezar Ceresini pela confiança, paciência e direcionamento em todas as etapas do projeto de pesquisa e na produção de material científico de relevância.

Ao meu coorientador Silvino Intra Moreira por me instruir na elaboração do projeto e colaborar na condução dos experimentos.

Aos amigos da equipe de Fitopatologia, Samara Vicentini, Abimael Gomes, Davi Prata, Félix Cristiano, Tamiris Yoshie, Helena Julia, Tatiane Carla e Loane Krug, por me auxiliarem na condução dos experimentos, técnicas laboratoriais e elaboração do trabalho acadêmico.

Aos colaboradores desse projeto de outros departamentos ou instituições, Amanda Paixão, Deila Magna, Patrícia Ricardino, Diego Feitosa e Eduardo Marcandalli.

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

“As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP”.

“Porque há esperança para a árvore, que se for cortada,
ainda se renovará, e não cessarão os seus renovos.”
(BÍBLIA, Jó, 14, 7)

Capítulo 1: Potencial de *Pseudomonas* e *Trichoderma* como agentes de biocontrole da brusone do trigo na cultivar Sossego

Resumo

Neste estudo buscamos determinar se bactérias do gênero *Pseudomonas* e fungos do gênero *Trichoderma* tem potencial como antagonistas do fungo *Pyricularia oryzae* Triticum lineage, agente causal da brusone do trigo. A doença é uma das mais importantes na cultura, podendo causar perdas de até 100% nas lavouras. O controle químico com fungicidas é a principal estratégia de manejo, uma vez que não há variedades com resistência estável à brusone em virtude da alta variação genética em populações do patógeno. Entretanto, a eficácia de fungicidas sistêmicos de modo de ação específico (como estrobilurinas e triazóis) é considerada baixa devido à distribuição generalizada da resistência no país, sendo assim o manejo biológico possivelmente é uma alternativa sustentável de elevada importância para minimizar o impacto das perdas de produção causadas pela brusone no trigo. Dessa forma, objetivamos especificamente: i. avaliar três isolados do gênero *Pseudomonas* e três do gênero *Trichoderma* quanto ao antagonismo contra *Pyricularia oryzae* Triticum lineage *in vitro*; ii. avaliar bactérias *Pseudomonas* e fungos *Trichoderma* quanto ao potencial de biocontrole de brusone do trigo em condições de casa de vegetação; e iii. descrever as interações ultra-estruturais entre agentes de biocontrole, patógeno e planta por meio de microscopia eletrônica de varredura. Pela capacidade de agirem por diferentes mecanismos de ação nossa hipótese foi que estes antagonistas seriam eficazes no manejo da brusone, diminuindo significativamente a severidade da doença e seu impacto sobre a produção de trigo. Os experimentos *in vitro* e *in vivo* indicaram que *Pseudomonas putida* Amana e *Trichoderma koningiopsis* Cachara reduziram significativamente tanto o crescimento micelial de *PoTl* quanto a severidade da doença em plantas de trigo, e tem potencial como agentes de biocontrole. O experimento utilizando microscópio eletrônico de varredura nos permitiu descrever duas interações ultra-estruturais sendo estas os mecanismos de defesa: formação de biofilme e antagonismo direto.

Palavras-chave: Biocontrole. Brusone do trigo. Antagonista. *Pseudomonas*. *Trichoderma*.

Chapter 1: Potential of *Pseudomonas* and *Trichoderma* as biocontrol agents of wheat blast in the Sossego cultivar

Abstract

In this study we sought to determine whether bacteria of the genus *Pseudomonas* and fungi of the genus *Trichoderma* have potential as antagonists of the fungus *Pyricularia oryzae* lineage *Triticum*, the causal agent of wheat blast. The disease is one of the most important in the culture, causing losses of up to 100% in crops. Chemical control with fungicides is the main management strategy, since there are no varieties with stable resistance to blast due to the high genetic variation in populations of the pathogen. However, the effectiveness of systemic fungicides with a specific mode of action (such as strobilurins and triazoles) is considered low due to the widespread distribution of resistance in the country, so biological management is possibly a sustainable alternative of high importance to minimize the impact of plant losses. production caused by wheat blast. Thus, we specifically aim to: i.; to evaluate three isolates of the genus *Pseudomonas* and three of the genus *Trichoderma* for antagonism against *Pyricularia oryzae Triticum lineage* in vitro; ii. to evaluate *Pseudomonas* bacteria and *Trichoderma* fungi for the biocontrol potential of wheat blast under greenhouse conditions; and iii. to describe the ultrastructural interactions between biocontrol agents, pathogen and plant by means of scanning electron microscopy. Due to the ability to act through different mechanisms of action, our hypothesis was that these antagonists would be effective in the management of blast, significantly reducing the severity of the disease and its impact on wheat production. In vitro and in vivo experiments indicated that *Pseudomonas putida* Amana and *Trichoderma koningiopsis* Cachara significantly reduced both *PoTl* mycelial growth and disease severity in wheat plants, and have potential as biocontrol agents. The experiment using a scanning electron microscope allowed us to describe two ultrastructural interactions, which are the defense mechanisms: biofilm formation and direct antagonism.

Keywords: Biocontrol. Wheat blast. Antagonist. *Pseudomonas*. *Trichoderma*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** (A) Experimento de confronto *in vitro* entre o patógeno *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (PoTl) e agentes de biocontrole do gênero *Pseudomonas*. (B) Visão geral do experimento de confronto *in vitro* de (PoTl) e agentes de biocontrole do gênero *Trichoderma*.....19
- Figura 2.** (A) Suspensão de esporos de *Trichoderma* e recipientes utilizados para inoculação do agente de biocontrole fúngico à base de *Trichoderma* spp. em plantas de trigo. (B) Visão geral do experimento em casa de vegetação antes do tratamento com agentes de biocontrole e inoculação do patógeno da brusone e plantas de trigo.....20
- Figura 3.** Experimento ainda em casa de vegetação, com plantas aos 60 DAE, antes de ser levado para a câmara climatizada onde foram tratadas com o agente de biocontrole *Pseudomonas putida* ‘Amana’ e inoculadas com PoTl..... 21
- Figura 4.** Experimento em condições de câmara de crescimento com plantas já tratadas com agentes de biocontrole e já inoculadas com o patógeno.....22
- Figura 5.** Distribuição *boxplot* do crescimento micelial relativo de *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (PoTl) submetidos ao antagonismo *in vitro* de três isolados de *Pseudomonas* spp. contra o patógeno.....24
- Figura 6.** Antagonismo *in vitro* de *Pseudomonas* spp. contra *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (PoTl). A–C: isolados de PoTl (12.1.146, 12.1.207,12.1.047). D–F: Isolados de *P. putida* Amana (marca azul), *Pseudomonas* sp. nov Poti (marca preta) e *P. putida* Yara (marca vermelha) pareados com PoTl (colônia no centro).....25
- Figura 7.** Distribuição *boxplot* do crescimento micelial relativo de *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (PoTl) submetidos ao antagonismo *in vitro* de três isolados de *Trichoderma* spp. contra isolados do patógeno.....26
- Figura 8.** Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (PoTl). A–C: isolados de PoTl (12.1.146, 12.1.207 e 12.1.047). A–C: isolados do patógeno, apenas. Isolados de PoTl pareados com isolados de *T. koningiopsis* ‘Cachara’ (D–F), *Trichoderma virens* ‘Jau’ (G–I) e *T. lentiforme* ‘Jurupoca’ (J–L).....27
- Figura 9.** Severidade de brusone em espigas de trigo cv. Sossego inoculadas ou não com *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (PoTl), e isolados de *Pseudomonas* (Amana, Poti e Yara) e *Trichoderma* (Cachara, Jaú e Jurupoca) como potenciais agentes de biocontrole.....28
- Figura 10.** Espigas de trigo cv. Sossego inoculadas ou não com *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (PoTl), e tratadas com potenciais agentes de biocontrole, que incluíram *Pseudomonas* spp. (Amana, Poti e Yara) (A-B-C-H-I-J) e *Trichoderma* spp. (Cachara, Jaú e Jurupoca) (D-E-F-K-L-M). M: Controle negativo. N: Espiga inoculada apenas com PoTl.....29
- Figura 11.** Formação de biofilme por bactérias *Pseudomonas putida* ‘Amana’ (Pp) em teste de antagonismo *in vitro* contra *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (Ps) em meio BDA (A-D).....30

Figura 12. Antagonismo direto <i>in vitro</i> de <i>Pseudomonas</i> spp. (Ps) contra <i>Pyricularia oryzae</i> linhagem <i>Triticum</i> (Py) em meio BDA. (A–C): <i>Pseudomonas</i> spp. Poti (Ps); (D–F): <i>Pseudomonas putida</i> Yara (Pp).....	31
Figura 13. Conídios e hifas do fungo <i>Trichoderma koningiopsis</i> ‘Cachara’ (Tk) em meio de cultura BDA.....	31
Figura 14. Aparelho analisador de gás infravermelho (IRGA): parte do equipamento utilizado para a medição da taxa fotossintética líquida, da condutância estomática, da transpiração e da concentração de CO ₂ interno nas folhas de trigo.....	38
Figura 15. Súmula do teste de média do experimento com a cultivar IPR Catuara inoculadas ou não com <i>Pyricularia oryzae</i> linhagem <i>Triticum</i> (PoTl) e tratadas com o agente de biocontrole <i>Pseudomonas putida</i> ‘Amana’ (formulado com bentonita), para as variáveis: severidade da brusone em espigas de trigo, taxa fotossintética líquida, clorofila a, clorofila b, clorofila a+b, altura de plantas, tamanho de espigas, grãos por espiga, massa total de grãos e porcentagem de grãos chochos.....	42
Figura 16. Espigas de trigo cv. IPR Catuara inoculadas ou não com <i>Pyricularia oryzae</i> linhagem <i>Triticum</i> (PoTl), e agente de biocontrole <i>Pseudomonas putida</i> Amana formulada em bentonita.....	43
Figura 17. Súmula do teste de média do experimento com a cultivar IPR Catuara inoculadas ou não com <i>Pyricularia oryzae</i> linhagem <i>Triticum</i> (PoTl) e tratadas com o agente de biocontrole <i>Pseudomonas putida</i> ‘Amana’ (formulado com bentonita), para a atividade enzimática de glucanase (GLU), peroxidase (POX) e quitinase (QUI), em dois tempos de coleta (48h e 72h) no experimento de bioformulado à base de <i>Pseudomonas putida</i> ‘Amana’ e bentonita.....	45
Figura 18. Súmula dos resultados do teste de média do experimento com a cultivar IPR Catuara inoculadas ou não com <i>Pyricularia oryzae</i> linhagem <i>Triticum</i> (PoTl) e tratadas com o agente de biocontrole <i>Trichoderma koningiopsis</i> Cachara (formulação natural com milheto), para as variáveis: severidade da brusone em espigas de trigo, clorofila a, clorofila b, clorofila a+b, altura de plantas, tamanho de espigas, grãos por espiga, massa total de grãos e porcentagem de grãos chochos.....	56
Figura 19. Espigas de trigo cv. IPR Catuara inoculadas ou não com <i>Pyricularia oryzae</i> linhagem <i>Triticum</i> (PoTl), e agente de biocontrole <i>Trichoderma koningiopsis</i> ‘Cachara’ associado ou não a milheto.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados da identidade dos antagonistas bacterianos e fúngicos utilizados neste estudo.....	18
Tabela 2. Análise de variância dos dados do antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Pseudomonas</i> spp. como agentes de biocontrole contra <i>Pyricularia oryzae</i> linhagem <i>Triticum</i>	23
Tabela 3. Análise de variância dos dados do antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp. como agentes de biocontrole contra <i>Pyricularia oryzae</i> linhagem <i>Triticum</i>	25
Tabela 4. Análise de variância do potencial de biocontrole de <i>Pseudomonas</i> e <i>Trichoderma</i> na redução da severidade de brusone em espigas de trigo cv. Sossego.....	28
Tabela 5. Súmula do quadro de ANAVA com os valores de <i>F</i> _c e significância do Teste <i>F</i> para os experimentos com a cultivar IPR Catuara inoculadas ou não com <i>Pyricularia oryzae</i> linhagem <i>Triticum</i> (<i>PoTl</i>) e tratadas com o agente de biocontrole <i>Pseudomonas putida</i> Amana (formulado com bentonita), para as variáveis: severidade da brusone em espigas de trigo, taxa fotossintética líquida (TFL), clorofila a, clorofila b, clorofila a+b, altura de plantas, tamanho de espigas, grãos por espiga, massa total de grãos e porcentagem de grãos chochos.....	41
Tabela 6. Súmula dos Quadros de Análise de Variância com os valores de <i>F</i> _c e a significância do teste <i>F</i> dos dados de atividade enzimática de glucanase (GLU), peroxidase (POX) e quitinase (QUI), em dois tempos de coleta (48h e 72h) no experimento de bioformulado à base <i>Pseudomonas</i> e bentonita.....	44
Tabela 7. Súmula do quadro de ANAVA com os valores de <i>F</i> _c e significância do Teste <i>F</i> para os experimentos com a cultivar IPR Catuara inoculadas ou não com <i>Pyricularia oryzae</i> linhagem <i>Triticum</i> (<i>PoTl</i>) e tratadas com o agente de biocontrole <i>Trichoderma koningiopsis</i> Cachara (formulação natural com milheto), para as variáveis: severidade da brusone em espigas de trigo, clorofila a, clorofila b, clorofila a+b, altura de plantas, tamanho de espigas, grãos por espiga, massa total de grãos e porcentagem de grãos chochos.....	55
Tabela 8. Súmula dos Quadros de Análise de Variância com os valores de <i>F</i> _c e a significância do teste <i>F</i> dos dados de atividade enzimática de glucanase (GLU), peroxidase (POX) e quitinase (QUI), em dois tempos de coleta (48h e 72h) no experimento de bioformulado à base de <i>Trichoderma</i> e milheto.....	58

Sumário

Capítulo 1: Potencial de <i>Pseudomonas</i> e <i>Trichoderma</i> como agentes de biocontrole da brusone do trigo na cultivar Sossego	6
1.1. Introdução	14
1.2. Revisão Bibliográfica	15
1.3.0. Materiais e métodos.....	17
1.3.1. Teste de confronto <i>in vitro</i> entre o patógeno da brusone e <i>Pseudomonas</i> como agente de biocontrole	18
1.3.2. Teste de confronto <i>in vitro</i> entre o patógeno da brusone e de <i>Trichoderma</i> como agente de biocontrole.....	19
1.3.3. Avaliação do potencial de <i>Pseudomonas</i> e <i>Trichoderma</i> na redução da severidade da brusone em espigas de trigo na cultivar TBIO Sossego	20
1.3.4. Estudo da interação agente de biocontrole-patógeno-planta por meio de microscopia eletrônica de varredura.	22
1.4.0. Resultados e Discussão.....	23
1.4.1. Experimento de antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Pseudomonas</i> à <i>PoTl</i>	23
1.4.2. Experimento de antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> à <i>PoTl</i>	25
1.4.3. Experimento para avaliação do potencial de biocontrole <i>in vivo</i> de <i>Pseudomonas</i> e <i>Trichoderma</i> na redução da severidade de brusone em plantas de trigo.....	27
1.4.4. Estudo da interação agente de biocontrole-patógeno-planta por meio de microscopia eletrônica de varredura.	30
1.5. Conclusão	32
Capítulo 2: Potencial de bioformulado a base de <i>Pseudomonas</i> e bentonita no controle biológico da brusone do trigo cv. IPR Catuara	33
2.1. Introdução	35
2.2.0. Materiais e Métodos.	36
2.2.1. Experimento de bioformulado de bentonita a base de <i>Pseudomonas putida</i> ‘Amana’.	

2.2.2. Avaliação da redução da severidade dos sintomas de brusone em espigas de trigo.

37

2.2.3. Avaliações de alterações morfológicas em espigas..... 37

2.2.4. Avaliação fisiológica da atividade fotossintética em folhas utilizando IRGA.... 38

2.2.5. Avaliação fisiológica em folhas para determinação do teor de clorofila. 38

2.2.6. Determinação da atividade enzimática de glucanase (GLU), peroxidase (POX) e quitinase (QUI), em dois tempos de coleta 48 horas e 72 horas, no experimento de bioformulado à base de *Pseudomonas* e bentonita..... 39

2.3.0. Resultados e Discussão...... 40

2.3.1. Teste de bioformulado a base de *Pseudomonas* e bentonita quanto ao potencial de redução da severidade da brusone em espigas de trigo. 40

2.3.2. Determinação da atividade enzimática de glucanase (GLU), peroxidase (POX) e quitinase (QUI), em dois tempos de coleta 48 horas e 72 horas, nos experimentos de bioformulado à base de *Pseudomonas* e bentonita..... 44

2.4. Conclusão 46

Capítulo 3: Potencial de formulado natural a base de *Trichoderma* e milho no controle biológico da brusone do trigo cv. IPR Catuara 47

3.1. Introdução 49

3.2. Materiais e Métodos. 50

3.2.1. Experimento de bioformulado natural de milho a base de *Trichoderma koningiopsis* ‘Cachara’ no biocontrole da brusone do trigo. 50

3.2.2. Avaliação da redução da severidade dos sintomas de brusone em espigas..... 51

3.2.3. Avaliações de alterações morfológicas em espigas..... 52

3.2.4. Avaliação fisiológica para determinação do teor de clorofila em folhas. 52

3.2.5. Determinação da atividade enzimática de glucanase (GLU), peroxidase (POX) e quitinase (QUI), em dois tempos de coleta 48 horas e 72 horas, no experimento de bioformulado à base de *Trichoderma* e milho..... 52

3.3. Resultados e Discussão...... 54

3.3.1. Experimento de bioformulado a base de *Trichoderma* associado à milho quanto ao potencial de redução da severidade da brusone em espigas de trigo..... 54

3.3.2. Determinação da atividade enzimática de glucanase (GLU), peroxidase (POX) e quitinase (QUI), em dois tempos de coleta 48 horas e 72 horas, nos experimentos de bioformulado à base de <i>Trichoderma</i> e milho.....	58
3.4. Conclusão	59
4.0. Referências bibliográficas	59

1.1. Introdução

A brusone é uma das mais importantes doenças do trigo, podendo causar perdas de até 100% nas lavouras (DUVEILLER, 2016), por ser de difícil controle, tornando importante conhecer seu desenvolvimento em diferentes cultivares e condições ambientais (URASHIMA; KATO, 1994).

A etiologia do agente causal da brusone do trigo foi recentemente proposta como *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (PoTl) (GLADIEUX et al. 2018). O fitopatógeno ataca as espigas e espiguetas destruindo os tecidos vegetais a partir do ponto de penetração resultando em descoloração esbranquiçada e chochamento. Esporadicamente pode ocorrer também manchas foliares (COELHO et al., 2016; GOULART et al., 2007).

As estratégias recomendadas para o manejo da brusone baseiam-se no uso de fungicidas aplicados na parte aérea, alteração da época de semeadura para não coincidir com condições favoráveis à doença, e na diversificação regional de cultivares, com base na predominância diferencial de grupos de virulência do patógeno (CERESINI et al. 2018). Entretanto, a eficácia de fungicidas sistêmicos de modo de ação específico (como estrobilurinas e triazóis) é considerada baixa devido à distribuição generalizada da resistência no país (CASTROAGUDIN et al. 2015, POLONI et al. 2021). Considerando a indisponibilidade de resistência varietal estável e a ineficácia dos fungicidas sistêmicos, o manejo biológico da brusone do trigo é, possivelmente, a única alternativa sustentável para minimizar o impacto das perdas de produção causadas pelo patógeno no trigo. Por esse motivo, o desenvolvimento de biofungicidas é considerado iniciativa de elevada importância para o manejo eficaz da brusone do trigo. Ainda não há quaisquer produtos biofungicidas registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para manejo da brusone do trigo no Brasil.

