

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

CLEVERSON RODRIGUES

**ATIVIDADES BIOQUÍMICAS DE ISOLADOS AMAZÔNICOS DE *TRICHODERMA*,
AÇÃO ANTAGÔNICA AO *FUSARIUM BRASILIENSE* E EFEITO
BIOESTIMULANTE EM PLANTAS DE SOJA**

Ilha Solteira
2023

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CLEVERSON RODRIGUES

**ATIVIDADES BIOQUÍMICAS DE ISOLADOS AMAZÔNICOS DE
TRICHODERMA, AÇÃO ANTAGÔNICA AO *FUSARIUM BRASILIENSE*
E EFEITO BIOESTIMULANTE EM PLANTAS DE SOJA**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de
Ilha Solteira – Unesp como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Dr. André Rodrigues dos Reis
Orientador

Dra. Grace Queiroz David Peres
Coorientadora

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Rodrigues, Cleverson.

R696a Atividades bioquímicas de isolados amazônicos de *Trichoderma*, ação antagônica ao *Fusarium brasiliense* e efeito bioestimulante em plantas de soja / Cleverson Rodrigues. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2023
142 f. : il.

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

Orientador: André Rodrigues dos Reis
Co-orientador: Grace Queiroz David Peres
Inclui bibliografia

1. Bioprospecção. 2. Antagonismo. 3. Bioestimulante. 4. Microbioma. 5. Controle biológico. 6. *Glycine max*.


Amanda Sertori dos Santos

Bibliotecária - CRB/8-9061
Seção Técnica de Referência, Atendimento ao
Usuário e Documentação
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

Impacto potencial desta pesquisa

A bioprospecção revela muitas potencialidades ainda desconhecidas ou ocultas aos olhos da ciência. A busca por novas ferramentas, que permitam melhorar os sistemas agrícolas e incrementar a oferta de alimentos, são de suma importância. Corroborando aos anseios e acordos de sustentabilidade, firmados entre as nações e pautados pelo Brasil em vários planos nacionais para uma agricultura racional e sustentável.

Potential impact of this research

Bioprospecting reveals many potentialities that are still unknown or hidden from the eyes of science. The search for new tools to improve agricultural systems and increase food supply is of paramount importance. Corroborating the sustainability aspirations and agreements, signed between nations, and guided by Brazil in several national plans for rational and sustainable agriculture.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ATIVIDADES BIOQUÍMICAS DE ISOLADOS AMAZÔNICOS DE *TRICHODERMA*, AÇÃO ANTAGÔNICA AO *FUSARIUM BRASILIENSE* E EFEITO BIOESTIMULANTE EM PLANTAS DE SOJA

AUTOR: CLEVERSON RODRIGUES

ORIENTADOR: ANDRÉ RODRIGUES DOS REIS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Agronomia, especialidade: Sistemas de Produção pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ANDRÉ RODRIGUES DOS REIS (Participação Virtual)

Departamento de Engenharia de Biosistemas / Faculdade de Ciências e Engenharia - UNESP

Documento assinado digitalmente
 **ANDRÉ RODRIGUES DOS REIS**
Data: 04/09/2023 18:14:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. SERGIO MIGUEL MAZARO (Participação Virtual)

Departamento de Agronomia / Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR

Documento assinado digitalmente
 **SERGIO MIGUEL MAZARO**
Data: 06/09/2023 15:27:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. SOLANGE MARIA BONALDO (Participação Virtual)

Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais / Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT

Documento assinado digitalmente
 **SOLANGE MARIA BONALDO**
Data: 07/09/2023 10:26:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. FÁBIO FERNANDO DE ARAÚJO (Participação Virtual)

Faculdade de Ciências Agrárias / Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE

Documento assinado digitalmente
 **FABIO FERNANDO DE ARAUJO**
Data: 10/09/2023 22:14:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. MAYTHSULENE INÁCIO DE SOUSA OLIVEIRA (Participação Virtual)

Departamento de Desenvolvimento Tecnológico / Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Arroz e Feijão

Documento assinado digitalmente
 **MAYTHSULENE INACIO DE SOUSA OLIVEIRA**
Data: 11/09/2023 14:12:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Ilha Solteira, 28 de agosto de 2023

DEDICO

Dedico a todos aqueles que vieram antes de mim,
juntamente a meus irmãos e meus pais Antônio Rodrigues e Ceverina Rozário.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as bençãos e lições que me possibilitou durante mais essa jornada.

Agradeço aos meus familiares, em especial a meus pais Seu Antônio e Dona Ceverina, cujos princípios e educação foram alicerce nesse período remoto do ceio familiar.

Aos meus irmãos Cleber, Cléia e Fernando, meus cunhados Marisa e Marcelo, aos meus sobrinhos Caio Vitor, Carlos Eduardo, Camille Vitória e João Lucas, a vocês minha gratidão por todo apoio, que ao longo de uma vida acadêmica se fizeram presentes das mais diversas maneiras.

Honro aqui todos os seres de luz que encontrei nesse caminho e os que trouxe comigo em pensamento, com esses compartilhei muitos momentos, experiências, anseios e angústias... muito obrigado meus amigos vocês foram importantes nesse processo. Em especial a minha amiga Nandhara Mendes que muito me auxiliou para a consolidação dessa pesquisa.

Minha gratidão ao grupo de estudos em fisiologia agrícola - Gefa, grupo esse diverso, dedicado e comprometido com suas pesquisas e abordagens, na qual pude contar com a colaboração de todos durante as avaliações dos experimentos da segunda fase.

Grato a minha coorientadora Grace, que sempre apoiou, encorajou e possibilitou muitas conquistas ao longo desse caminho.

Agradeço a meu orientador André Rodrigues dos Reis, pela disposição, coragem, investimento e apoio desde o início do projeto, permitindo integrar os anseios do mundo agro com suas linhas de pesquisa.

Agradeço muito a instituição pública que me possibilitou alcançar esta titularidade, por meio de seus servidores, que sempre foram solícitos a me atender tanto no Campus de Ilha Solteira como Tupã.

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

A todos o meu muito obrigado.

Epígrafe

“Na natureza, tudo está interligado e interdependente. A verdadeira arte da agricultura está em entender essas conexões e trabalhar em harmonia com elas”

Ana Primavesi

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	13
	REFERÊNCIAS	15
2	CAPÍTULO 1 - MECANISMOS DE AÇÃO E PAPÉIS FISIOLÓGICOS DE <i>TRICHODERMA</i> NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS E EFEITOS ESTIMULANTES NO CRESCIMENTO E RENDIMENTO DAS CULTURAS	17
2.1	INTRODUÇÃO	18
2.2	MECANISMOS DE AÇÃO DE BIOCONTROLE - MAB.....	19
2.2.1	Competição.....	20
2.2.2	Antibiose	21
2.2.3	Micoparasitismo	22
2.3	COMPOSTOS DO METABOLISMO SECUNDÁRIO	23
2.3.1	Compostos orgânicos voláteis - COVs.....	29
2.3.2	Produção de enzimas	30
2.3.3	Produção de ácidos orgânicos, sideróforos e solubilização de fósforo	31
2.4	PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E ESTÍMULOS A MECANISMOS DE DEFESA VEGETAL	34
2.5	INCREMENTOS E GANHOS DE PRODUTIVIDADE	37
2.6	CONSIDERAÇÕES.....	37
	REFERÊNCIAS	38
3	CAPÍTULO 2 - PHOTOGRAPH REGISTRATION OF PETRI DISHES IN HIGH QUALITY AND IMAGE EDITING OF MICROBIOLOGICAL ASSAYS	47
3.1	INTRODUCTION.....	47
3.2	MATERIAL AND METHODS	50
3.2.1	Necessary material	50
3.2.2	Procedures for the confection of the paper tube.....	50
3.2.3	Procedures for the making of the cellphone framework	51
3.2.4	Making of the studio for the photographic registration.....	52
3.2.5	High-Quality Photograph Register – PRHQ Protocol.....	53
3.2.6	Image Editing with Powerpoint tools.....	54
3.2	RESULTS AND DISCUSSION	56
3.3	CONCLUSIONS	61
	REFERENCES	62
4	CAPÍTULO 3 – <i>TRICHODERMA</i>: AÇÃO ANTAGÔNICA AO <i>FUSARIUM BRASILIENSE</i>, DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES BIOQUÍMICAS E COMPATIBILIDADE A PRODUTOS QUÍMICOS.....	63

4.1	INTRODUÇÃO	65
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	66
4.2.1	Isolados biológicos	66
4.2.1.1	<i>Obtenção dos isolados de Trichoderma spp. e F. brasiliense</i>	66
4.2.1.2	<i>Identificação molecular dos isolados nativos de Trichoderma spp.</i>	67
4.2.2	Antagonismo	69
4.2.2.1	<i>Pareamento de colônias</i>	69
4.2.2.2	<i>Produção de Compostos orgânicos voláteis (COV's)</i>	71
4.2.3	Atividades bioquímicas	72
4.2.3.1	<i>Atividade Quitinolítica</i>	72
4.2.3.2	<i>Atividade Celulolítica</i>	73
4.2.3.3	<i>Determinação de ácido indol acético (AIA)</i>	73
4.2.3.4	<i>Sideróforos</i>	74
4.2.3.5	<i>Solubilização de P (Fosfatos de cálcio, alumínio e ferro)</i>	75
4.2.3.6	<i>Solubilização de K</i>	76
4.2.4	Compatibilidade com fungicidas e herbicida	76
4.2.4.1	<i>Teste de sensibilidade do Trichoderma spp. a fungicidas utilizados no tratamento de sementes (Ts) de soja</i>	77
4.2.4.2	<i>Teste de sensibilidade de Trichoderma spp. ao herbicida Glifosato</i>	78
4.2.5	Registro fotográfico das placas de Petri	80
4.2.6	Análises estatísticas	80
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
4.3.1	Isolados biológicos	80
4.3.1.1	<i>Identificação molecular dos isolados nativos de Trichoderma spp.</i>	80
4.3.2	Antagonismo	80
4.3.2.1	<i>Pareamento de colônias</i>	80
4.3.3	Compostos Orgânicos Voláteis - COV's	83
4.3.4	Atividades bioquímicas	86
4.3.4.1	<i>Atividade Quitinolítica e Celulolítica</i>	86
4.3.4.2	<i>Produção de ácido indol acético (AIA)</i>	88
4.3.4.3	<i>Sideróforos</i>	89
4.3.4.4	<i>Solubilização de fósforo</i>	90
4.3.4.5	<i>Solubilização de potássio</i>	93
4.3.5	Compatibilidade com moléculas químicas	94
4.3.5.1	<i>Compatibilidade no Tratamento de sementes - Fungicidas</i>	94

4.3.5.2	<i>Compatibilidade com Herbicida – Teste de Tanque</i>	96
4.4	CONCLUSÃO	98
	REFERÊNCIAS	99
5	CAPÍTULO 4 - POTENCIAL BIOESTIMULANTE DE <i>TRICHODERMA</i> NO CRESCIMENTO, DESEMPENHO FISIOLÓGICO E PRODUTIVIDADE DA SOJA.....	106
5.1	INTRODUÇÃO	107
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	108
5.2.1	Preparo do solo.....	108
5.2.2	Preparo do inóculo	109
5.2.3	Multiplicação em fermentação sólida (arroz).....	109
5.2.3.1	<i>Inoculação de Trichoderma spp. no solo</i>	110
5.2.4	Semeadura da soja.....	110
5.2.4.1	<i>Aplicação de Trichoderma spp. via foliar</i>	111
5.2.5	Análises agronômicas.....	111
5.2.5.1	<i>Altura parte aérea (cm)</i>	111
5.2.5.2	<i>Comprimento raiz (cm)</i>	111
5.2.5.3	<i>Massa seca da parte aérea e da raiz (g)</i>	111
5.2.5.4	<i>Número de nódulos e peso dos nódulos (g)</i>	111
5.2.5.5	<i>Número de vagens</i>	112
5.2.5.6	<i>Produtividade por vaso (g) e o peso de 100 grãos (g)</i>	112
5.2.6	Análises fisiológicas.....	112
5.2.6.1	<i>Pigmentos fotossintéticos</i>	112
5.2.6.2	<i>Malondialdeído (MDA) e Peroxido de hidrogênio (H₂O₂)</i>	112
5.2.6.3	<i>Metabolismo antioxidante</i>	112
5.2.6.4	<i>Compostos nitrogenados</i>	113
5.2.6.5	<i>Indução de resistência</i>	113
5.2.6.6	<i>Proteínas de reserva</i>	116
5.2.7	Teste de colonização radicular	116
5.2.8	Análises estatísticas.....	117
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	117
5.3.1	Desenvolvimento vegetativo e nodulação.....	117
5.3.2	Pigmentos fotossintéticos	122
5.3.3	MDA e H ₂ O ₂ e Enzimas antioxidantes	123
5.3.4	Compostos nitrogenados	125
5.3.4.1	<i>Teor de açúcar total em folhas e nódulos</i>	126

5.3.5	Enzimas de indução de resistência e fitoalexina	127
5.3.6	Indicadores de produtividade e qualidade grãos	130
5.3.6.1	<i>Qualidade bioquímica dos grãos produzidos</i>	132
5.3.7	Correlação dos dados	133
5.4	CONCLUSÕES	134
	REFERÊNCIAS	134
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	140

1 INTRODUÇÃO GERAL

No cenário agrícola atual os bioinsumos surgem como uma resposta inovadora e promissora aos desafios enfrentados pela produção sustentável de alimentos. Esses produtos, derivados de microrganismos benéficos, extratos vegetais ou compostos naturais, representam uma mudança na abordagem do manejo agrícola. Os bioinsumos oferecem uma alternativa aos agroquímicos tradicionais, ao proporcionar ações que vão desde o controle biológico de pragas e doenças até a promoção do crescimento das plantas e o aumento da resistência a estresses ambientais (Souza et al., 2022).

O modelo agrícola, pautado em grandes áreas de monocultivos e a crescente perda de eficácia dos fungicidas convencionais, contribuem para o aumento no número de doenças em plantas de interesse agrícola. A utilização contínua e intensiva dos mesmos princípios ativos, levou ao desenvolvimento de resistência por parte dos patógenos, reduzindo drasticamente sua capacidade de controlar muitas doenças, impactando diretamente as cadeias produtivas agrícolas (Carmona; Sautua, 2017).

Na busca por estratégias para reverter essa problemática, a bioprospecção tem possibilitado a geração de tecnologias promissoras e potenciais para o segmento agrícola, buscando métodos que reduzam a dependência de agroquímicos e minimizem os impactos negativos no ambiente.

O Brasil desponta em políticas e metas ambientais, que torna o sistema de produção de alimentos e recursos mais sustentáveis. O Plano Agricultura de Baixa Emissão de Carbono (Plano ABC+), que se concentra na redução das emissões de carbono através de práticas como plantio direto e integração lavoura-pecuária-floresta e o Plano Nacional de Bioinsumos (PNB), que promove a pesquisa e uso de insumos agrícolas de origem biológica, visando reduzir o uso de produtos químicos sintéticos, compartilham o objetivo de tornar a agricultura brasileira mais sustentável, e podem, em certos casos, complementar-se para promover sistemas agrícolas mais amigáveis ao ambiente (MAPA, 2023).

Fortalecendo essa necessidade, na última década a indústria passou a investir e oferecer moléculas e tecnologias de natureza biológica, colocando em ascensão o segmento de produtos biológicos. Esses produtos têm demonstrado ampla aptidão e abrangência, desde o controle de doenças até a promoção do crescimento e aumento produtivo das plantas; representando uma alternativa promissora aos agroquímicos convencionais (Soares, 2022).

Dentre os produtos biológicos, compostos por microrganismos como bactérias e fungos, o gênero *Trichoderma* têm se destacado devido à sua versatilidade e capacidade de interação com as plantas, tornando-se uma valiosa ferramenta para o manejo de doenças eficaz e sustentável.

A incorporação de *Trichoderma* no manejo agrícola pode resultar em aumentos significativos na produtividade das culturas como soja (Chagas Junior et al., 2021), milho (Steffen et al., 2021), feijão (Peres, 2022), arroz (Eidt et al., 2020), trigo (Oliveira, 2017) e caupi (Santos et al., 2020). Além disso, a capacidade do *Trichoderma* em melhorar a resistência das plantas a estresses bióticos (causados por patógenos) e abióticos (como seca) amplifica ainda mais seu valor na agricultura.

Cepas de *Trichoderma* possuem a capacidade produzir inúmeros metabólitos secundários (voláteis e não-voláteis), agindo como antibióticos ou enzimas hidrolíticas, capazes de inibir ou destruir propágulos de fungos, bactérias e nematoides fitopatogênicos, são descritos mais de 120 compostos em diferentes estruturas moleculares, tornando uma das fontes de maior diversidade metabólica do Reino Fungi (Harman, 2000; Hermosa et al., 2012, Monte et al., 2019).

Arelado ao seu arsenal metabólico, o *Trichoderma* também apresenta inúmeras enzimas, como as fosfatases que melhoram a disponibilidade de fósforo para as plantas, e a produção de ácido indolacético (AIA), que estimulam o crescimento das raízes e melhoram a eficiência do sistema radicular, aumentando a capacidade de absorção de água e nutrientes (Sood et al., 2020).

O *Trichoderma* também desencadeia a produção de moléculas que promovem a resistência sistêmica adquirida nas plantas, fortalecendo suas defesas contra patógenos. Essas moléculas ativam caminhos de sinalização que amplificam a resposta imune das plantas, permitindo que elas enfrentem melhor os desafios de infecções fúngicas.

Essas comprovações permitem investigar a ação do *Trichoderma*, principalmente no manejo de doenças radiculares, por meio de mecanismos como competição, antibiose, e micoparasitismo, elevando sua eficiência no controle de diversos patógenos de solo, como a podridão vermelha radicular da soja, causada na América do Sul pelo *Fusarium brasiliense*. Os danos levam a reduções de produtividade em até 27% e desfolha de acima de 30% em R6 (Farias Neto et al., 2008). Ainda não há produtos registrados ou eficientes para o manejo do *F. brasiliense*.

A soja é uma importante matriz energética para as cadeias produtivas atuais e considerando as projeções de aumento populacional nas próximas décadas é necessário

pesquisas que possam melhorar a produção de alimentos, seja integrando essas ferramentas biológicas, reduzindo o uso de moléculas sintéticas ou de origem fóssil não renovável.

A presente pesquisa está estruturada em quatro capítulos, nos quais as abordagens culminam em confirmar as seguintes hipóteses:

- Os isolados de *Trichoderma* serão antagônicos ao *Fusarium brasiliense*, expressando diferentes mecanismos de ação.
- Os isolados terão atividades bioquímicas que poderão beneficiar as plantas.
- Haverá melhoria no metabolismo fisiológico das plantas
- O *Trichoderma* induzirá a síntese de ureídeos, convertendo-os em aminoácidos e proteínas
- A interação tripartite (planta-*Trichoderma*-*Bradyrhizobium*) será potencializada.
- Os isolados de *Trichoderma* promoverão o aumento do desenvolvimento das plantas de soja.
- O efeito bioestimulante na soja refletirá na produtividade.

Nesse contexto, este estudo tem como objetivo avaliar *in vitro* as atividades bioquímicas produzidas por isolados de *Trichoderma*, nativos do bioma amazônico e verificar os mecanismos de ação e antagonismo sobre o *Fusarium brasiliense*, e quando em condições *in vivo* caracterizar as atividades fisiológicas e os desempenhos fitotécnicos decorridos do efeito bioestimulante em plantas de soja.

REFERÊNCIAS

- CAMPEÃO, P., SANCHES, A. C., MACIEL, W. R. E. Mercado Internacional de Commodities: uma análise da participação do Brasil no mercado mundial de soja entre 2008 e 2019. **Desenvolvimento em Questão**, Ijuí, v.18, n.51, p.76-92, 2020.
- CARMONA, M., SAUTUA, F. La problemática de la resistencia de hongos a fungicidas. Causas y efectos en cultivos extensivos. **Agronomía & Ambiente**, Buenos Aires, v.37, n.1, 2017.
- CHAGAS JUNIOR, A. F., CHAGAS, L. F. B, MARTINS, A. L. L, COLONIA, B. S. O., OLIVEIRA, R. S. Soybean productivity with *Trichoderma asperellum* seed treatment in different regions of the Brazilian Cerrado. **Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, Recife, v.16, n.4, p.1-8, 2021.
- EIDT, R. T., BERNARDO, J. T., BARROS, J. N. G., AGUILERA, J. G., GROHS, M., COSTA, D. F. A. Evaluation of the use of Agrohomoepathy and *Trichoderma* sp. in the productivity of rice susceptible to blast. **Research, Society and Development**, Vargem Grande Paulista, v.9, n.9, p.e416997420, 2020.
- FARIAS NETO, A. L. D., SCHMIDT, M., HARTMAN, G. L., SHUXIAN, L., DIERS, B. W. Inoculation methods under greenhouse conditions for evaluating soybean resistance to sudden death syndrome. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, p.1475-1482, 2008.

HARMAN, G. E. Myths and Dogmas of Biocontrol Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant disease**, Geneva, v.84, n.4, p.377-393, 2000.

HERMOSA, R., VITERBO, A., CHET, I., MONTE, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, Nova Iorque, v.158, n.1, p.17-25, 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Programa Nacional de Bioinsumos**. Brasília, DF, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos>

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

OLIVEIRA, J. B. **Promoção do crescimento e da produtividade de trigo pelo emprego de cepas comerciais de *Trichoderma* spp**, 2017. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Estadual de Goiás, Ipameri, 2017.

PERES, W. M. Uso de *Trichoderma atroviride* na cultura do feijoeiro. 2022. Tese (Doutorado em Agronomia). Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP, Ilha Solteira, 2022.

SANTOS, G. R., REIS, H. B., ROTILI, E. A., MOURÃO, D. D. S. C., FARIAS, D. I. O. A., PEREIRA, T. A., JUNIOR, A. F. C. Inoculation of *Rhizobium* associated with *Trichoderma asperellum* on the development and yield of cowpea. **Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, Recife, v.15, n.2, p.1-8, 2020.

SOARES, C. O. O próximo salto da agricultura. **AgroANALYSIS**, São Paulo, v.42, n.4, p.21-22, 2022.

SOOD, M., KAPOOR, D., KUMAR, V., SHETIWIY, M.S., RAMAKRISHNAN, M., LANDI, M., ARANITI, F., SHARMA, A. *Trichoderma*: The “secrets” of a multitasking biocontrol agent. **Plants**, Basileia, v.9, n.6, p.762, 2020.

SOUZA, F. P., CASTILHO, T. P., MACEDO, L. O. Um marco institucional para os bioinsumos na agricultura brasileira baseado na economia ecológica. **Sustainability in Debate**, Brasília, DF, v.13, n.1, p.266-285, 2022.

STEFFEN, G. P. K, TOMAZZI, D. J., STEFFEN, R. B., GABE, N. L., SILVA, R. F., MORTARI, J. L. M., MALDANER, J. Incremento da produtividade de milho pela inoculação de *Trichoderma harzianum*. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.1, p.4455-4468, 2021.

2 **CAPÍTULO 1 - MECANISMOS DE AÇÃO E PAPÉIS FISIOLÓGICOS DE *TRICHODERMA* NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS E EFEITOS ESTIMULANTES NO CRESCIMENTO E RENDIMENTO DAS CULTURAS**

RESUMO

É necessário aumentar a produção de alimentos para atender o aumento da população mundial. A aplicação de fungicidas é um dos principais gastos na produção de alimentos. São necessárias alternativas de controle que visem reduzir a agressividade dos patógenos e melhorar o desempenho do vegetal de forma eficiente com redução dos danos ao meio ambiente. Agentes de biocontrole como os fungos antagonistas do gênero *Trichoderma* desencadeiam inúmeras reações fisiológicas, bem como indução de resistência e promoção de crescimento do vegetal, garantindo assim a produtividade das culturas. O *Trichoderma* tem a capacidade de produção de metabólitos antifúngicos, enzimas hidrolíticas da parede celular como proteases e glucanases. Além disso, o *Trichoderma* é capaz de realizar a disponibilização de fósforo (fosfatases ou ácidos orgânicos), absorção e disponibilização de ferro (sideróforos), ou ainda promover crescimento através de ação indireta. A aplicação do *Trichoderma* na agricultura tem promovido o crescimento de plantas pela produção de fitohormônios e indóis relacionados ao ácido indolacético, ácido salicílico, ácido jasmônico, etileno e indução do sistema de defesa da planta pelo aumento da atividade da quitinase e peroxidase, cuja resposta imune é dependente da cepa, concentração, duração da interação e do estado de desenvolvimento e órgão da planta. Essa revisão de literatura compila e sumariza os principais mecanismos de ação de *Trichoderma* atrelados ao biocontrole e seus efeitos fisiológicos como estimulantes do crescimento e rendimento produtivo das culturas agrícolas.

Palavras-chave: controle biológico; antagonismo; bioestimulantes.

ABSTRACT

It is necessary to increase food production to meet the increase in world population. The application of fungicides is one of the main expenses in food production. Control alternatives are needed that aim to reduce the aggressiveness of pathogens and improve plant performance efficiently with reduced damage to the environment. Biocontrol agents such as antagonistic fungi of the genus *Trichoderma* trigger numerous physiological reactions, in addition to inducing resistance and promoting plant growth, thus ensuring crop productivity. *Trichoderma* has the ability to produce antifungal metabolites, cell wall hydrolytic enzymes such as proteases

and glucanases. Furthermore, *Trichoderma* is capable of making phosphorus available (phosphatases or organic), absorbing and making iron available (siderophores), or even promoting growth by indirect action. The application of *Trichoderma* in agriculture has promoted plant growth through the production of phytohormones and indoles related to indoleacetic acid, salicylic acid, jasmonic acid, ethylene and the induction of the plant's defense system by increasing the activity of chitinase and peroxidase, whose immune system response depends on the strain, concentration, duration of interaction, developmental state and organ of the plant. This literature review compiles and summarizes the main switches of action of *Trichoderma* and linked to biocontrol its physiological effects as growth stimulants and productive yield of agricultural crops.

Keywords: biological control; antagonism; biostimulants.

2.1 INTRODUÇÃO

Os modelos agrícolas de produção limitam-se a inúmeros fatores, sejam eles: as adversidades ambientais ou causas bióticas. De modo que novas ferramentas, como uso de produtos biológicos, ganham espaço e otimizam os moldes agrícolas dos cenários atuais, visando suprir as demandas de alimentos e reduzir os efeitos negativos consolidados, como a resistência de muitas pragas às moléculas químicas.

As práticas de manejo cultural das áreas de produção e o uso de mecanismos biológicos de controle surgem como novas estratégias para uma agricultura sustentável. Guzman-Guzman et al. (2023) apontam em suas compilações inúmeras vantagens e estratégias atribuídas ao controle biológico por meio do gênero fúngico *Trichoderma*.

Vários são os benefícios apontados por Woo et al. (2023) em sua revisão, voltada à multifuncionalidade deste gênero para as áreas agrícolas, inclusive demonstrando o quão expressivo é este seguimento na formulação de produtos, principalmente em países líderes na produção de matrizes energéticas (ex.: soja, milho) como o Brasil, que se destaca no cenário global por suas legislações e número de registros de produtos à base de *Trichoderma*.

As espécies de *Trichoderma* são de vida livre, antagonistas a vários fitopatógenos, bem distribuídos e altamente interativos na raiz e solo, bem como no interior de plantas. São consideradas saprófitas e de grande interesse científico, por serem utilizadas como agentes de controle biológico e produtores de enzimas para uso industrial (Tyśkiewicz et al., 2022).

Entre alguns mecanismos antagonistas, destaca-se a competição por nutrientes, produção de metabólitos antifúngicos, enzimas hidrolíticas da parede celular, quitinases, proteases e glucanases, além do micoparasitismo, liberação de hormônios e biossolubilização de elementos nutricionais como fósforo e potássio na zona rizosférica (Manzar et al., 2022).

Os estudos descrevem que o gênero *Trichoderma* atua sinérgica ao vegetal e promove uma série de reações que atuam na germinação de sementes, nos processos bioquímicos durante o crescimento das plantas, elicitação as defesas das plantas diante a presença de patógenos, além de mitigar estresses abióticos como seca, veranicos ou salinidade.

Monte et al. (2019), acrescentam que como resultado dessa interação, surgem distintos sistemas de regulação gênica que podem estimular o crescimento da planta, adaptando-se às condições sub-ótimas de cultivo ou defendendo-se por meio de mecanismos de resistência sistêmica, isso culmina em benefícios fisiológicos e possivelmente ganhos em rendimento e produtividade

Essa revisão traz um panorama dos efeitos dessa interação, seus mecanismos de ação e principais metabólitos envolvidos no decorrer do biocontrole, bem como estes estão atreladas ao aumento de produtividade das culturas.

2.2 MECANISMOS DE AÇÃO DE BIOCONTROLE - MAB

Diferentes mecanismos são desencadeados durante o antagonismo, ou seja, as relações entre os agentes de biocontrole e os organismos alvos. No caso do *Trichoderma* há uma grande produção de metabólitos oriundos de elevado número de genes, que garantem amplo oportunismo ambiental.

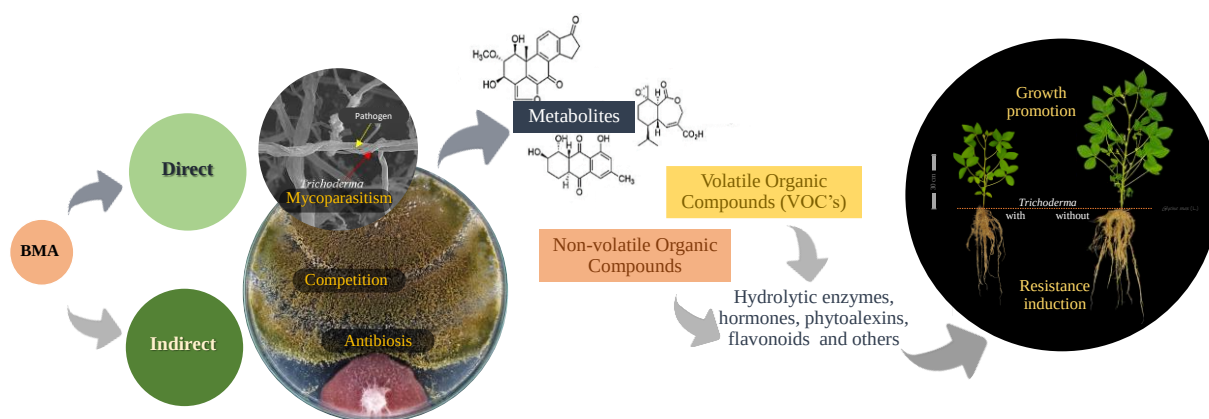
É o gênero fúngico que possui maior capacidade de codificar enzimas hidrolíticas, como proteases, quitinases e glucanases graças a presença de chaperonas e transportadores ABC. Considerando a fisiologia do organismo fúngico, estes se nutrem absorvendo os nutrientes por meio de suas hifas, para tanto necessitam liberar enzimas extracelulares capazes de degradar a parede celular e hidrolisar as moléculas de alto peso molecular tornando-as compostos nutricionais menores e assimiláveis (Monte et al., 2019).

O sucesso do biocontrole pelo *Trichoderma* está associado a uma série de fatores, como a elevada capacidade reprodutiva, alta eficiência no aproveitamento de nutrientes e crescimento em condições adversas, modificador da zona rizosférica, forte agressividade contra fungos fitopatogênicos e promotor de crescimento e indutor de defesa vegetal (Benítez et al., 2004).

Essas respostas diretas (micoparasitismo) ou indiretas (competição e antibiose) causadas pela presença do *Trichoderma*, caracterizam os principais mecanismos de ação de

biocontrole (MAB), de modo que podem ocorrer simultaneamente em maior ou menor intensidade, por meio da liberação de inúmeros metabólitos (voláteis ou não) que exercem diversas atividades bioquímicas como: enzimas hidrolíticas, hormônios indutores de auxinas, liberação de ácidos orgânicos solubilizadores, elicitação de fitoalexinas, aumento da sinalização de flavonoides e outros compostos que incrementam o microbioma radicular e beneficiam todo o desenvolvimento da planta. Esses mecanismos foram esquematizados e representados na figura 1.

Figura 1 - Principais mecanismos de ação de biocontrole desencadeados pela presença de *Trichoderma* na zona da rizosfera



Fonte: Elaboração do próprio autor

2.2.1 Competição

A competição é um importante mecanismo quando se trata da eficiência no controle biológico, visto que a partir deste, o antagonista, pode reduzir a oferta de recursos, como nutrientes, oxigênio, luz, espaço físico, entre outros requerimentos que garantiriam a permanência de organismos como os fitopatógenos que ali habitam, conforme evidenciam os vários trabalhos, cuja supressão de inúmeros patógenos é devido à presença do *Trichoderma* (Mahmood et al., 2018; Al-Ani, 2019)

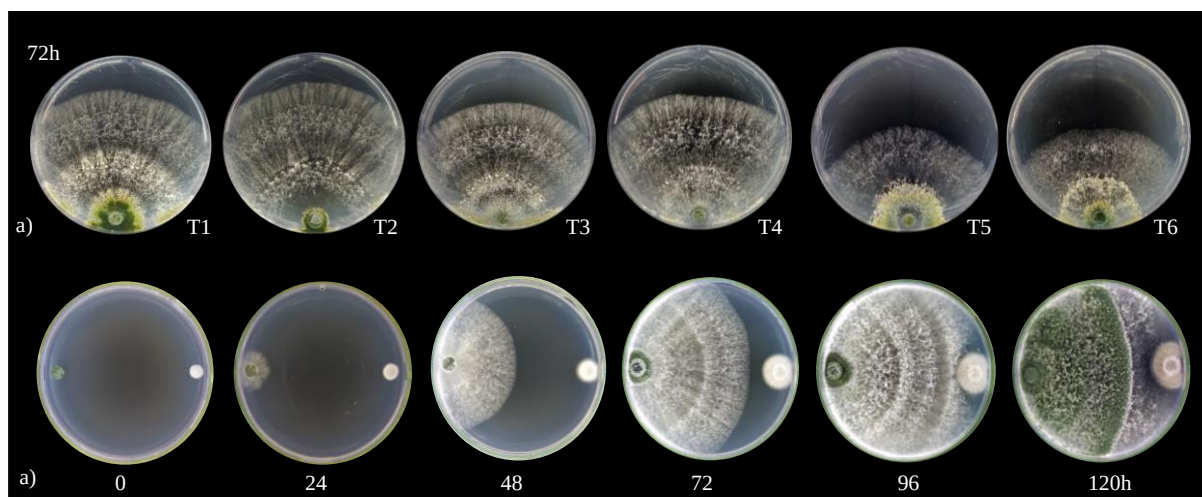
A competição por nutrientes, mesmo sendo indireta, proporciona ao *Trichoderma* ser um agente de controle formidável, possibilitando-o a colonização de diferentes substratos em diversas regiões, expressando assim um amplo oportunismo ambiental, fato que o permite agilidade no antagonismo, principalmente na rizosfera, zona de intensa atividade microbiana e extravasamento de secreções vegetativas que permitem tamanha riqueza, mantendo-o ativo e

colonizando os mais diferentes nichos, além de desencadear inúmeras reações, como a produção de ácidos orgânicos, enzimas e compostos que liberam o fósforo ou quelam elementos como ferro (Infante et al., 2009; Prajapati et al., 2020)

O *Trichoderma* exibe uma elevada capacidade de mobilizar e absorver nutrientes do solo em comparação com outros microrganismos rizosféricos; logo a disponibilidade limitada e a competição por nutrientes levam ao manejo natural de fungos fitopatogênicos (Sood et al., 2020). Ressalta-se ainda que durante as interações de fungos a competição por macro e micronutrientes como nitrogênio, carbono e ferro desempenham papel fundamental, oferecendo grandes vantagens aos sistemas de biocontrole.

Em testes *in vitro* esse mecanismo se torna um importante critério para seleção de cepas, visto que indicam as potencialidades competitivas que poderiam ocorrer frente a um patógeno (Figura 2).

Figura 2 - a) Capacidade competitiva de miceliação em meio de cultura para seleção de *Trichoderma* spp. (T1, T2, T3, T4, T5 e T6) após 72 horas de incubação. b) Rastreamento da competição *in vitro* entre *Trichoderma* sp. e *Corynespora cassiicola* acima de 120h, observando que o antagonista limita totalmente a área disponível, permitindo melhor aproveitamento dos recursos disponíveis do meio de cultura



Fonte: Elaboração do próprio autor

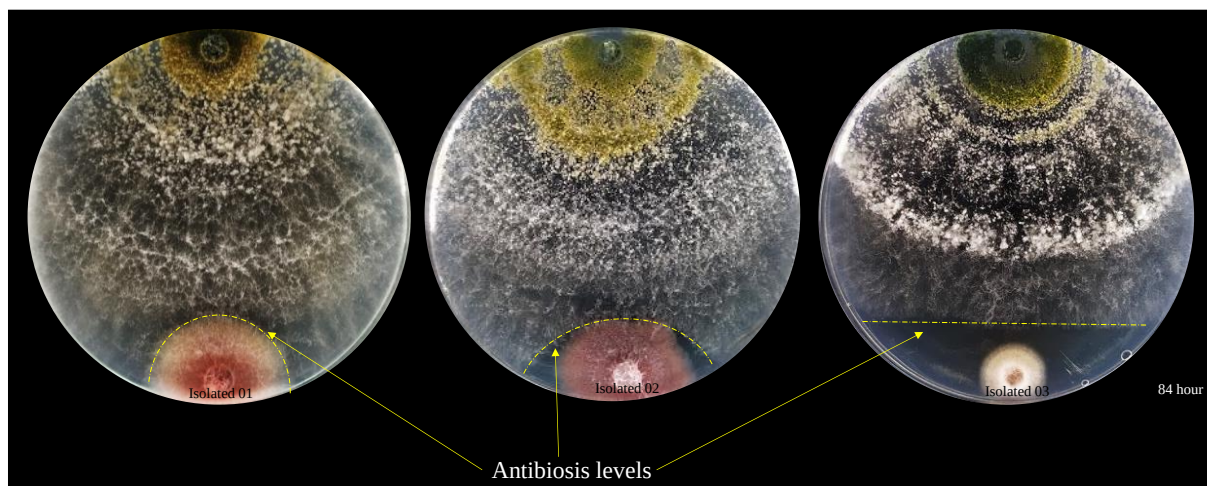
2.2.2 Antibiose

Esse conceito está relacionado a interação entre os organismos de uma população, que são capazes de secretar metabólitos, a fim de inibir ou impedir o desenvolvimento de indivíduos de uma outra espécie. Cepas de *Trichoderma* possuem a capacidade produzir inúmeros

metabólitos secundários voláteis e não-voláteis, como antibióticos e enzimas hidrolíticas, capazes de inibir ou destruir propágulos de fungos, bactérias e nematoides fitopatogênicos; além de apresentar ampla variedade e aplicação potencial, pois são vários compostos distribuídos em mais de 120 estruturas moleculares, tornando-se uma das fontes de maior diversidade metabólica do Reino Fungi (Harman, 2000; Hermosa et al., 2012, Monte et al., 2019)

A antibiose desempenha importante papel no controle biológico de doenças radiculares. A combinação de antibióticos e enzimas hidrolíticas resultam em um nível mais alto de antagonismo do que qualquer um dos mecanismos isoladamente. Quando em campo seus efeitos nem sempre são distintos aos do micoparasitismo (Lobo Junior et al., 2019), e quando em laboratório os testes *in vitro* revelam a potencialidades antibiótica de muitos isolados de *Trichoderma* com elevada eficiência antagônica, conforme evidenciado na figura 3.

Figura 3 - Observação dos diferentes níveis de antibiose promovidos em resposta ao pareamento antagonista de *Trichoderma* sp. e três isolados de *Fusarium* spp. O halo entre as duas colônias revela a liberação de compostos metabólicos que impedem o avanço e o desenvolvimento da colônia do fitopatógeno



Fonte: Elaboração do próprio autor

2.2.3 Micoparasitismo

Vários isolados do gênero *Trichoderma* possuem o micoparasitismo como principal mecanismo de ação durante o biocontrole. O ataque direto de um fungo a outro é um processo complexo que envolve uma série de eventos, incluindo reconhecimento, avanço, penetração e consequentemente a morte do hospedeiro (Benítez et al., 2004).

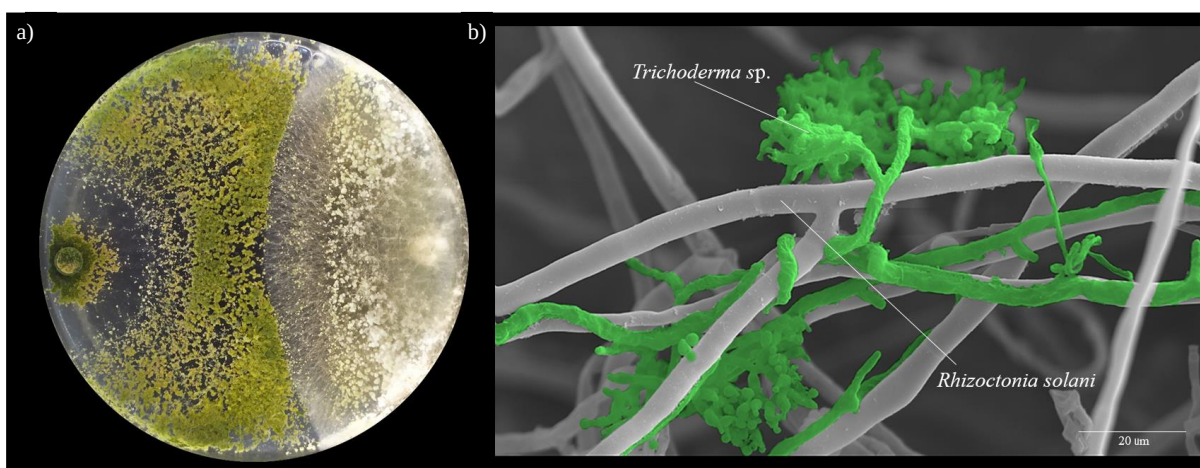
O *Trichoderma* apresenta esse potencial de biocontrole direto por detectar outros fungos e crescer em direção a eles, graças a receptores e vias de sinalização intracelular para detecção e interação de sinais liberados pelo fitopatógeno. Esse direcionamento induzido ocorre antes do contato físico direto, devido a ação de um conjunto de genes presentes em receptores da superfície celular das hifas do *Trichoderma* (Druzhinina et al., 2018, 2011)

Os genes reconhecem oligocitosacarídeos e oligopeptídeos do fungo-presa, liberando enzimas que degradam a parede celular desencadeando (Seidl et al., 2009)

O micoparasitismo decorrente da ação deste gênero, possibilita inúmeras cepas com amplo potencial de aplicação nas áreas de produção. Para tanto, testes *in vitro* permitem elucidar o comportamento destes isolados frente aos principais fitopatógenos de difícil controle das áreas agrícolas (Figura 4).

Conforme Contreras-Cornejo et al. (2020), o micoparasitismo é um processo complexo, na qual o *Trichoderma* spp. é capaz de promover inúmeras reações para coordenar a expressão gênica e produção de metabólitos secundários eficazes contra sua presa.

Figura 4 - a) Bioensaios *in vitro* mostrando o mecanismo de ação do micoparasitismo de *Trichoderma* spp. no fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani*. b) Imagens de microscopia eletrônica de varredura revelam contato físico direto, promovendo o enrolamento das hifas de *Trichoderma* spp. (em verde – edição em Photoshop) sobre o patógeno *R. solani* (cinza)



Fonte: Elaboração do próprio autor

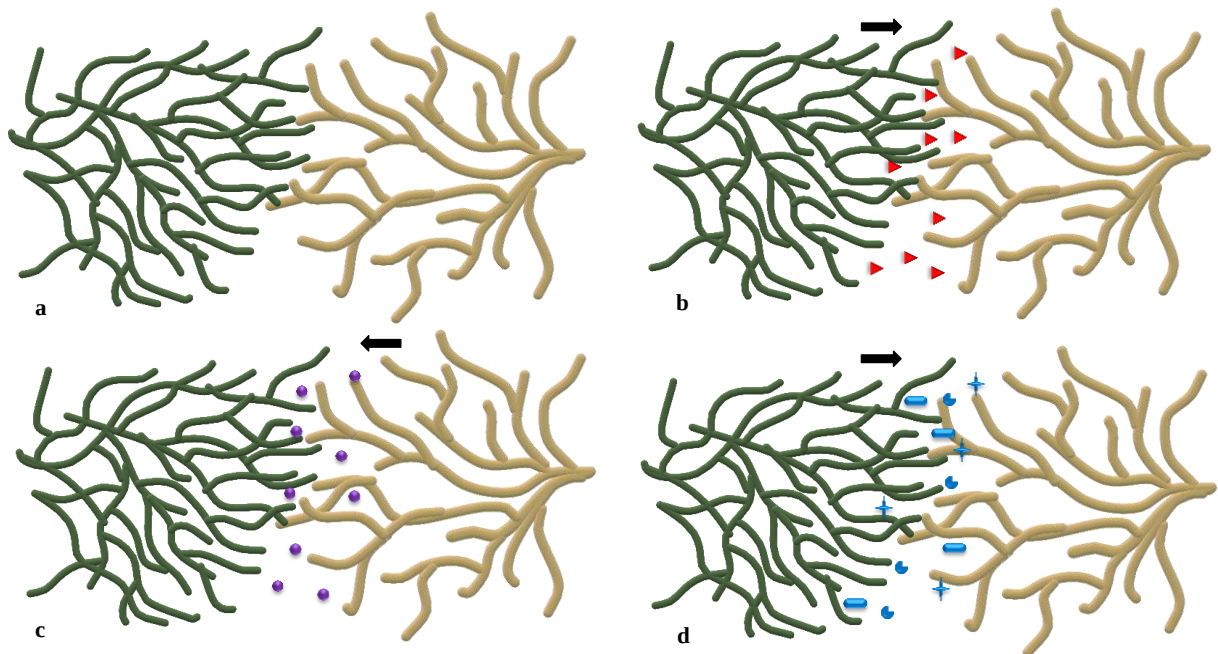
2.3 COMPOSTOS DO METABOLISMO SECUNDÁRIO

Estudos sobre os mecanismos de ação do *Trichoderma* spp. adotando técnicas de biologia molecular evidenciam que além da competição, micoparasitismo e antibiose, há uma importante ação de metabólitos secundários produzidos pelo fungo, agindo como promotor de

crescimento de plantas e como indutor de resistência a patógenos (Harman et al., 2004; Hermosa et al., 2012).

Esses metabólitos secundários são compostos químicos de baixa massa molecular e muito diversificados e estão envolvidos em vias de sinalização, desenvolvimento e interação com outros organismos. No entanto, não exercem um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento do *Trichoderma*, esses metabólitos são importantes na colonização de habitats, oferecendo vantagem ecológica na conquista do ambiente (Ramada et al., 2022) e garantam que suas aplicações reduzam as perdas das safras (Figura 5).