No controle biológico de doenças, existem diversas formulações a base de microrganismos, como fungos (EL-KATATNY et al. 2000) e bactérias (HADDAD et al. 2009; HALFELD-VIEIRA et al. 2004; MIZUBUTI et al. 1995; ROMEIRO et al. 2000), os quais têm sido estudados para o controle de patógenos nas mais diferentes culturas. A maioria dos relatos sobre o uso de antagonistas para o controle de doenças induzidas por fungos fitopatogênicos apresenta diversas espécies do gênero *Trichoderma* como muito promissoras entre os agentes de biocontrole (SILVA et al., 2015; KONG, HONG, 2017; YU, LOU, 2020; RUANGWONG et al., 2021). A maioria das espécies de *Pseudomonas* que apresentam a capacidade de atuar no biocontrole de fitopatógenos pertencem ao grupo fluorescente, tendo destaque as espécies *P.*

fluorescens e *P. putida*, que também estão relacionadas com a promoção do crescimento em plantas (KLOEPPER et al. 1980; FERREIRA et al. 2009).

A preocupação da sociedade com o impacto da agricultura no ambiente e com a contaminação da cadeia produtiva alimentar com agrotóxicos está alterando o cenário da produção agrícola atual, da qual passa a se exigir que atenda critérios mínimos de segurança alimentar da população. O desenvolvimento de biofungicidas vem atender a essa demanda crescente da sociedade moderna por maior segurança alimentar dos produtos de origem agrícola (BETTIOL, 2008).

Diante da situação exposta, o presente estudo visa avaliar o potencial de dois grupos de microrganismos antagonistas para biocontrole do patógeno *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum*, agente causal da brusone do trigo, sendo um a base de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* obtidas de solos da Amazônia, e o outro de fungos do gênero *Trichoderma* obtidos do mesmo bioma. O objetivo geral deste estudo foi avaliar se os fungos do gênero *Trichoderma* e as bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* possuem capacidade de controlar a brusone do trigo no Brasil.

Especificamente, objetivou-se:

- i. avaliar três isolados do gênero *Pseudomonas* e três do gênero *Trichoderma* quanto ao antagonismo contra *Pyricularia oryzae* *Triticum* lineage *in vitro*;
- ii. avaliar bactérias *Pseudomonas* e fungos *Trichoderma* quanto ao potencial de biocontrole de brusone do trigo em condições de casa de vegetação;
- iii. descrever as interações ultra-estruturais entre agentes de biocontrole, patógeno e planta por meio de microscopia eletrônica de varredura.

1.2. Revisão Bibliográfica

1.2.1. A brusone do trigo

As doenças estão entre os fatores que mais têm limitado a produtividade na triticultura brasileira, sendo favorecidas pelo excesso de chuvas (com períodos longos e frequentes de molhamento foliar, também proporcionado por irrigação) e temperaturas elevadas (GOULART et al. 2001). Segundo Goulart et al. (2004), num período de cinco anos de avaliações, em Mato Grosso do Sul, registrou perdas médias na produtividade de grãos do trigo devido ao ataque de *P. graminis-tritici*, da ordem de 32%. Estes autores observaram ainda, dependendo da época de infecção, perdas em peso por espiga, de até 74%.

As estratégias recomendadas para o seu controle baseiam-se no uso de fungicidas aplicados em parte aérea, época de semeadura e na diversificação de cultivares, dando preferência àquelas menos suscetíveis (GOULART *et al.* 2007). Atualmente, pela ausência de variedades de trigo com resistência varietal estável (CERESINI *et al.*, 2018), o manejo da doença é baseado principalmente em controle químico, com intensa aplicação de fungicidas. No entanto, a eficiência de moléculas com sítios de ação específicos vem sendo comprometida devido à seleção de populações de fungos resistentes às principais classes químicas utilizadas no manejo da doença, como estrobilurinas, triazóis e SDHIs (CASTROAGUDIN *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2015; PAGANI *et al.*, 2014; POLONI, 2016; CASADO, 2017). Para o patossistema *P. graminis-tritici* - trigo, vários estudos demonstram que é baixa a eficiência dos fungicidas no controle da doença, principalmente pela dificuldade de atingir o alvo na espiga (ROCHA *et al.*, 2014).

1.2.2. Controle biológico

A preocupação da sociedade com o impacto da agricultura no ambiente e a contaminação da cadeia alimentar com agrotóxicos está alterando o cenário agrícola, resultando em mercados de alimentos produzidos sem o uso de agrotóxicos ou aqueles que garantem que os agrotóxicos foram utilizados adequadamente. Esses aspectos estão fazendo que a situação do uso dos agrotóxicos permeie a agenda ambiental de diversos países (BETTIOL, 2008). Entretanto, apenas a substituição de um produto químico por um biológico não é a situação adequada, mas sim caminhar para o desenvolvimento de sistemas de cultivo mais sustentáveis e, portanto, menos dependentes do uso de agrotóxicos. O conceito de agricultura sustentável envolve o manejo adequado dos recursos naturais, evitando a degradação do ambiente de forma a permitir a satisfação das necessidades humanas das gerações atuais e futuras (BIRD *et al.*, 1990).

Controle biológico

Nesse contexto, uma das estratégias alternativas recomendadas no manejo integrado de doenças de plantas e que pode diminuir o impacto ecológico-ambiental do uso de fungicidas na agricultura é o controle biológico (BETTIOL e MORANDI, 2009). Os agentes de biocontrole podem atuar diretamente, indiretamente e também pela indução de mecanismos de defesa das plantas no controle de doenças fúngicas de plantas (DOOHAN, 2005).

No controle biológico de doenças, diversos microrganismos, como fungos (EL-KATATNY *et al.*, 2000) e bactérias (HADDAD *et al.*, 2009; HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2004; MIZUBUTI *et al.*, 1995; ROMEIRO *et al.*, 2000) têm sido estudados para o controle de patógenos nas mais diferentes culturas. Vários fungos já foram estudados quanto o seu potencial

como agentes de biocontrole para a brusone do arroz, os quais possivelmente atuem também contra a brusone do trigo (CERESINI et al., 2018). Dentre as espécies já estudadas, podem ser mencionadas *Chaetomium globosum* (PARK et al., 2005), *Cladosporium* sp. (CHAIBUB et al., 2016), *Epicoccum* sp. (SENA et al., 2013), *Sarocladium oryzae* (CÔRTEZ et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2017), *Trichoderma asperellum* (SOUSA et al., 2018), *Trichoderma harzianum* (SINGH et al., 2012), e *Waitea circinata* (CARVALHO et al., 2015).

Park et al. (2005) verificaram reduções maiores que 80% na severidade da brusone em folhas de arroz quando utilizaram $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do metabólito purificado chaetoviridina A produzida por *Chaetomium globosum* F0142 endofítico isolado de *Eragrotis*. Quando o isolado de *Cladosporium* sp. C24 foi aplicado antes ou após inoculação com *P. oryzae* em folhas de arroz cv. Primavera em casa de vegetação, Chaibub et al. (2016) observaram significativo aumento na atividade de enzimas de defesa vegetal como quitinase (CHI), β -1,3-glucanase (GLU), fenilalanina amônia-liase (PAL), lipoxigenase (LOX) e peroxidase (POX), além de suprimir a severidade da brusone em cerca de 85 e 77%, respectivamente. Além disso, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi observada a colonização superficial do agente de biocontrole nas folhas de arroz, onde o antagonismo resultou em deformidades de conídios e apressórios de *P. oryzae*.

1.3.0. Materiais e Métodos

Para todos os estudos desta pesquisa foram utilizados microrganismos do gênero *Pseudomonas* e *Trichoderma* que foram selecionados como potenciais agentes de biocontrole da queima foliar e morte de pastagens causadas pelo fungo basidiomiceto *Rhizoctonia solani* AG-1 IA em gramíneas forrageiras da espécie *Urochloa brizantha* (NUNES 2019; VICENTINI 2018) (Tabela 1).

Tabela 1. Dados da identidade dos antagonistas bacterianos e fúngicos utilizados neste estudo.

Isolado	Espécie	Referência
Amana	<i>Pseudomonas putida</i>	Vicentini (2018)
Poti	<i>Pseudomonas</i> sp. nov.	Vicentini (2018)
Yara	<i>Pseudomonas putida</i>	Vicentini (2018)
Cachara	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	Nunes (2019)
Jaú	<i>Trichoderma virens</i>	Nunes (2019)
Jurupoca	<i>Trichoderma lentiforme</i>	Nunes (2019)

Fonte: próprio autor.

1.3.1. Teste de confronto *in vitro* entre o patógeno da brusone e *Pseudomonas* como agente de biocontrole

As colônias de *PoTl* foram repicadas em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA, 20,8 g.L⁻¹ de batata dextrose, 15 g.L⁻¹ ágar) com adição de cloranfenicol e estreptomicina (50 µg mL⁻¹ de cada) e incubadas em BOD a 28 ± 0,2 °C por 15 dias a 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

Os três isolados dos antagonistas do gênero *Pseudomonas* spp. (Amana, Poti e Yara) foram ativadas em meio de cultura Luria-Bertani líquido (20 g L⁻¹ de LB) em shaker por 12h a 28°C e 200 rpm, mediu-se a O.D (densidade ótica) e uniformizando-as para OD₆₂₀= 0,8. O experimento foi estabelecido em delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições, pelo pareamento entre 3 isolados de *PoTl* (12.1.146, 12.1.207,12.1.047) usando discos de colônias miceliais de 7 mm de diâmetro, e 3 bactérias antagonistas do gênero *Pseudomonas* (o inóculo consistiu de 1 mL de meio líquido LB contendo o antagonista) em placas de Petri contendo meio King B, posicionados em lados opostos a 0,5 cm da borda. Incluiu-se testemunha negativa (meio de LB, apenas) onde não se aplicou as bactérias antagonistas. Os pareamentos entre *PoTl* e os antagonistas foram incubadas por 7 dias a 25°C.

A avaliação do crescimento micelial de *PoTl* foi realizada, por medição com régua, sete dias após os pareamentos. O crescimento micelial do fitopatógeno, C, em porcentagem, foi obtido pela metodologia adaptada de Camporota (1985), em que: $C = DT/DE \times 100$, sendo DT, o raio de crescimento da colônia de *PoTl* em direção frontal ao agente de biocontrole, *Pseudomonas* e DE, a distância que separa as duas colônias. Os dados foram analisados aplicando-se o teste *F*, para se detectar a significância do efeito de tratamentos e ao teste Tukey a 5% para a comparação entre médias. O experimento foi repetido uma vez.

1.3.2. Teste de confronto *in vitro* entre o patógeno da brusone e de *Trichoderma* como agente de biocontrole

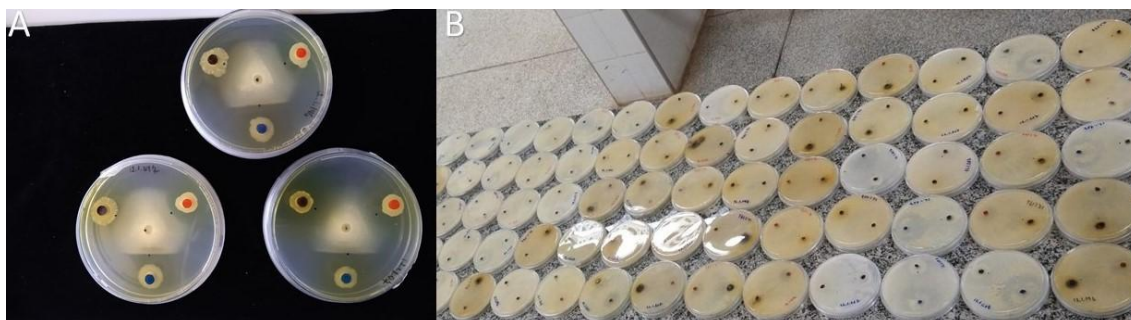
As colônias de *PoTl* foram inicialmente reativadas em meio de cultura BDA com adição de cloranfenicol e estreptomicina como descrito no item 3.1 e incubadas em BOD a $28 \pm 0,2$ °C por 15 dias a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Para produção de inóculo de *PoTl*, os isolados foram também cultivados em meio de cultura BDA com cloranfenicol e estreptomicina, nas mesmas condições de cultivo, por 3 dias.

Isolados de *Trichoderma* spp. (NUNES, 2019) foram inicialmente reativados e depois cultivados para produção de inóculo também em meio BDA com cloranfenicol e estreptomicina e incubados a 25 °C com 12 horas fotoperíodo por 5 dias.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com os seguintes tratamentos: os 3 isolados de *PoTl* (12.1.146, 12.1.207, 12.1.047) foram pareados com os 3 isolados dos fungos antagonistas *Trichoderma koningiopsis* ‘Cachara’, *T. virens* ‘Jaú’ e *T. lentiforme* ‘Jurupoca. Incluiu-se uma testemunha negativa onde não se aplicou os fungos antagonistas. O experimento de antagonismo *in vitro* foi estabelecido pelo pareamento entre discos de micélio de 4 mm de *PoTl* e *Trichoderma* posicionados em lados opostos a 0,5 cm da borda de placas de Petri, com 4 repetições.

A avaliação do crescimento micelial de *PoTl* foi realizada, por medição com régua(mm), sete dias após os pareamentos. O crescimento micelial do fitopatógeno, C, em porcentagem, foi obtido aplicando-se metodologia adaptada de Camporota (1985), em que: $C = DT/DE \times 100$, sendo DT, o raio de crescimento da colônia de *PoTl* em direção frontal à colônia do *Trichoderma* e DE, a distância que separa as duas colônias. Os dados foram analisados aplicando-se o teste *F*, para detectar a significância do efeito de tratamentos, e o teste Tukey a 5% para a comparação entre médias. O experimento foi repetido uma vez.

Figura 1. (A) Experimento de confronto *in vitro* entre o patógeno *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (*PoTl*) e agentes de biocontrole do gênero *Pseudomonas*. (B) Visão geral do experimento de confronto *in vitro* de (*PoTl*) e agentes de biocontrole do gênero *Trichoderma*.



Fonte: próprio autor.

1.3.3. Avaliação do potencial de *Pseudomonas* e *Trichoderma* na redução da severidade da brusone em espigas de trigo na cultivar TBIO Sossego

Plantas de trigo cv. TBIO Sossego (Biotrigo Genética) foram cultivadas a partir da semeadura de três sementes, sem tratamento, em vasos com capacidade de 700 mL contendo substrato para plantas Topstrato HT Hortalças, com irrigação diária e a cada 20 dias fertilizadas com formulado N-P-K (10-10-10), em casa de vegetação, desbaste feito 15 DAE deixando apenas três plantas/vaso.

Figura 2. Experimento ainda em casa de vegetação, com plantas aos 60 DAE, antes de ser levado para a câmara climatizada onde foram tratadas com o agente de biocontrole *Pseudomonas putida* ‘Amana e inoculadas com *PoTl*.



Fonte: próprio autor.

Os isolados de *Pseudomonas* spp. (VICENTINI, 2018) (Tabela 1) foram cultivados em erlenmeyers contendo 20 mL de meio de cultura LB líquido, mantidos a 28 °C sob agitação a 190 rpm durante 16h e a concentração de bactérias ajustada para $6,2 \times 10^8$ ufc mL⁻¹ (DO₆₂₀ = 0,8); posteriormente centrifugação por 15 minutos a 5000 rpm para separação da bactéria do meio LB e por escorrimento retirado o meio e acrescentada água autoclavada resultando na suspensão de bactérias.

Já os isolados de *Trichoderma* spp. (NUNES, 2019) (Tabela 1) foram reativados em BDA com cloranfenicol e estreptomicina e incubados a 25 °C com 12 horas fotoperíodo por 7 dias. Os esporos foram coletados utilizando água destilada e tween 20 a 0,01%. A suspensão de conídios foi calibrada utilizando-se câmara de Neubauer para cerca de 10^9 conídios mL⁻¹.

Figura 3. (A) Suspensão de esporos de *Trichoderma* e recipientes utilizados para inoculação do agente de biocontrole fúngico à base de *Trichoderma* spp. em plantas de trigo. (B) Visão geral do experimento em casa de vegetação antes do tratamento com agentes de biocontrole e inoculação do patógeno da brusone e plantas de trigo.



Fonte: próprio autor.

O inóculo do patógeno *PoTl* foi obtido por indução de esporulação em 150 placas de Petri sendo, 75 em meio de aveia (60 g L⁻¹ de farinha de aveia, 15 g L⁻¹ ágar) e 75 em meio de arroz (15g L⁻¹ de farelo de arroz, 15 g L⁻¹ de aveias flocos finos, 5 g L⁻¹ de dextrose, 20 g L⁻¹ de ágar) com adição de cloranfenicol e estreptomicina (50 mg mL⁻¹ de cada). As placas foram incubadas por 15 dias a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Coletou-se conídios do patógeno produzidos em ambos os meios de cultura. Preparou-se a suspensão mista de inóculo do patógeno que incluiu os isolados de *PoTl* 12.1.146, 12.1.207, 12.1.047. A suspensão de conídios foi calibrada utilizando-se câmara de Neubauer para cerca de 10⁴ conídios mL⁻¹, preparada com água destilada e tween 20 a 0,01%, e aplicada por meio de pulverização com alvo às folhas e espigas de trigo.

Inicialmente, aplicou-se em toda a planta os agentes de biocontrole em plantas de trigo 60 dias após a emergência, no estágio de espigamento, código 10,5 (ZADOCKS, et al. 1974), 7 dias antes da inoculação do patógeno. Foram aplicados os seguintes tratamentos: (1) Amana; (2) Poti; (3) Yara; (4) Cachara; (5) Jaú; (6) Jurupoca; (7) Amana+*PoTl*; (8) Poti+*PoTl*; (9) Yara+*PoTl*; (10) Cachara+*PoTl*; (11) Jaú+*PoTl*; (12) Jurupoca+*PoTl*; (13) Controle negativo (sem *PoTl*); (14) Controle positivo (+*PoTl*).

Após a aplicação dos agentes de biocontrole as plantas foram colocadas em uma câmara de crescimento com nebulização por 24 horas sob temperatura de 25°C, umidade relativa ajustada para 90%, no escuro. Após esse período, restabeleceu-se o fotoperíodo de 12 h. Sete dias depois, inoculou-se o patógeno, e as plantas foram mantidas em câmara de crescimento por mais 14

dias nas mesmas condições de incubação e fotoperíodo de 12 horas, e então realizou-se a avaliação.

Figura 4. Experimento em condições de câmara de crescimento com plantas já tratadas com agentes de biocontrole e já inoculadas com o patógeno.



Fonte: próprio autor.

A avaliação da severidade dos sintomas de brusone foi realizada 14 dias após a inoculação, onde fotografou-se digitalmente as espigas e determinando-se a área infectada com o auxílio do software de análise de imagens Assess da APS (ASSESS: Image Analysis Software for Plant Disease Quantification, Department of Plant Science, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canadá) (LAMARI, 2008).

Os dados foram analisados aplicando-se o teste *F*, para detectar a significância do efeito de tratamentos, e o teste de Scott-Knott a 5% para a comparação entre médias. O experimento foi repetido uma vez.

1.3.4. Estudo da interação agente de biocontrole-patógeno-planta por meio de microscopia eletrônica de varredura

Fragmentos de cerca de 0,25 cm² de folhas e ráquis de espigas de trigo foram coletadas e fixadas em FAA 70 (JOHANSEN, 1940) e armazenadas sob refrigeração. As amostras

correspondem a: Amana x (*PoTl*) (1); Poti x (*PoTl*) (2); Yara x (*PoTl*)(3); *Trichoderma spp.* x *PoTl*(4).