Figura 5 - Representação da interação de *Trichoderma* com fitopatógenos e comportamento da direção de resposta na liberação de compostos metabólitos (←→). a) Encontro da hifa de *Trichoderma* (verde) com o fitopatógeno (bege); b) liberação de metabólitos produzidos por *Trichoderma* (▶); c) resposta do fitopatógeno (●) devido à ação do *Trichoderma*; d) contrarresposta de *Trichoderma* com a secreção de diferentes enzimas hidrolíticas (◀ + ▶)



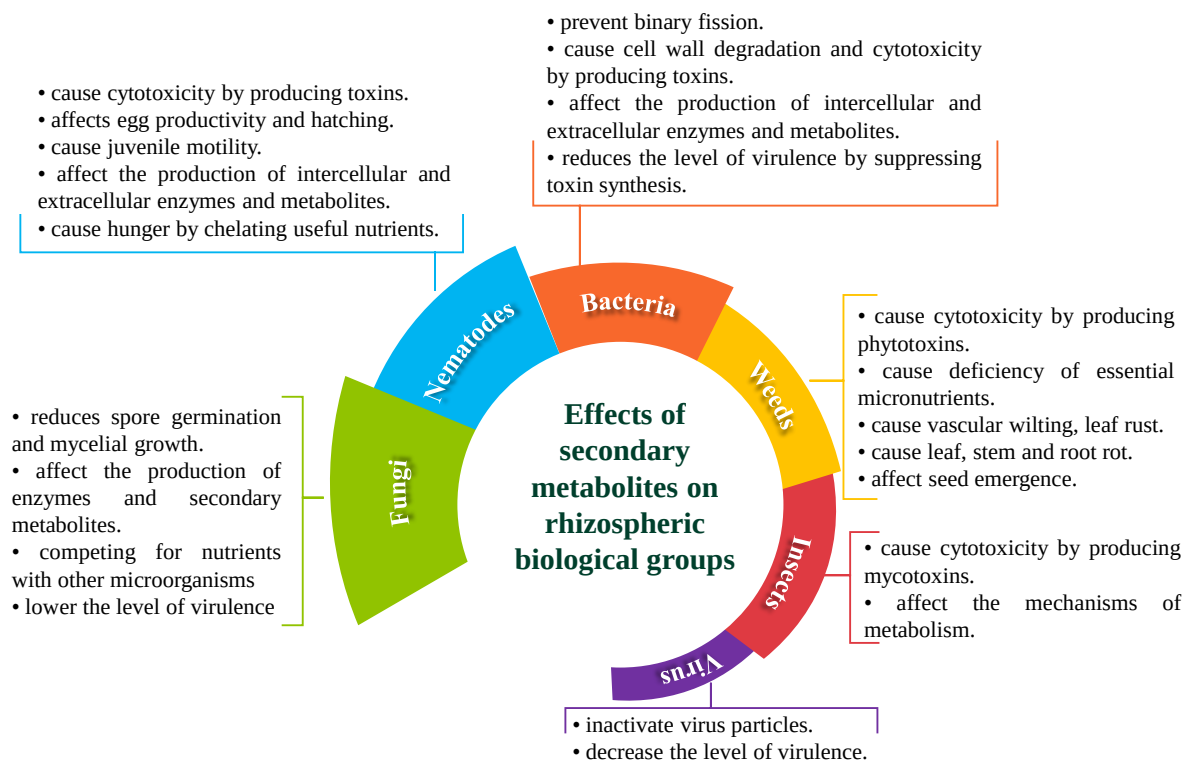
Fonte: Adaptado de Ramada et al. (2022).

A grande diversidade de organismos-alvo parasitados pelo *Trichoderma* é o que possibilita a ampla variedade de metabólitos secundários. Em geral, esses metabólitos são ácidos orgânicos, cetonas, ésteres, éteres, hidrocarbonetos, peptídeos, pironas, policetídeos, enxofre e compostos contendo nitrogênio. Esses compostos podem exibir uma infinidade de funções biológicas e atuar como protagonistas em diversas interações entre organismos, seja

entre: fungo – fungos; fungo – planta, ou na rizosfera entre fungo – microbiota local como bactérias e nematoides (Mukherjee et al., 2012).

Vinale e Sivasithamparam (2020), afirmam que muitos genes fúngicos envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários não são transcritos sob condições *in vitro*, mas podem ser ativadas quando há presença de comunidades microbianas complexas, principalmente na zona rizosférica, conforme descrito por Al-Ani (2019) e esquematizado na figura 6.

Figura 6 - Efeitos gerados pelos metabólitos secundários produzidos por *Trichoderma* spp. aos diferentes grupos biológicos presentes na rizosfera vegetal



Fonte: Elaboração do próprio autor

A produção de metabólitos secundários de origem fúngica compreendem vias bioquímicas incomuns que levam a diferentes compostos naturais obtidos de alguns precursores do metabolismo primário (aminoácidos, acetil-CoA e mevalonato) (Zeilinger et al., 2016) ou produtos de complexos enzimáticos chamados de sintetases não ribossomais, conhecidos como peptaibols (Mukherjee et al., 2012).

São descritas mais de 500 estruturas diferentes produzidas por *Trichoderma*, onde são exemplos de grupos de metabólitos secundários compostos como: esteroides, gliotoxinas,

gliovirinas, pironas, quinonas, terpenóides e peptídeos antibióticos (peptaibols) (Patil et al., 2016).

Destaca-se entre estes, compostos como: peptaibóis, sesquiterpenos, policetídeos, alquilpironas, esteróides, isonitrilas e dicetopiperazinas, que são metabólitos de propriedades antibióticas frequentemente associadas à atividade de biocontrole. As classes e os diferentes metabólitos secundários produzidos pelo *Trichoderma*, foram sumarizados por Khan et al., (2020), atualizados e representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais classes e respectivos metabólitos secundários produzidos pelo gênero *Trichoderma* spp. com ação sobre fungos fitopatogênicos

Class	Secondary metabolite	Species <i>Trichoderma</i> promoter	Activity	Target organism	Reference
Epipolythiodioxopiperazines/Diketopiperazines	Gliotoxin	<i>T. lignorum</i> , <i>T. viride</i> , <i>T. hamatum</i>	antimicrobial	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Rhizoctonia bataticola</i> , <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Pythium deharayanum</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Botrytis cinerea</i>	Scharf et al. (2016); Mukherjee et al. (2012); Zaid et al. (2022)
	Gliovirin	<i>T. virens</i> , <i>T. longibrachiatum</i>	antimicrobial	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium ultimum</i> <i>Sclerotium rolfsii</i>	Vargas et al. (2014); Pachauri et al. (2023)
Butenolides	Butenolide	<i>T. harzianum</i> ;	antifungal	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> ; <i>Pythium ultimum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Botrytis cinerea</i>	Scharf et al. (2016)
	Harzianolide	<i>T. harzianum</i> ;	antifungal	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> ; <i>Pythium ultimum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Botrytis cinerea</i>	Vinale et al. (2006); Andrade et al. (1992)
	5-hydroxyvertinolide	<i>T. longibrachiatum</i>	antifungal	<i>Mycena citricolor</i>	Vinale et al. (2009)
Pyridones	Harzianopyridone	<i>T. harzianum</i>	antifungal	<i>Pythium ultimum</i> , <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> ; <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Botrytis cinerea</i> ; <i>Phytophthora cinnamomi</i> ,	Vinale et al. (2006); Ahluwalia et al. (2015)

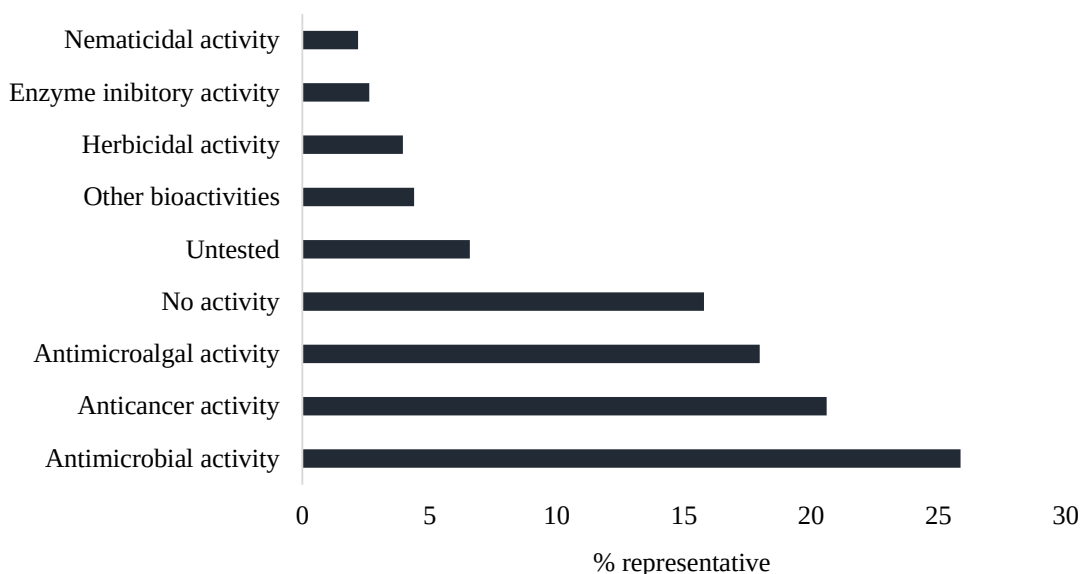
				<i>Leptosphaeria maculans</i> <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i>	
Peptaibols	Alamethicin F30	<i>T. viride</i> , <i>T. koningii</i> , <i>T. brevicompactum</i> , <i>T. turrialbense</i> , <i>T. protrudens</i> and <i>Hypocrea rodmanii</i> .	anticancer antimicrobials inductor resistance	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Verticillium dahliae</i> , <i>Botrytis cinerea</i>	Viterbo et al. (2007); Leitgeb et al. (2007); Degenkolb et al. (2008)
	Trichoconins VI, VII and VIII	<i>T. pseudokoningii</i>	anticancer antimicrobials inductor resistance	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Phytophthora parasitica</i> , <i>Verticillium dahliae</i>	Xiao-Yan et al., (2006); Shi et al., (2012)
	Tricorzianin A1 and B1	<i>T. harzianum</i>	anticancer antimicrobials inductor resistance	<i>Clavibacter spp</i>	Schirmbock, et al. (1994)
	Peptaivirins A and B	<i>T. harzianum</i>	antimicrobial and antiviral	tobacco mosaic virus	Yun et al. (2000)
Pyrons	6-pentyl-2-pyranone (6-PP)	<i>T. viride</i> <i>T. koningii</i> <i>T. harzianum</i> <i>T. longibrachiatum</i> <i>T. atroviride</i>	Antifungal, plant growth promoter	<i>Phytophthora sp.</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>Candida albicans</i> , <i>Penicillium spp.</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Armillaria mellea</i>	Mutawila et al. (2016); Shi et al. (2012); Tarus et al. (2003); Vinale et al. (2008)
	Viridepironone	<i>T. viride</i>	antifungal	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Evidente et al. (2003)
Azaphilones	T22 azafilone, harzifilone and fleefilone	<i>T. harzianum</i>	antifungal	<i>Pythium ultimum</i> , <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Phytophthora cinnamomi</i> , <i>Leptosphaeria maculans</i>	Huang et al. (2020); Vinale et al. (2009, 2006)
Koninginins	Koninginin A, Koninginin B, Koninginin C, Koninginin D, Koninginin E, Koninginin G	<i>T. koningii</i> <i>T. aureoviride</i> <i>T. harzianum</i>	antifungal	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Bipolaris sorokiniana</i> , <i>Phytophthora cinnamomi</i> , <i>Phytophthora middletonii</i> <i>Fusarium solani</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	Liu; Wang (2001); Mori et al. (2002); Chen et al. (2015)
Steroids	Stigmasterol	<i>T. harzianum</i> <i>T. koningii</i>	antifungal	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	Ahluwalia et al. (2015)
	Ergosterol and 3,5,9-trihydroxyergosta- 7,22-dien-6-one	<i>Trichoderma sp.</i>	antifungal	<i>Pyricularia. oryzae</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Alternaria alternata</i>	Xuan et al. (2014)

anthraquinones	1,8-dihydroxy-3-methylanthraquinone 1-hydroxy-3-methylanthraquinone 6-methyl-1,3,8-trihydroxyanthraquinone	<i>T. harzianum</i>	Antifungal, resistance induction	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> <i>Phytium ultimum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotium. rolfsii</i> , <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	Liu et al. (2001); Vinale et al. (2006); Ahluwalia et al. (2015)
Lactones	Cremenolide lactone	<i>T. cremeum</i>	growth promoting, antifungal	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	Vinale et al.(2012)
	Lactone and Aspinolide C	<i>T. arundinaceum</i>	antibiotic to induce plant resistance	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Fusarium sporotrichioides</i> .	Malmierca et al.(2014).
	Cerinolactone	<i>T. cerinum</i>	antibiotic	<i>Rosellinia necatrix</i>	Vinale et al.(2012)
Trichothecenes	Trichodermin	<i>T.brevicompactum</i> <i>T. harzianum</i>	Antifungal and protein synthesis inhibitor	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> <i>Cochliobolus miyabeanus</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Thanatephorus cucumeris</i> ,	Degenkolb et al. (2008); Shi et al. (2009)
Other - antifungal compounds belonging to different chemical classes isolated from	Harziandione diterpene	<i>T. harzianum</i> <i>T. viride</i>	antifungal	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Mannina et al. (1997)
	10,11-dihydrocyclonerotriol; Catenioblin C and Sohimone	<i>T.longibrachiatum</i>	antifungal	<i>Candida albicans</i> <i>Pyricularia oryzae</i>	Xuan et al. (2014)
	Harzianic acid	<i>T. harzianum</i>	antimicrobial and plant growth promotion	<i>Pythium irregulare</i> <i>Sclerotinea sclerotiorum</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	Lee et al. (2009)
	Tricodermester A	<i>T. atroviride</i>	antifungal	<i>Pseudopezalotiopsis theae</i>	Tang et al. (2020)

Fonte: Adaptado de Khan et al., (2020)

Como uma parcela representativa desse contexto, Zhang et al. (2021) descreveram em sua publicação, cerca de 203 metabólitos secundários produzidos por diferentes espécies de *Trichoderma*, especialmente o *T. harzianum*, de acordo com os manuscritos de diversos autores, há várias bioatividades atribuídas aos metabolitos, conforme representação da figura 7.

Figura 7 - Porcentagem representativa das principais atividades promovidas pelos metabólitos secundários de *Trichoderma* spp



Fonte: Adaptado de Zhang et al. (2021).

Os metabólitos secundários de *Trichoderma* são descritos na literatura como padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs), esses são responsáveis pela ativação de uma série de sinalizações químicas que resultam na: indução de resistência a doenças, na ativação de hormônios vegetais para controlar o ataque de patógenos e estresse ambiental, além de serem precursores da sinalização para promoção de crescimento do vegetal (Hermosa et al., 2012; Vinale; Sivasithamparam, 2020).

2.3.1 Compostos orgânicos voláteis - COVs

Os metabólitos secundários podem ser categorizados em três grupos, sendo: os peptaibols; os compostos solúveis em água e os antibióticos voláteis (Ghisalberti; Sivasithamparam, 1991).

Os antibióticos voláteis são altamente eficientes nas ações de biocontrole. Sabe-se que cepas fúngicas de *Trichoderma* são grandes produtoras de metabólitos ou compostos orgânicos voláteis (COVs) com atividades antibióticas, com papel significativo na comunicação entre as espécies interativas na rizosfera, sendo esse o *start* que desencadeará os demais mecanismos de ação (MAB – direto), como o micoparasitismo (Guo et al., 2019; Zeilinger; Omann, 2007).

A zona rizosférica possibilita grande atividade metabólica e de elevada biodiversidade incluindo a presença de fitopatógenos de difícil controle convencional (Penuelas et al., 2014). No entanto, devido à sua volatilidade e difusividade através dos espaços porosos, os COVs têm

propriedades biofísicas ideais para funcionar como moléculas de sinalização acima e abaixo do solo (Schulz-Bohm et al., 2017).

O *Trichoderma* se destaca na eficácia fisiológica dessas pequenas moléculas de fase gasosa e seu potencial para exploração em biotecnologias, há cerca de 480 COVs diferentes oriundos do *Trichoderma*, que compreendem: hidrocarbonetos simples, heterociclos, compostos contendo enxofre, piranos simples, derivados de benzeno, compostos hidroxilados ou amino, aldeídos, cetonas, álcoois, fenóis, tioálcoois, tioésteres e seus derivados, esses compostos dependem de espécies/cepas, composição do substrato e ambiente de cultivo (Crutcher et al., 2013; Siddiquee, 2014; Contreras-Cornejo et al., 2014; Li et al., 2018).

2.3.2 Produção de enzimas

O gênero *Trichoderma* possui o maior número de enzimas hidrolíticas encontradas no Reino Fungi, enzimas como quitinases, glucanases e proteases são importantes compostos nos processos de biocontrole. Além de possibilitar o crescimento e reparação celular quando em condições desfavoráveis (Manzar et al., 2022; Monte et al., 2019; Geraldine et al., 2013).

Cada enzima hidrolítica possui um série de componentes enzimáticos que exibem diferentes funções durante as interações biológicas decorrentes dos mecanismos de ação de biocontrole, em especial no micoparasitismo cujas ações são diretas (Kredics et al., 2005). Durante o contato entre *Trichoderma* e o fitopatógeno enzimas hidrolíticas (quitinases e glucanases) juntamente com metabólitos secundários (COVs e sintetases de peptídeo não ribossomal) são expressos, induzindo a morte do patógeno (Masi et al., 2018; Sood et al., 2020).

Vários componentes enzimáticos liberados por cepas de *Trichoderma* foram sumarizados por Sood et al. (2020), na qual apontam as principais enzimas: *Hidrolíticas* (β -glucosidases, endo- β -1,4-glucanases, exo- β -1,4-glucanases, cellulolytic enzymes, xylanase, chitinase, endochitinases, exochitinases); *Proteases* (exopeptidases, endopeptidases, lipase, glucose oxidase, antioxidant enzymes – POD, SOD, CAT); *Biosintéticas e sinalizadoras* (glucan and chitin synthases, MAP-quinase, ETR1 and CTR1, chalcona sintase, lipoxygenase, phenylalanine ammonia lyase, ACC synthase ACC oxidase, δ -cadinene synthase), caracterizando-as suas funções durante contato direto.

2.3.3 Produção de ácidos orgânicos, sideróforos e solubilização de fósforo

Em solos neutros a alcalinos os metabólitos secundários na forma de ácidos orgânicos como o glucônico, cítrico e fumárico secretados por cepas de *Trichoderma* tem papel especial na absorção de nutrientes (Vinale et al., 2012). Estes ácidos orgânicos que promovem alteração no pH na região rizosférica, potencializando a solubilização de fosfatos mediante processos de acidificação (Li et al., 2015), redox, quelação e hidrólises, facilitando a absorção pelas plantas de elementos pouco disponíveis como é o caso de micronutrientes e cátions como manganês, magnésio e ferro.

O ferro é um nutriente essencial devido à sua função metabólica nas plantas. Suas propriedades redox permitem que ele exista em dois estados de oxidação, ferroso (Fe^{2+}) e férrico (Fe^{3+}) para a doação e aceitação de elétrons, respectivamente. Embora o elemento ferro seja abundante na terra, sua biodisponibilidade é baixa principalmente porque o ferro férrico reage com o oxigênio formando hidróxidos férricos (Anke et al., 1991).

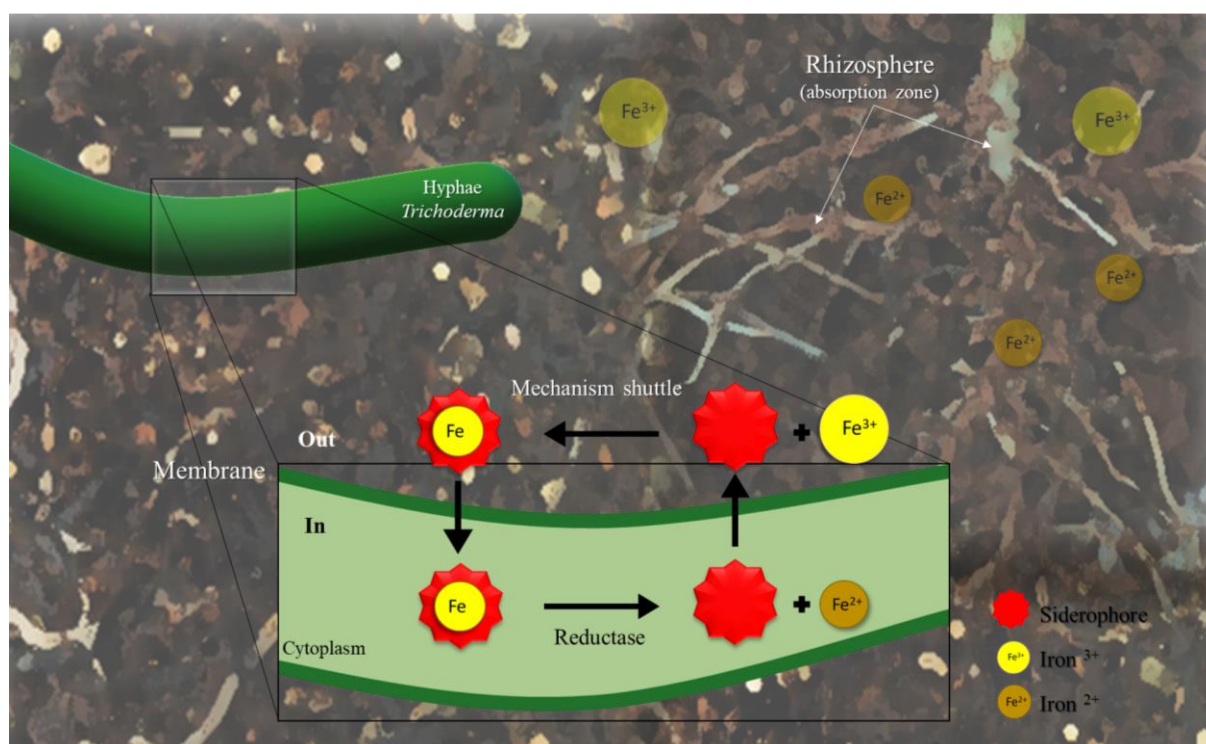
Alguns microrganismos, incluindo cepas de *Trichoderma* e bactérias do gênero *Pseudomonas* reagem a condições limitantes de ferro liberando moléculas quelantes de Fe^{3+} . Estas substâncias são denominadas de sideróforos (do grego *sideros*=ferro, *foros* = transportador), cada microrganismo pode produzir um ou mais tipos desta substância (Neilands, 1995). Em geral são de baixo peso molecular que possuem alta afinidade pelo Fe^{3+} , formando compostos mais estáveis ou que se dissociem com maior facilidade, e também são usados como transportadores de ferro para o interior das células (Hider; Kong, 2010).

Em filtrados de cultura de *Trichoderma* spp. sob condições de deficiência de ferro, Anke e colaboradores (1991), verificaram a presença de diferentes sideróforos: coprógeno, coprógeno B, fusarinina C (fusígeno) e ferrirocina. Mesmo espécies patogênicas como *Fusarium*, *Aspergillus* e *Ustilago*, desenvolveram capacidade de produzir substâncias quelantes devido a necessidade do ferro para seu desenvolvimento.

O ferro é um fator de crescimento para fungos. Esporos de *Fusarium* spp. só germinam na presença de ferro. Desta forma, quando o *Trichoderma* sequestra o ferro no entorno das raízes, ele impede a germinação destes esporos de *Fusarium* que é um importante patógeno radicular para muitas espécies vegetais. Além disso, pelo contato íntimo com as raízes, estes elementos assimilados pelas hifas de *Trichoderma* são transferidas para as raízes vegetais, seja por trocas de contato ou quando estas hifas se degradam e então seus nutrientes podem ser absorvidos pela raiz (Tyskiewicz et al., 2022; Li et al., 2015; Mukherjee et al., 2012).

Renshaw et al. (2002) abordam diversas pesquisas com sideróforos fúngicos, elencando suas estruturas, funções e aplicações, a partir daí, esquematizou-se o mecanismo de transporte dos sideróforos produzidos pelo *Trichoderma* spp. (Figura 8).

Figura 8 - Esquema do mecanismo de transporte de ferro pelos sideróforos através da membrana de *Trichoderma* spp. O Fe^{3+} + complexo sideróforo atravessa a membrana e, no citoplasma, sofre redução a Fe^{2+} e o sideróforo retorna ao meio extracelular, onde pode se ligar novamente ao Fe^{3+}



Fonte: Elaboração do próprio autor

Os íons ferro servem como cofator para várias classes de enzimas e desempenham um papel fundamental como nutriente para o crescimento e desenvolvimento das plantas. O ferro ocorre principalmente como Fe^{3+} nas condições de pH neutro e na presença de oxigênio (Sood et al., 2020).

O *Trichoderma* pode realizar a acidificação do solo da área rizosférica e por si só este efeito pode tornar elementos como o fósforo mais disponíveis, pela alteração de pH. O fósforo é um macronutriente importante para as culturas agrícolas, atua como fator limitante ao crescimento vegetal por fornecer energia necessária para os processos metabólicos. No entanto aproximadamente 80% do fosfato inorgânico solúvel aplicado se torna indisponível, pois é

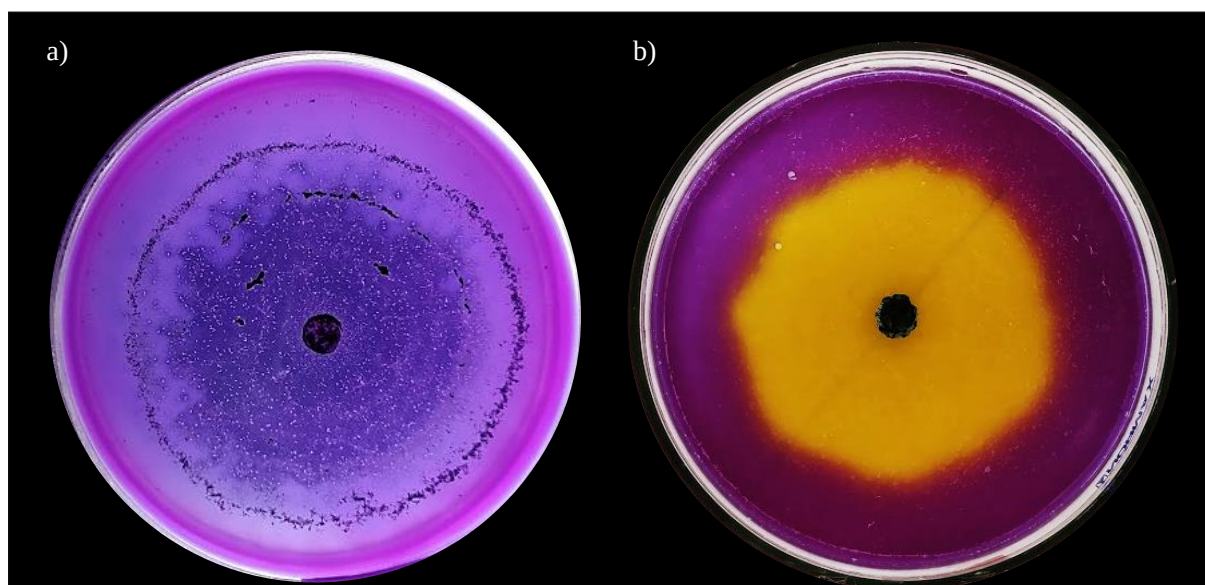
rapidamente imobilizado na forma de fosfato insolúvel, pois fixam a minerais de argila, ao cálcio ou óxidos de ferro e alumínio (Behera et al., 2014).

A baixa eficiência na absorção do fósforo inorgânico é um dos desafios no cenário da pesquisa agrícola atual. Muitos microrganismos presentes na rizosfera são capazes de atuar solubilizando o fosfato inorgânico (Ribas et al., 2016).

Trichoderma spp. apresentam potencial de solubilização de fosfato aumentando a eficiência na absorção deste nutriente. O uso de cepas capazes de realizar fosfatase e quelar ferro, leva a diminuição das doses de aplicação de fertilizantes fosfatados reduzindo consideravelmente os custos de produção, assim como ocorreu com a adubação nitrogenada e a fixação biológica de nitrogênio. Estudos demonstram que estes fungos podem realizar fosfatase alcalina e ou fosfatase ácida, sendo a última mais frequente (Bononi et al., 2020; Li et al., 2015).

Em screening *in vitro* esse potencial indicativo de solubilidade pode ser expresso pela reação promovida em meio de cultura específico, como o meio NBRIP (Figura 9).

Figura 9 – Crescimento de *Trichoderma* sp. em meio NBRIP sólido com adição de corante azul de bromotimol (a), em que a presença de halo translúcido (após 96h) e o aspecto granular indicam solubilização de fosfato; ou corante púrpura de bromocresol (b), cuja mudança na coloração do meio de cultura (púrpura para amarelo) indica a liberação de ácidos orgânicos capazes de solubilizar o fósforo



Fonte: Elaboração do próprio autor

2.4 PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E ESTÍMULOS A MECANISMOS DE DEFESA VEGETAL

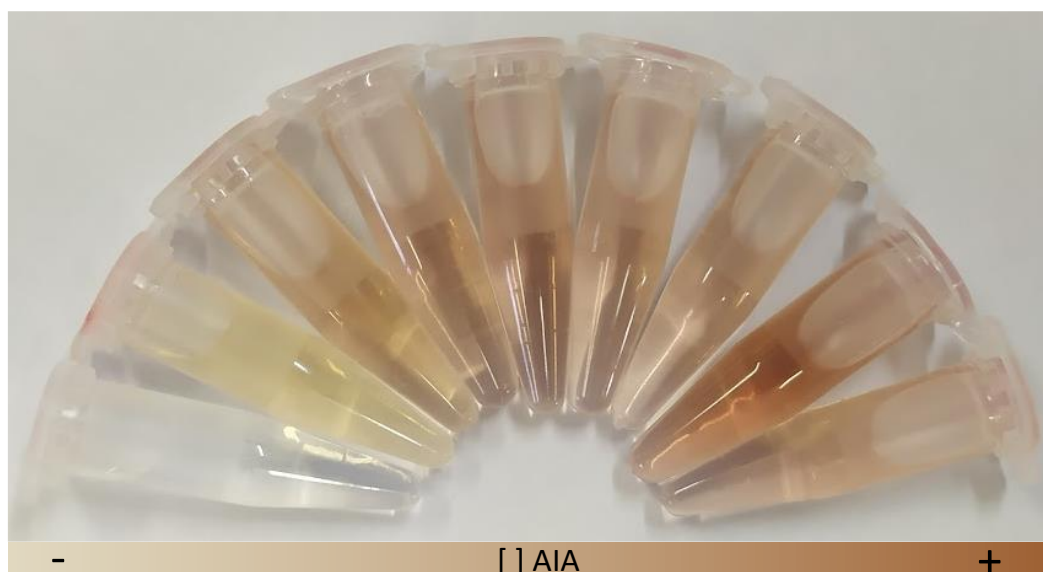
Ressalta-se que dentro deste gênero fúngico existe muita diversidade, pode-se ter cepas capazes de realizar a disponibilização de fósforo em quantidades significativas, ou na absorção e disponibilização de ferro, produção ou transporte de hormônios como auxina, ou ainda promover crescimento através de ação indireta (Ribas et al., 2016).

O *Trichoderma* é encontrado em associação com as plantas de forma endofítica e ou colonizando a rizosfera. São atraídos para esta região pelos exsudatos secretados pelas raízes. Nestes exsudatos encontram-se substâncias como o L-triptofano que são usados em seu metabolismo e são precursores outros compostos como o ácido indolacético (AIA), que promovem o aumento no número de raízes, tolerância à seca (Bailey et al., 2006).

Além de promover a germinação e o vigor das sementes, aumento da biomassa e do comprimento de parte aérea, melhoram a absorção de nutrientes de forma geral, portanto, considerado um fungo capaz de promover crescimento vegetal e gerar efeitos benéficos significativos para as plantas (Harman et al., 2004; Sood et al., 2020).

O potencial de produção de AIA por diferentes isolados de *Trichoderma* spp. podem ser expressos em testes laboratoriais, através de meio específicos, para multiplicação do microrganismo, a exemplo do meio BD+Tryptofano (Figura 10)

Figura 10 - Triagem de AIA orgânico produzido por diferentes isolados de *Trichoderma* spp. sob crescimento orbital em meio BD+Trip, e posterior avaliação em espectrofotometria 72h após a inoculação. Cores mais intensas demonstram maior concentração de AIA na amostra



Fonte: Elaboração do próprio autor

Trabalhos evidenciam que algumas espécies de *Trichoderma* tem promovido o crescimento das plantas pela produção de fitohormônios e indóis relacionados ao ácido indolacético, ácido salicílico, ácido jasmônico, etileno e a indução do sistema de defesa da planta pelo aumento da atividade da quitinase e peroxidase, cuja resposta imune é dependente da cepa, concentração, duração da interação e do estado de desenvolvimento e órgão da planta (Segarra et al., 2007; Meyer et al., 2019)

Foram caracterizados vários elicitores do sistema de defesa de plantas na presença do *Trichoderma*, bem como proteínas com atividade enzimática, oligossacarídeos e compostos de baixo peso molecular, além da melhoria do dano oxidativo quando induzido pelo estresse. Essa resposta é o análogo mais próximo da resistência induzida descrita pela ação de rizobactérias (Contreras-Cornejo et al., 2009; Hermosa et al., 2012; Salas-Marina et al., 2011; Shores et al., 2010).

As interações entre os metabólitos secundários com as plantas são permeadas de inúmeras sinalizações, que possibilitam a indução de resistência do vegetal, sendo essas: resistência sistêmica induzida e resistência sistêmica adquirida (Bisen et al., 2016).

De acordo com Fiorini et al. (2016), quando o *Trichoderma* interage com as raízes das plantas, provoca alterações profundas e substanciais a nível bioquímico que, dependendo do tipo de metabólito regulado na planta, afetam a fisiologia, defesa e as respostas ao estresse.

O efeito benéfico do *Trichoderma* nas plantas pode ser explicado pela capacidade do fungo em modular a arquitetura radicular e/ou pela produção de compostos que aumentam a disponibilidade de nutrientes, como sideróforos e ácidos orgânicos (López-Bucio et al., 2015).

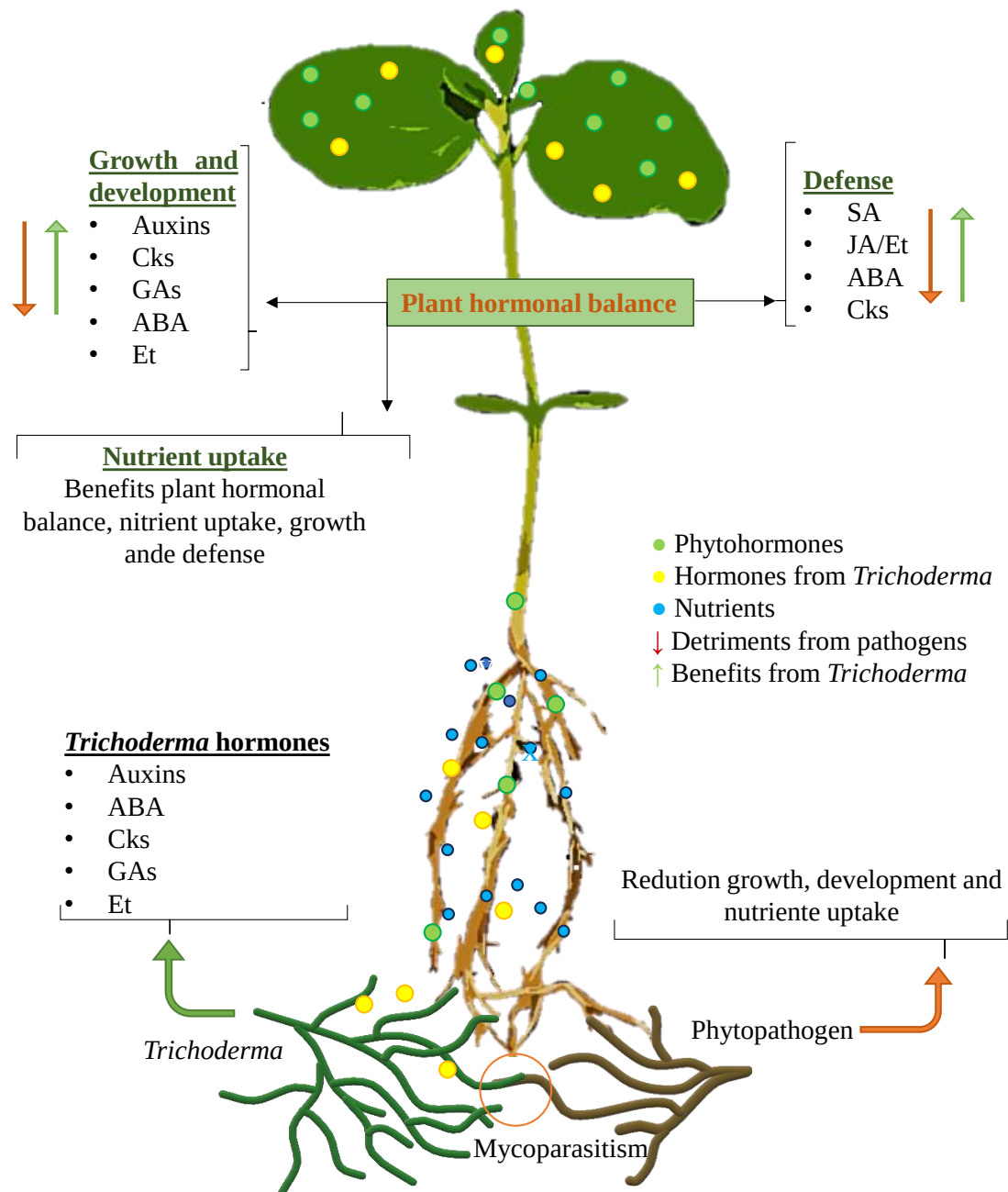
Há mudanças consideráveis no conteúdo de fitohormônios em tecidos vegetais após inoculação *Trichoderma* spp., demonstrando que os fitohormônios produzidos por fungos desempenham papéis importantes nas interações patogênicas fungo-planta (Contreras-Cornejo et al., 2020).

Guzmán-Guzmán et al. (2019) relatam que o *Trichoderma* produz auxinas e um precursor ácido abscísico, além de produzir citocininas e etileno que juntos, contribuem para uma infinidade de maneiras, pelas quais esse fungo interage com seu hospedeiro gerando inúmeros benefícios.

Os autores demonstram o impacto da presença de *Trichoderma* na rizosfera de plantas, enfatizando a colonização da raiz, levando ao aumento no crescimento da planta, proteção contra fitopatógenos por micoparasitismo e preparação contra estressores bióticos e abióticos

por meio da participação de metabólitos secundários, efetores e modulação do equilíbrio hormonal (Figura 11).

Figura 11 – O *Trichoderma* spp. interage com a planta, colonizando suas raízes e ocorre uma alteração no equilíbrio hormonal da planta, mediada por hormônios derivados de *Trichoderma* sp., melhorando a saúde e o vigor da planta



Fonte: Adaptado de Guzmán -Guzmán et al., 2019.

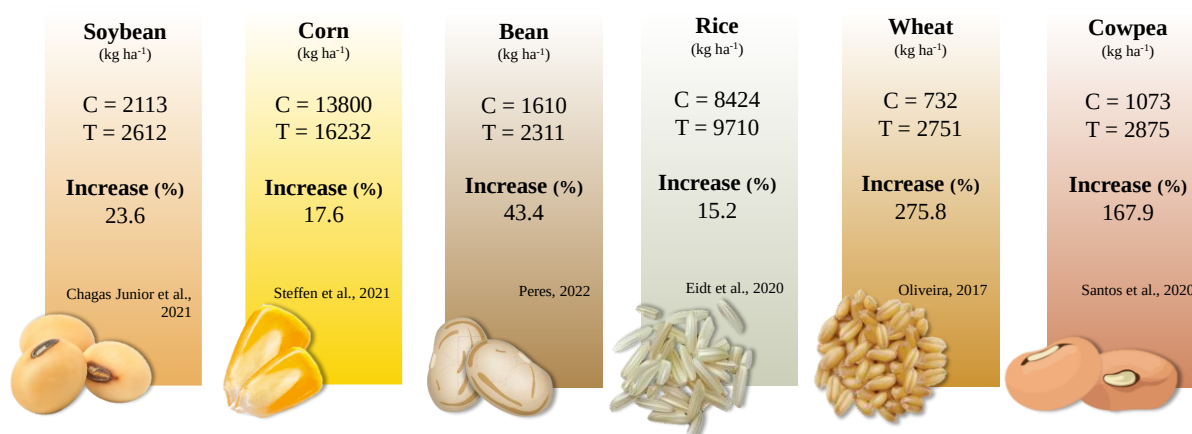
2.5 INCREMENTOS E GANHOS DE PRODUTIVIDADE

Compreendendo todo o arsenal metabólico e capacidade adaptativa às condições adversas que o *Trichoderma* possui, o reflexo direto dos papéis fisiológicos e bioquímicos desencadeados no controle biológico de fitopatógenos, bem como efeitos bioestimulantes para as culturas, culminam em incrementos e ganhos de produtividade, conforme evidenciado por diversos autores, que tiveram rendimentos satisfatórios ao fazer o uso de *Trichoderma* spp. em seus sistemas de produção.

A elevação do rendimento das culturas, permite otimizar e melhor aproveitar as áreas de produção, atrelado a isso, o uso de bioinsumos com *Trichoderma* spp. possibilitam o aumento da diversidade biológica nos solos, tornando-os supressivos e mais sustentáveis.

Demonstrando a versatilidade e aplicabilidade desse microrganismo, há um compilado dos incrementos produtivos mais expressivos obtidos para as principais fontes energéticas base da nutrição humana e pecuária (Figura 12).

Figura 12 - Infográfico do aumento médio da produtividade (Kg ha^{-1}) das principais *commodities* e matrizes energéticas produzidas com a aplicação de *Trichoderma* spp. (T) comparado ao controle (C) sem a aplicação



Fonte: Elaboração do próprio autor

2.6 CONSIDERAÇÕES

O uso de microrganismos benéficos na lavoura é o elo entre ganhos de produtividade e uso racional de agroquímicos, tornando-se uma ferramenta muito promissora dentro dos sistemas agrícolas de produção, junto a outras estratégias potencializando ainda mais seus efeitos.

A exemplo de nações líderes na produção agrícola e rica na diversidade biológica existentes em toda sua extensão territorial, o Brasil sem dúvidas tem muito a oferecer e contribuir com esse segmento.

Desta forma, o investimento em pesquisas, em bioprospecção de cepas de microrganismos multi-eficientes como o *Trichoderma*, seja em controle biológico, na disponibilização de nutrientes, promoção de crescimento ou indução de resistência são primordiais para o fortalecimento de uma agricultura contemporânea, pautada nos objetivos do desenvolvimento sustentável instituídos pela ONU. Possibilitando a redução no uso de insumos ou moléculas nocivas ao ambiente e a todos que dele dependem.

Agradecimentos

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

REFERÊNCIAS

- AHLUWALIA, V., KUMAR, J., RANA, V. S., SATI, O. P., WALIA, S. Comparative evaluation of two *Trichoderma harzianum* strains for major secondary metabolite production and antifungal activity. **Journal of Natural Products**, Londres v.29, n.2, p.914–920, 2015.
- AL-ANI, L. K. T. Bioactive secondary metabolites of *Trichoderma spp.* for efficient management of phytopathogens. In: SINGH, H. B., KESWANI, C., REDDY, M. S., SANSINENEA, E., GARCÍA-ESTRADA, C. (Eds.) Secondary metabolites of Plant growth promoting rhizomicroorganisms. **Springer**, Singapura, p.125–143, 2019.
- ANDRADE, R., AYER, W. A., MEBE, P. P. The metabolites of *Trichoderma longibrachiatum*. Part 1. Isolation of the metabolites and the structure of trichodimerol'. **Canadian Journal of Chemistry**, Canadá, v.70, n.10, p.2526-2535, 1992.
- ANKE, H., KINN, J., BERGQUIST, K. E., STERNER, O. Production of siderophores by strains of the genus *Trichoderma*. **Biology of Metals**, Estados Unidos, v.4, p.176-180, 1991.
- BAILEY, B. A., BAE, H., STREM, M. D., ROBERTS, D. P., THOMAS, S. E., CROZIER, J., SAMUELS, G. J., CHOI, I. Y., HOLMES, K. A. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. **Planta**, Bonn, v.224, p.1449–1464, 2006.
- BEHERA, B. C., SINGDEVSACHAN, S. K., MISHRA, R. R., DUTTA, S. K., THATOI, H. N. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove-A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Illinois, v.3, n.2, 97-110
- BENÍTEZ, T., RINCÓN, A. M., LIMÓN, M. C., CODON, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Sevilha, v.7, n.4, p.249-260, 2004.

BETTIOL, W., MORANDI, M. A. B. Biocontrole de doenças de plantas uso e perspectivas. **Embrapa Meio Ambiente**, Brasília, DF, v.1, p.1-341, 2009.

BISEN, K., KESWANI, C., PATEL, J. S., SARMA, B. K., SINGH, H. B. *Trichoderma spp.*: efficient inducers of systemic resistance in plants. **Springer**, Singapura, p.185-195, 2016.

BONONI, L., CHIARAMONTE, J. B., PANSÁ, C. C., MOITINHO, M. A., MELO, I. S. Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. **Scientific Reports**, London, v.10, n.1, p.2858, 2020.

CHAGAS JUNIOR, A. F., CHAGAS, L. F. B., MARTINS, A. L. L., COLONIA, B. S. O., OLIVEIRA, R. S. Soybean productivity with *Trichoderma asperellum* seed treatment in different regions of the Brazilian Cerrado. **Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, Recife, v.16, n.4, p.1-8, 2021.

CHEN, F., CHEN, X. Z., QIN, L. N., TAO, Y., DONG, Z. Y. Characterization and homologous overexpression of an N-acetylglucosaminidase Nag1 from *Trichoderma reesei*. **Biochemical Biophysical Research Communication**, Philadelphia, v. 459, n.2, p.184–188, 2015.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A., MACÍAS-RODRÍGUEZ, L., DEL-VAL, E., LARSEN, J. Interactions of *Trichoderma* with plants, insects, and plant pathogen microorganisms: chemical and molecular bases. **Springer**, Cham, p.263-290, 2020.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A., MACÍAS-RODRÍGUEZ, L., CORTÉS-PENAGOS, C., LÓPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Oxônia, v.149, n.3, p.1579–1592, 2009.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A., MACÍAS-RODRÍGUEZ, L., LÓPEZ-BUCIO, J. S., LÓPEZ-BUCIO, J. Enhanced plant immunity using *Trichoderma*. In: GUPTA, V. K., SCHMOLL, M., HERRERA-ESTRELLA, A., UPADHYAY, R. S., DRUZHININA, I., TUOHY, M. G. (Eds). **BioTechnology and Biology of Trichoderma**, Amsterdam, p. 495–504, 2014.

CRUTCHER, F.K, PARICH, A., SCHUHMACHER, R., MUKHERJEE, P.K, ZEILINGER, S., KENERLEY, C.M. A putative terpene cyclase, vir4, is responsible for the biosynthesis of volatile terpene compounds in the biocontrol fungus *Trichoderma virens*. **Fungal genetics and biology**, Maryland Heights, v 56, p.67-77. 2013.

DEGENKOLB, T., DIECKMANN, R., NIELSEN, K. F., GRÄFENHAN, T., THEIS, C., ZAFARI, D., CHAVERRI, P., ISMAIEL, A., BRÜCKNER, H., VON DÖHREN, H., THRANE, U., PETRINI, O., SAMUELS, G. J. The *Trichoderma brevicompactum* clade: A separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. **Mycological Progress**, Frankfurt, v.7, p.177–219, 2008.

DRUZHININA, I. S., CHENTHAMARA, K., ZHANG, J., ATANASOVA, L., YANG, D., MIAO, Y., RAHIMI, M. J., GRUJIC, M., CAI, F., POURMEHDI, S., SALIM, K. A., PRETZER, C., KOPCHINSKIY, A. G., HENRISSAT, B., KUO, A., HUNDLEY, H., WANG, M., AERTS, A., SALAMOV, A., LIPZEN, A., LABUTTI, K., BARRY, K., GRIGORIEV, I.

V., SHEN, Q., KUBICEK, C. P. Massive lateral transfer of genes encoding plant cell wall-degrading enzymes to the mycoparasitic fungus *Trichoderma* from its plant-associated hosts. **PLOS Genetics**, San Francisco, v.14, n.4, p.e1007322, 2018.

DRUZHININA, I. S., SEIDL-SEIBOTH, V., HERRERA-ESTRELLA, A., HORWITZ, B. A., KENERLEY, C. M., MONTE, E., MUKHERJEE, P. K., ZEILINGER, S., GRIGORIEV, I. V., KUBICEK, C.P. *Trichoderma*: The genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.9, n.10, p.749-759, 2011.

EIDT, R. T., BERNARDO, J. T., BARROS, J. N. G., AGUILERA, J. G., GROHS, M., COSTA, D. F. A. Evaluation of the use of agrohomoepathy and *Trichoderma* sp. in the productivity of rice susceptible to blast. **Research, Society and Development**, Vargem Grande Paulista, v.9, n.9, p.e416997420, 2020.