Foram desidratadas em série etílica (70, 80, 90 e 99,5 %) e secas em ponto crítico e metalizadas com ouro. As imagens foram geradas utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss EVO/LS15 no Departamento de Física de Química (DFQ – Unesp/Ilha Solteira). Por meio destas análises foi possível determinar o potencial de colonização dos agentes de biocontrole no hospedeiro e verificar se há interações de parasitismo com o *PoTl*.

1.4.0. Resultados e Discussão

Inicialmente, isolados de *Pseudomonas* e *Trichoderma* foram avaliados quanto ao antagonismo ao agente casual *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* por meio de experimentos *in vitro* e quanto ao potencial de biocontrole da brusone do trigo *in vivo*. Posteriormente, com base nesses resultados, foram selecionados os isolados de *Pseudomonas putida* ‘Amana’ e *Trichoderma koningiopsis* ‘Cachara’ para as etapas subsequentes de formulação e respectivos testes de eficácia no controle da brusone.

1.4.1. Experimento de antagonismo *in vitro* de *Pseudomonas* à *PoTl*

O crescimento micelial de isolados de *PoTl* foi reduzido significativamente ($p \leq 0,05$) pelos três isolados de *Pseudomonas* spp. avaliados (Tabela 2, Figuras 5-6). Dentre estes, o isolado ‘Amana’ resultou na maior inibição do crescimento relativo do patógeno, com percentual de 48 a 67%.

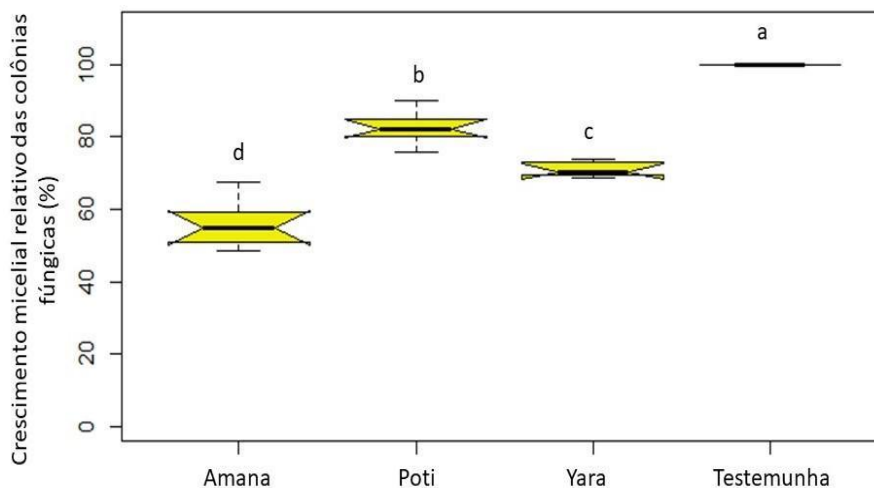
Tabela 2. Análise de variância dos dados do antagonismo *in vitro* de *Pseudomonas* spp. como agentes de biocontrole contra *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum*.

Fonte de variação	Graus de liberdade	SQ	QM	Fc	p
Tratamento	3	8381,53	2793,84	180,60	0,0000 *
Erro	28	433,16	15,47		
Total	31	8814,69			
CV(%):	5,09				

Fonte: próprio autor.

* Significativo pelo teste F a $p \leq 0,05$ e não significativo (NS). O experimento foi repetido uma vez.

Figura 5. Distribuição *boxplot* do crescimento micelial relativo de *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (PoTl) submetidos ao antagonismo *in vitro* de três isolados de *Pseudomonas* spp. contra o patógeno.

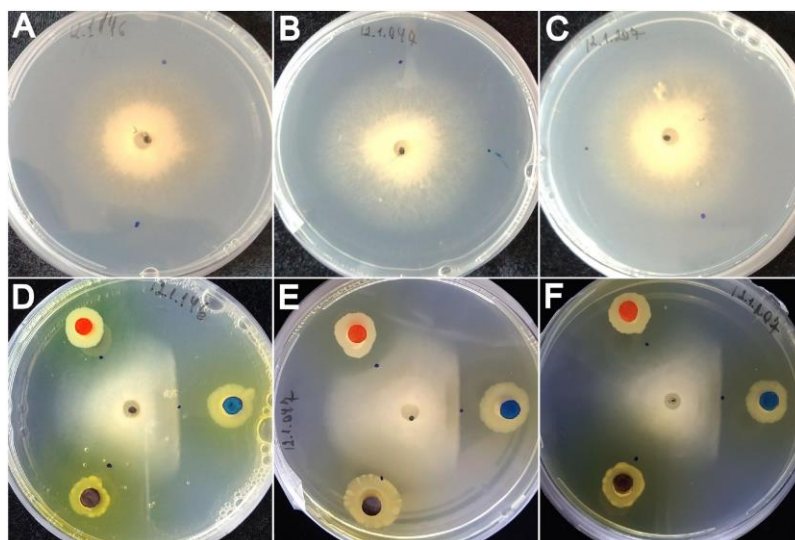


Fonte: próprio autor.

* Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a $p \leq 0,05$. O experimento foi repetido uma vez.

Vicentini (2018) também observou a capacidade de *P. putida* 'Amana' na inibição do crescimento micelial *in vitro* do fungo basidiomiceto *R. solani* AG-1 IA, assim como redução da severidade da queima da folha da braquiária tanto por aplicação do antagonista via sementes quanto pela pulverização da parte aérea com suspensão do agente de biocontrole. Em análises complementares detectou-se que *P. putida* 'Amana' possui alta atividade de protease, quitinase e fosfatase, e produção de sideróforos (Vicentini e colaboradores, informação pessoal; manuscrito em preparação para submissão à *Plant Pathology*). Isso demonstra o potencial desse agente de biocontrole em exercer antagonismo contra diferentes fitopatógenos, de forma direta, pela produção de metabólitos anti-fungos, ou de forma indireta, pela promoção de crescimento das plantas (FERREIRA et al., 2009). Dentre os metabólitos conhecidos produzidos por *Pseudomonas* fluorescentes antagonistas a fitopatógenos, podem ser mencionados o ácido fenazina-1-carboxílico (PCA), 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), piroluteorina, e pirrolnitrina (VELUSAMY; GNANAMANICKAM, 2008).

Figura 6. Antagonismo *in vitro* de *Pseudomonas* spp. contra *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (*PoTl*). A–C: isolados de *PoTl* (12.1.146, 12.1.207, 12.1.047). D–F: Isolados de *P. putida* Amana (marca azul), *Pseudomonas* sp. nov Poti (marca preta) e *P. putida* Yara (marca vermelha) pareados com *PoTl* (colônia no centro).



Fonte: próprio autor.

1.4.2. Experimento de antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* à *PoTl*

Detectou-se diferenças significativas ($p \leq 0,05$) na inibição do crescimento micelial de *PoTl* pelos três isolados de *Trichoderma* testados (Tabela 3, Figuras 7-8). Os agentes de biocontrole *T. koningiopsis* ‘Cachara’ e *T. lentiforme* ‘Jurupoca’ promoveram a maior inibição do crescimento micelial relativo de *PoTl*, não diferindo significativamente entre si. *Trichoderma virens* ‘Jaú’ também inibiu consideravelmente o crescimento micelial relativo de *PoTl*.

Tabela 3. Análise de variância dos dados do antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole contra *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum*.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Fc	p
Tratamento	3	33858,42	11286,14	1287,57	0,0000*
Erro	28	245,43	8,77		
Total	31				
CV(%):	6,20				

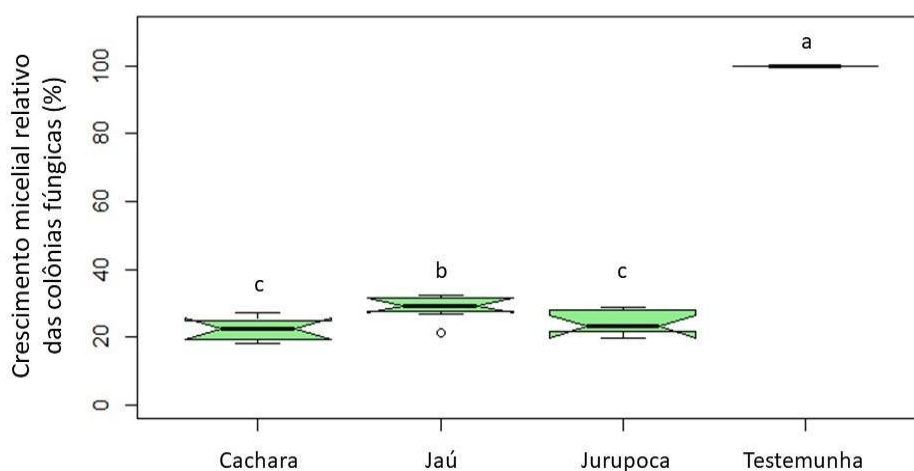
Fonte: próprio autor.

*Significativo pelo teste F a $p \leq 0,05$ e não significativo (^{NS}). O experimento foi repetido uma vez.

Essa atividade antagonística pode ser resultado da produção de metabólitos, como ácido harziânico, alameticinas e tricolinas, além da atividade de enzimas líticas, como quitinases,

glucanases e proteases (BENITEZ et al. 2004; MONTEIRO et al. 2010; MORÁN-DIEZ et al. 2009). Além disso, o parasitismo de *Trichoderma* sobre o patógeno pode envolver a formação de estruturas de ganchos, penetração, enovelamento, ou hifas paralelas (ABDULLAH et al., 2008; ZHANG et al., 2016), o que é observado por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

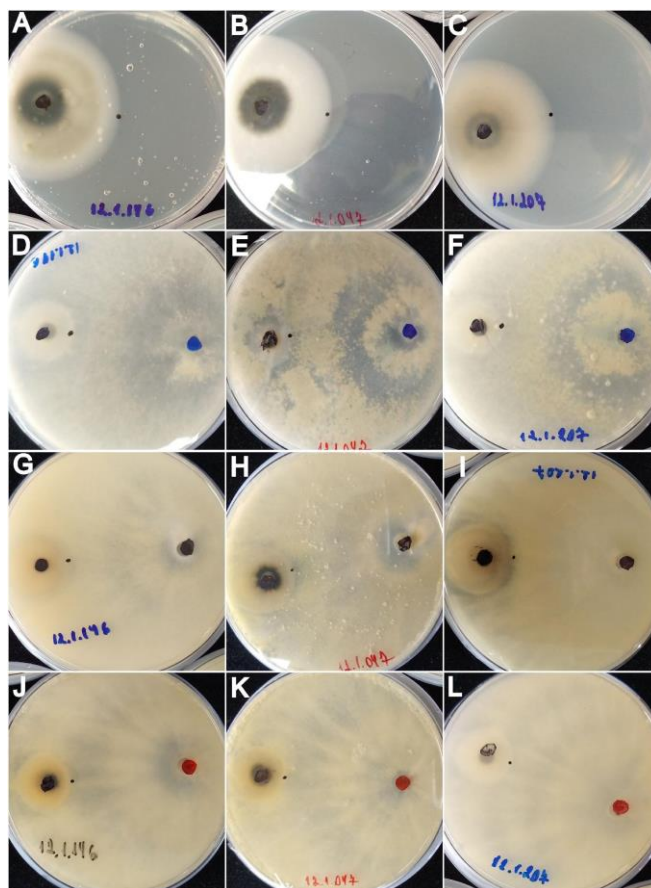
Figura 7. Distribuição *boxplot* do crescimento micelial relativo de *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (PoTl) submetidos ao antagonismo *in vitro* de três isolados de *Trichoderma* spp. contra isolados do patógeno.



Fonte: próprio autor.

* Médias seguidas pela mesma não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a $p \leq 0,05$.

Figura 8. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (*PoTl*). A–C: isolados de *PoTl* (12.1.146, 12.1.207 e 12.1.047). A–C: isolados do patógeno, apenas. Isolados de *PoTl* pareados com isolados de *T. koningiopsis* ‘Cachara’ (D–F), *Trichoderma virens* ‘Jau’ (G–I) e *T. lentiforme* ‘Jurupoca’ (J–L).



Fonte: próprio autor.

1.4.3. Experimento para avaliação do potencial de biocontrole *in vivo* de *Pseudomonas* e *Trichoderma* na redução da severidade de brusone em plantas de trigo

Neste experimento, foram avaliados três isolados de *Pseudomonas* e três isolados de *Trichoderma*, para selecionar o mais eficaz em aplicação na parte aérea, dentro de cada grupo de organismos, na redução da severidade de brusone de plantas de trigo cv. Sossego. Foram utilizadas suspensões de células bacterianas ou de conídios dos agentes potenciais de biocontrole, não formuladas.

Os experimentos foram analisados em conjunto por não haver diferenças significativas entre réplicas nem da interação tratamentos*réplicas, indicando completa reprodutibilidade das observações, independente do experimento (Tabela 4). A análise conjunta dos experimentos indicou diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre tratamentos com agentes de biocontrole na redução da severidade da brusone (Tabela 4).

Tabela 4. Análise de variância do potencial de biocontrole de *Pseudomonas* e *Trichoderma* na redução da severidade de brusone em espigas de trigo cv. Sossego.

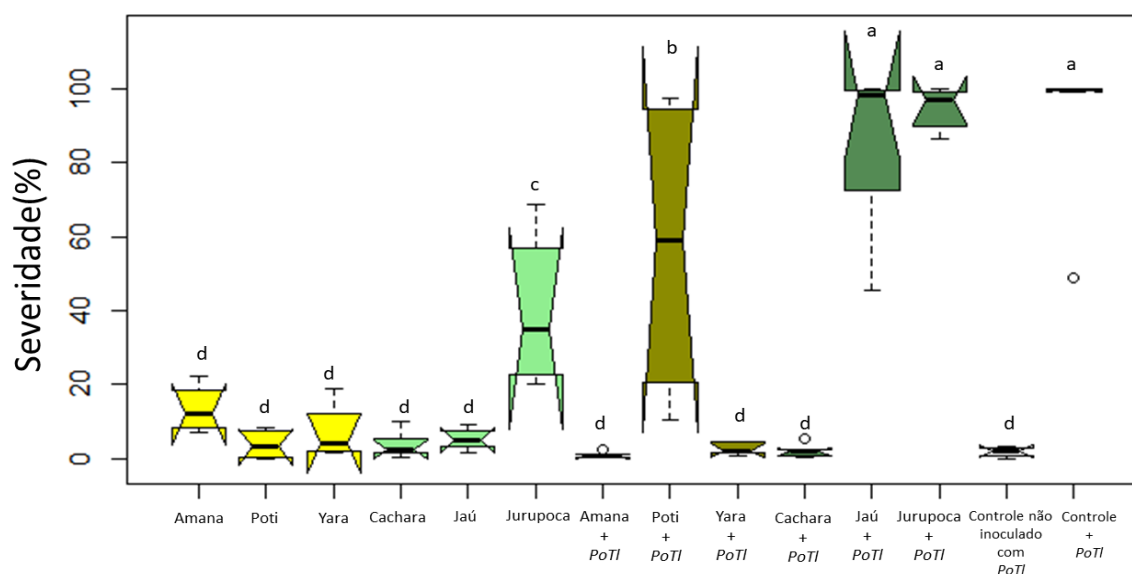
Fonte de variação	Graus de liberdade	QM	F_c	p
Tratamentos	13	7087,59	29,01	0,0000*
Réplicas (1 e 2)	1	0,62	0,003	0,9606 ^{NS}
Blocos	2	145,24	0,59	0,5636 ^{NS}
Tratamentos*réplicas	13	562,36	2,30	0,0582 ^{NS}
Tratamentos*blocos	25	70,30	0,29	0,9974 ^{NS}
Erro	16	244,34		
Total	70	105407,43		
CV(%): 52,51				

Fonte: próprio autor.

*Significativo pelo teste F a $p \leq 0,05$ e não significativo (NS). O experimento foi repetido uma vez. Combinaram-se as réplicas e efetuou-se a análise conjunta dos dados.

Foi observada redução significativa da severidade de brusone em espigas de trigo em plantas tratadas com os isolados de *Pseudomonas putida* ‘Amana’ e ‘Yara’, e com *Trichoderma koningiopsis* ‘Cachara’. Esses tratamentos não diferiram significativamente do controle não inoculado com *PoTl* (Figura 9). Para os demais isolados de agentes de biocontrole avaliados, a severidade média apresentou valores acima de 60% (Poti+*PoTl*, Jaú+*PoTl* e Jurupoca+*PoTl*).

Figura 9. Severidade de brusone em espigas de trigo cv. Sossego inoculadas ou não com *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (*PoTl*), e isolados de *Pseudomonas* (Amana, Poti e Yara) e *Trichoderma* (Cachara, Jaú e Jurupoca) como potenciais agentes de biocontrole.



Fonte: próprio autor.

*As letras acima de cada boxplot indicam diferença significativa pelo teste Scott-Knott com $p \leq 0,05$.

Os tratamentos não inoculados com *PoTl* apresentaram os menores valores de severidade significativamente, com exceção de ‘Jurupoca’ (Figura 9). A incidência de brusone nestes tratamentos pode estar associada a contaminação no momento da inoculação onde o tratamento que não poderia estar com patógeno recebeu inóculo dentro da câmara de incubação. É importante observar que os microrganismos avaliados como potenciais agentes de biocontrole não causaram dano aparente às espigas (Figura 10).

Figura 10. Espigas de trigo cv. Sossego inoculadas ou não com *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (*PoTl*), e tratadas com potenciais agentes de biocontrole, que incluíram *Pseudomonas* spp. (Amana, Poti e Yara) (A-B-C-H-I-J) e *Trichoderma* spp. (Cachara, Jaú e Jurupoca) (D-E-F-K-L-M). G: Controle negativo. N: Espiga inoculada apenas com *PoTl*.



Fonte: próprio autor.

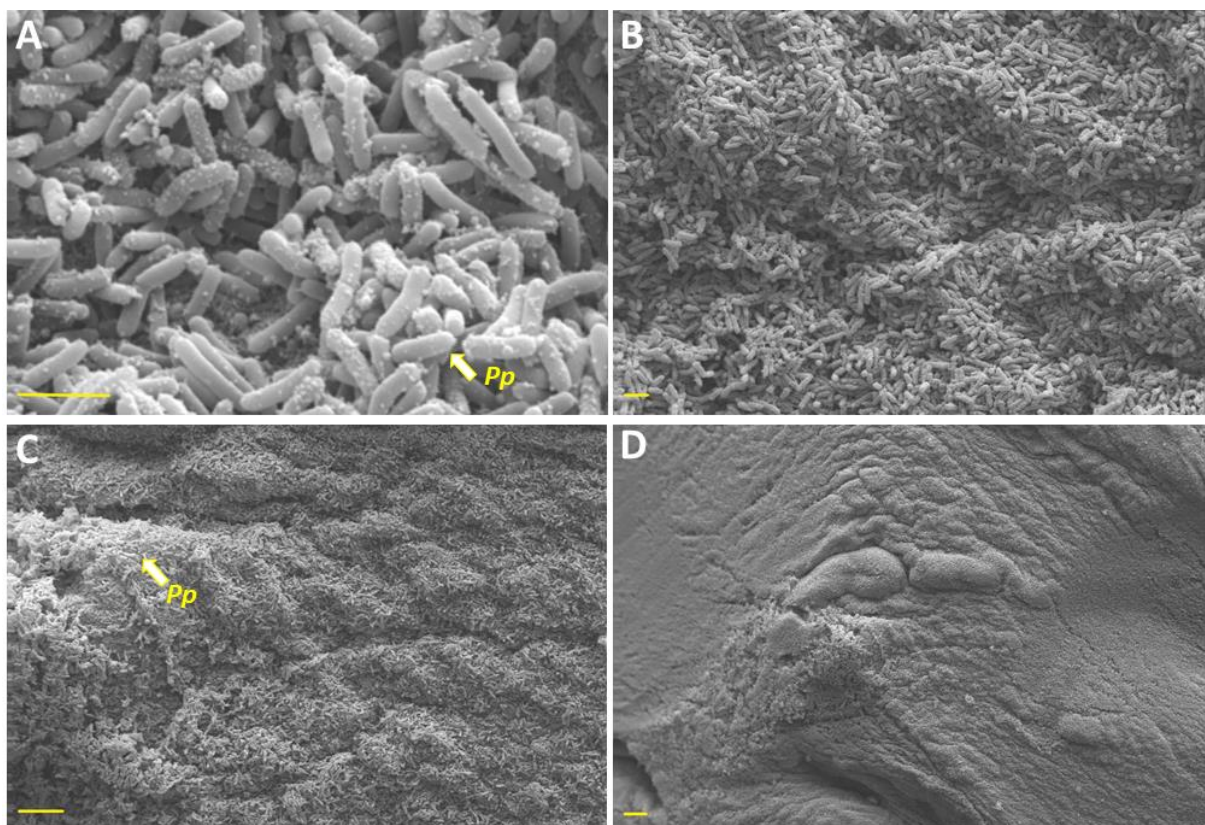
Os resultados deste experimento, especialmente para a eficácia de *T. koningiopsis* ‘Cachara’, corroboram com os observados em patossistema semelhantes a brusone do arroz (*P. oryzae* linhagem *Oryza*). Por exemplo, *T. asperellum* reduziu a severidade da brusone nas folhas em 85% com aplicação curativa, com indicação de biocontrole por micoparasitismo e interferências nos mecanismos de antibiose (SOUZA et al., 2021). *Trichoderma harzianum* também é relatado como eficaz no controle da brusone do arroz por hiperparasitismo (PÉREZ et al., 2005).