EVIDENTE, A., CABRAS, A., MADDAU, L., SERRA, S., ANDOLFI, A., MOTTA, A. Viridepyronone, a New Antifungal 6-Substituted 2H-Pyran-2-one Produced by *Trichoderma viride*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.51, n.24, p.6957–6960, 2003.

FIORINI, L., GUGLIELMINETTI, L., MARIOTTI, L., CURADI, M., PICCIARELLI, P., SCARTAZZA, A., SARROCCO, S., VANNACCI, G. *Trichoderma harzianum* T6776 modulates a complex metabolic network to stimulate tomato cv. Micro-Tom growth. **Plant and Soil**, Perth, v.400, 351–366, 2016.

GERALDINE, A. M., LOPES, F. A. C., CARVALHO, D. D. C., BARBOSA, E. T., RODRIGUES, A. R., BRANDÃO, R. S., ULHOA, C. J., LOBO JUNIOR, M. Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. **Biological Control**, Washington, v.67, n.3, p.308–316, 2013.

GHISALBERTI, E. L.; SIVASITHAMPARAM, K. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. **Soil biology and Biochemistry**, Nottingham, v. 23, n. 11, p. 1011-1020, 1991.

GUO, Y., GHIRARDO, A., WEBER, B., SCHNITZLER, J. P., BENZ, J. P., ROSENKRANZ, M. *Trichoderma* species differ in their volatile profiles and in antagonism toward ectomycorrhiza *Laccaria bicolor*. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 10, p. 891. 2019.

GUZMÁN-GUZMÁN, P., PORRAS-TRONCOSO, M. D., OLMEDO-MONFIL, V., HERRERA-ESTRELLA, A. *Trichoderma* species: Versatile plant symbionts. **Phytopathology**, Eagan, v.109, n.1, p.6-16, 2019.

GUZMÁN-GUZMÁN, P., KUMAR, A., DE LOS SANTOS-VILLALOBOS, S., PARRA-COTA, F. I., OROZCO-MOSQUEDA, M. D. C., FADIJI, A. E., SANTOYO, G. *Trichoderma* species: Our best fungal allies in the biocontrol of plant diseases—A review. **Plants**, Winnipeg, v.12, n 3, p. 432, 2023.

HARMAN, G. E. Myths and Dogmas of Biocontrol Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant disease**, Geneva, v.84, n.4, p.377-393, 2000.

HARMAN, G. E., HOWELL, C. R., VITERBO, A., CHET, I., LORITO, M. *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.2, n.1, p. 43-56, 2004.

HERMOSA, R., VITERBO, A., CHET, I., MONTE, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, New York, v.158, n.1, p.17-25, 2012.

HIDER, R.C., KONG, X. Chemistry and biology of siderophores. **Natural Product Reports**, Londres, v.27, n.5, p.637-657, 2010.

HUANG, X., ZHANG, W., TANG, S., WEI, S., LU, X. Collaborative biosynthesis of a class of bioactive azaphilones by two separate gene clusters containing four PKS/NRPSs with transcriptional crosstalk in fungi. **Angewandte Chemie**, Weinheim, v.132, n.11, p.4379-4383, 2020.

INFANTE, D., MARTÍNEZ, B., GONZÁLEZ, N., REYES, Y. *Trichoderma* mechanisms of action of against phytopathogenic fungi. **Revista de Protección Vegetal**, Havana, v.24, n.1, p14-21, 2009.

KHAN, R. A. A., NAJEEB, S., HUSSAIN, S., XIE, B., LI, Y. Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma spp.* against phytopathogenic fungi. **Microorganisms**, Basel, v.8, n.6, p.817, 2020.

KREDICS, L., ANTAL, Z., SZEKERES, A., HATVANI, L., MANCZINGER, L., VÁGVÖLGYI, C. S., NAGY, E. Extracellular proteases of *Trichoderma* species. **Acta microbiologica et immunologica hungarica**, Hungri, v.52, n.2, p.169-184, 2005.

LEE, S.J.; YEO, W.H.; YUN, B.S.; YOO, I.D. Isolation and sequence analysis of new peptaibol, boletusin, from *Boletus spp.* **Journal Peptide Science**, Oxford, v. 5, p.374–378, 1999.

LEITGEB, B., SZEKERES, A., MANCZINGER, L., VÁGVÖLGYI, C., KREDICS, L. The history of alamethicin: A review of the most extensively studied peptaibol. **Chemistry and Biodiversity**, Zurique, v.4, n.6, p.1027-1051, 2007.

LI, N., ALFIKY, A., WANG, W., ISLAM, M., NOUROLLAHI, K., LIU, X., KANG, S. Volatile compound-mediated recognition and inhibition between *Trichoderma* biocontrol agents and *Fusarium oxysporum*. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v 9, p. 2614. 2018.

LI, R. X., CAI, F., PANG, G., SHEN, Q. R., LI, R., CHEN, W. Solubilization of phosphate and micronutrients by *Trichoderma harzianum* and its relationship with the promotion of tomato plant growth. **PLoS One**, San Francisco, v.10, n.6, p.0130081, 2015.

LIU, G., WANG, Z. Total synthesis of Koninginin D, B and E. **Synthesis**, Stuttgart, v.1, n.1. p.119–127, 2001.

LOBO JUNIOR, M., MACHADO-ROSA, T. A., GERALDINE, A.M. Uso de *Trichoderma* na cultura do feijão-comum In: MEYER, M. C., MAZARO, S. M., SILVA, J. C. (Eds.) **Trichoderma: uso na agricultura**, Embrapa, Brasília, DF, p. 393-406, 2019.

LÓPEZ-BUCIO, J., PELAGIO-FLORES, R., HERRERA-ESTRELLA, A. *Trichoderma* as biostimulant: Exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.196, p.109-123, 2015.

MAHMOOD, A., KATAOKA, R. Potential of biopriming in enhancing crop productivity and stress tolerance. *In*: RAKSHIT, A., SINGH, H. (EDS.) **Advances in Seed Priming**. Singapore: Springer, 2018. p.127–145.

MALMIERCA, M.G.; BARUA, J.; MCCORMICK, S.P.; IZQUIERDO-BUENO, I.; CARDOZA, R.E.; ALEXANDER, N.J.; GUTIÉRREZ, S. Novel aspinolide production by *Trichoderma arundinaceum* with a potential role in *Botrytis cinerea* antagonistic activity and plant defense priming. **Environment Microbiology**, Wales, v. 17, p. 1103–1118. 2014

MANNINA, L.; SEGRE, A.L.; RITIENI, A.; FOGLIANO, V.; VINALE, F.; RANDAZZO, G.; BOTTALICO, A. A new fungal growth inhibitor from *Trichoderma viride*. **Tetrahedron**, Pasadena, v. 53, p. 3135–3144, 1997.

MANZAR, N., KASHYAP, A. S., GOUTAM, R. S., RAJAWAT, M. V. S., SHARMA, P. K., SHARMA, S. K., & SINGH, H. V. *Trichoderma*: Advent of versatile biocontrol agent, its secrets and insights into mechanism of biocontrol potential. **Sustainability**, New Rochelle, v. 14, n 19, p. 12786, 2022.

MASI, M., NOCERA, P., REVEGLIA, P., CIMMINO, A., EVIDENTE, A. Fungal metabolites antagonists towards plant pests and human pathogens: Structure-activity relationship studies. **Molecules**, Suíça, v.23, n.4. p.834, 2018.

MEYER, M.C., MAZARO, S. M., SILVA, J. C. **Trichoderma**: uso na agricultura: livro científico (ALICE). Brasília, DF: Embrapa Soja, 2019.

MONTE, E., BETTIOL, W., HERMOSA, R. *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. *In*: Meyer, M.C., Mazaro, S.M., Silva, J.C. (Eds.) **Trichoderma**: uso na agricultura. Brasília, DF: Embrapa Soja, 2019. p.181-199

MORI, K., BANDO, M., ABE, K. Determination of the stereochemistry of (–) koniginin A by an X-ray analysis of its synthetic sample. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Oxford, v. 66, n. 8, p.1779–1781, 2002.

MUKHERJEE, P. K., HORWITZ, B. A., KENERLEY, C. M. Secondary metabolism in *Trichoderma* - A genomic perspective. **Microbiology**, Nova Iorque, v.158, n.1. p.35-45, 2012.

MUTAWILA, C., VINALE, F., HALLEEN, F., LORITO, M., MOSTERT, L. Isolation, production and in vitro effects of the major secondary metabolite produced by *Trichoderma* species used for the control of grapevine trunk diseases. **Plant Pathology**, Coreia do Sul, v.65, n.1, p.104–113, 2016.

NEILANDS, J.B. Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. **Journal of Biological Chemistry**, New York, v.270, n.45, p.26723-26726, 1995.

OLIVEIRA, J. B. **Promoção do crescimento e da produtividade de trigo pelo emprego de cepas comerciais de *Trichoderma* spp**, 2017. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Estadual de Goiás, Ipameri, 2017.

PACHAURI, S., ZAID, R., SHERKHANE, P. D., EASA, J., VITERBO, A., CHET, I., HORWITZ, B. A., MUKHERJEE, P. K. Comparative Phenotypic, Genomic, and Transcriptomic Analyses of Two Contrasting Strains of the Plant Beneficial Fungus *Trichoderma virens*. **Microbiology Spectrum**, Washington, v.11, n.2. p.e03024-22.

PATIL, A. S., PATIL, S. R., PAIKRAO, H. M. *Trichoderma* secondary metabolites: their biochemistry and possible role in disease management. In: CHOUDHARY, D.K., VARMA, A. **Microbial-mediated induced systemic resistance in plants**. Singapura: Springer, p. 69-102, 2016.

PEÑUELAS, J., ASENSIO, D., THOLL, D., WENKE, K., ROSENKRANZ, M., PIECHULLA, B., SCHNITZLER, J. Biogenic volatile emissions from the soil. **Plant, cell & environment**, West Sussex, v 37, n 8, p. 1866-1891. 2014.

PERES, W. M. **Uso de *Trichoderma atroviride* na cultura do feijoeiro**, p.99, 2022. Tese (Doutorado em Agronomia). Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP, Ilha Solteira, 2022.

PRAJAPATI, S., KUMAR, N., KUMAR, S., MAURYA, S. Biological control a sustainable approach for plant diseases management: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, New Delhi, v.9, n.2, p.1514-1523, 2020.

RAMADA M. H. S., LOPES, F. A .C, ULHOA, C. J. *Trichoderma*: metabólitos secundários, In: MEYER, M.C., MAZARO, S.M., SILVA, J.C. (Eds.) ***Trichoderma*: su uso en la agricultura**, 1ª ed. Brasília: Embrapa, 2022. p.202-220.

RENSHAW, J. C., ROBSON, G. D., TRINCI, A. P. J., WIEBE, M. G., LIVENS, F. R., COLLISON, D., TAYLOR, R. J. Fungal siderophores: Structures, functions and applications. **Mycological Research**, London, v.106, n.10, p.1123-1142, 2002.

RIBAS P. P., RECH, R., MATSUMURA, A. T. S., VAN DER SAND, S. T. Potencial *in vitro* para solubilização de fosfato por *Trichoderma* spp. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.14, n.2, p.70-75, 2016.

SALAS-MARINA, M. A., SILVA-FLORES, M. A., URESTI-RIVERA, E.E., CASTRO-LONGORIA, E., HERRERA-ESTRELLA, A., CASAS-FLORES, S. Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. **European Journal of Plant Pathology**, Coreia do Sul, v.131, p.15–26, 2011.

SANTOS, G. R., REIS, H. B., ROTILI, E. A., MOURÃO, D. D. S. C., FARIAS, D. I. O. A., PEREIRA, T. A., JUNIOR, A. F. C. Inoculation of *Rhizobium* associated with *Trichoderma asperellum* on the development and yield of cowpea. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.15, n.2, p.1-8, 2020.

SCHARF, D. H., BRAKHAGE, A. A., MUKHERJEE, P. K. Gliotoxin - bane or boon? **Environmental Microbiology**, Chichester, v.18, n.4. p.1096-1109, 2016.

SCHIRMBOCK, M., LORITO, M., WANG, Y. L., HAYES, C. K., ARISAN-ATAC, I., SCALA, F., HARMAN, G. E., KUBICEKL, C. P. Parallel Formation and Synergism of Hydrolytic Enzymes and Peptaibol Antibiotics, Molecular Mechanisms Involved in the Antagonistic Action of *Trichoderma harzianum* against Phytopathogenic Fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.12, p.4363-4370, 1994.

SCHULZ-BOHM, K.; MARTÍN-SÁNCHEZ, L.; GARBEVA, P. Microbial volatiles: small molecules with an important role in intra-and inter-kingdom interactions. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 8, p. 2484, 2017.

SEGARRA, G., CASANOVA, E., BELLIDO, D., ODENA, M. A., OLIVEIRA, E., TRILLAS, I., 2007. Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. **Proteomics**, Weinheim, v.7, n.21, p.3943–3952, 2007.

SEIDL, V., SONG, L., LINDQUIST, E., GRUBER, S., KOPTCHINSKIY, A., ZEILINGER, S., SCHMOLL, M., MARTÍNEZ, P., SUN, J., GRIGORIEV, I., HERRERA-ESTRELLA, A., BAKER, S. E., KUBICEK, C. P. Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. **BMC Genomics**, London, v.10, n.1, p.1-13, 2009.

SHI, M., CHEN, L., WANG, X. W., ZHANG, T., ZHAO, P. B., SONG, X. Y., SUN, C. Y., CHEN, X. L., ZHOU, B. C., ZHANG, Y. Z. Antimicrobial peptaibols from *Trichoderma pseudokoningii* induce programmed cell death in plant fungal pathogens. **Microbiology**, Nova Iorque, v.158, n.1, p.166–175, 2012.

SHORESH, M., HARMAN, G. E., MASTOURI, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.48, p.21–43, 2010.

SIDDIQUEE, S. Recent advancements on the role and analysis of volatile compounds (VOCs) from *Trichoderma*. **Biotechnology and biology of Trichoderma**, Amsterdam, p. 139-175. 2014.

SOOD, M., KAPOOR, D., KUMAR, V., SHETEIWY, M.S., RAMAKRISHNAN, M., LANDI, M., ARANITI, F., SHARMA, A. *Trichoderma*: The “secrets” of a multitasking biocontrol agent. **Plants**, Basel, v.9, n.6, p.762, 2020.

STEFFEN, G. P. K., TOMAZZI, D. J., STEFFEN, R. B., GABE, N. L., SILVA, R. F., MORTARI, J. L. M., MALDANER, J. Incremento da produtividade de milho pela inoculação de *Trichoderma harzianum*. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.1, p.4455-4468, 2021.

TANG, X.X.; LIU, S.Z.; SUN, Y.Y.; HE, F.M.; XU, G.X.; FANG, M.J.; QIU, Y.K. New cyclopentenoneacrylic acid derivatives from a marine-derived fungus *Trichoderma atroviride* H548. **Natural Product Research**, Oxfordshire, v 35, n 21, p. 3772-3779. 2020.

TARUS, P. K., LANG'AT-THORUWA, C. C., WANYONYI, A. W., CHHABRA, S. C. Bioactive metabolites from *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma longibrachiatum*. **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**, Addis Ababa, v.17, n.2, p.185–190, 2003.

TYŚKIEWICZ, R., NOWAK, A., OZIMEK, E., JAROSZUK-ŚCISEŁ, J. *Trichoderma*: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 23, n 4, p. 2329. 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>

VARGAS, W. A., MUKHERJEE, P. K., LAUGHLIN, D., WIEST, A., MORAN-DIEZ, M. E., KENERLEY, C. M. Role of gliotoxin in the symbiotic and pathogenic interactions of *Trichoderma virens*. **Microbiology**, Nova Iorque, v.160, n.10, p.2319–2330, 2014.

VINALE, F., GHISALBERTI, E. L., SIVASITHAMPARAM, K., MARRA, R., RITIENI, A., FERRACANE, R., WOO, S., LORITO, M. Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, Chichester, v.48, n.6, p.705–711, 2009.

VINALE, F., MARRA, R., SCALA, F., GHISALBERTI, E. L., LORITO, M., SIVASITHAMPARAM, K. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. **Letters in Applied Microbiology**, Inglaterra, Chichester, v.43, n.2, p.143–148, 2006.

VINALE, F., SIVASITHAMPARAM, K. Beneficial effects of *Trichoderma* secondary metabolites on crops. **Phytotherapy Research**, Londres, v.34, n.11, p.2835–2842, 2020.

VINALE, F., SIVASITHAMPARAM, K., GHISALBERTI, E. L., MARRA, R., WOO, S. L., LORITO, M. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v.40, n.1, p.1–10, 2008.

VINALE, F., SIVASITHAMPARAM, K., GHISALBERTI, E. L., RUOCCO, M., WOO, S., LORITO, M. *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism. **Natural product communications**, London, v.7, n.11, p.1545–1550, 2012.

VITERBO, A., WIEST, A., BROTMAN, Y., CHET, I., KENERLEY, C. The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses. **Molecular Plant Pathology**, Chichester, v.8, n.6, p.737–746, 2007.

XIAO-YAN, S., QING-TAO, S., SHU-TAO, X., XIU-LAN, C., CAI-YUN, S., YU-ZHONG, Z. Broad-spectrum antimicrobial activity and high stability of Trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v.260, n.1, p.119–125, 2006.

XUAN, Q.C.; HUANG, R.; MIAO, C.P.; CHEN, Y.W.; ZHAI, Y.Z.; SONG, F.; WANG, T.; WU, S.H. Secondary metabolites of endophytic fungus *Trichoderma* sp. YM 311505 of *Azadirachta indica*. **Chemistry of Natural Compounds**, New York, v. 50, p.139–141. 2014.

YUN, B. S., YOO, I.-D., KIM, Y. H., KIM, Y. S., LEE, S. J., KIM, K. S., YEO, W. H. Peptaivirins A and B, two new antiviral peptaibols against TMV infection. **Tetrahedron Letters**, London, v. 41, n.9, p.2308–2312, 2000.

WOO, SL, HERMOSA, R., LORITO, M., MONTE, E. *Trichoderma*: A multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.21, n.5, p.312-326, 2023.

ZAID, R., KOREN, R., KLIGUN, E., GUPTA, R., LEIBMAN-MARKUS, M., MUKHERJEE, P. K., KENERLEY, C. M., BAR, M., HORWITZ, B. A. Gliotoxin, an immunosuppressive fungal metabolite, primes plant immunity: Evidence from *Trichoderma virens*-Tomato interaction. **MBio**, Washington, v. 13, n. 4, p.e00389-22, 2022.

ZEILINGER, S., GRUBER, S., BANSAL, R., MUKHERJEE, P. K. Secondary metabolism in *Trichoderma* - Chemistry meets genomics. **Fungal Biology Reviews**, London v.30, n.2, p.74-90, 2016.

ZHANG, J. L., TANG, W. L., HUANG, Q. R., LI, Y. Z., WEI, M. L., JIANG, L. L., LIU, C., YU, X., ZHU, H. W., CHEN, G. Z., ZHANG, X. X. *Trichoderma*: A Treasure House of Structurally Diverse Secondary Metabolites with Medicinal Importance. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v.12, p.723828, 2021.

3 **CAPÍTULO 2 - PHOTOGRAPH REGISTRATION OF PETRI DISHES IN HIGH QUALITY AND IMAGE EDITING OF MICROBIOLOGICAL ASSAYS¹**

ABSTRACT

Science is based on evidence that can be measured or observed through methodical techniques which are expressed in several ways, either quantitatively or qualitatively. Technical photograph becomes one of the most important key tools to disclose experimental results. In microbiological research, several pieces of evidence can be indicated with parameters that are deeply related to culture media; pH and color variation, halo formation, overlay of structures, culture shape, among others. The employment of technical photographs as a strategy of the experimental observation and reliable representation is indispensable. The protocol presented here suggests the production of photographic support in microbiological assays in Petri dishes taken by smartphone to obtain high-quality images, besides showing tools to edit images using PowerPoint. The support is composed of a paper tube with a transparent border, whose reduced light penetration avoiding light reflection over the Petri dishes or the culture media. The edition consists of photograph variation, and in clipping and pasting on uniform backgrounds to provide further detailing. The protocol allowed a standardized photograph collection in high quality, which is ideal for a comparative portrait of microbiological behaviors. The image editing enabled a framework and greater visibility of physical and biological structures in the exhibition of photographs inside the manuscript, such as the removal of noises, background alterations, deformities, or irregularities. This protocol is an intelligent and cheap tool to help researcher on the knowledge-obtaining process, and it is applied to different experiments or adapted into the most variable research subjects.

Keywords: technical photograph; bioassays; microbiology

3.1 **INTRODUCTION**

The scientific experimentation photographing or registering act requires dedication to its execution, whose main goal is obtaining a high-quality image that can reflect, with more credibility, the results of the research that was carried out. Science seeks the understanding of reality based on observation methods and registration of what is seen or measured and calculated (Belz, 2011).

¹O capítulo 2, refere-se ao artigo publicado em língua inglesa no periódico *International Microbiology* pelos autores Rodrigues, C., David, G.Q. & Reis, A.R. está intitulado como: Photograph registration of Petri dishes in high quality and image editing of microbiological assays. (2022). In *International Microbiology* volume 25, pag.561–570. Este pode ser acessado via link: <https://doi.org/10.1007/s10123-022-00242-z> ou <https://rdcu.be/djnoh>, por isso manteve-se a língua da publicação científica, integrando ao corpo da tese, diferindo desta forma dos demais capítulos.

According to Mafia et al. (2016), the photograph is constituted by one of the best documentation forms to illustrate the observations and experiments' results. These authors affirm that, although the photographing seems extremely simple, it is necessarily accurate in the scientific field, however, higher education and research institutes, broadly, do not possess a professional staff to execute such tasks, and are submitted to people involved in the experiment, who face the everyday challenge of taking photos. It must be highlighted that amateurism is, many times, not yet enough and at least, core principles are necessary to handle the photograph equipment efficiently.

Belz (2017) reports that the easy access and the trivialization of photography generates an image landslide that, many times, does not bring an attractive communicative context, and to avoid this from happening, it is necessary inciting a more complex analysis and interpretation. It is in this regard that photography can be used as an important scientific and teaching communication tool in any science field.

In the microbiological aspect, the images must allow the proper characterization of the organism under study, in terms of shapes, coloration or structural dimensions, corroborating with Smith and Schuster (2021). For this purpose, besides adequate equipment, the effort, and dedication of the researcher are needed, in order to obtain a high-quality photographic registration, since a good image reveals many pieces of important information to the scientific research, which becomes a communication element.

The employment of photography happens through the image reading, in other words, the acknowledgement of the richness of information contained in the registration, allowing the viewer to realize its representation nuances, which provides a scientific reflection, fulfilling its roles in the research (Guran, 2012).

The scientific photograph has as a goal being the most reliable as possible to the photographed matter, respecting the colors, proportions, textures, patterns, shapes, and everything else that allows a better analysis regarding the registered information (Freitas, 2016). An image can contribute to scientific work in the same way that a graph or a chart, it only needs to be driven to this objective (Belz, 2017).

According to Messas (2016), digital photography became the less expensive and most accessible photographic practice to researchers, reflecting exponential growth in the employment of photographic tools as a scientific method on biological studies, with countless pieces of work evidencing, mainly because it is a non-invasive methodology, easily performed and efficient in terms of data generation.

The technological sector has innovated itself increasingly in the market of photographic equipment, may it be through digital cameras, tablets, cellphones, micro-cameras to microscope/stereoscope or others, making its popularization possible, as well as the access to some resource for the image capturing (Mafia et al., 2016). However, the researchers must acknowledge the photograph as a research and disclosure tool, and at the same moment, it is needed that they make this knowledge their own, since, in practice, most of the time, they are restricted to books, post-graduation essays and scientific texts with a few high-quality photographic registrations (Belz, 2017).

Messas (2017) highlights the fact that as important as the acquisition of high-quality images, in the field or the lab, it is the adequate image flow adoption in order to guarantee the quality and reliability of the research. The involved steps, in the image postprocessing, are fundamental to the organization of the collected data, to the study objective suitability and the good practices and safety of the photographs against mechanical and/or electronic failures.