1.4.4. Estudo da interação agente de biocontrole-patógeno-planta por meio de microscopia eletrônica de varredura

Estas imagens elucidam de forma ilustrativa a colonização do meio de cultura tanto pelo patógeno *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* quanto pelos agentes de biocontrole, *Pseudomonas* e *Trichoderma*, utilizados nos experimentos.

Dentre os mecanismos de antagonismo que as bactérias do gênero *Pseudomonas* podem produzir, tem-se biofilmes, que é resultante da formação de microcolônias pela fixação de talos bacterianos abundante sobre uma superfície adequada para o crescimento (MASÁK et al., 2014; MULCAHY et al., 2014; RASAMIRAVAKA et al., 2015; RIBEIRO et al., 2016). As bactérias Amana e Yara (*Pseudomonas putida*) e Poti (*Pseudomonas spp.*) possuem esse mecanismo (Figura 11).

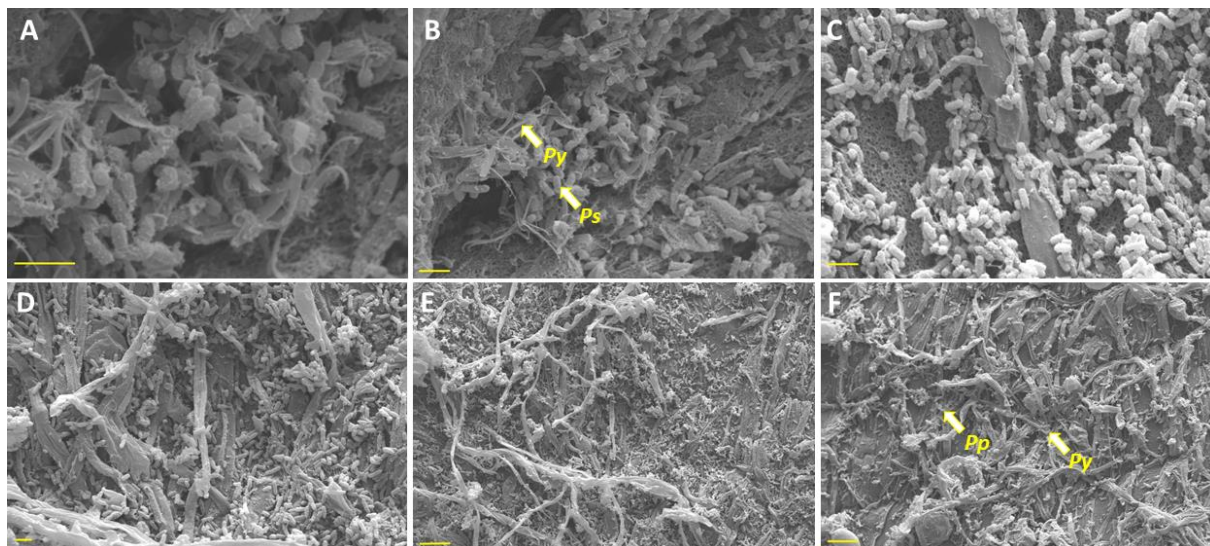
Figura 11. Formação de biofilme por bactérias *Pseudomonas putida* ‘Amana’ (Pp) em teste de antagonismo *in vitro* contra *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (Ps) em meio BDA (A-D).



Barras de escala: 2 μm (A-B), 10 μm (C), 20 μm (D).

Fonte: próprio autor.

Figura 12. Antagonismo direto *in vitro* de *Pseudomonas* spp. (*Ps*) contra *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (*Py*) em meio BDA. (A–C): *Pseudomonas* spp. Poti (*Ps*); (D–F): *Pseudomonas putida* Yara (*Pp*).

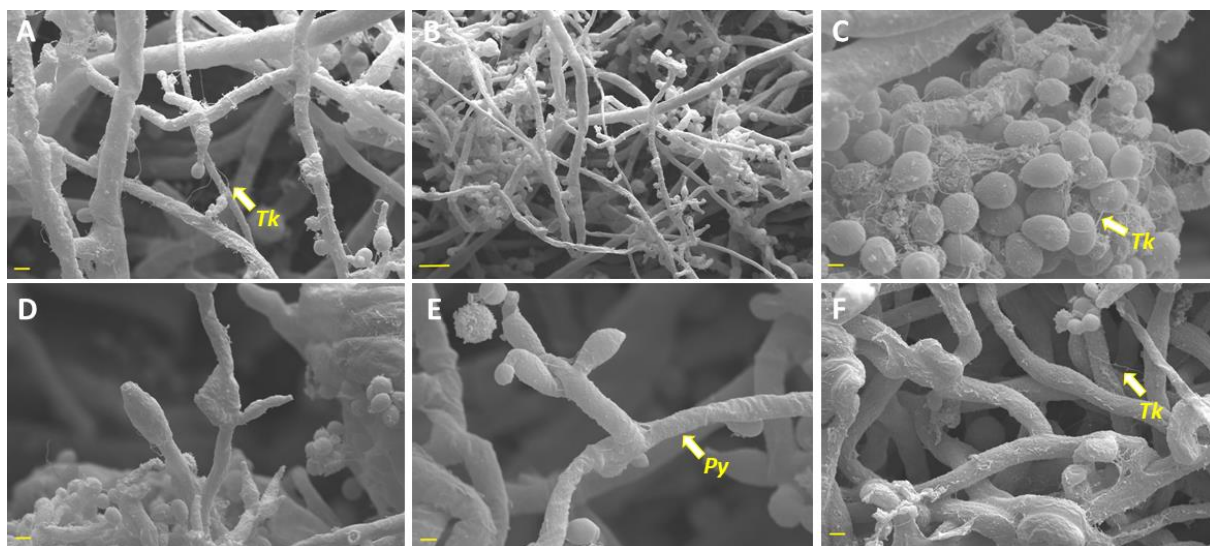


Fonte: próprio autor.

Barras de escala: 2 μ m (A-D), 10 μ m (E-F).

As três bactérias, Amana, Poti e Yara, conforme ocorrido no experimento do item 1.3.3, agiram diretamente contra as hifas do fungo *PoTl* como mostram as setas em B e F (Figura 12).

Figura 13. Conídios e hifas do fungo *Trichoderma koningiopsis* ‘Cachara’ (*Tk*) em meio de cultura BDA.



Fonte: próprio autor.

Barras de escala: 2 μ m (A,D,F), 10 μ m (B), 1 μ m (C,E).

A capacidade de antagonismo direto de *Trichoderma* sobre *Pyricularia oryzae* é demonstrada pelas hifas do agente antagonista se envolvendo as hifas do patógeno (Figura 13) (PÉREZ *et al.* 2005; SOUZA *et al.* 2021).

1.5. Conclusão

Os experimentos de confronto patógeno e agente de biocontrole *in vitro* demonstraram a eficácia potencial de *Pseudomonas putida* ‘Amana’ e de *Trichoderma koningiopsis* ‘Cachara’, que reduziram significativamente o crescimento micelial de *PoTl*.

Os experimentos *in vivo* indicaram que *Pseudomonas putida* ‘Amana’, *P. putida* ‘Yara’ e *Trichoderma koningiopsis* ‘Cachara’ reduziram significativamente a severidade da brusone do trigo e tem potencial como agentes de biocontrole.

O experimento utilizando microscópio eletrônico de varredura nos permitiu descrever duas interações ultra-estruturais sendo elas os mecanismos de defesa: formação de biofilme e antagonismo direto.

Capítulo 2: Potencial de bioformulado a base de *Pseudomonas* e bentonita no controle biológico da brusone do trigo cv. IPR Catuara

Resumo

Neste estudo buscamos determinar se um bioformulado a base de bentonita e *Pseudomonas putida* isolado Amana é capaz de fazer biocontrole da brusone do trigo que tem como seu agente causal o fungo *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum*. A maioria das espécies de *Pseudomonas* que apresentam a capacidade de atuar no biocontrole de fitopatógenos pertencem ao grupo fluorescente, tendo destaque as espécies *P. fluorescens* e *P. putida*, que também estão relacionadas com a promoção do crescimento em plantas. A formulação de células microbianas tem sido estabelecida há muito tempo para aplicações agrícolas, farmacêuticas e industriais. Existem diversos materiais que podem ser utilizados como suportes nessas formulações, dentre eles estão: bagaço, esterco, pó de coco, farelo de arroz, fosfato de rocha, carvão, bentonita, talco e argilas. A argila bentonita é um material transportador ideal que fornece proteção para as células de *Pseudomonas* contra condições ambientais tóxicas e adversas. Dessa forma, objetivamos especificamente: i. avaliar se a bactéria *Pseudomonas putida* Amana associada a bentonita tem potencial de biocontrole da brusone do trigo em condições de casa de vegetação; ii. determinar alterações morfo-fisiológicas em plantas de trigo em resposta ao agente de biocontrole; e iii. determinar a atividade enzimática em espigas de trigo após a aplicação dos agentes antagonistas e do patógeno *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum*. Nossa hipótese foi que este antagonista em sua versatilidade seria eficaz no manejo da brusone, diminuindo significativamente a severidade da doença e seu impacto sobre a produção de trigo, e causaria alterações fisiológicas a nível de fotossíntese e atividade enzimática das enzimas de proteção nas plantas. A formulação de *P. putida* ‘Amana’ em bentonita, aplicada na concentração de 10^8UFC.mL^{-1} reduziu consideravelmente a severidade da brusone para 15% em comparação à testemunha inoculada com patógeno. As enzimas em estudo, glucanase, peroxidase e quitinase, no experimento tiveram as 72 horas pós-inoculação do patógeno, uma diminuição significativa de sua atividade enzimática nos tratamentos com biocontrole demonstrando redução da doença na planta.

Palavras-chave: Bentonita. Biocontrole. Enzimas. Formulação. *Pseudomonas*.

Chapter 2: Potential of *Pseudomonas* and bentonite-based bioformulate in the biological control of wheat blast cv. IPR Catuara

Abstract

In this study, we sought to determine whether a bioformulated based on bentonite and *Pseudomonas putida* Amana is able to biocontrol wheat blast that has the fungus *Pyricularia oryzae Triticum* lineage, as its causal agent. Most *Pseudomonas* species that have the ability to act in the biocontrol of phytopathogens belong to the fluorescent group, with emphasis on the species *P. fluorescens* and *P. putida*, which are also related to the promotion of plant growth. Microbial cell formulation has long been established for agricultural, pharmaceutical and industrial applications. There are several materials that can be used as supports in these formulations, among them are: bagasse, manure, coconut powder, rice bran, rock phosphate, coal, bentonite, talc and clays. Bentonite clay is an ideal carrier material that provides protection for *Pseudomonas* cells against toxic and adverse environmental conditions. Thus, we specifically aim to: i. to evaluate whether the bacteria *Pseudomonas putida* Amana associated with bentonite has the potential to biocontrol wheat blast under greenhouse conditions; ii. to determine morphophysiological changes in wheat plants in response to the biocontrol agent; and iii. to determine the enzymatic activity in wheat ears after the application of antagonist agents and the pathogen *Pyricularia oryzae Triticum* lineage. Our hypothesis was that these antagonists in their versatility would be effective in the management of blast, significantly reducing the severity of the disease, its impact on wheat production, and physiological changes in photosynthesis and enzymatic activity of protective enzymes in plants. The formulation of *P. putida* 'Amana' in bentonite, applied at a concentration of 10^8CFU.mL^{-1} considerably reduced the severity of the blast to 15% compared to the control inoculated with the pathogen. The enzymes under study, glucanase, peroxidase and chitinase, in the experiment had at 72 hours post-inoculation of the pathogen, a significant decrease in their enzymatic activity in the treatments with biocontrol demonstrating a reduction of the disease in the plant.

Keywords: Bentonite. Biocontrol. enzymes. Formulation. *Pseudomonas*.

2.1. Introdução

Dentro do gênero *Pseudomonas*, o grupo de bactérias fluorescentes apresenta um metabolismo muito versátil, podendo utilizar compostos orgânicos simples ou complexos conferindo a estas bactérias alta habilidade para adaptação a vários agroecossistemas (ZAGO et al., 2000). A maioria das espécies de *Pseudomonas* que apresentam a capacidade de atuar no biocontrole de fitopatógenos pertencem ao grupo fluorescente, tendo destaque as espécies *P. fluorescens* e *P. putida*, que também estão relacionadas com a promoção do crescimento em plantas (KLOEPPER et al., 1980; FERREIRA et al., 2009). O efeito antagônico de *P. fluorescens* no biocontrole de fungos fitopatogênicos tem sido satisfatório no controle de alguns patógenos de grande importância agrícola, como *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani* (MELO et al., 1998; BAUTISTA et al., 2007). Luz (1996) relatou *P. putida* controlando a podridão da raiz do trigo no campo.

A ação antagônica do grupo fluorescente resultante da produção de sideróforos (que privam de ferro potenciais fitopatógenos), de diversos outros metabólitos secundários como o ácido cianídrico e de antibióticos não são os únicos mecanismos para explicar o biocontrole de doenças de plantas. De fato, tais bactérias possuem, também, a capacidade de induzir resistência sistêmica que garante a redução dos sintomas de doenças pela diminuição da colonização do patógeno devido à ativação dos sistemas de defesa na planta (KLOEPPER et al., 1980; BENHAMOU et al., 1996; CHEN et al., 2000).

A formulação de células microbianas tem sido estabelecida há muito tempo para aplicações agrícolas (MEYER, 2003), farmacêuticas (TANAKA et al., 1993; FROKJAER; HOVGAARD, 2000) e industriais (TANAKA et al., 1993). Existem diversos materiais que podem ser utilizados como suportes nessas formulações, dentre eles estão: bagaço, esterco, pó de coco, farelo de arroz, fosfato de rocha, carvão, bentonita, talco e argilas (ALBAREDA et al., 2008; ARDAKANI et al., 2010; BASHAN et al., 2014).

A argila bentonita é um material transportador ideal que fornece proteção para as células de *Pseudomonas* contra condições ambientais tóxicas e adversas (GENTRY et al., 2004). Os materiais argilosos beneficiam as células ao fornecer grandes áreas de superfície que atuam como uma unidade de sobrevivência eficaz para absorção de nutrientes e proteção quando exposta à luz solar (LUNSDORF et al., 2000). Segundo Ting et al. (2010) a presença de carreadores à base de argila, especialmente argila bentonítica, pode conferir proteção às células de *Pseudomonas*, pois após a exposição à luz solar, a média viável de células formuladas apenas com argila bentonítica foram propostas como a solução mais benéfica de formulação com

potencial para testes em larga escala pelos bons resultados de viabilidade e eficácia que foram obtidos, mesmo após exposição à luz solar.

Dessa forma, objetivou-se especificamente:

- i. avaliar se a bactéria *Pseudomonas putida* Amana associada a bentonita tem potencial de biocontrole da brusone do trigo em condições de casa de vegetação;
- ii. determinar alterações morfo-fisiológicas em plantas de trigo em resposta ao agente de biocontrole;
- iii. determinar a atividade enzimática em espigas de trigo após a aplicação dos agentes antagonistas e do patógeno *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum*.

2.2.0. Materiais e Métodos

2.2.1. Experimento de bioformulado de bentonita a base de *Pseudomonas putida* ‘Amana’

Para este estudo foi utilizado o agente de biocontrole *Pseudomonas putida* ‘Amana’, selecionado no experimento de eficácia de potenciais agentes de biocontrole, que foi então formulado com uma mistura de bentonita, sendo 200g de bentonita e 800 ml de suspensão. Neste experimento, foi avaliado o potencial do agente de biocontrole em reduzir a severidade de brusone em espigas de trigo cv. IPR Catuara (IDR Paraná/IAPAR) com pulverização da parte aérea das plantas utilizando suspensões de células bacterianas submetidas à formulação com bentonita e não formuladas.

Plantas de trigo cv. IPR Catuara foram cultivadas a partir da semeadura de cinco sementes em vasos com capacidade de 700 mL contendo substrato para plantas Topstrato HT Hortaliças, com irrigação diária e a cada 20 dias fertilizadas com formulado N-P-K (10-10-10), em casa de vegetação, desbaste feito 15 dias após emergência (DAE), deixando-se apenas três plantas/vaso.

Para a formulação, o isolado de *P. putida* ‘Amana’ (VICENTINI, 2018) foi reativado em cultivo em erlenmeyers contendo 20 mL de meio de cultura Luria-Bertani (20 g L⁻¹ de LB) líquido, mantidos a 28 °C sob agitação a 190 rpm durante 16h e a concentração de bactérias ajustada para $6,2 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ (DO₆₂₀ = 0,8), e posteriormente centrifugação por 15 minutos a 5000 rpm para separação da bactéria do meio LB e por escoamento retirado o meio e acrescentada água autoclavada resultando na suspensão de bactérias. O formulado final líquido e homogêneo consistiu na adição de 800 ml da bactéria em suspensão ($6,2 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) e 200 g de bentonita (TING et al., 2010).

Subsequentemente, com auxílio de um borrifador/pulverizador, foi efetuada a aplicação do agente de biocontrole (formulado e não formulado) até o total molhamento das plantas de trigo e levadas para a câmara de crescimento para receber o patógeno 7 dias depois.

O inóculo do patógeno *PoTl* foi obtido por indução de esporulação em 150 placas de Petri em meio de aveia (60 g L⁻¹ de farinha de aveia, 15 g L⁻¹ ágar) com adição de cloranfenicol e estreptomicina (50 mg mL⁻¹ de cada), incubados por 15 dias a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, e foram utilizados os isolados 12.1.146, 12.1.207, 12.1.047, na mesma suspensão.

O experimento foi estabelecido com a aplicação dos agentes de biocontrole às plantas de trigo aos 60 DAE, no estágio de espigamento, código 10,5 (ZADOCKS et al., 1974), 8 dias antes da inoculação do patógeno. Foram aplicados os seguintes tratamentos: (T1) Controle negativo; (T2) *PoTl*; (T3) Bentonita; (T4) *P. putida* ‘Amana’(suspensão)+ Bentonita; (T5) *P. putida* ‘Amana’+Bentonita(formulado)+*PoTl*.