Although the principles and the techniques to obtaining a good photo are known, there are moments when it is necessary the file editing, in order to better represent the expected goal. Therefore, the basic application of some computational tools (Photoshop, Corel Draw Photo, PowerPoint or similar others) to the image editing, will be able to solve some imperfections or layout adjustments to a greater observation valuation documented by the photographs, as it is defended by Mafia et al. (2016).

Intending to propose methodological discussion and procedures regarding the photographic registration of biological runs, some authors suggest that specific protocols to different techniques and organisms must be created, with the goal of standardising photographic methodologies and generate trustworthy and comparable data with each other. Messas (2017) emphasizes that besides meeting ethical questions and good scientific quality, the new photograph methods must be easy to be reproduced, present a cost for its execution that is as low as possible and take into account the variation of the produced photographs for different brands and models of photographic equipment.

This research has as a goal proposing a new protocol for the photograph registration with high-quality bioassays carried out through Petri dishes (named by Protocol PRHQ), as well as exploring image editing tools with the employment of PowerPoint.

3.2 MATERIAL AND METHODS

One of the most frequent failures in the *in vitro* trials with Petri dishes is on the photographic registration, since, in its majority, they are carried out in reflective materials, such as plastic, acrylic or, the most common, glass, which depending on the work environment, can suffer luminous interventions. It jeopardizes the image quality and has a negative effect on the obtained results through the experiment or in the results' confirmation.

The protocol here proposed used a paper tube with a transparent border and emerges as an alternative to correct the previously mentioned mistakes, based on microbiological trials of filamentous fungi in growing process and bacteria on Petri dishes with different means of culture, and the cellphone as image registering equipment, allowing the high quality on the scientific photograph to be reached.

3.2.1 Necessaire material

- 01 blurred black sheet of paperboard.
- 01 sheet of transparent material or similar (for example.: plastic bottle, curriculum kind "L" file);
- Cardbox (20 x 20 cm);
- Scissors, white glue, scotch tape, pen and ruler.
- Led ring light.
- black/blue cloth, sulphit paper or a lightbox (x-ray visualizer).

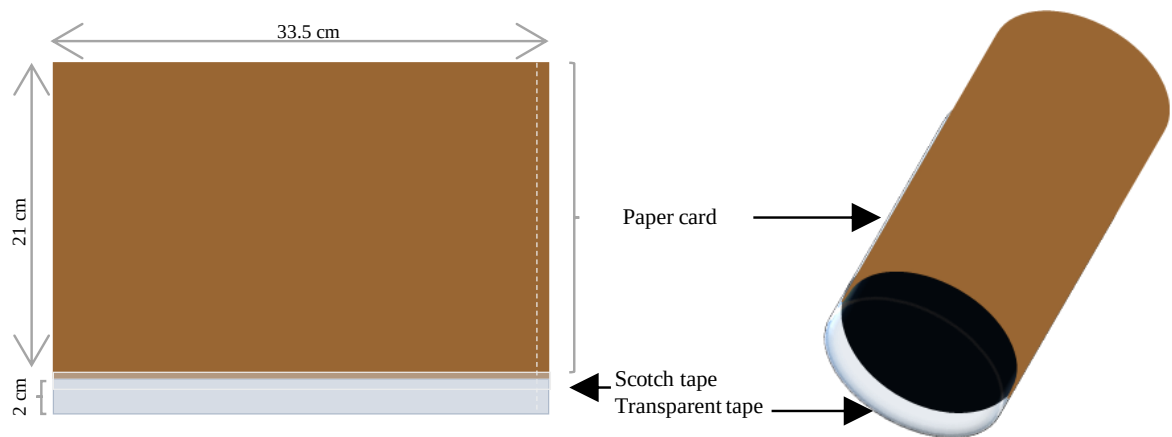
3.2.2 Procedures for the confection of the paper tube

The PRHQ Protocol consists of the confection of a paper tube, made with black paperboard, whose dimensions may vary according to the size of the Petri dish used in the experiment. The descriptions here presented are valid to trials with glass plates (100x20mm). The images can be obtained with the closed plates (lid and bottom) or open (only the bottom). Obviously, it will affect the tube diameter (Fig. 1).

- a) On the blurred black paperboard, cut a rectangle with the proportion of 21 x 33.5 cm, in order to its shape be able to circle all the Petri dish diameter, with a small remnant for the lateral edges fixation;
- b) On the transparent sheet or similar, cut a piece of ribbon that is, preferable, the same height of the plates (2 x 33.5 cm) and surrounds all of its diameters;

- c) Through the scotch tape, make a junction of the parts (items *a* and *b*) on the larger edge of the rectangle;
- d) Using an empty Petri dish (of the same dimensions as the ones used in the experiment) as a mold for the desired diameter, so the fixation is done on the lateral edges, forming a tube, maintaining the black side of the paper turned on the inside.

Figure 1 - Confection of the paper tube diagram, used as a way of conducting focus and light to the Petri dish photographic registration



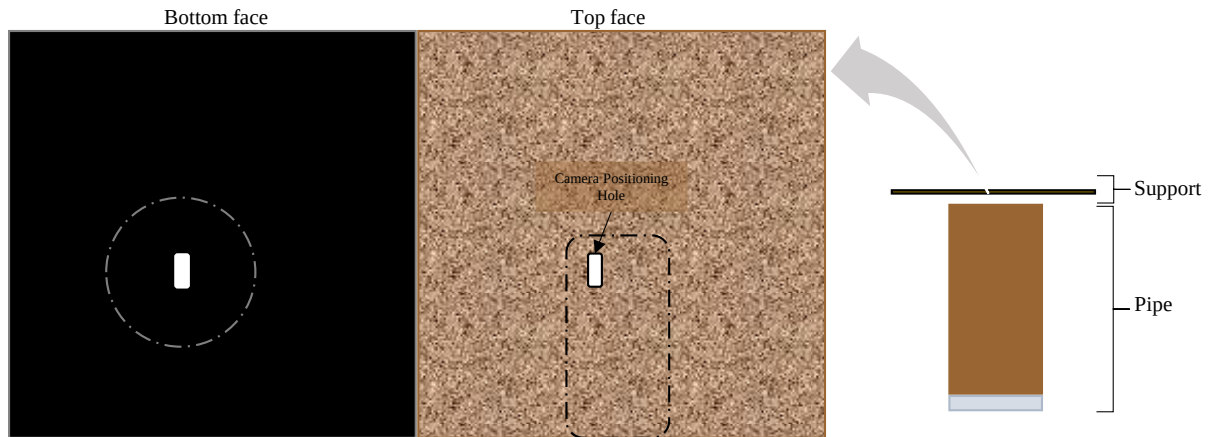
Source: Elaboration of the author

3.2.3 Procedures for the making of the cellphone framework

The PRHQ protocol adjusts itself mainly to the photographic cameras on cellphones, which have their own settings manually triggered or activated automatically with artificial intelligence sensors, hence, the adjustments on the capture of the image are done at the moment when the photo is taken, in order to obtain a better result.

- a) Over the paper tube, it is necessary to have a bracket to the cellphone placement, allowing a greater uniformity of the photographic registration; to achieve it, the use of an inflexible material is necessary, such as a cardbox, with the measures of 20 x 20 cm.
- b) Another square of the same proportions in black paperboard;
- c) The sides of both squares must be glued, in order to have an entirely black side (paperboard) and another one being the cardbox;
- d) On the superior side (cardbox), the cellphone placement delimitation is made, from then on, an orifice is opened (only enough) to the camera fitting, which will depend on the cellphone model (Fig. 2).

Figure 2 - Representation diagram of the cellphone square bracket, which allows greater safety and uniformity on the PRHQ protocol usage



Source: Elaboration of the author

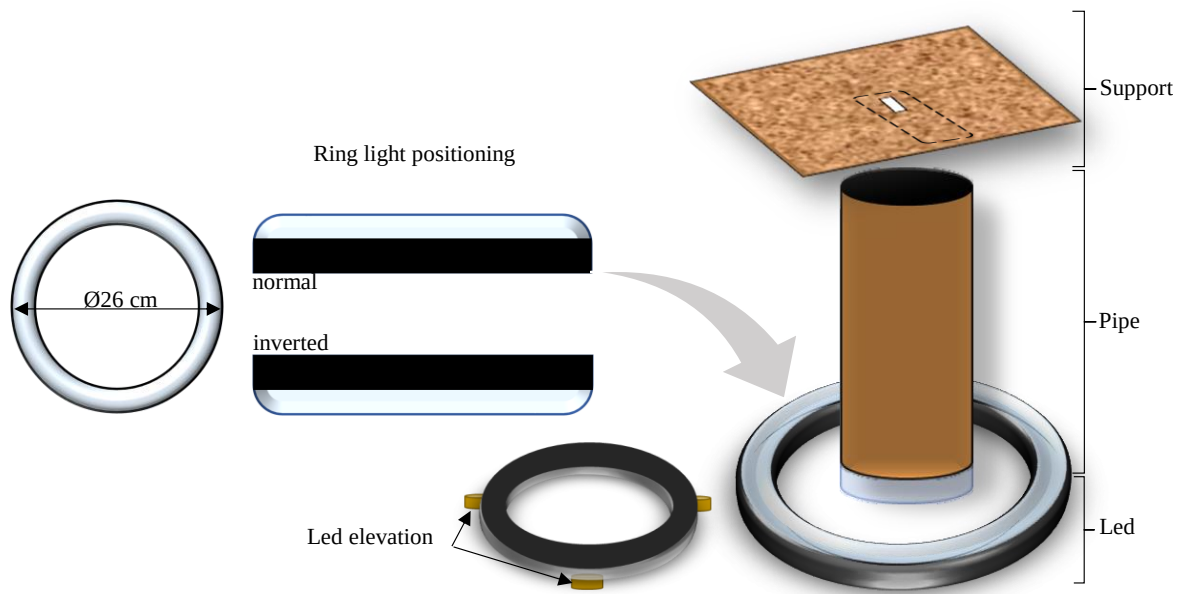
3.2.4 Making of the studio for the photographic registration

The photograph is a result of the performing of several steps, which will guarantee the greater quality of the final image, so the setting environment demands some attention. On the execution of the PRHQ protocol, it is important considering the luminous source and the background.

- a) Light: one of the biggest effects expressed on the photo final quality is on the employment of a good luminous source, the main light used on the protocol is a led ring light ($\varnothing$ 26 cm) without the tripod; its round shape allows a uniform distribution of the light on the Petri dish, revealing many characteristics of the culture or the degradation reaction of the environment, depending on the matter under study. The ring light is positioned with a luminous projection turned to upward (normal), but, depending on the kind of the culture or study focus, this position can be inverted, but, in this case, something to elevate it to a desirable height must be used, usually the same height as of the plate, this way there will be the perfect light crossing (Fig. 3).
- b) Background: The culture development over its environment can be better contrasted with the adoption of backgrounds; in this protocol, it is recommended the use of black or blue cloth, sulphite paper sheet or even a lightbox (x-ray visualizer), the choice depends on the culture environment, the colony color and other factors that can affect the contrast. The background works as the backbone for the making of the work studio

(led light, Petri dish, tube and cellphone bracket used for its placement). Usually, the black cloth is the most usual and allows great results.

Figure 3 - Work studio organization and positioning adjustments of the luminous source to the PRHQ protocol performance



Source: Elaboration of the author

3.2.5 High-Quality Photograph Register – PRHQ Protocol

After the organization of the whole methodological process for the making of the registration basic structure, the image capturing proceeds. All the exhibited photos were taken with a smartphone, regardless of its brand or model, since there are minimum settings, such as brightness, zoom, focus or other tools that can be used whenever necessary.

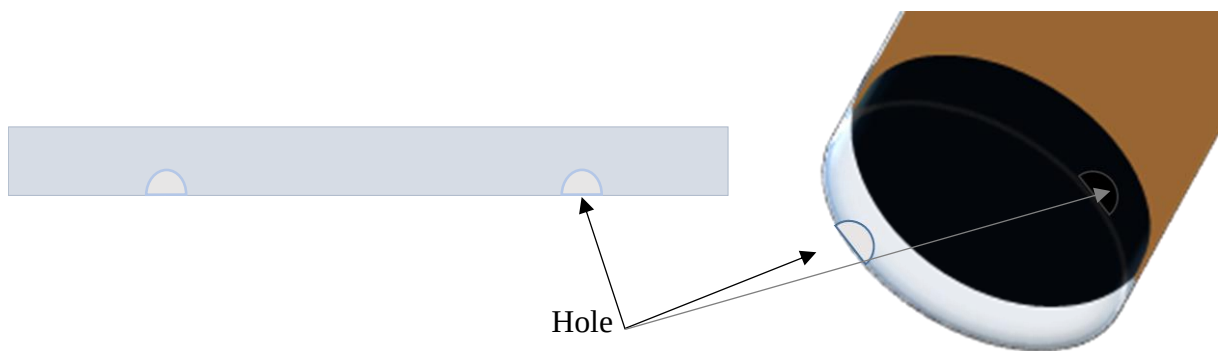
This protocol allows that the registration is made, one Petri dish each time, which means, each plate is photographed individually, and it can be representative or, after the registrations, all of them can be put into a group with the help of software or apps, in this way a composed picture is formed or images boards.

The Petri dish with the colony to be photographed is placed on the black cloth and, afterwards, the ring light is positioned, considering the plate in the center so the tube is adjusted over the plate, in a perfect fitting, because it was made measured for this arrangement. In the case of a smaller plate, an edge of the cloth will appear at the moment of the register. After the fitting, with the led already turned on, the tube is covered by the cellphone bracket, and the

device, on the image capturing mode, is positioned over it, just as the light enters through the transparent border, which allows a greater image quality, without negative influences on the registering act.

After the image capturing, the plate is removed from the tube, in the case, if there is any difficulty in this process, it is recommended that two opposed holes are made on the transparent tape, in order to not go beyond half of its width (≈ 1 cm) (Fig. 4).

Figure 4 - Details of the holes on the transparent tape to enable the Petri dish removal, if necessary



Source: Elaboration of the author

3.2.6 Image Editing with Powerpoint tools

Some adjustments, cuts, corrections, or layout reviews can be done with specific apps or more practical and accessible software, such as *PowerPoint*.

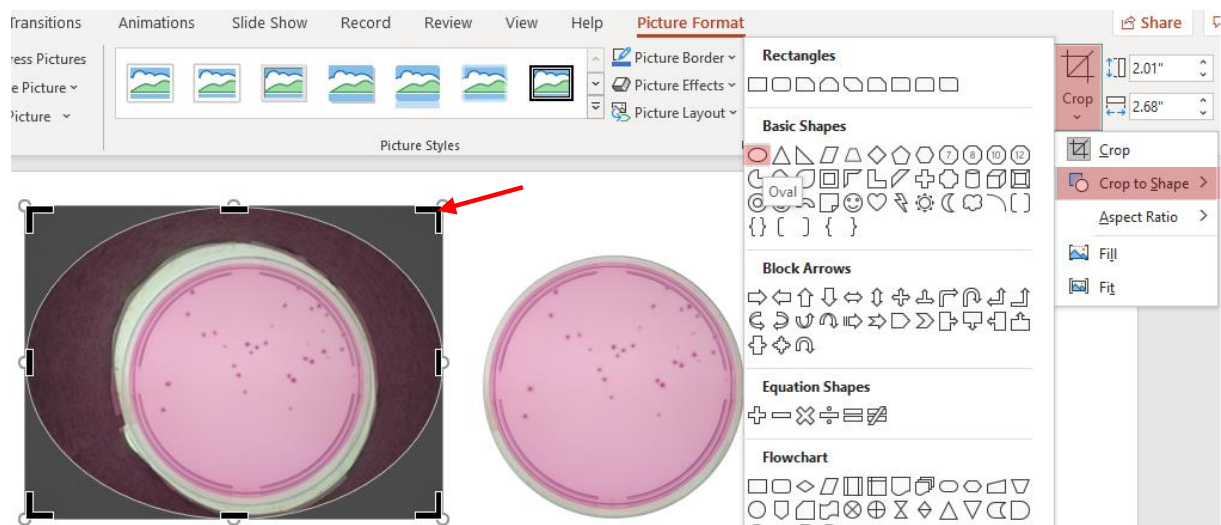
This software is meant to design the creation of audiovisual presentations; some tools allow image editing, offering satisfactory results regarding the final quality of the product, mainly in the presentation of results in digital media, presentations in forums, social networks, remote classes, or other means of scientific dissemination.

One of the main tools is located on the upper tab >>*Picture Format*<<. In order to add it, it is necessary “to copy” the photo that needs editing and “to paste” on the PowerPoint page, afterwards, one must double click on the image to activate the tab >>*Picture Format*<<, usually on the upper right side, the icon >>*crop*<< can be found, when it is triggered in the photo surroundings and “handles” will come up so one can drag the mouse to erase surplus or undesirable areas (Fig. 5).

In this same tool, there is the possibility of cutting the picture into the format of basic shapes (as the circular shape). To do this, it will be necessary to click on the arrow below the

cut icon (✂) and activate the command tab “*crop to demarcate shape*” and choose which shape is preferable to cut the image. Once the plates are round, the circular one is the most adequate, and it must be selected on the option <<Basic Shapes – oval>>. Afterwards, it is necessary to click on the icon <<crop>> and with the “handles” adjust accordingly the circle, in case it is needed, the size can be adjusted on the “dimension box” besides the cut icon (Fig. 5).

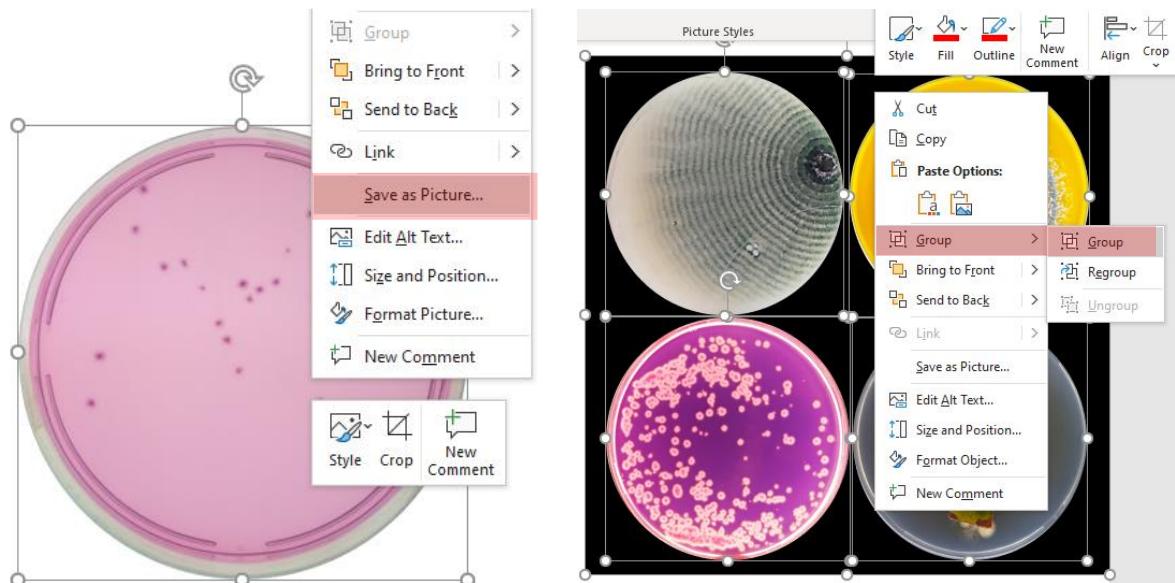
Figure 5 - Details of the image formatting tab as of the cutting process, and details of the image formatting, highlighting the cut into the circular shape



Source: Elaboration of the author

After the removal of undesired areas from the photograph, it can be saved as an image, clicking with the cursor right button, or it can be kept on PowerPoint to make a montage with other photos from the experiment, forming an image board, which, when it is finished, the pictures can be put into a group, inserted directly on Word or “save as picture” (Fig. 6).

Figure 6 - Suggestions of saving the image or image board montage after cutting and formatting.



Source: Elaboration of the author

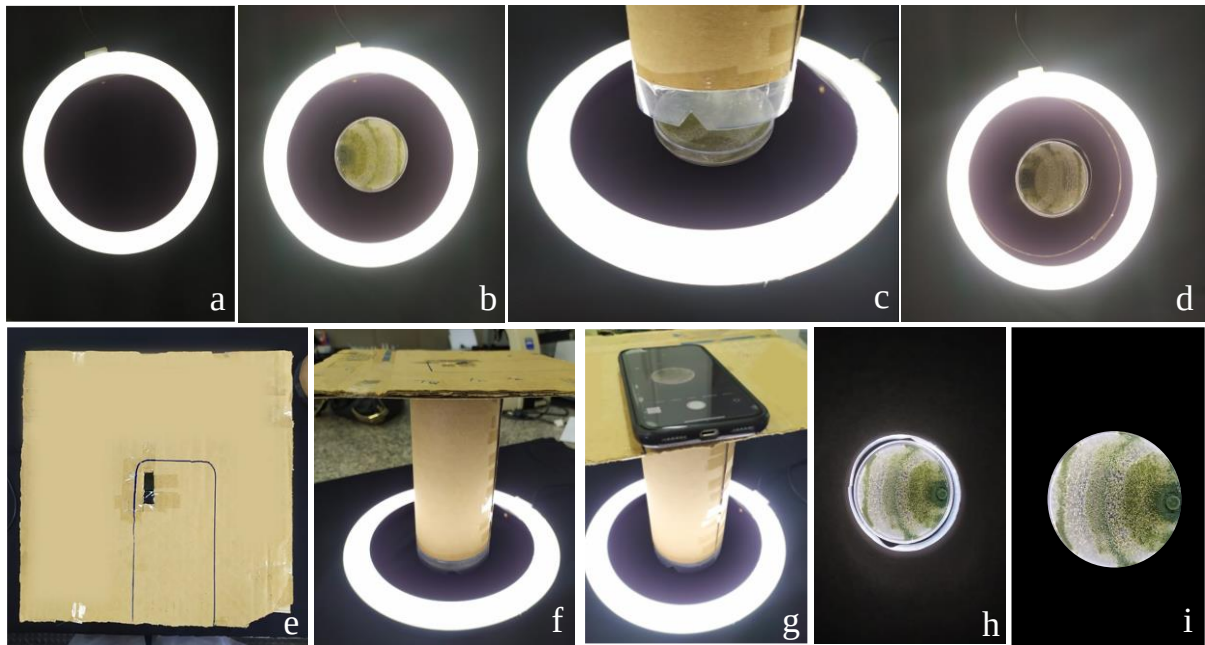
3.2 RESULTS AND DISCUSSION

The research will be able to explore the PRHQ protocol and enjoy its possibilities to the fullest. Here we propose a method that allows the reader, researcher, or explorer to photograph their photography through image specification software such as ImageJ, according to Smith and Schuster (2021), validating photographic methods.

There are cases in which the luminous intensity growth by the led (cold and hot light), or zoom adjustments, of brightness or capture, changes of the background colors will affect the obtained results. With the aim of organizing the photograph studio, according to the previously described and demonstrated steps in Fig. 7.

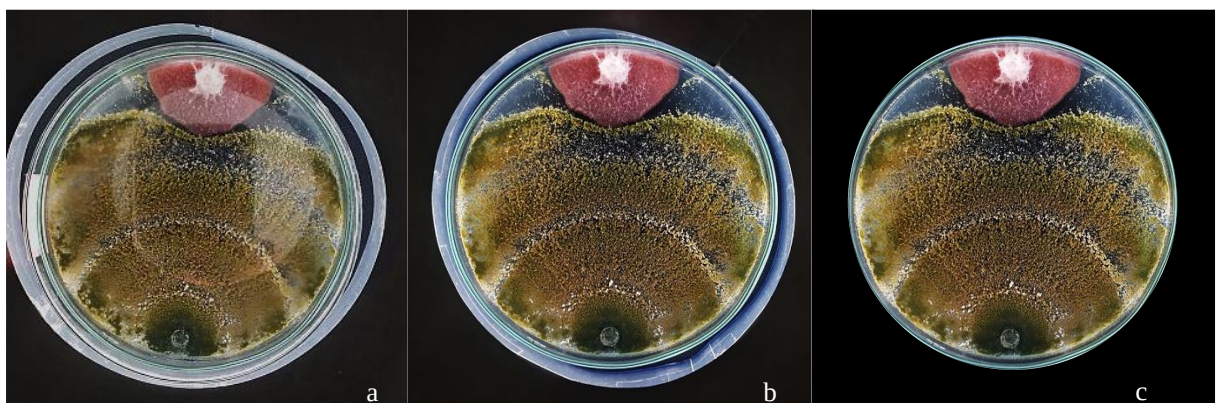
According to what was explained in the methodological description, it is recommended that the tube is manufactured in the dimensions of the plate to be photographed, avoiding interferences of irregular edges (Fig. 7 – h). In the case the tube is tight, making the plate removal difficult, a clipping on the tape can be done to facilitate the process after the photographic registration (Fig. 7 – c). The support lid for the cellphone (Fig. 7 – e), aside from functioning as an equipment bracket, avoiding variation or hand twitching, improves the distribution of light and focus quality of the device's camera, avoiding reflections of the lid or the culture environment (Fig. 8).