Após a inoculação do patógeno, as plantas foram colocadas em uma câmara de crescimento com nebulização por 24 horas sob temperatura de 25°C, umidade relativa ajustada para 70%, no escuro. Em seguida as plantas foram mantidas em câmara de crescimento por 7 dias nas mesmas condições e fotoperíodo ajustado para 12 horas.

2.2.2. Avaliação da redução da severidade dos sintomas de brusone em espigas de trigo

A avaliação dos sintomas de doença foi realizada 7 dias após a inoculação, fotografando-se digitalmente as plantas tratadas e determinando-se a área foliar infectada com o auxílio do software de análise de imagens *Assess* da APS (*Assess: Image Analysis Software for Plant Disease Quantification*, Department of Plant Science, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canadá) (LAMARI, 2008).

Os dados foram analisados aplicando-se o teste *F*, para detectar a significância do efeito de tratamentos, e o teste de Scott-Knott a 5% para a comparação entre médias. O experimento foi repetido uma vez.

2.2.3. Avaliações de alterações morfológicas em espigas

Avaliou-se as seguintes variáveis:

- a) Altura de plantas, definida como sendo à distância (cm) do nível do solo ao ápice da espiga;
- b) Tamanho de espigas (cm), determinado do ápice até a base da espiga;
- c) Grãos por espiga, obtido a partir da contagem do número de grãos em cada espiga de trigo;
- d) Massa total de grãos de trigo (g/parcela);
- e) Porcentagem de grãos chochos, obtido por meio do número percentual de grãos/espiguetas não desenvolvidos na espiga.

2.2.4. Avaliação fisiológica da atividade fotossintética em folhas utilizando IRGA

A análise foi efetuada no quinto dia após a inoculação do patógeno, na folha bandeira de uma planta de cada tratamento, e obteve-se assim a taxa fotossintética líquida, a condutância estomática, a transpiração e a concentração de CO₂ interno, utilizando-se o analisador de gás infravermelho (IRGA, modelo LI-6400XT Portable Photosynthesis System, LI-COR, Lincoln, USA)(Figura 6). As análises foram realizadas com fonte de radiação fotossinteticamente ativa (PAR), em câmara fechada, fixada em 750 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Blue + Red LED L1-6400-02B, LI-COR, Lincoln, USA).

Figura 14. Aparelho analisador de gás infravermelho (IRGA): parte do equipamento utilizado para a medição da taxa fotossintética líquida, da condutância estomática, da transpiração e da concentração de CO₂ interno nas folhas de trigo.



Fonte: próprio autor.

2.2.5. Avaliação fisiológica em folhas para determinação do teor de clorofila

Para quantificar o teor de clorofila 'a', 'b' e 'a+b', foi utilizado o método de extração com DMSO (HISCOX; ISRAELSTAM,1978), para esse processo foi coletada uma folha de cada parcela e cortada em tiras bem finas, pesados 0,250g, sendo colocado diretamente em tubos de ensaio. Após a pesagem de todas as amostras foi colocada a quantidade de 3,5 ml de DMSO nos tubos e levados ao banho maria por 30 minutos a 65°C, após isso as amostras foram colocadas imediatamente em ambiente escuro e no dia posterior feito a leitura em espectrômetro, visto que as leituras foram feitas nos comprimentos 663 e 645 nm.

Os dados foram analisados aplicando-se o teste *F*, para detectar a significância do efeito de tratamentos, e o teste de Scott-Knott a 5% para a comparação entre médias.

2.2.6. Determinação da atividade enzimática de glucanase (GLU), peroxidase (POX) e quitinase (QUI), em dois tempos de coleta 48 horas e 72 horas, no experimento de bioformulado à base de *Pseudomonas* e bentonita

Foram coletadas amostras de espigas dos tratamentos do experimento de avaliação da eficácia do bioformulado à base de bentonita *Pseudomonas*. Todas as amostras vegetais coletadas foram rapidamente congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80° C.

Um total de 200 mg de cada amostra foi macerado em almofariz com nitrogênio líquido. Ao macerado obtido foi adicionado 1 ml de tampão de extração (tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,8), homogeneizando-se e adicionando-se mais 1 ml do tampão, transferindo-se imediatamente para tubos tipo eppendorfs de 2 ml que foram mantidos em gelo até a centrifugação a $20.000 \times g$ por 25 min, e posteriormente transferidos os sobrenadantes para outro tubo e congelados a -20°C.

As análises enzimáticas foram efetuadas com base em protocolos pelo método Bradford (1976) de extração de proteínas. Para esse processo de determinação da atividade enzimática de GLU (β -1,3-glucanase), POX (peroxidase) e QUI (quitinase) utilizou-se o tampão de reação acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 (pH corrigido com ácido acético), laminarina: 4 mg.mL⁻¹ e DNS (no momento do uso do DNS é adicionado metabissulfito de sódio e fenol). Para cada 100 ml de DNS foram adicionados 140 μ L de metabissulfito (35%) e 400 μ L de fenol (50%). O metabissulfito e o fenol foram dissolvidos em água para serem adicionados apenas na hora do uso.

Em um béquer de 1000 mL, adicionou-se 10 g de ácido dinitrosalicílico e 200 mL de água destilada. Com auxílio de uma barra magnética agita-se com aquecimento para dissolver o DNS. Acrescentou-se, então, 300 mL de solução de NaOH 2 M (preparada previamente). Esperou-se que todo o DNS fosse dissolvido e foi adicionado lentamente tartarato de sódio e potássio, sob agitação, com auxílio de uma espátula (podendo levar até 30 minutos para se completar o processo) e transferiu-se para balão. Armazenou-se em frasco âmbar coberto com papel alumínio, obrigatoriamente, e rotulou-se.

Na mistura de reação (amostras) foram utilizados 57,5 μ L de tampão para reação, 62,5 μ L de substrato laminarina, 5 μ L do extrato e 125 μ L de DNS. Incubou-se de 30 a 60 min a 45°C, e após esse tempo adicionou-se o DNS e incubou-se por 10 a 15 min a 100°C, e parou-se a reação no gelo. As análises foram efetuadas em microplaca (volume final de 250 μ L). A leitura de valores de absorbância foi efetuada em espectrofotômetro a 540 nm. Como controle, foi

utilizada a seguinte mistura de reação: 57,5 µL de tampão para reação, 62,5 µL de substrato laminarina, 5 µL do extrato de enzimas e 125 µL de DNS. Adiciona-se o DNS junto com a mistura antes de incubar por 30 a 60 min a 45°C. Incuba-se de 10 a 15 min a 100°C, e para-se a reação no gelo.

O delineamento experimental foi o mesmo dos experimentos aos quais as amostras foram obtidas: em quatro blocos casualizados e réplica do experimento. Foi aplicado o teste *F* para análise de variância e o teste de Scott-Knott a 5% de significância para comparação de médias.

2.3.0. Resultados e Discussão

2.3.1. Teste de bioformulado a base de *Pseudomonas* e bentonita quanto ao potencial de redução da severidade da brusone em espigas de trigo

Não houve diferença significativa entre réplicas dos experimentos ($p \geq 0,05$), então para verificar o efeito de tratamentos, efetuou-se análise conjunta dos dois experimentos. Nessa análise conjunta, detectou-se diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamentos para as variáveis analisadas (Tabela 5).

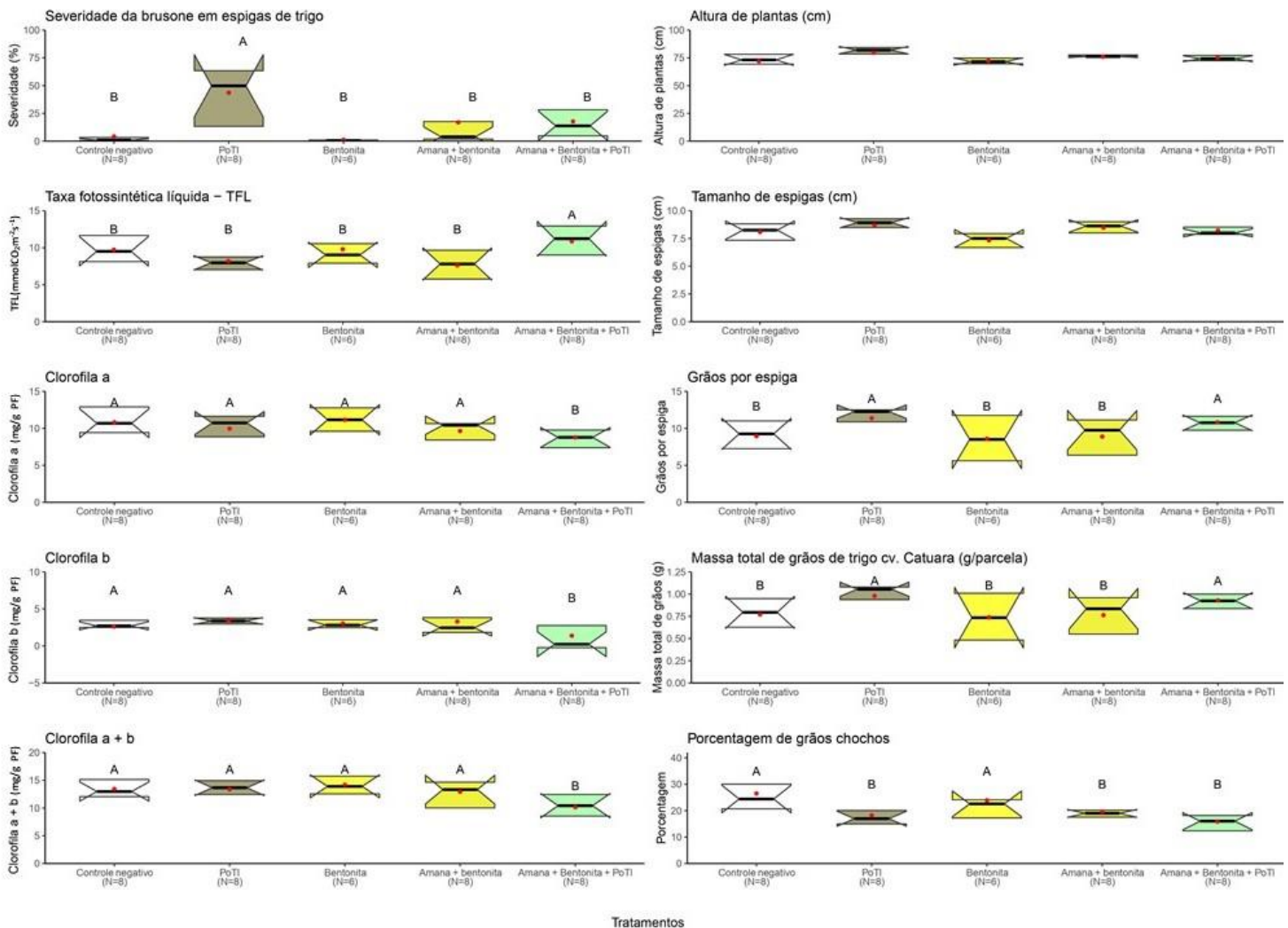
Tabela 5. Súmula do quadro de ANAVA com os valores de *F*c e significância do Teste *F* para os experimentos com a cultivar IPR Catuara inoculadas ou não com *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (*PoTl*) e tratadas com o agente de biocontrole *Pseudomonas putida* Amana (formulado com bentonita), para as variáveis: severidade da brusone em espigas de trigo, taxa fotossintética líquida (TFL), clorofila a, clorofila b, clorofila a+b, altura de plantas, tamanho de espigas, grãos por espiga, massa total de grãos e porcentagem de grãos chochos.

Fonte de variação	Graus de liberdade	severidade (%)	TFL	clorofila a	clorofila b	clorofila a+b	altura de plantas (cm)	tamanho de espigas (cm)	grãos por espiga	massa total de grãos (g/parcela)	grãos chochos (%)
Tratamento	4	4,151*	2,884*	1,564*	0,963*	2,549*	1,941 ^{NS}	2,289 ^{NS}	2,174*	2,156*	3,745*
Réplica (1 e 2)	1	0,900 ^{NS}	0,120 ^{NS}	1,253 ^{NS}	3,316 ^{NS}	3,051 ^{NS}	0,809 ^{NS}	0,175 ^{NS}	0,223 ^{NS}	0,207 ^{NS}	0,126 ^{NS}
CV(%):		128,90	29,19	20,58	65,21	21,08	8,22	10,66	24,45	24,48	35,64

Fonte: próprio autor.

*Significativo pelo teste *F* a $p \leq 0,05$ e não significativo (^{NS}). O experimento foi repetido uma vez. Combinaram-se as réplicas e efetuou-se a análise conjunta dos dados.

Figura 15. Súmula do teste de média do experimento com a cultivar IPR Catuara inoculadas ou não com *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (*PoTl*) e tratadas com o agente de biocontrole *Pseudomonas putida* ‘Amana’ (formulado com bentonita), para as variáveis: severidade da brusone em espigas de trigo, taxa fotossintética líquida, clorofila a, clorofila b, clorofila a+b, altura de plantas, tamanho de espigas, grãos por espiga, massa total de grãos e porcentagem de grãos chochos.



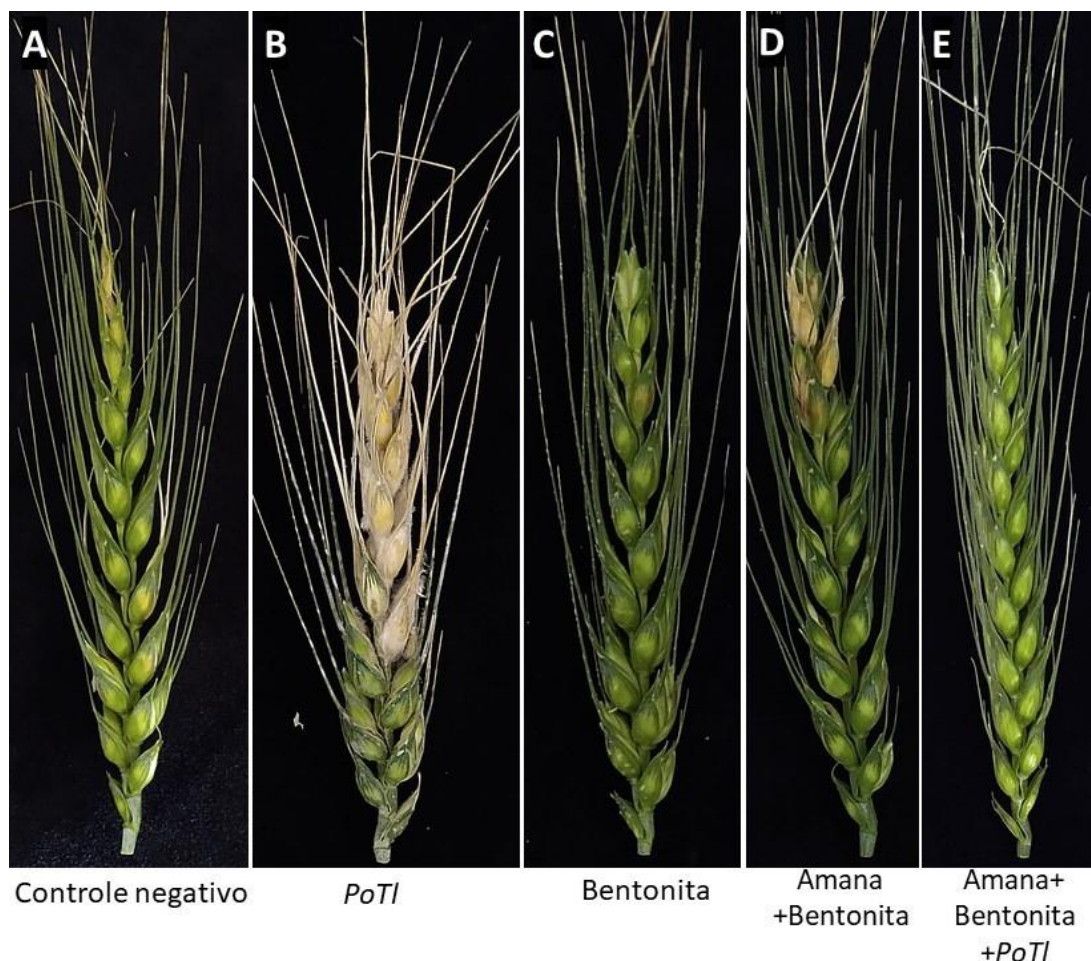
Fonte: próprio autor.

*As letras acima de cada boxplot indicam diferença significativa pelo teste Scott-Knott com $p \leq 0,05$.

O tratamento Amana+Bentonita+*PoTl* (T5) proporcionou redução significativa da severidade da brusone do trigo, diferindo significativamente do tratamento *PoTl* (T2) e do controle negativo, indicando que veicular a bactéria em bentonita foi essencial para o biocontrole do patógeno da brusone do trigo (WIYONO et al. 2008) (Figura 15-16). Diante do

exposto, a formulação de *Pseudomonas putida* Amana com bentonita será submetida ao processo de patenteamento.

Figura 16. Espigas de trigo cv. IPR Catuara inoculadas ou não com *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (*PoTl*), e agente de biocontrole *Pseudomonas putida* Amana formulada em bentonita.



Fonte: próprio autor.

Evidenciando-se alterações nos componentes de produção, houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) nas variáveis grãos por espiga e massa total de grãos onde T5 (Amana+Bentonita+*PoTl*) apresentando média maior em relação ao controle negativo e demonstrando que *Pseudomonas* associado a bentonita mesmo na presença de *PoTl* pode ter favorecido a produção de grãos (Figura 15). A argila bentonita é um material ideal que fornece proteção para as células de *Pseudomonas* contra condições ambientais adversas e tóxicas (GENTRY et al., 2004), beneficiando as células fornecendo grandes superfícies as quais atuam como uma unidade de sobrevivência eficaz para absorção e proteção de nutrientes quando expostos à luz solar (LUNSDORF et al., 2000).

Na avaliação de taxa fotossintética, houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre tratamentos, e detectou-se média maior no tratamento T5 (Amana+Bentonita+PoTl), sendo a média deste diferente estatisticamente tanto do controle negativo (T1) quanto da testemunha inoculada com patógeno (T2). Quanto a clorofila a, clorofila b, e a+b, os tratamentos nas três variáveis não tiveram diferença estatística significativa, com exceção de Amana+Bentonita+PoTl (T5), que teve valor de média superior a todos os outros (Figura 15).

2.3.2. Determinação da atividade enzimática de glucanase (GLU), peroxidase (POX) e quitinase (QUI), em dois tempos de coleta 48 horas e 72 horas, nos experimentos de bioformulado à base de *Pseudomonas* e bentonita

Não houve diferença significativa entre réplicas dos experimentos ($p \geq 0,05$). Da mesma forma, o efeito da interação tratamentos x réplicas foi não significativo (Tabela 6), indicando completa reprodutibilidade das observações, independente do experimento. Dessa forma, para verificar o efeito de tratamentos, efetuou-se análise conjunta dos dois experimentos. Nessa análise conjunta, detectou-se diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamentos quanto à atividade enzimática (Tabela 6).

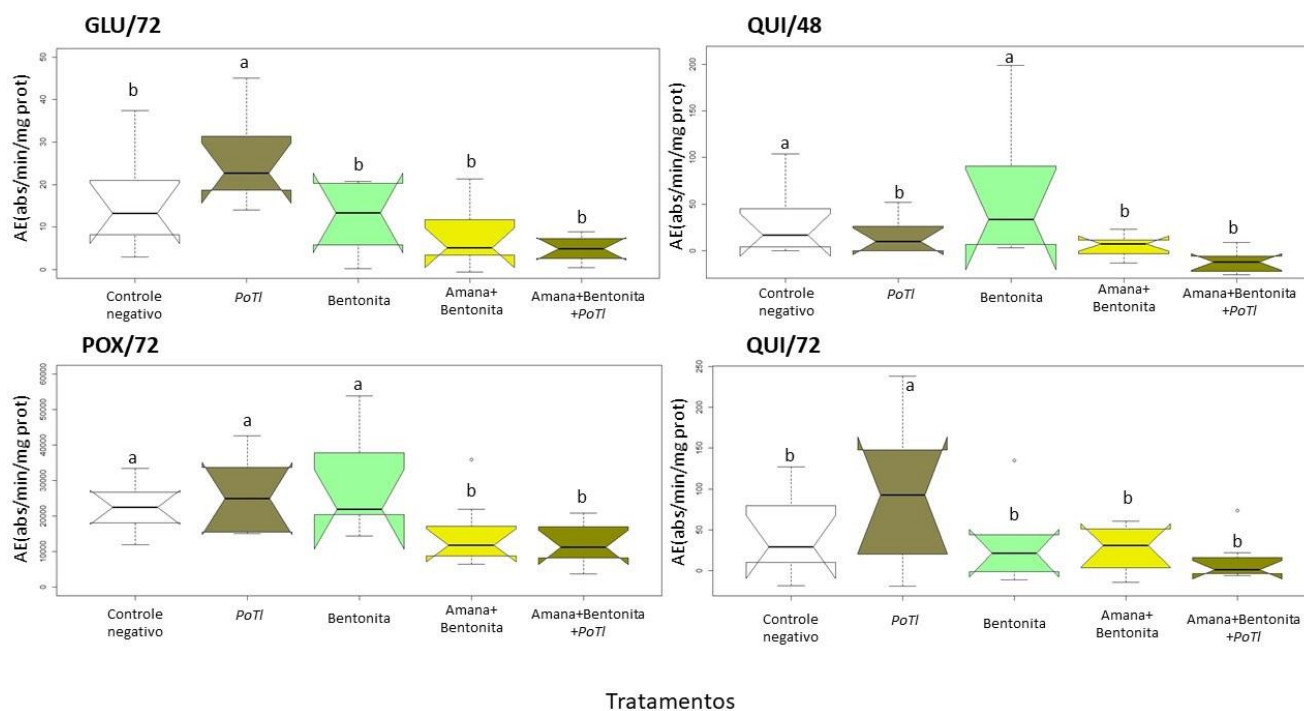
Tabela 6. Súmula dos Quadros de Análise de Variância com os valores de F_c e a significância do teste F dos dados de atividade enzimática de glucanase (GLU), peroxidase (POX) e quitinase (QUI), em dois tempos de coleta (48h e 72h) no experimento de bioformulado à base *Pseudomonas* e bentonita.

Fonte de variação	Graus de liberdade	GLU/48	GLU/72	POX/48	POX/72	QUI/48	QUI/72
Tratamento	4	1,872 ^{NS}	7,138 [*]	0,966 ^{NS}	3,791 [*]	4,506 [*]	3,050 [*]
Réplica (1 e 2)	1	0,989 ^{NS}	1,489 ^{NS}	0,068 ^{NS}	0,160 ^{NS}	0,012 ^{NS}	0,619 ^{NS}
Bloco	3	0,477 ^{NS}	1,303 ^{NS}	0,031 ^{NS}	0,643 ^{NS}	2,913 ^{NS}	2,899 ^{NS}
tratamento*réplica	4	1,044 ^{NS}	0,480 ^{NS}	0,892 ^{NS}	1,323 ^{NS}	0,155 ^{NS}	0,859 ^{NS}
CV (%):		68,67	64,35	71,27	48,26	205,09	126,03

Fonte: próprio autor.

*Significativo pelo teste F a $p \leq 0,05$ e não significativo (^{NS}). O experimento foi repetido uma vez. Combinaram-se as réplicas e efetuou-se a análise conjunta dos dados.

Figura 17. Súmula do teste de média do experimento com a cultivar IPR Catuara inoculadas ou não com *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (*PoTl*) e tratadas com o agente de biocontrole *Pseudomonas putida* ‘Amana’ (formulado com bentonita), para a atividade enzimática de glucanase (GLU), peroxidase (POX) e quitinase (QUI), em dois tempos de coleta (48h e 72h) no experimento de bioformulado à base de *Pseudomonas putida* ‘Amana’ e bentonita.



Fonte: próprio autor.

*As letras acima de cada boxplot indicam diferença significativa pelo teste Scott-Knott com $p \leq 0,05$.

As 72 horas pós-inoculação do patógeno a atividade enzimática (AE) de glucanase apresentou valores de médias estatisticamente iguais para todos os tratamentos exceto o tratamento 2 (*PoTl*) que teve média estatisticamente diferente dos demais indicando a maior atividade da enzima em estudo nesse tempo de coleta (Figura 17). A glucanase esteve em menor atividade no tratamento que continha o agente de biocontrole evidenciando que a planta foi protegida da infecção do patógeno e o sistema de defesa da planta não disparou (VAN LOON et al., 2006).

Os resultados de peroxidase corroboram com glucanase no tempo 72h especificamente, onde também pode-se visualizar baixa atividade enzimática nos tratamentos com agente de biocontrole, T4 e T5 (Figura 17). A peroxidase atua na oxidação de compostos fenólicos que são tóxicos para patógenos como descrito por Sutic e Sinclair (1991), porém não se pode afirmar

que houve aumento da ação dessa enzima para proteger a planta no tratamento 2 (*PoTl*) porque não diferiu estatisticamente do controle negativo.

Quanto a atividade enzimática da quitinase as 48 horas pós-inoculação não houve diferença significativa entre a testemunha inoculada somente com patógeno *PoTl* e o tratamento 5 (Amana+Bentonita+*PoTl*), isso torna inconclusivo a eficácia do formulado nesse tempo de coleta. Já as 72 horas pós-inoculação houve um aumento expressivo na atividade enzimática no tratamento 2 diferindo significativamente do tratamento 5 que se manteve com valor de média igual estatisticamente ao controle negativo (Figura 17).

Os resultados demonstram que houve redução da ação desta enzima pela presença dos microrganismos antagonistas que protegeram a planta da infecção do patógeno diminuindo a quantidade da doença e concluindo-se então que o mecanismo de defesa da planta não entrou em atividade e consequentemente a eficácia do bioformulado foi comprovada (VAN LOON et al, 2006).

2.4. Conclusão

A formulação de *P. putida* isolado Amana em bentonita, aplicada na concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹ reduziu consideravelmente a severidade da brusone (para 15%, apenas) em comparação à testemunha inoculada com patógeno.

As enzimas em estudo, glucanase, peroxidase e quitinase, tiveram as 72 horas pós-inoculação do patógeno, uma diminuição significativa de sua atividade enzimática nos tratamentos com biocontrole demonstrando redução da doença na planta.

O agente antagonista em formulação com bentonita demonstrou alto potencial na redução da severidade da brusone do trigo em uma cultivar suscetível a doença viabilizando o processo de patenteamento do formulado.

Capítulo 3: Potencial de formulado natural a base de *Trichoderma* e milho no controle biológico da brusone do trigo cv. IPR Catuara

Resumo

Neste estudo buscamos determinar se um formulado natural a base de milho e o fungo *Trichoderma koningiopsis* isolado Cachara é capaz de fazer biocontrole da brusone do trigo que tem como seu agente causal o fungo *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum*. Diversas espécies de *Trichoderma* têm o potencial de controlar patógenos de plantas do solo de forma mais eficaz do que produtos químicos. O uso desses fungos não é tão prejudicial ao meio ambiente como fungicidas químicos e estão presentes em grande quantidade em quase todos os solos agrícolas e em outros ambientes como madeira em decomposição, seu uso está sendo reconhecido mundialmente como uma alternativa em controle de doenças de plantas. De fato, empresas em todo o mundo estão envolvidas na produção de biopesticidas à base de microrganismos. A implementação do agente é a preparação de biomassa de alta contagem populacional com alto nível de viabilidade e vigor, ou seja, a formulação de agentes de controle biológico depende da produção de biomassa e manutenção da viabilidade no final do processo. Dessa forma objetivou-se especificamente: i. avaliar se o fungo *Trichoderma koningiopsis* Cachara associado a milho tem potencial de biocontrole da brusone do trigo em condições de casa de vegetação; ii. determinar alterações morfo-fisiológicas em plantas de trigo em resposta ao agente de biocontrole; e iii. determinar a atividade enzimática em espigas de trigo após a aplicação dos agentes antagonistas e do patógeno *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum*. Nossa hipótese foi que este antagonista em sua versatilidade seria eficaz no manejo da brusone diminuindo significativamente a severidade da doença e seu impacto sobre a produção de trigo, e causaria alterações fisiológicas a nível de fotossíntese e atividade das enzimas de proteção. *Trichoderma koningiopsis* Cachara em formulação natural de milho, na concentração de 10^9 UFC.mL⁻¹, controlou significativamente a doença demonstrando redução na severidade cerca de 50% comparado ao tratamento 2 (*Milho+PoTI*) que apresentou 100% de severidade dos sintomas em espigas. Nas análises enzimáticas não houve diferença significativa entre tratamentos em nenhum tempo de coleta e para nenhuma das enzimas testadas.

Palavras-chave: *Trichoderma koningiopsis*. *Pyricularia oryzae*. Milho. Formulado. *Triticum aestivum* L.

Chapter 3: Potential of a natural formulation based on *Trichoderma* and millet in the biological control of wheat blast cv. IPR Catuara

Abstract

In this study, we sought to determine whether a natural millet-based formulation and the fungus *Trichoderma koningiopsis* isolated Cachara is capable of biocontrolling the wheat blast that has as its causal agent the fungus *Pyricularia oryzae* lineage *Triticum*. Several species of *Trichoderma* have the potential to control soil plant pathogens more effectively than chemicals. The use of these fungi is not as harmful to the environment as chemical pesticides and they are present in large quantities in almost all agricultural soils and in other environments such as decaying wood, their use is being recognized worldwide as an alternative in plant disease control. In fact, companies all over the world are involved in the production of microorganism-based biopesticides. The implementation of the agent is the preparation of high population count biomass with a high level of viability and vigor, that is, the formulation of biological control agents depends on the production of biomass and maintenance of viability at the end of the process. Thus, we specifically aim to: i. to evaluate whether the fungus *Trichoderma koningiopsis* Cachara associated with millet has the potential to biocontrol wheat blast under greenhouse conditions; ii. to determine morphophysiological changes in wheat plants in response to the biocontrol agent; and iii. to determine the enzymatic activity in wheat ears after the application of antagonist agents and the pathogen *Pyricularia oryzae* *Triticum* strain. Our hypothesis was that this antagonist in its versatility would be effective in the management of blast, significantly reducing the severity of the disease and its impact on wheat production, and would cause physiological changes in photosynthesis and activity of protective enzymes. *Trichoderma koningiopsis* Cachara in a natural millet formulation, at a concentration of 10^9 CFU.mL⁻¹, significantly controlled the disease, showing a reduction in severity of about 50% compared to treatment 2 (Millette+PoTl) which presented 100% of symptom severity in ears. In the enzymatic analysis, there was no significant difference between treatments at any time of collection and for none of the tested enzymes.

Keywords: *Trichoderma koningiopsis*. *Pyricularia oryzae*. millet. Formulated. *Triticum aestivum* L.

3.1. Introdução

A maioria dos relatos sobre o uso de antagonistas para o controle de doenças induzidas por fungos fitopatogênicos apresenta *Trichoderma* spp. como um dos mais promissores entre os agentes de biocontrole (SILVA et al., 1999). Diversas espécies de *Trichoderma* têm o potencial de controlar patógenos de plantas do solo de forma mais eficaz do que produtos químicos. O uso desses fungos não é tão prejudicial ao meio ambiente como pesticidas químicos e estão presentes em grande quantidade em quase todos os solos agrícolas e em outros ambientes como madeira em decomposição, seu uso está sendo reconhecido mundialmente como uma alternativa em plantas controle de doenças (HARMAN et al., 2004).

Espécies desse gênero vêm sendo utilizadas com sucesso no controle de fitopatógenos de solo, por serem capazes de proteger plantas por meio de diferentes mecanismos de ação (parasitismo, antibiose, competição e indução de resistência), e por colonizar eficientemente o substrato e o sistema radicular de várias espécies de plantas. Além disso, esse gênero está entre os microrganismos mais resistentes às toxinas e produtos químicos naturais e sintetizados pelo homem, capazes até mesmo de degradar alguns desses compostos, tais como hidrocarbonetos e pesticidas. Outra importante característica desse gênero é que muitas de suas linhagens são produtoras prolíficas de esporos e de poderosos antibióticos (WOO et al., 2006 citado por LUCON et al.).

Singh et al. (2012) verificaram significativa maior porcentagem de germinação de sementes e menor severidade de brusone quando sementes de oito diferentes cultivares de arroz foram inoculadas com *Trichoderma harzianum*. A utilização de um pool de isolados de *Trichoderma asperellum* resultou em significativa supressão de brusone em folhas de arroz cultivar Primavera, e ainda aumento na matéria seca, comprimento de raízes, e nos níveis de ácido salicílico e jasmonato. Experimentos *in vivo* com brusone do arroz causada por *Magnaporthe oryzae*, onde isolados identificados como *Trichoderma asperellum*, reduziram a severidade nas folhas em 85% com aplicação curativa, mostrando assim biocontrole de *M. oryzae* por micoparasitismo, e que houve interferências nos mecanismos de antibiose pelo processo de infecção por *M. oryzae* (SOUZA et al. 2021); a utilização de *Trichoderma harzianum* em plantas de arroz com sintomas de *Pyricularia grisea* e *Rhizoctonia solani* mostraram eficácia antagônica e hiperparasitária do agente de biocontrole em estudo (PÉREZ et al. 2005).

De fato, empresas em todo o mundo estão envolvidas na produção de biopesticidas à base de microrganismos (FRAVEL, 2005). A produção massal do agente de biocontrole constitui uma das etapas mais importantes no desenvolvimento de biofungicidas, sendo que o

impedimento mais crítico ao controle biológico é a falta de conhecimento de métodos para produção em massa e um sistema de entrega adequado de agentes de biocontrole (PAPAVIZAS, 1985; GOMES et al., 2006).

A implementação do agente é a preparação de biomassa de alta contagem populacional com alto nível de viabilidade e vigor, ou seja, a formulação de agentes de controle biológico depende da produção de biomassa e manutenção da viabilidade no final do processo (ADEKUNLE et al., 2001). Os fungos antagonistas devem ser facilmente cultivados em meios disponíveis e não serem exigentes em seus requerimentos nutricionais, possibilitando que grandes quantidades de inóculo possam ser preparados (WOOD; TVEIT, 1955). Com a finalidade de obter a produção de conídios de fungos em larga escala, tem se utilizado produtos vegetais de baixo custo, especialmente grão de arroz (LEITE et al., 2003). A eficácia do arroz parboilizado já foi constatada, por exemplo, por Borges Neto et al. (2004) para a obtenção de inóculo de *Fusarium graminearum* e *Dicyma pulvinata* (MELO, 2006).

Dessa forma, objetivou-se especificamente:

- i. avaliar se o fungo *Trichoderma koningiopsis* Cachara associado a milho tem potencial de biocontrole da brusone do trigo em condições de casa de vegetação;
- ii. determinar alterações morfo-fisiológicas em plantas de trigo em resposta ao agente de biocontrole;
- iii. determinar a atividade enzimática em espigas de trigo após a aplicação dos agentes antagonistas e do patógeno *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum*.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Experimento de bioformulado natural de milho a base de *Trichoderma koningiopsis* ‘Cachara’ no biocontrole da brusone do trigo

Para este estudo foi utilizado o agente de biocontrole *Trichoderma koningiopsis* ‘Cachara’, selecionado no experimento de eficácia de potenciais agentes de biocontrole. Neste experimento, foi avaliado o potencial do agente de biocontrole em reduzir a severidade de brusone em espigas de trigo cv. IPR Catuara (IDR Paraná / IAPAR), com pulverização das espigas das plantas utilizando suspensão de conídios ou esporos obtidos de formulação em milho.

Plantas de trigo cv. IPR Catuara foram cultivadas a partir da semeadura de cinco sementes em vasos com capacidade de 700 mL contendo substrato para plantas Topstrato HT Hortaliças, com irrigação diária e a cada 20 dias fertilizadas com formulado N-P-K (10-10-10), em casa de vegetação, desbaste feito 15 dias após emergência (DAE), deixando-se apenas três plantas/vaso.

Os grãos de milho a serem utilizados como meio de crescimento e multiplicação do *Trichoderma* foram autoclavados e colocados em sacos plásticos envolvendo as bocas em cano de PVC e fita própria para autoclavagem, sendo o orifício tampado com algodão e papel alumínio. Depois de submetidos a esterilização em autoclave foram armazenados em refrigerador para posteriormente receber o inóculo de *Trichoderma* estabelecendo assim uma formulação natural para desenvolvimento do fungo, sendo os grãos de milho meio e substrato para multiplicação do agente de biocontrole em larga escala (MENEZES et al, 2007).

Para formulação natural em milho, os isolados de *Trichoderma koningiopsis* (NUNES 2019) (Tabela 1) foram reativados em BDA com cloranfenicol e estreptomicina e incubados a 25 °C por 7 dias, posteriormente, discos de micélio foram coletados utilizando cortador circular e depositados nos sacos contendo milho onde ficaram por mais 7 dias crescendo, os saquinhos foram virados diariamente para melhor exposição à luz. A suspensão de conídios e esporos proveniente da produção do agente de biocontrole em milho foi obtida retirando com água destilada e Tween 20 a 0,01% e foi calibrada utilizando-se câmara de Neubauer para cerca de 10^9 conídios mL⁻¹.

O inóculo do patógeno *PoTl* foi obtido por indução de esporulação em 150 placas de Petri em meio de aveia (60 g L⁻¹ de farinha de aveia, 15 g L⁻¹ ágar) com adição de cloranfenicol e estreptomicina (50 mg mL⁻¹ de cada), incubados por 15 dias a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, e foram utilizados os isolados 12.1.146, 12.1.207, 12.1.047, na mesma suspensão.

O experimento foi estabelecido com a aplicação dos agentes de biocontrole às plantas de trigo aos 60 DAE, no estágio de espigamento, código 10,5 (ZADOCKS et al. 1974), 8 dias antes da inoculação do patógeno. Foram aplicados os seguintes tratamentos: (T1) Controle negativo; (T2) Milho+*PoTl*; (T3) Milho; (T4) Cachara+Milho e (T5) Cachara+Milho+*PoTl*.

Após a inoculação do patógeno, as plantas foram colocadas em uma câmara de crescimento (Figura 4) com nebulização por 24 horas sob temperatura de 25°C, umidade relativa ajustada para 70%, no escuro. Em seguida as plantas foram mantidas em câmara de crescimento por 7 dias nas mesmas condições e fotoperíodo ajustado para 12 horas.

3.2.2. Avaliação da redução da severidade dos sintomas de brusone em espigas

A avaliação dos sintomas de doença foi realizada 7 dias após a inoculação, fotografando-se digitalmente as plantas tratadas e determinando-se a área foliar infectada com o auxílio do software de análise de imagens Assess da APS (Assess: *Image Analysis Software for Plant Disease Quantification*, Department of Plant Science, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canadá) (LAMARI 2008).

Os dados foram analisados aplicando-se o teste F , para detectar a significância do efeito de tratamentos, e o teste de Scott-Knott a 5% para a comparação entre médias. O experimento foi repetido uma vez.

3.2.3. Avaliações de alterações morfológicas em espigas

Avaliou-se as seguintes variáveis:

- a) Altura de plantas, definida como sendo à distância (cm) do nível do solo ao ápice da espiga;
- b) Tamanho de espigas (cm), determinado do ápice até a base da espiga;
- c) Grãos por espiga, obtido a partir da contagem do número de grãos em cada espiga de trigo;
- d) Massa total de grãos de trigo (g/parcela);
- e) Porcentagem de grãos chochos, obtido por meio do número percentual de grãos/espiguetas não desenvolvidos na espiga.