Figure 7 - Making of the photographic registration studio's steps in order to execute the PRHQ protocol. a) Led Ring light over the black cloth; b) placing the Petri dish on the center of the led; c - d) positioning of the cylindrical paper tube over the plate; e) lid of support for the cellphone; f - g) organization of the parts and performing of the register; h) photographic result of the employment of this method, emphasizing the irregularity of the edge because it is a wider tube than the plate diameter; i) edge adjustments made by the tool of cutting into a circle on PowerPoint, and pasting in a black background



Source: Elaboration of the author

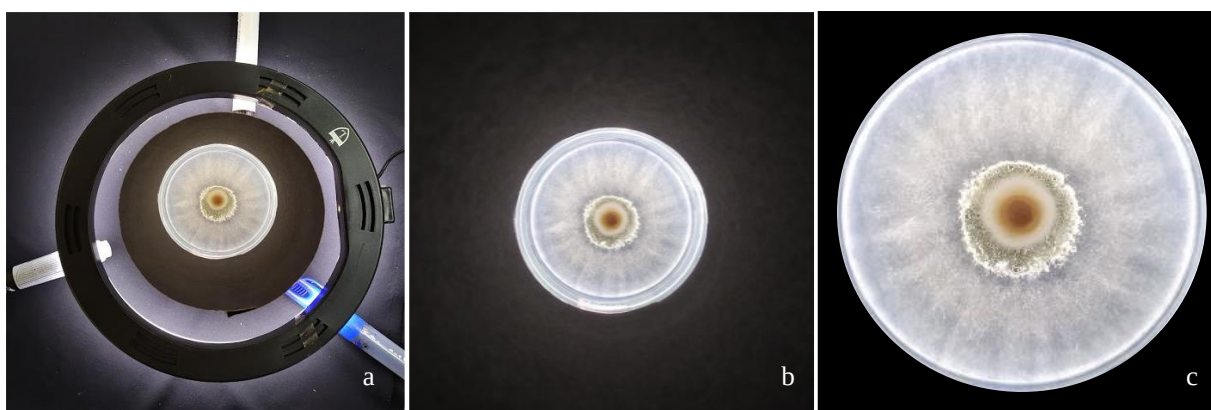
Figure 8 - Reflection of equipment by the covered plate (a) that was avoided by the employment of a supporting lid (b) and can be improved with final touches by the cutting off edges and pasting on a black background (c)



Source: Elaboration of the author

There will be situations when the inversion of the light from the led will allow better results on the photograph, it depends a lot on the color of the environment culture, on the microorganism or on the chosen technique on the trial, in the application of the protocol, it was verified that in experiments with overlapping colonies, as in tests of evaluation of volatile organic compounds, there is a greater richness of details of the myceliation in the capture of the image (Fig. 9).

Figure 9 - Ring light inversion to the registration of Petri dishes in organic compounds volatile by antagonists and pathogens evaluation



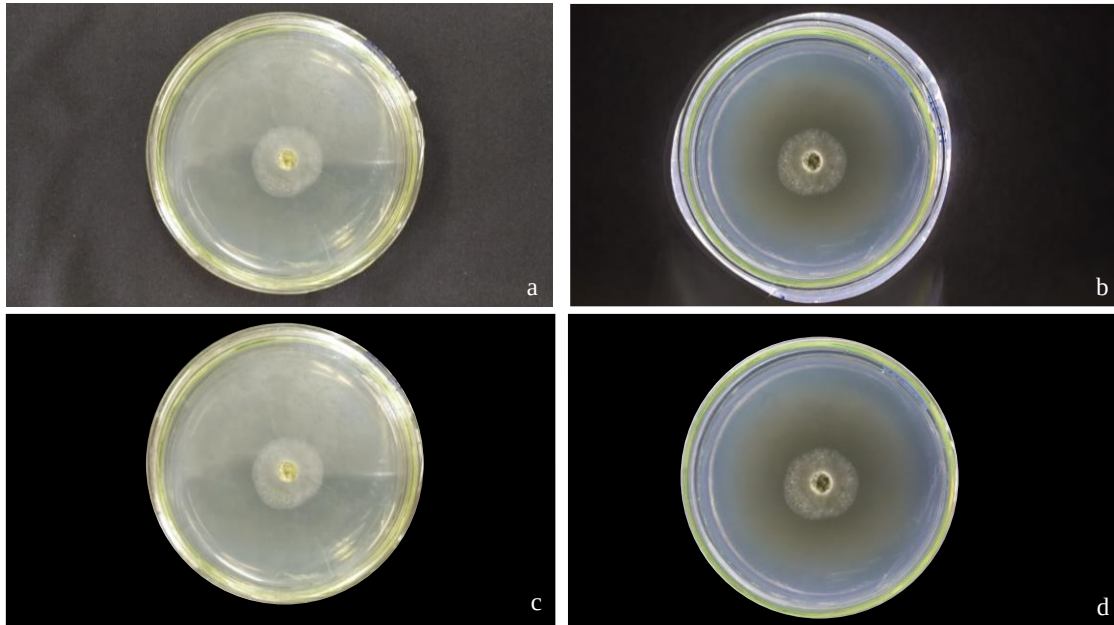
Source: Elaboration of the author

The scientific photograph has to express the communicative capacity, highlighting details and results reached through research, that is because the concern on having a final material in high-quality and of practical obtaining endorse the statements made by Mafia et al., (2016), in which the scientific photograph requires, first of all, the simplicity, which is the main orientation, on the generation of the product, the picture.

Below (Fig. 10), it is made clear that the improvement in the photo quality when it was taken through the PRHQ protocol. It is also suggested that, in case of necessity, the exhibition of the picture must happen over a black background, emphasizing the photograph details.

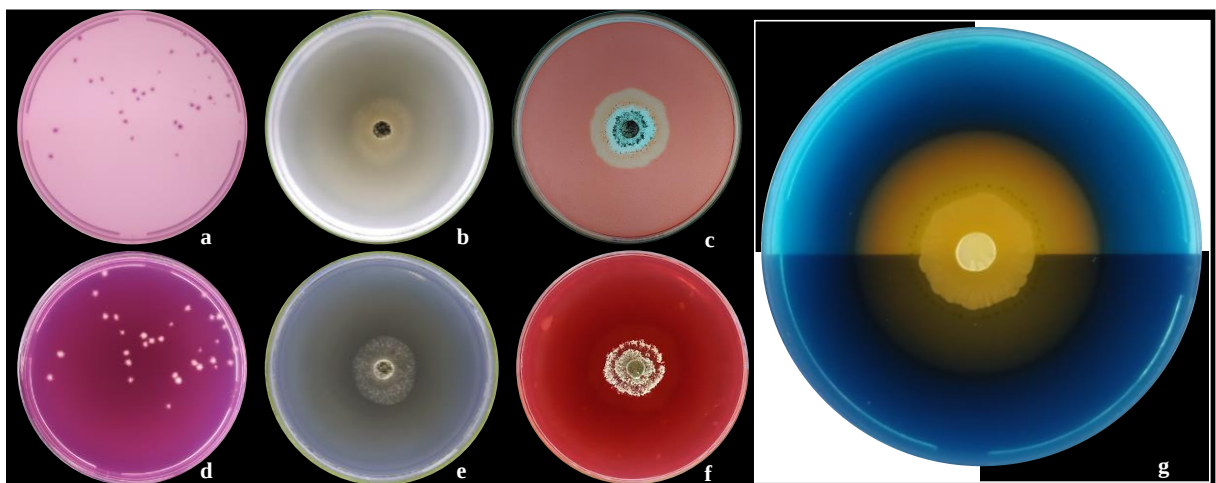
The photographic background varies in relation to the object under study and/or better characterization of the experiment. For this purpose, it is suggested the employment of a one-colored cloth (black or blue), blank sheet of paper or lightbox, whose luminous source is widely distributed, and the ring light usage is not necessary when this option is chosen. Below (Fig. 11), two situations with a clear and dark background are represented, under the PRHQ protocol, as well as the plate's appearance when exposed in a black or white background.

Figure 10 - Photographic registration of a Petri dish sealed with plastic foil without (a) and with (b) the employment of the PRHQ protocol; and editing of the edges by the circular cutting and pasting on a black background in both situations of unemployment (c) and employment (d) of this protocol



Source: Elaboration of the author

Figure 11 - Different photographed experiments with PRHQ protocol, using a clear background (a,b,c) and the same plates under a dark background (d,e,f), it is suggested that independently of the photo's background choice (clear or dark), a black background can be used (g) to the exhibition of the results in the image board or image compilation.

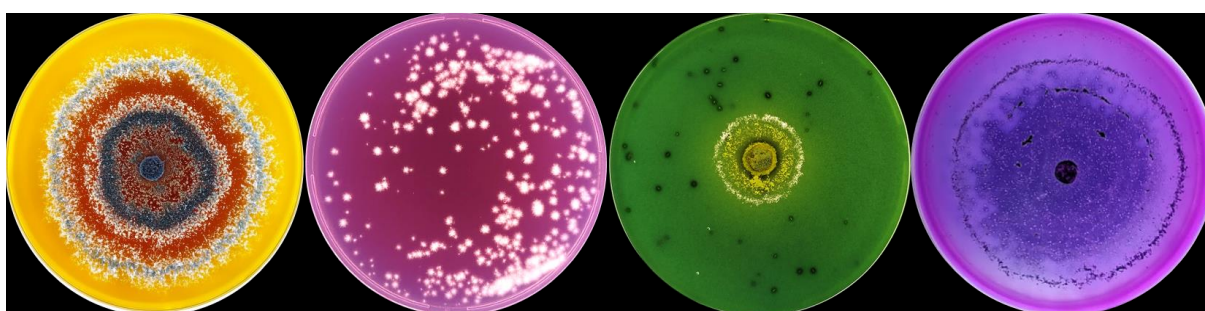


Source: Elaboration of the author

In the growing of microorganisms, means of culture containing necessary nutrients and vitamins for their growth and reproduction are employed. The nutrients are provided in a way

to meet the species' demands to be cultured, promoting their growth or satisfactory sporulation. However, the mean of culture composition depends on the microorganism that one wishes to grow and the study purpose Zauza et al. (2016), in figure 12 shows the mycelial growth, as well as the different reactions generated by the microorganism in specific culture media for its characterization.

Figure 12 - Use of the PRHQ protocol for assays of growth and production of metabolites by *Trichoderma* sp., showing the number of colonies, color change, degradation and crystal formation during P solubilization and chitinase production.

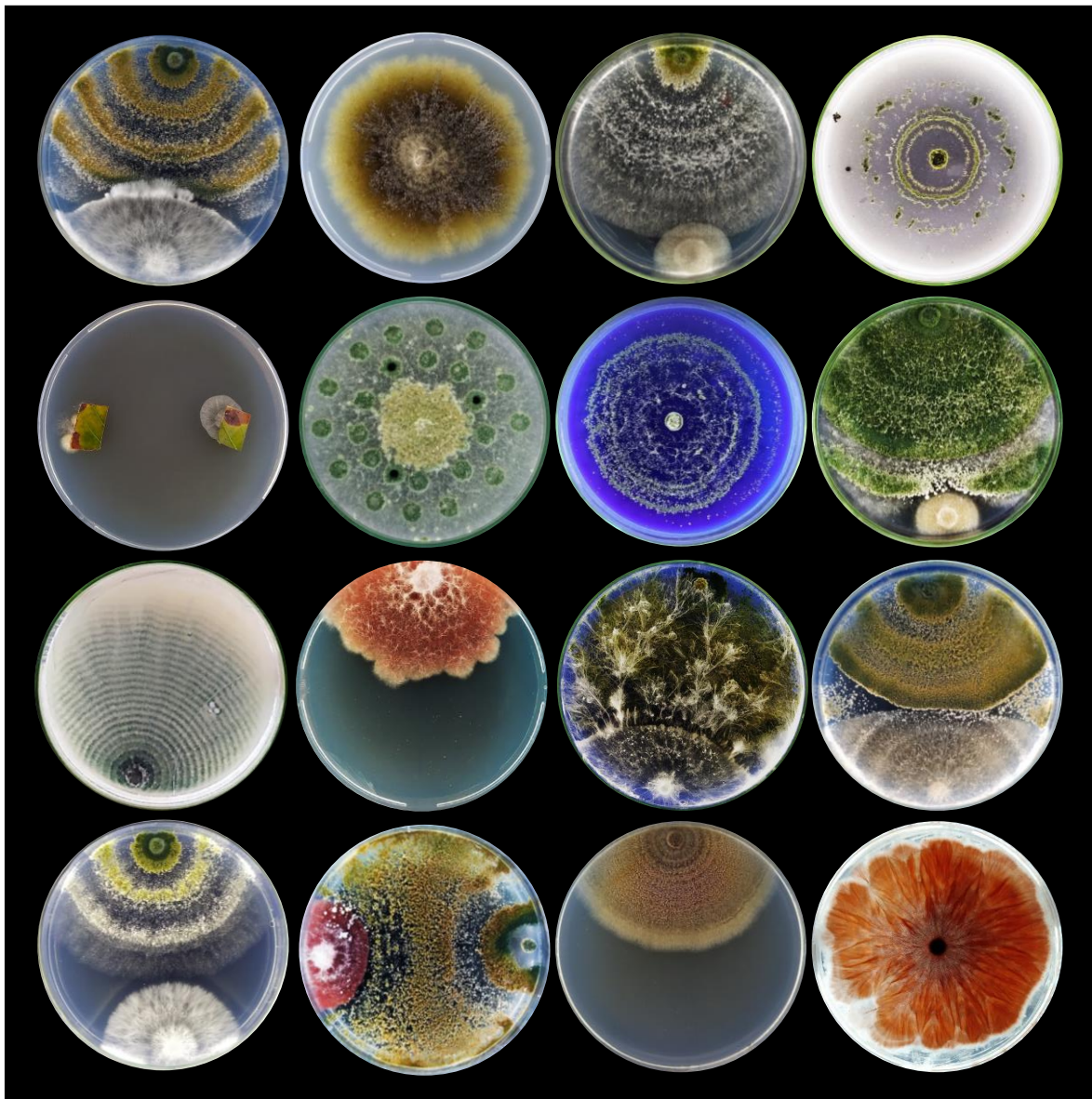


Source: Elaboration of the author

These means present different colorings, textures and goals, which can be revealed through the microorganism development, as growth limitation, halo formation of substance degradation, color variation for pH changes, crystal formation and others, in order to make the photograph an indispensable tool in the presentation of these results. Through this protocol, it was possible to portrait faithfully (Fig. 13) several microbiological trials, commonly carried out in the study of the microorganisms.

The scientific photograph taken in high quality allows a wide comprehension language of what is the research purpose and makes the reader explore even more the manuscript during its appreciation. This registration, when made with criteria and technical approach, can go beyond the qualitative patterns, allowing the use of software for the image analysis in the RGB standards, and provide reinterpretations of a quantitative nature in the evaluation's experiment.

Figure 13 - The image board exposes different photographic registrations performed through the PRHQ protocol on several occasions, emphasizing the microorganisms details and characteristics, such as colors, textures, colony shapes, antagonist reactions, among others, reassuring the protocol efficiency in the scientific documentation. All the pictures in this essay were taken by a device called Xiaomi Redmi Note 7, and the setting happened mostly through 9 MP and can be accessed originally through the link <https://photos.app.goo.gl/tJ2ABv7BVzMosQMt8>



Source: Elaboration of the author

3.3 CONCLUSIONS

The scientific research has its merit and acknowledgement by everything that is investigated and proven, among the various strategies adopted to such doing, the photography,

without a shadow of a doubt, allows and raises, even more, the credibility of the action, so, the protocol purpose to the photographic register of Petri dishes (PRHQ Protocol), here presented by the employment of a paper tube and its modifications, is one more tool that helps the research in the knowledge creation, through the supply, when manipulated consistently, the high-quality images and without external interferences, which can be applied to different experiments, or adapted to the most varied research subjects.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES) – Finance Code 001.

REFERENCES

- BELZ, C.E. A fotografia Científica. Site Lebio. 2011. Disponível: <http://lebioufpr.wixsite.com/lebio/single-post/2013/05/01/A-Fotografia-Cient%C3%ADfica>. Acesso 26 de março de 2022.
- BELZ, C. E. A fotografia como ferramenta de Ensino e Divulgação Científica. **Revista de Fotografia Científica Ambiental**, Rio de Janeiro, v.1, n.1, p.26-29, 2017.
- FREITAS, A. C. Fotografia, ciência e educação. **Revista Susinere**, Rio de Janeiro, v.4, n.2, p.328-330, 2016.
- GURAN, M. Documentação Fotográfica e Pesquisa Científica: Notas e reflexões. Rio de Janeiro: XII Prêmio Funarte Marc Ferrez de Fotografia. Disponível em: http://www.labhoi.uff.br/sites/default/files/doc_foto_pq.versao_final_27_dez.pdf. Acesso 26 de março de 2023.
- MAFIA, R. G., ZAUZA, E. A. V., ALFENAS, A. C., CANDIDO, T. S. Basic Principles of Technical Photography, Photomicrograph and Optical Micrometric. *In*: ALFENAS A (ed) **Methods in Phytopathology**. 2ª ed. Viçosa, Brasil, p.187-205, 2016.
- MESSAS, Y. F. Environment Scientific Photography: a biological perspective. **Revista de Fotografia Científica Ambiental**, Rio de Janeiro, v.1, n.1, p.65-79, 2021.
- SMITH, P., SCHUSTER, M. Inexpensive Apparatus for High-Quality Imaging of Microbial Growth on Agar Plates. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v.12, p.689476, 2021.
- ZAUZA, E. A.V.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Sterilization, preparation of means of culture and factors related to the pathogen growing. *In*: ALFENAS A (ed) **Methods in Phytopathology**. 2ª ed. Viçosa, Brasil, p.27-54, 2016.

4 **CAPÍTULO 3 – *TRICHODERMA*: AÇÃO ANTAGÔNICA AO *FUSARIUM BRASILIENSE*, DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES BIOQUÍMICAS E COMPATIBILIDADE A PRODUTOS QUÍMICOS**

RESUMO

Cereais e grãos estão na base da dieta alimentar e no topo das cadeias produtivas agrícolas, cujas demandas por fertilizantes e defensivos aumentam e encarecem o sistema, ou geram consequências danosas ao ambiente. Alternativas racionais ao manejo nutricional e fitossanitário dos campos de produção como uso de bioinsumos é uma realidade assídua na última década. A bioprospecção de cepas biológicas para mitigar os efeitos de moléculas químicas, permitem inúmeros benefícios e garantem a sustentabilidade dos agroecossistemas. Objetivou-se avaliar *in vitro* os efeitos antagônicos de isolados de *Trichoderma*, nativos do bioma amazônico sobre *Fusarium brasiliense*, causador da podridão vermelha radicular da soja, determinando suas potencialidades, atividades bioquímicas, além da compatibilidade com moléculas químicas comumente adotadas nos tratos culturais. Foram realizados testes laboratoriais para determinação da atividade antagônica por meio do pareamento de culturas (considerando o crescimento, o índice de velocidade e porcentual de inibição do crescimento micelial e escalas de notas). Determinou-se as interferências dos compostos orgânicos voláteis no desenvolvimento do fitopatógeno. Atividades bioquímicas (quitinolítica, celulolítica, produção de ácido indol acético, solubilização de fosfatos e potássio, além da produção de sideróforos). Investigou-se a compatibilidade dos isolados biológicos com moléculas químicas usuais no tratamento de sementes da soja e manejo de plantas invasoras. Todas as cepas de *Trichoderma* foram antagônicas ao *F. brasiliense*. Os compostos orgânicos voláteis foram capazes de reduzir o crescimento e afetar a viabilidade dos conídios do fitopatógeno. Os isolados produziram atividade quitinolítica, celulolítica, além de produzir ácido indol acético. Houve a produção de sideróforos, bem como a solubilização de potássio, e de fósforo ligado a cálcio, alumínio e ferro. Os isolados apresentaram algum grau de sensibilidade as moléculas químicas organofosforada e de fungicidas usados nos tratamentos de sementes. Os isolados de *Trichoderma* revelaram mecanismos de ação e atividades bioquímicas interessantes para bioprospecção, com potencial para desenvolvimento de novas pesquisas e aplicabilidade agrícola, sendo superiores em muitos casos aos produtos comerciais destinados a tais finalidades.

Palavras-chave: bioprospecção; antagonismo; controle biológico.

ABSTRACT

Cereals and grains are at the base of the diet and at the top of agricultural production chains, whose demands for fertilizers and pesticides increase and make the system more expensive or generate harmful consequences for the environment. Rational alternatives to the nutritional and phytosanitary management of production fields, such as the use of bio inputs, has been an assiduous reality in the last decade. The bioprospecting of biological strains to mitigate the effects of chemical substances, allows several benefits and ensures the sustainability of agroecosystems. The objective was to evaluate in vitro the antagonistic effects of *Trichoderma* isolates, native to the Amazonian biome, on *Fusarium brasiliense*, which causes red root rot in soybeans, determining its potential, biochemical activities, in addition to compatibility with chemical products commonly accepted in cultural practices. Laboratory tests were carried out for the antagonistic experience through the pairing of cultures (considering growth, velocity index and percentage of follow-up of mycelial growth and grade scales). It was determined as interference of volatile organic compounds in the development of the phytopathogen. Biochemical activities (chitinolytic, cellulolytic, production of indole acetic acid, solubilization of phosphates and potassium, in addition to the production of siderophores). The compatibility of biological isolates with usual chemical emission in the treatment of soybean seeds and management of weeds was investigated. All *Trichoderma* strains were antagonistic to *F. brasiliense*. The volatile organic compounds were able to reduce the growth and affect the viability of the phytopathogen conidia. The isolates produced chitinolytic and cellulolytic activity, in addition to producing indole acetic acid. There was the production of siderophores, as well as the solubilization of potassium, and phosphorus linked to calcium, aluminum, and iron. The isolates have adopted some degree of obedience to organophosphate and fungicide chemicals used in seed treatments. The *Trichoderma* isolates showed interesting control of action and biochemical activities for bioprospecting, with potential for the development of new research and agricultural applicability, being superior in many cases to commercial products intended for such purposes.

Keywords: bioprospecting; antagonism; biological control.

4.1 INTRODUÇÃO

Áreas agrícolas expandem e se verticalizam no intuito de aumentarem seus níveis de produtividade fornecendo fibras, proteínas e carboidratos para atender a demanda da população. Cereais e grãos, como a soja, desempenham papel fundamental na dieta alimentar animal. No entanto, demandas com insumos (fertilizantes e defensivos) aumentam e encarecem ou inviabilizam o sistema, além de gerar consequências danosas ao meio em que estão inseridas.

Em 2021, o Brasil ocupou a 25ª posição no consumo de defensivos por hectare. No entanto, em 2018 ocupou o terceiro lugar no ranking de consumidores de defensivos no volume total, ficando atrás da China e Estados Unidos (Lohbauer; Albuquerque, 2021).

Na última década houve expressivo crescimento no interesse pelo uso de técnicas mais racionais e desenvolvimento de bioinsumos destinados a produção vegetal. O Brasil possui uma política nacional de bioinsumos e se destaca no cenário mundial. Esse setor movimenta cerca de R\$ 3,3 bilhões por ano com taxas de crescimento acima de 10% (CLB, 2023; Vidal et al., 2021). Woo et al. (2023), em sua revisão, revelam que o Brasil detém o mercado mais ativo em número de registros globais, com cerca de 28% destes, seguido da Colômbia e União Europeia.