3.2.4. Avaliação fisiológica para determinação do teor de clorofila em folhas

Para quantificar o teor de clorofila 'a', 'b' e 'a+b', foi utilizado o método de extração com DMSO (HISCOX & ISRAELSTAM, 1978), para esse processo foi coletada uma folha de cada parcela e cortada em tiras bem finas, pesados 0,250g, sendo colocado diretamente em tubos de ensaio. Após a pesagem de todas as amostras foi colocada a quantidade de 3,5 ml de DMSO nos tubos e levados ao banho maria por 30 minutos a 65°C, após isso as amostras foram colocadas imediatamente em ambiente escuro e no dia posterior feito a leitura em espectrômetro, visto que as leituras foram feitas nos comprimentos 663 e 645 nm.

Os dados foram analisados aplicando-se o teste F , para detectar a significância do efeito de tratamentos, e o teste de Scott-Knott a 5% para a comparação entre médias.

3.2.5. Determinação da atividade enzimática de glucanase (GLU), peroxidase (POX) e quitinase (QUI), em dois tempos de coleta 48 horas e 72 horas, no experimento de bioformulado à base de *Trichoderma* e milho

Foram coletadas amostras de espigas dos tratamentos do experimento de avaliação da eficácia do bioformulado natural a base de milho e *Trichoderma*. Todas as amostras vegetais coletadas foram rapidamente congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80° C.

Um total de 200 mg de cada amostra foi macerado em almofariz com nitrogênio líquido. Ao macerado obtido foi adicionado 1 ml de tampão de extração (tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,8), homogeneizando-se e adicionando-se mais 1 ml do tampão, transferindo-se

imediatamente para tubos tipo eppendorfs de 2 ml que foram mantidos em gelo até a centrifugação a $20.000 \times g$ por 25 min, e posteriormente transferidos os sobrenadantes para outro tubo e congelados a -20°C .

As análises enzimáticas foram efetuadas com base em protocolos pelo método Bradford (1976) de extração de proteínas. Para esse processo de determinação da atividade enzimática de GLU (β -1,3-glucanase), POX (peroxidase) e QUI (quitinase) utilizou-se o tampão de reação acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 (pH corrigido com ácido acético), laminarina: 4 mg.mL⁻¹ e DNS (no momento do uso do DNS é adicionado metabissulfito de sódio e fenol). Para cada 100 ml de DNS foram adicionados 140 μL de metabissulfito (35%) e 400 μL de fenol (50%). O metabissulfito e o fenol foram dissolvidos em água para serem adicionados apenas na hora do uso.

Em um béquer de 1000 mL, adicionou-se 10 g de ácido dinitrosalicílico e 200 mL de água destilada. Com auxílio de uma barra magnética agita-se com aquecimento para dissolver o DNS. Acrescentou-se, então, 300 mL de solução de NaOH 2 M (preparada previamente). Esperou-se que todo o DNS fosse dissolvido e foi adicionado lentamente tartarato de sódio e potássio, sob agitação, com auxílio de uma espátula (podendo levar até 30 minutos para se completar o processo) e transferiu-se para balão. Armazenou-se em frasco âmbar coberto com papel alumínio, obrigatoriamente, e rotulou-se.

Na mistura de reação (amostras) foram utilizados 57,5 μL de tampão para reação, 62,5 μL de substrato laminarina, 5 μL do extrato e 125 μL de DNS. Incubou-se de 30 a 60 min a 45°C , e após esse tempo adicionou-se o DNS e incubou-se por 10 a 15 min a 100°C , e parou-se a reação no gelo. As análises foram efetuadas em microplaca (volume final de 250 μL). A leitura de valores de absorbância foi efetuada em espectrofotômetro a 540 nm. Como controle, foi utilizada a seguinte mistura de reação: 57,5 μL de tampão para reação, 62,5 μL de substrato laminarina, 5 μL do extrato de enzimas e 125 μL de DNS. Adiciona-se o DNS junto com a mistura antes de incubar por 30 a 60 min a 45°C . Incuba-se de 10 a 15 min a 100°C , e para-se a reação no gelo.

O delineamento experimental foi o mesmo dos experimentos aos quais as amostras foram obtidas: em quatro blocos casualizados e réplica do experimento. Foi aplicado o teste *F* para análise de variância e o teste de Scott-Knott a 5% de significância para comparação de médias.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Experimento de bioformulado a base de *Trichoderma* associado à milheto quanto ao potencial de redução da severidade da brusone em espigas de trigo

Não houve diferença significativa entre réplicas dos experimentos ($p \geq 0,05$), então para verificar o efeito de tratamentos, efetuou-se análise conjunta dos dois experimentos. Nessa análise conjunta, detectou-se diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamentos para as variáveis analisadas (Tabela 7).

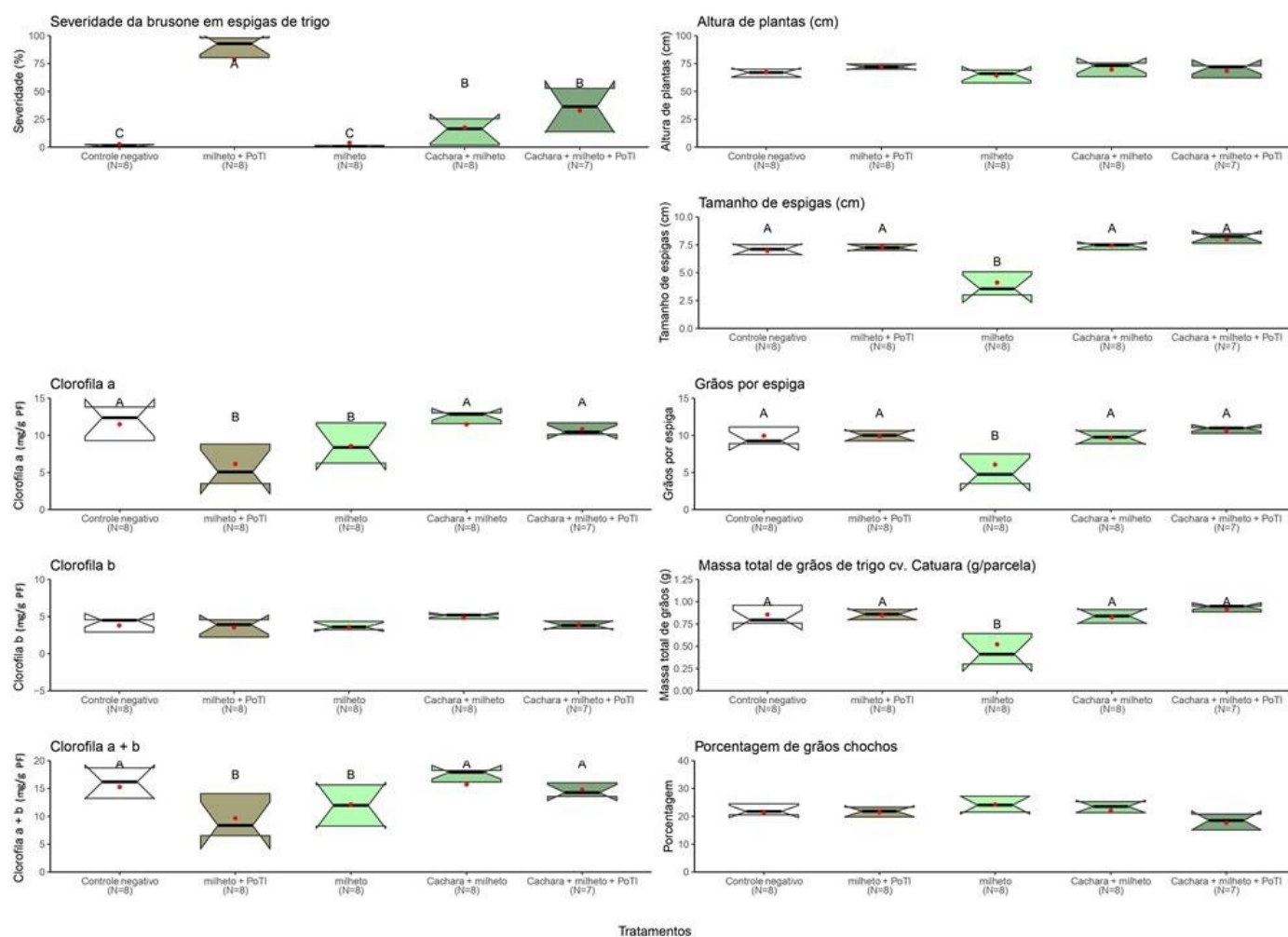
Tabela 7. Súmula do quadro de ANAVA com os valores de F_c e significância do Teste F para os experimentos com a cultivar IPR Catuara inoculadas ou não com *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (*PoTl*) e tratadas com o agente de biocontrole *Trichoderma koningiopsis* Cachara (formulação natural com milho), para as variáveis: severidade da brusone em espigas de trigo, clorofila a, clorofila b, clorofila a+b, altura de plantas, tamanho de espigas, grãos por espiga, massa total de grãos e porcentagem de grãos chochos.

Fonte de variação	Graus de liberdade	severidade (%)	clorofila a	clorofila b	clorofila a+b	altura de plantas (cm)	tamanho de espigas (cm)	grãos por espiga	massa total de grãos (g/parcela)	porcentagem de grãos chochos (%)
Tratamento	4	18,261*	4,743*	1,366 ^{NS}	3,508*	1,222 ^{NS}	2,140*	3,403*	3,393*	3,084 ^{NS}
Réplica (1 e 2)	1	1,084 ^{NS}	0,074 ^{NS}	0,005 ^{NS}	0,032 ^{NS}	0,291 ^{NS}	0,123 ^{NS}	0,832 ^{NS}	0,869 ^{NS}	0,112 ^{NS}
Bloco	3	1,055 ^{NS}	0,153 ^{NS}	0,337 ^{NS}	0,171 ^{NS}	0,630 ^{NS}	0,749 ^{NS}	1,609 ^{NS}	1,615 ^{NS}	0,288 ^{NS}
Tratamento*réplica	4	0,958 ^{NS}	2,147 ^{NS}	0,991 ^{NS}	1,821 ^{NS}	1,067 ^{NS}	0,613 ^{NS}	0,799 ^{NS}	0,779 ^{NS}	1,202 ^{NS}
CV(%):		78,53	31,25	31,98	30,02	11,35	30,43	28,05	28,14	25,15

Fonte: próprio autor.

*Significativo pelo teste F a $p \leq 0,05$ e não significativo (^{NS}). O experimento foi repetido uma vez. Combinaram-se as réplicas e efetuou-se a análise conjunta dos dados.

Figura 18. Súmula dos resultados do teste de média do experimento com a cultivar IPR Catuara inoculadas ou não com *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (*PoTl*) e tratadas com o agente de biocontrole *Trichoderma koningiopsis* Cachara (formulação natural com milho), para as variáveis: severidade da brusone em espigas de trigo, clorofila a, clorofila b, clorofila a+b, altura de plantas, tamanho de espigas, grãos por espiga, massa total de grãos e porcentagem de grãos chochos.



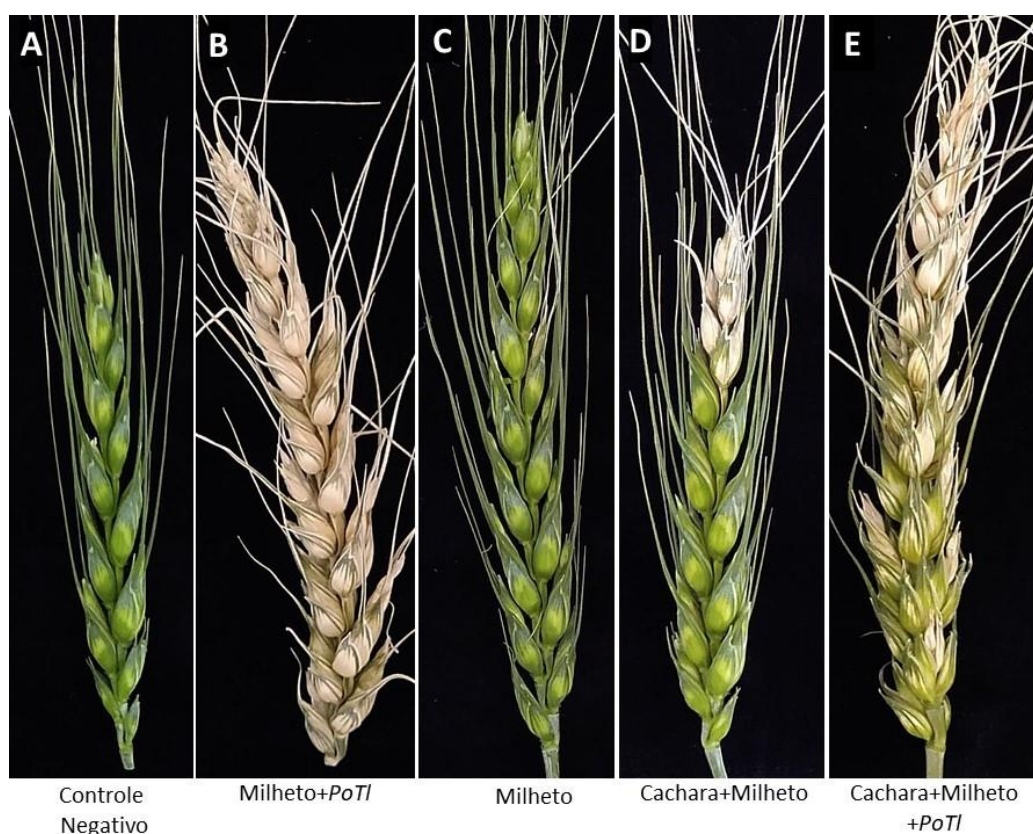
Fonte: próprio autor.

*As letras acima de cada boxplot indicam diferença significativa pelo teste Scott-Knott com $p \leq 0.05$.

Na avaliação de severidade, o tratamento 5 (Cachara+milho+PoTl) controlou significativamente a brusone ao se comparar com o tratamento milho+PoTl (T2) (Figuras 18). O T2 provavelmente em função da solução de milho em água autoclavada aplicada nesse tratamento pode ter favorecido a multiplicação do patógeno nas espigas pós-pulverização, por ser rica em nutrientes (Figura 18). Sousa et al. (2020) utilizaram *T. asperellum* como agente de biocontrole contra brusone do arroz e também observaram biocontrole nas folhas

independentemente da forma de aplicação dos isolados de *Trichoderma* em que todos os tratamentos suprimiram a severidade da brusone diferindo estatisticamente da testemunha inoculada somente com o patógeno. A formulação de *Trichoderma koningiopsis* Cachara associado a milho será submetida ao processo de patenteamento.

Figura 19. Espigas de trigo cv. IPR Catuara inoculadas ou não com *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum* (*PoTl*), e agente de biocontrole *Trichoderma koningiopsis* ‘Cachara’ associado ou não a milho.



Fonte: próprio autor.

Nota-se que a ‘clorofila a’ e ‘a+b’ foram afetadas pela presença do patógeno como demonstrado no baixo teor do pigmento em (T2), tratamento esse que não tinha nenhum agente de biocontrole da doença para diminuição de sintomas em folhas como o T5 (Cachara+Milheto+*PoTl*). Houve diferença significativa entre tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 0,05%, onde os tratamentos ‘Cachara+Milheto’ e ‘Cachara+Milheto+*PoTl*’ foram estatisticamente iguais ao controle negativo, médias maiores, e diferiram da testemunha inoculada com o patógeno (T2) e de T3, que tiveram média estatisticamente iguais entre si (Figuras 18-19). Em experimento na cultura do arroz, utilizando *Trichoderma asperellum* como agente de biocontrole contra *Magnaporthe oryzae*, obteve-se resultados iguais para clorofila ‘a+b’ (SOUSA et al. 2020).

Os componentes de produção tamanho de espiga, número de grãos por espiga e massa total de grãos apresentaram diferença significativa entre tratamentos, sendo que o tratamento 3 (milheto) foi o único que diferiu dos demais e sua média menor que todos os outros (Figuras 18-19). Assim como houve biocontrole eficaz na avaliação de severidade, nota-se que os tratamentos que receberam inoculação de patógeno não foram afetados morfológicamente e consequentemente não teve uma perda na produção tão significativa. A altura de plantas de trigo não apresentou diferença significativa entre tratamentos.

Quanto a avaliação de grãos chochos não houve diferença significativa entre tratamentos, isso possivelmente pelo fato de que, além das lesões de proporções indefinidas na ráquis, o fungo pode causar pontos de infecção que bloqueiam a translocação de fotossintatos para a espiga, impedindo o enchimento dos grãos, tornando-os “chochos” e com baixo peso específico (GOULART, 2007).

3.3.2. Determinação da atividade enzimática de glucanase (GLU), peroxidase (POX) e quitinase (QUI), em dois tempos de coleta 48 horas e 72 horas, nos experimentos de bioformulado à base de *Trichoderma* e milheto

Não houve diferença significativa entre réplicas dos experimentos ($p \geq 0,05$). Da mesma forma, o efeito da interação tratamentos x réplicas foi não significativo (Tabela 8), indicando completa reprodutibilidade das observações, independente do experimento. Efetuou-se a análise conjunta dos dois experimentos e nessa análise conjunta não se detectou diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre tratamentos quanto à atividade enzimática (Tabela 8).

Tabela 8. Súmula dos Quadros de Análise de Variância com os valores de F_c e a significância do teste F dos dados de atividade enzimática de glucanase (GLU), peroxidase (POX) e quitinase (QUI), em dois tempos de coleta (48h e 72h) no experimento de bioformulado à base de *Trichoderma* e milheto.

Fonte de variação	Graus de liberdade	GLU/48	GLU/72	POX/48	POX/72	QUI/48	QUI/72
Tratamento	4	0,670 ^{NS}	1,891 ^{NS}	2,608 ^{NS}	2,529 ^{NS}	0,682 ^{NS}	0,872 ^{NS}
Réplica (1 e 2)	1	0,085 ^{NS}	2,012 ^{NS}	0,392 ^{NS}	0,080 ^{NS}	1,498 ^{NS}	2,763 ^{NS}
Bloco	3	0,849 ^{NS}	3,555 ^{NS}	0,858 ^{NS}	0,228 ^{NS}	1,550 ^{NS}	0,472 ^{NS}
tratamento*réplica	4	2,484 ^{NS}	0,590 ^{NS}	0,345 ^{NS}	0,530 ^{NS}	0,224 ^{NS}	0,575 ^{NS}
CV(%):		947,73	67,60	141,21	66,33	302,87	146,06

Fonte: próprio autor.

*Significativo pelo teste F a $p \leq 0,05$ e não significativo (^{NS}). O experimento foi repetido uma vez. Combinaram-se as réplicas e efetuou-se a análise conjunta dos dados.

3.4. Conclusão

Trichoderma koningiopsis Cachara em formulação natural de milho, na concentração de 10^9 UFC.mL⁻¹ controlou significativamente a doença demonstrando redução na severidade cerca de 50% comparado ao tratamento 2 (*Milho+PoTl*) que apresentou 100% de severidade dos sintomas em espigas de trigo.

No experimento para avaliação de enzimas não houve diferença significativa entre tratamentos em nenhum tempo de coleta e para nenhuma das enzimas testadas.

O agente antagonista em formulação natural no milho demonstrou alto potencial na redução da severidade da brusone do trigo em uma cultivar suscetível a doença viabilizando o processo de patenteamento do formulado.

4.0. Referências bibliográficas

- ABDULLAH, M.T.; ALI, N.Y.; SULEMAN, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, Surrey, v. 27, p. 1354-1359, 2008.
- ADEKUNLE, A.T., CARDWELL, K.F., FLORINI, D.A., IKOTUN, T. Seed treatment with *Trichoderma* species for control of damping-off of cowpea caused by *Macrophomina phaseolina*. **Biocontrol Sci. Technol.** v. 11, p. 449-457, 2001.
- ALBAREDA, M.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. N.; CAMACHO, M. AND TEMRANO, F. J. Alternatives to peat as carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. **Soil Biol. Biochem.** v. 40, n.11, p. 2771-2779, 2008.
- ARDAKANI, S. S.; HEYDARI, A.; TAYEBI, L. AND MOHAMMADI, M. Promotion of cotton seedlings growth characteristics by development and use of new bioformulations. **Inter. J. Bot.** v. 6, n. 2, p. 95-100, 2010.
- BASHAN, Y.; BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNÁNDEZ, J. P. Advances in plant growth bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant Soil**, 378(1-2):1-3, 2014.
- BAUTISTA, G.; MENDOZA, H.; URIBE, D. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* in native potato (*Solanum phureja*) plants using native *Pseudomonas fluorescens*. **Acta biológica Colombiana**, Bogotá, v. 12, p. 19-32, 2007.
- BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W.; QUADT-HALLMAN, A.; TUZUN, S. Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. **Plant physiology**, v. 112, p. 919-929, 1996.
- BENITEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Madrid, v.7, n.4, p.249-260, 2004.

BETTIOL, W. **Seleção de microrganismos antagônicos a *P. oryzae* para o controle da Brusone do arroz (*Oryza sativa* L.)**. Piracicaba, 140 p., 1988. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-Universidade de São Paulo.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. **Biocontrole de doenças de plantas: Usos e perspectivas**. Jaguariúna. p. 29 – 45, 2009.

BÍBLIA, A. T. Jó. Português. In. **Bíblia Sagrada**: Antigo e Novo Testamento. Tradução de João Ferreira de Almeida. São Paulo: Sociedade Bíblica do Brasil, 1995. p. 784.

CARVALHO, J. C. B. et al. Biocontrol potential of *Waitea circinata*, an orchid mycorrhizal fungus, against the rice blast fungus. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, n. 3, p. 151-159, 2015.

CASADO, P.S. **Validation of the microplate method and studies on resistance to the fungicide fluxapyroxad in populations of *Pyricularia graminis-tritici* in Brazil**. 2017. 53 (MSc Dissertation). University of São Paulo State, Ilha Solteira, São Paulo.

CASTROAGUDIN, V.L. CERESINI, PC, de Oliveira SC, Reges JT, Maciel JL, Bonato AL, Dorigan AF, McDonald BA. Resistance to QoI Fungicides Is Widespread in Brazilian Populations of the Wheat Blast Pathogen *Magnaporthe oryzae*. **Phytopathology**, v. 105, n. 3, p. 284-94, 2015.

CASTROAGUDIN, V.L.; MOREIRA, S.I.; PEREIRA, D.A.S.; MOREIRA, S.S.; BRUNNER, P.C.; MACIEL, J.L.N.; CROUS, P.W.; MCDONALD, B.A.; ALVES, E.; CERESINI, P.C. *Pyricularia graminis-tritici*, a new *Pyricularia* species causing wheat blast. *Persoonia*. **Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 37, p. 199–216, 2016.

CASTROAGUDIN, V.L.; DANELLI, A.L.D.; MOREIRA, S.I.; REGES, J.T.A.; CARVALHO, G.; MACIEL, J.L.N.; BONATO, A.L.V.; FORCELINI, C.A.; ALVES, E.; MCDONALD, B.A.; CROLL, D.; CERESINI, P.C. The wheat blast pathogen *Pyricularia graminis-tritici* has complex origins and a disease cycle spanning multiple grass hosts. **bioRxiv**, 2017. Doi: <<https://doi.org/10.1101/203455>>

CERESINI, P.C.; CASTROAGUDIN, V.L.; RODRIGUES, F.A.; RIOS, J.A.; AUCIQUE-PÉREZ, C.A.; MOREIRA, S.I.; ALVES, E.; CROLL, D.; MACIEL, J.L.N. Wheat Blast: Past, Present, and Future. **Annual Review of Phytopathology**, v. 56, p. 427-456, 2018a.

CERESINI, P.C.; CASTROAGUDIN, V.L.; RODRIGUES, F.A.; RIOS, J.A.; AUCIQUE-PÉREZ, C.A.; MOREIRA, S.I.; CROLL, D.; ALVES, E.; CARVALHO, G.; MACIEL, J.L.N.; MCDONALD, B.A. Wheat blast: from its origins in South America to its emergence as a global threat. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, p. 1-18, 2018b.

CHAIBUB et al. Defence responses in rice plants in prior and simultaneous applications of *Cladosporium* sp. during leaf blast suppression. **Environmental Science and Pollution Research**, v.23, n.21, p.21554-21564, 2016.

CHEN, C.; BÉLANGER, R. R.; BENHAMOU, N.; PAULITZ, T. C. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 56, n. 1, p. 13-23, 2000.

CÔRTEZ, M.V.C.B. et al. Potential for using crude extract of *Sarocladium oryzae* for suppression of rice blast. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 1, p. 28-34, 2014.

DANELLI, A. L. D. *Pyricularia oryzae* Cavara: Virulência de isolados, densidade de conídios no ar e efeito do nitrogênio na suscetibilidade do trigo. 2015. 177 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2015.

DEBONA, D.; RODRIGUES, F.A.; RIOS, J.A.; MARTINS, S.C.V.; PEREIRA, L. F.; MATTA, F.M. Limitations to photosynthesis in leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, St. Paul, v.104, n.1, p.34-39, 2014.

DOOHAN, F. 2005. **Fungal pathogens of plants**. In: K. Kavanagh (Ed), Fungi. p. 232-263.

DUVEILLER, E. A History of Wheat. **World Wheat Book**, v. 3, p. 1107, 2016.

EL-KATATNY, M. H., W. SOMITCH, K. H. ROBRA & G. M. GUBITZ. 2000. Production of chitinase and β -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 38, p.173-180.

FERREIRA, E. P. B.; VOSS, M.; SANTOS, H. P.; DE-POLLI, H.; NEVES, M. C. P.; RUMJANECK, N. G. Diversidade de *Pseudomonas* fluorescentes em diferentes sistemas de manejo do solo e rotação de culturas. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 4, n. 2, p. 140-148, 2009.

FRAVEL, D. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, 337-359, 2005.

FROKJAER, S. AND L. HOVGAARD. **Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins**. Taylor and Francis Limited, London, ISBN: 0748407456, p. 238, 2000.

GENTRY, T.; RENSING, C.; PEPPER, I. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 34, p. 447-494, 2004.

GICHEVA, G.; PANEVA, D.; MANOLOVA, N.; NAYDENOV, M; RASHKOV, I. New polyelectrolyte complex of chitosan: Preparation, characterization, and application as a biocontrol agent carrier. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 27, p. 148-160, 2012.

GLADIEUX, P.; CONDON, B.; RAVEL, S.; SOANES, D.; MACIEL, J.L.N.; NHANI, A.; CHEN, L.; TERAUCHI, R.; LEBRUN, M.H.; THARREAU, D. AND MITCHELL, T. Gene flow between divergent cereal- and grass-specific lineages of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **mBio**, v.9, e01219-01217, 2018.

GNANAMANICKAM S.S. The effect of bacterial secondary metabolites on bacterial and fungal pathogens of rice. In: Karlovsky P. (eds) Secondary metabolites in soil ecology. **Soil Biology**, v. 14, 2008.

GOMES, D. M. P. A.; ÁVILA, Z. R.; PÁDUA, R. R.; ALVARENGA, D. O.; MELLO, S. C. M. Avaliação de substratos sólidos para produção de esporos de *Trichoderma* spp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, suplemento, p. 225, 2006.

- GOULART, A.C.P. **Perdas em trigo causadas pela brusone. In: Workshop de Epidemiologia de Doenças de Plantas**, 1., 2005, Viçosa, MG. Quantificação de perdas no manejo de doenças de plantas: anais. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004b. p. 123-130.
- GOULART, A.C.P.; NASSER, L.C.B.; AZEVEDO, J.A. Manejo integrado de doenças em trigo irrigado sob pivô central na região do cerrado. In: Zambolim, L. (Ed.). **Manejo integrado: fitossanidade: cultivo protegido, pivô central e plantio direto**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2001. p.137-163.
- GOULART, A.C.P.; SOUSA, P.G.; URASHIMA, A.S. Danos em trigo causados pela infecção de *Pyricularia grisea*. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.33, n.4, p.358-363, 2007.
- GUIMARÃES, R.A. et al. Characterization of *Sarocladium oryzae* and its reduction potential of rice leaf blast. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.47, n.1, p. 41-52, 2017.
- HADDAD, F., L. A. MAFFIA, E. S. G. MIZUBUTI & H. TEIXEIRA. Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. **Biological Control**, v. 49, p.114 –119, 2009.
- HALFELD-VIEIRA, B. A., R. S. Romeiro & E. S. G. Mizubuti. Métodos de isolamento de bactérias do filoplano de tomateiro visando populações específicas e implicações como agentes de biocontrole. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p.638-643, 2004.
- HARMAN, G.E., HOWELL, C.R., VITERBO, A., CHET, I., LORITO, M. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43–56, 2004.
- HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annual Microbiology**, v.60, n.4, p.579-598, 2010.
- HE, Y.; WU, Z.; TU, L.; AND SHAN, C. Effect of encapsulated *Pseudomonas putida* Rs-198 strain on alleviating salt stress of cotton. **Journal of Plant Nutrition**, v. 40, p. 1180–1189, 2017.
- HRSCOX, J. D.; G. F. ISRAELSTAM. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**. v. 57, p.1332-1334, 1979.
- KLOEPPER, J. W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M. N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. **Nature**, v. 286, p. 885 - 885, 1980.
- KONG, P.; HONG, C. Biocontrol of boxwood blight by *Trichoderma koningiopsis* Mb2. **Crop Protection**, v. 98, p. 124-127, 2017.
- LEITE, L. G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; ALVES, S. B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: OESP, 92 p. 2003.
- LUCON, C. M. M.; KOIKE, C. M.; ISHIKAWA, A. I.; PATRICIO, F. R. A.; HARAKAVA, R. Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na

produção de mudas de pepino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.3, p.225-232, 2009.

LUNSDORF et al. Clay hutches: A novel interaction between bacteria and clay minerals. **Journal Environmental Microbiology**, v. 2, p. 161-168, 2000.

LUNSDORF, H., ERB, R.W., ABRAHAM, W.R. AND TIMMIS, K.N. 2000. Clay hutches: A novel interaction between bacteria and clay minerals. *J. Environ. Microbiol.*, **2**: 161-168.

LUZ, W.C. Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas e bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 4, p. 1-49. 1996.

MASAK, J., ČEJKOVA, A., SCHREIBEROVA, O., ŘEZANKA, T. Pseudomonas biofilms: possibilities of their control. **FEMS microbiology ecology**, v. 89, n. 1, p. 1-14, 2014.

MELO, D. F. **Estudo sobre *Dicyma pulvinata* como agente de controle biológico para o mal-das-folhas da seringueira**. 2006. 112 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

MELO, I. S.; MELO, J. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Embrapa Meio Ambiente. p. 197-204, 1998.

MENÊZES, J.E.; SOUZA, R.C.; MARQUES, G.A.; SILVA, J.B.T.; MELLO, S.C.M. Avaliação de sementes de milho no cultivo de *Trichoderma* spp. **Circular Técnica** n. 56, Embrapa. Dez. 2007.

MEYER, S.L.F. United States department of agriculture-agricultural research servisse research programs on microbes for management of plantparasitic nematodes. **Pest Management Science**, v. 59, n. 665-670, 2003.

MISHRA, S.; JAGADEESH, K. S.; KRISHNARAJ, P.U.; PREM, S. Biocontrol of tomato leaf curl virus (ToLCV) in tomato with chitosan supplemented formulations of *Pseudomonas* sp. under field conditions. **Australian Journal of Crop Science**, v.8, p. 347-355, 2014.

MIZUBUTI, E. S. G., L. A. MAFFIA, J. J. MUCHOVEJ, R. S. Romeiro & U. G. Batista. Selection of isolates of *Bacillus subtilis* with potential for the control of dry bean rust. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.540-544, 1995.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N.; STEINDORFF, A. S.; COSTA, F. T.; NORONHA, E.F.; RICART, C. A. O. New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. **Current Microbiology**, New York, v.61, n.4, p.298-305, 2010.

MORÁN-DIEZ, E.; HERMOSA, R.; AMBROSINO, P.; CARDOZA, R.E.; GUTIÉRREZ, S.; LORITO, M.; MONTE, E. The ThPG1 Endopolygalacturonase Is Required for the *Trichoderma harzianum* – Plant Beneficial Interaction. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Palo Alto, v.22, n.8, p.1021-1031, 2009.

MULCAHY, L. R.; VINCENT, I.M.; LEWIS, K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. **Microbial ecology**, v. 68, n. 1, p. 1-12, 2014.

NEHA, K. V.; BALABASKAR, P.; RAMASAMY, N. Survey and occurrence of *Rhizoctonia solani* (Kuhn) causing sheath blight of rice and in vitro efficacy of bacterial antagonists

against *Rhizoctonia solani* (Kuhn). **Environmental Biology**, Ithaca, v. 37, p. 1421-1427, 2016.

NUNES, T. C. **Controle biológico da queima-das-folhas e morte de pastagens de Braquiária (*Urochloa brizantha*) causados por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. 2019.** Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Engenharia (Campus de Ilha Solteira).

OLIVEIRA, S.C. et al. Resistência cruzada aos fungicidas IQo azoxistrobina e piraclostrobina no patógeno da brusone do trigo *Pyricularia oryzae* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 4, p. 298-304, 2015.

PAGANI, A.P.S. et al. Management of wheat blast with synthetic fungicides, partial resistance and silicate and phosphite minerals. **Phytoparasitica**, v. 42, p. 609–617, 2014.

PAPAVIZAS, G.C., *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**. v. 23, p. 13–54, 1985.

PARK, J. et al. Antifungal activity against plant pathogenic fungi of chaetoviridins isolated from *Chaetomium globosum*. **FEMS Microbiology Letters**, v.252, p.309–313, 2005.

PÉREZ AL, RONDÓN TR, GUTIÉRREZ GR, ZAYAS ADP. Efectividad in vitro de *Trichoderma harzianum* (rifai) en el biocontrol de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Pyricularia grisea* (sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). **Fitosanidad**, v. 9, n. 57-60, 2005.

POLONI, N. M. Widespread distribution of resistance to triazole fungicides in Brazilian populations of the wheat blast pathogen. **Plant Pathology**, v.70, n.2., p. 436-448, 2021.

RASAMIRAVAKA, T., LABTANI, Q., DUEZ, P., EL JAZIRI, M. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. **BioMed research international**, v. 2015, p. 17, 2015.

RIBEIRO, S. M., FELICIO, M. R., BOAS, E. V., GONCALVES, S., COSTA, F. F., SAMY, R. P., FRANCO, O. L. New frontiers for anti-biofilm drug development. **Pharmacology & therapeutics**, v. 160, p. 133-144, 2016.

ROMEIRO, R. S., D. M. S. NEVES, B. A. HALFELD- VIEIRA, E. S. G. MIZUBUTI & C. C. DEUNER. Inadequação de apenas um patógeno desafiante na seleção massal de residentes de filoplano para fins de controle biológico - um caso. **Summa Phytopathologica**, v.26, p.142, 2000.

RUANGWONG, O.U.; PORNSURIYA, C.; PITIJA, K.; SUNPAPAO, A. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma koningiopsis* psu3-2 against postharvest anthracnose of chili pepper. **Journal of Fungi**, v. 7, p. 276. 2021.

SENA, A. P. A. Increased enzymatic activity in rice leaf blast suppression by crude extract of *Epicoccum* sp. **Tropical Plant Pathology**, v.38, n.5, p.387-397, 2013.

SILVA, A.C.F.; ROSA, C.R.E.; MELO, I.S.; Sensibilidade de isolados de *Trichoderma* spp. a benomil e iprodione. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, p.395-399, 1999.

SILVA, G.B.P.; HECKLER, L.I.; SANTOS, R.F.; DURIGON, M.R.; BLUME, E. Identificação e utilização de *Trichoderma spp.* armazenados e nativos no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista Caatinga**, v. 28, p. 33 – 42, 2015.

SINGH, P. K. et al. Biological Control of Rice Blast Disease with *Trichoderma harzianum* in Direct Seeded Rice under Medium Low Land Rainfed Conditions. **Environment & Ecology**, v.30, p.834-837, 2012.

SOUSA, T. P. et al. Bioagents and silicon promoting fast early upland rice growth. **Environmental Science and Pollution Research**, v.25, p.3657–3668, 2018.

SOUSA, T. P.; CHAIBUB, A. A.; SILVA, G. B. *Trichoderma asperellum* modulates defense genes and potentiates gas exchanges in upland rice plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.112, 101561, 2020.

SOUSA, T.P.; CHAIBUB, A.A.; CORTES, M.V.C.B.; BATISTA, T.F.C.; BEZERRA, G.A.; SILVA, G.B.; FILIPPI, M.C.C. Molecular identification of *Trichoderma* sp. isolates and biochemical characterization of antagonistic interaction against rice blast. **Archives of Microbiology**, 2021.

SUTIC, D. D.; SINCLAIR, J. B. Anatomy and physiology of diseased plants. Boston: CRC Press, 1991.

TANAKA, A., T. TOSA AND T. KOBAYASHI. **Industrial Application of Immobilized Biocatalysts**. Marcel Dekker, Inc., New York, United States of America. p. 3-67, 1993.

TING, A. S.Y.; FANG, M. T.; TEE, C. S. An in vitro Assessment on the Efficacy of Clay-Based Formulated Cells of *Pseudomonas* Isolate UTAR EPA2 for Petrol Degradation. **American Journal of Applied Sciences**, v. 7, p. 178-184, 2010.

TING, A.S.Y., FANG, M.T. AND C.S. TEE. An *in vitro* assessment on the efficacy of clay-based formulated cells of *Pseudomonas* Isolate UTAR EPA2 for petrol degradation. **American Journal of Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 178-184, 2010.

URASHIMA, A.S.; KATO, H. Varietal resistance and chemical control of wheat blast fungus. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.20, n.2, p.107-112, 1994.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, n. 1, p. 135-162, 2006.

VICENTINI, S.N.C. **Bioprospecção e filogenia de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* como potenciais agentes de biocontrole da queima-das-folhas em braquiária. 2018.** Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Engenharia (Campus de Ilha Solteira).

WIYONO, S.; SCHULZ, D.F.; WOLF, G.A. Improvement of the formulation and antagonistic activity of *Pseudomonas fluorescens* B5 through selective additives in the pelleting process. **Biological Control**, v. 46, p. 348–357, 2008.

WOOD, R. K. S.; TVEIT, M. Control of plant diseases by use of antagonistic organisms. **Botanical Review**, Bronx, v. 21, p. 441-492, 1955.

YU, C.; LUO, X. *Trichoderma koningiopsis* controls *Fusarium oxysporum* causing damping-off in *Pinus massoniana* seedlings by regulating active oxygen metabolism, osmotic potential, and the rhizosphere microbiome. **Biological Control**, v.150, p.1-12, 2020.

ZADOCKS, J.C.; CHANG, P. P.; KONZAK, C. F. A decimal code for the growth stages of cereals. **Weed Research**, v.14, p.415-421, 1974.

ZAGO, V. C. P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N. G. *Pseudonomas* spp. Fluorescentes - Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, p. 12-14, 2000. (Embrapa -CNPAB. Documentos, 127).

ZHANG, F.; GE, H.; ZHANG, F.; GUO, N.; WANG, Y.; CHEN, L.; JI, X.; LI, C. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.100, p.64-74, 2016.