No momento, o país tem mais de 600 produtos autorizados para uso nacional, incluindo reguladores de crescimento, extratos vegetais, semioquímicos, bioquímicos, microbiológicos e microbiológicos. Esse último, representa cerca de 65% dos registros atuais, com inúmeras finalidades, em destaque seus efeitos biofungicidas e promotores de crescimento (CLB, 2023; MAPA, 2023).

Dentre esses microrganismos, um agente de biocontrole que se destaca é o gênero fúngico *Trichoderma* spp. Esses fungos de vida livre, bem distribuídos e altamente interativos na rizosfera, e no interior de plantas. São amplamente estudados por apresentarem elevado controle de fitopatógenos, efeitos bioestimulantes no crescimento vegetal e capacidade de solubilizar minerais adsorvidos ao solo. Essa versatilidade e eficácia deve-se as suas interações e estratégias, bem como seus vários mecanismos de ação (Meyer et al., 2019).

O *Trichoderma* produz inúmeros metabólitos advindos de uma elevada quantidade de genes, que garantem um amplo oportunismo ambiental. É o gênero fúngico que possui maior capacidade de codificar enzimas hidrolíticas, devido a presença de chaperonas e transportadores ABC. Essas proteínas da membrana celular que secretam metabólitos primários e secundários, além de facilitar a entrada de muitos nutrientes e precursores biossintéticos (Monte et al., 2019).

Destacam-se alguns mecanismos como a competição, a antibiose, o micoparasitismo a produção de compostos do metabolismo secundário como os compostos orgânicos voláteis,

além da liberação de ácidos orgânicos responsáveis pela biossolubilização de P e K, e quelar Fe^{3+} por meio de sideróforos, há a produção de enzimas como proteases, quitinases, glucanases e outros compostos capazes de induzir a resistência das plantas e estimular os mecanismos de defesa vegetal (Harman et al., 2004; Druzhinina et al., 2018; Al-Ani, 2019; Guo et al., 2019; Lobo Junior et al., 2019; Sood et al., 2020; Vinale; Sivasithamparam, 2020).

Essas comprovações permitem investigar a ação do *Trichoderma*, principalmente no manejo de doenças radiculares, como a podridão vermelha radicular da soja, causada na América do Sul pelo *Fusarium brasiliense*. Ainda não há produtos registrados ou eficientes para o manejo do *F. brasiliense*, cujos danos levam a reduções de produtividade em até 27% e desfolha de acima de 30% em R6 (Farias Neto et al., 2008).

Considerando a versatilidade do *Trichoderma* e potencial de expansão de seu uso em áreas agrícolas, bem como a diversidade de moléculas químicas ofertadas e consolidadas no mercado, ainda é escassa pesquisa que confrontam a adoção das práticas biológicas e químicas, sejam concomitantes ou subsequentes, que corroborem com os anseios dos sistemas de produção e que permitam a inserção dessa ferramenta biológica cada vez mais no cenário agrícola.

A soja é uma importante matriz energética para as cadeias produtivas atuais e considerando as projeções de aumento populacional nas próximas décadas é necessário pesquisas que possam melhorar a produção de alimentos, seja integrando essas ferramentas biológicas, reduzindo o uso de moléculas sintéticas ou de origem fóssil não renovável.

O objetivo desse trabalho foi investigar o efeito antagônico *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. da biodiversidade Amazônica ao *F. brasiliense*, evidenciar as principais atividades bioquímicas realizadas por esses isolados e classificá-los quanto ao grau de compatibilidade a moléculas químicas usuais nos sistemas de produção da soja, consolidando este um estudo basal para bioprospecção e potencial uso no sistema produtivo da cultura.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Isolados biológicos

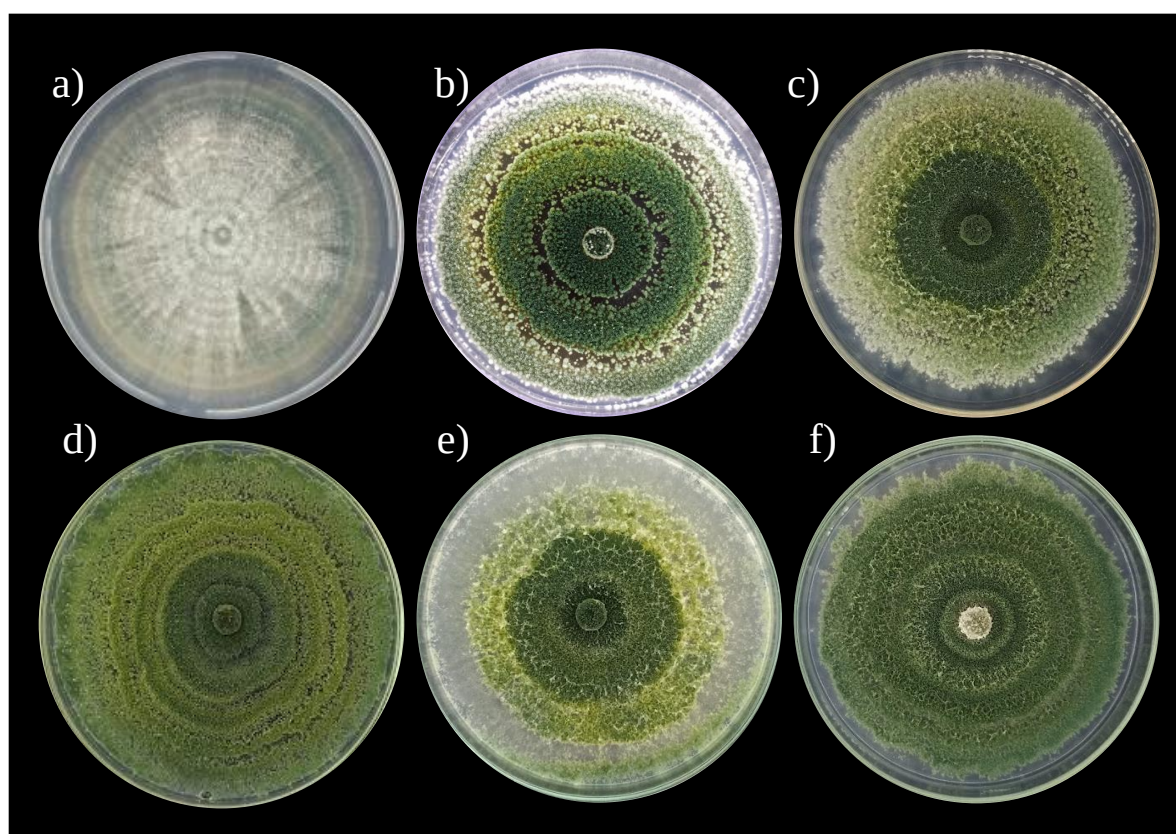
4.2.1.1 Obtenção dos isolados de *Trichoderma* spp. e *F. brasiliense*

Isolados fúngicos do gênero *Trichoderma* spp., pertencentes a micoteca da Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus de Alta Floresta, foram coletados em áreas de produção hortifruti em agroecossistemas amazônicos (Projeto FAPEMAT nº 411716/2011) e após triagem e ensaios prévios em laboratório, foram selecionados quatro destes (identificados como

TB, TF, TP e TQ) para comporem os experimentos, além de um isolado comercial *Trichoderma asperellum* URM 5911 (codificado como TA) e um isolado de *Fusarium brasiliense* (Fb), agente causal da podridão vermelha da raiz da soja, oriundo da Coleção de Microrganismos de Interesse para a Agricultura da Embrapa Soja (CMES).

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

Figura 1 - Aspectos morfológicos das colônias: a) *Fusarium brasiliense* CMES 04; b) isolado comercial TA - *Trichoderma asperellum* e os isolados nativos *Trichoderma* spp.; c) isolado TB; d) isolado TF; e) isolado T; f) isolado TQ, com 7 dias de incubação em BDA



Fonte: Elaboração do próprio autor

4.2.1.2 Identificação molecular dos isolados nativos de *Trichoderma* spp.

Material micelial de cada isolado nativo, crescido em meio líquido batata dextrose (BD) por 7 dias foi liofilizado e encaminhado ao laboratório especializado para a amplificação e sequenciamento da região *barcode* dos fungos (ITS). De cada amostra foram utilizados 100 mg para extração de DNA com o kit DNeasy Power Soil Pro kit, conforme as instruções do

fabricante. A qualidade e quantidade de DNA extraído foi verificada no fluorímetro Quantus[®] (Promega) e por espectrofotometria em Nanodrop TM (Thermo Fisher Scientific).

O DNA extraído de cada amostra foi utilizado em reações de amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando o LongAmp Taq 2X Master Mix (New England Biolabs) e primers (Tabela 1) para obtenção da região do fungo. Os produtos da PCR foram verificados em gel de agarose e purificados utilizando beads magnéticas.

Os produtos purificados da PCR foram quantificados e utilizados na construção de biblioteca para sequenciamento do DNA em plataforma MinION (Oxford Nanopore Technology – ONT). A biblioteca foi preparada com os kits de barcoding e ligação da ONT e enzimas da New England Biolabs - NEB.

A biblioteca preparada foi aplicada na Flongle Flow Cell R9.4.1 (ONT), inserida no dispositivo MinION (ONT) para o sequenciamento de DNA. Parâmetros de leitura e de qualidade de dados foram determinados no software de corrida e de análises MinKNOW (ONT) e, ao final do sequenciamento, os dados gerados seguiram para análises de bioinformática.

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados na amplificação das regiões alvo

Alvo/ Domínio	Primer	Sequência 5' – 3'	Tamanho do produto*	Referência
Fungi	ITS fungo_F ITS fungo_R3	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	~ 650 pb	White et al., (1990)

* Pares de bases

Os dados brutos do sequenciamento de DNA foram processados no modo “acurado” do software MinKNOW, de multiplexados para individualização de amostras e filtrados com base em índices de qualidade (score > 8) e tamanho de reads. Dados brutos em fastq foram analisados no programa NanoPlot e seqkit para a obtenção dos valores das métricas de sequenciamento, incluindo o tamanho dos fragmentos, a qualidade e a quantidade de sequências, essas foram filtradas de acordo com o tamanho dos fragmentos com o programa seqkit.

O tamanho filtrado para este projeto variou de 592 a 622 pb. As amostras em formato de “fastq” foram utilizadas para a criação de sequências consensos e posteriormente classificadas ao banco de dados nucleotídeos (nt) do NCBI utilizando a ferramenta decona (<https://github.com/Saskia-Oosterbroek/decona>).

4.2.2 Antagonismo

4.2.2.1 Pareamento de colônias

O pareamento de culturas em placas de Petri foi realizado com cinco isolados de *Trichoderma* spp. (TA, TB, TF, TP e TQ) contra o fitopatógeno *F. brasiliense* (Fb) por meio do confronto direto, conforme Dennis e Webster (1971). Discos (6 mm Ø), retirados de culturas do antagonista e do patógeno, foram depositados, em lados opostos, em placas com meio BDA e incubados em BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 h. Em delineamento inteiramente casualizado, por tratamento foram estabelecidas sete repetições, com repetição para validação dos dados. As variáveis analisadas foram:

- *Crescimento médio micelial (CMM)*: obtido das medidas diárias do crescimento em diâmetro (cm) da colônia do patógeno, com o auxílio de uma régua milimetrada, em sentido transversal a partir da borda do disco de inoculação, até o momento em que se verificar que não há mais crescimento micelial da colônia.
- *Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM)*: obtido a partir das médias dos valores diários de crescimento micelial de cada tratamento, conforme proposto por Oliveira (1991).

$$IVCM = \frac{\sum(D - Da)}{N}$$

Em que:

IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial

D = diâmetro médio atual da colônia;

Da = diâmetro médio da colônia do dia anterior;

N = número de dias após a inoculação

- *Porcentagem de inibição do crescimento (PIC)*: Abbott, (1925) propõe uma equação que considera o desenvolvimento do patógeno sob presença do *Trichoderma* em relação a testemunha (somente patógeno)

$$PIC = (\emptyset C - \emptyset T) / \emptyset C * 100$$

ØC = diâmetro do controle (testemunha)

ØT = diâmetro do tratamento na presença do antagonista

- *Antagonismo micelial*: Foram atribuídas notas de acordo com escala proposta por Rodrigues (2010) adaptada de Bell et al. (1982), onde aos 7 e 14 dias de incubação, com uso de um gabarito de avaliação (Figura 2).

Nota 1- Antagonista cresce por toda a placa de Petri e sobre o disco do patógeno

Nota 2- Antagonista cresce por toda a placa, porém não sobrepõe o disco do patógeno;

Nota 3- Antagonista cresce sobre 3/4 da placa;

Nota 4- Antagonista cresce sobre 2/3 da placa;

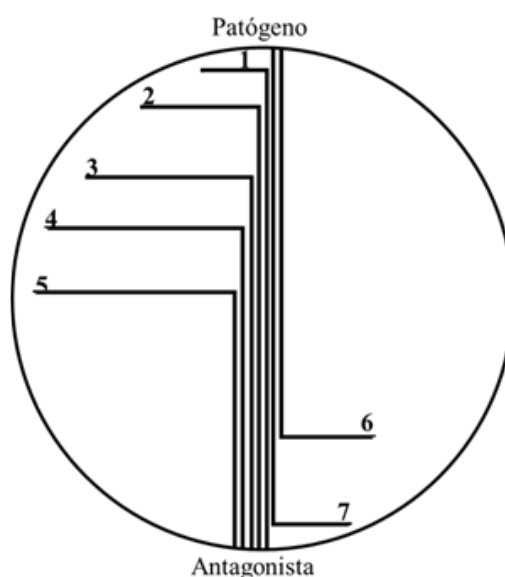
Nota 5- Antagonista e patógeno crescem até a metade da placa;

Nota 6- Patógeno cresce sobre 2/3 da placa;

Nota 7- Patógeno cresce por toda a placa.

Conforme Louzada et al. (2009) considerou-se antagônico o isolado que teve nota inferior ou igual a 3.

Figura 2 – Gabarito de avaliação do grau de antagonismo do *Trichoderma* por meio de escalas de notas proposto por Rodrigues (2010).



Fonte: Elaboração Rodrigues (2010).

- *Microscopia de varredura (MEV)*: Discos de 6 mm Ø das áreas do confronto entre as colônias de isolados de *Trichoderma* e do patógeno crescidos em meio AA (ágar-água), seguindo a proposta de Bossola e Russell (1998), modificado por Alves (2005), que propõe a fixação da amostra por meio de Karnovisk a 4 °C durante 48 h, desidratação em gradiente crescente de álcool etílico (10, 20, 30, 50, 70, 80, 90, 95 e 100%), permanecendo 15 minutos cada.

Em seguida os discos são depositados sobre papel filtro mantidos em álcool 100% e encaminhadas para secagem no secador Elmitech Critical Point Drayer K850 (ponto crítico), utilizando a injeção de acetona e dióxido de carbono por 2,5 h. Em seguida as amostras foram montadas sobre os “stubs” de alumínio e metalizadas com banho de ouro (20 nm) em evaporador

de ouro Elmitech k 550 por 15 minutos.

As visualizações foram realizadas no microscópio eletrônico ZEISS® DSM 962 com o intuito de observar o micoparasitismo das hifas do *Trichoderma* sobre o patógeno.

4.2.2.2 Produção de Compostos orgânicos voláteis (COV's)

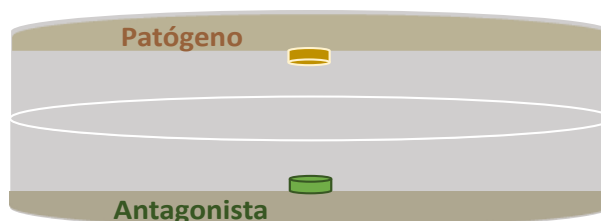
O teste adotado para o diagnóstico de COV's por cepas antagonistas, também chamado de teste de placa invertida, consiste no crescimento de fitopatógenos em atmosfera compartilhada com o bioagente de controle, nesse caso o *Trichoderma*, conforme Dennis e Webster (1971).

Para o teste são utilizados dois fundos de placas de Petri de mesma dimensão, em ambos são vertidos meio de cultura (BDA), e após solidificação é disposto ao centro de cada placa um disco (6 mm Ø) do micélio (Figura 3).

As placas contendo o fitopatógeno e outra o antagonista, são sobrepostas ou invertidas, de modo que o fitopatógeno fique na parte superior, em seguida partes são unidas e vedadas com filme plástico PVC e mantidas em BOD a 25 ± 2 °C fotoperíodo 12h, por cerca de 7 dias. A testemunha consistiu da sobreposição de placas, tendo apenas o fitopatógeno em um dos lados e apenas o meio de cultura do outro.

Figura 3 – Esquema para o teste de compostos orgânicos voláteis em atmosfera compartilhada por meio do método de placas invertidas. Placas do teste podem ser visualizadas no seguinte

link: <https://photos.app.goo.gl/eFbjTt4DemetkbVV6>



Fonte: Elaboração do próprio autor

Por tratamento foram estabelecidas seis repetições, conduzidas em delineamento inteiramente casualizado, com repetição para validação dos dados. As avaliações ocorreram diariamente sendo determinado: crescimento médio micelial da colônia do patógeno com auxílio de régua milimetrada; largura das hifas e comprimento dos conídios por meio de fotomicrografia com camara acoplada ao microscópio optico; contagem de conídios em câmara

de Neubauer; e viabilidade dos conídios, por meio da porcentagem de germinação dos conídios gerados pelas colônias expostas a atmosfera compartilhada, contabilizada em meio Martin.

4.2.3 Atividades bioquímicas

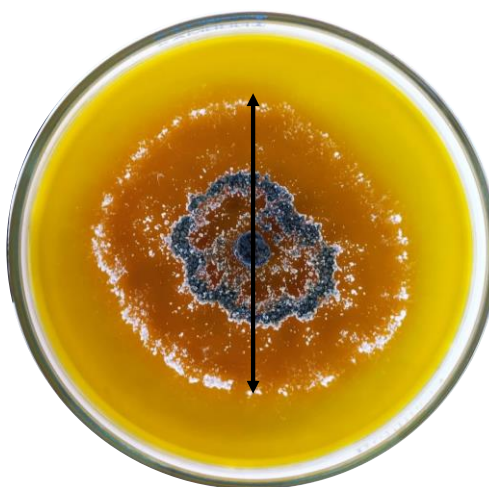
Investigou-se as atividades bioquímicas que potencialmente cada isolado poderia desenvolver ou expressar quando em contato com meios e procedimentos específicos, logo foram conduzidos ensaios com cinco tratamentos e cinco repetições em delineamento inteiramente casualizado.

4.2.3.1 Atividade Quitinolítica

Adotou-se a metodologia de Agrawal e Kotasthane (2012), com meio sólido contendo 0,3 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,0 g de KH_2PO_4 , 1,0 g de ácido cítrico monohidratado, 200 μL de Tween⁸⁰, 4,5 g de quitina coloidal, 0,15 g de vermelho de fenil, 15 g de ágar (pH final 4,7) e seguido de autoclavagem a 121°C por 15 min. Após, o meio fundente foi vertido em placas de Petri, e inoculado um disco de 6 mm do micélio, e incubado em BOD a 25°C e fotoperíodo de 12 h.

Foram observados, após 5 dias, a formação de halos avermelhados ao entorno do crescimento micelial, mensurado com auxílio de régua o diâmetro do halo, indicativo da atividade enzimática quitinase (Figura 4).

Figura 4 – Crescimento micelial do *Trichoderma* ssp. em meio com quitina coloidal e setas indicando o halo de mensuração da atividade quitinolítica



Fonte: Elaboração do próprio autor

4.2.3.2 Atividade Celulolítica

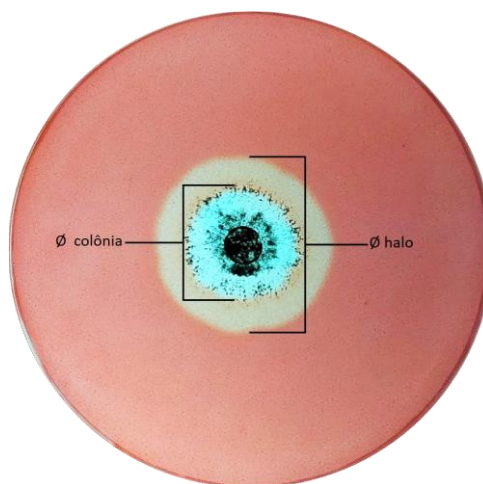
Seguiu-se a proposta de Durairaj et al. (2017), com modificações. Os isolados foram inoculados em meio CMC a base de 15 g de ágar, 10 g de CMC (carboximetilcelulose), 1,0 g de KH_2PO_4 , 0,3 g de $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$, 0,5 g de NaCl, 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, em 1 L de água, seguido de autoclavagem, inoculação e posterior incubação por 72 h a 25 °C.

Após a incubação, as placas foram inundadas com 5 mL de vermelho do Congo 0,1% por 20 min e depois com 10 mL de solução salina de NaCl a 1M por 20 min. Observou-se a formação de halos ao redor das colônias, desencadeado pela celulase, sendo esse o indicativo da degradação da carboximetilcelulose.

A atividade hidrolítica da celulase foi estimada usando-se o índice enzimático (IE) que expressa a relação do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia. Os isolados que exibiram os maiores IE, foram considerados com maior atividade enzimática extracelular (Figura 5).

$$IE = \varnothing \text{ halo} / \varnothing \text{ colônia}$$

Figura 5 – Indicativo de mensuração do diâmetro da colônia e do halo de degradação da atividade celulolítica do *Trichoderma* spp. em meio CMC



Fonte: Elaboração do próprio autor

4.2.3.3 Determinação de ácido indol acético (AIA)

Adotou-se o protocolo de Oliveira et al. (2012), onde 100 mL de batata-dextrose (BD) foi enriquecido com L-Triptofano ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), fracionados em erlenmeyer (250 mL) e autoclavados. Após, foi adicionado em cada erlenmeyer um disco do *Trichoderma* crescido em

BDA (7 dias) contendo micélio e conídio. Os frascos foram incubados sob agitação a 200 rpm a 28 °C na ausência de luminosidade.

As avaliações ocorreram aos 3, 6, 9, 12 dias após a incubação, onde 10 mL do material incubado era centrifugado a 10000 rpm a 6 °C por 15 min. Para a análise colorimétrica de AIA foram utilizados 1 mL do sobrenadante acrescido de 0,5 mL do reagente Salkowski (FeCl_3 0,5 mol L^{-1} + HClO_4 (35%)) e mantidos no escuro por 25 minutos, conforme Gordon e Weber (1951).

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 530 nm em cubeta de quartzo. As absorvâncias foram corrigidas pela equação da curva padrão de AIA (forma sintética) e expressas a concentração final do hormônio presente nas amostra em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.3.4 Sideróforos

Para a determinação de sideróforos produzidos pelos isolados de *Trichoderma* adotou-se a metodologia proposta por Dave e Dube (2000), Baakza et al. (2004), em meio líquido Grimm-Allen composto por 1 g K_2SO_4 , 3 g de acetato de amônio, 3 g K_2HPO_4 , 1 g ácido cítrico, 20 g de sacarose, suplementado com 0,002 g tiamina, 0,005 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,0035 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,2 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,08 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 1 L de água destilada deionizada e pH ajustado 6.8 com NaOH. O meio foi vertido em erlenmeyer e inoculado com um disco de micélio (8 mm Ø) e incubado em BOD a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 15 dias.

Adotou-se o método colorimétrico de Schwyn e Neilands (1987) por meio da solução de cromo azurol S (CAS), essa contendo 6 mL de hexadecyltrimetilamônio bromide (HDTMA) 10 mM, 1,5 mL de Ferro (III) (1 mM FeCl_3 em HCl 10 mM), 7,5 mL de solução de CAS (2 mM), 4,307 g de piperazina anidra, 6,25 mL de HCl 12 M depositados em balão volumétrico (100 mL) e completos com água e pH regulado em 5,6, mantido na ausência de luminosa.

A reação foi montada com 0,75 mL do sobrenadante após centrifugação + 0,75 mL da solução de CAS, realizado leitura (quatro repetições por tratamento) em espectrofotômetro (630 nm) após 1 hora de reação. A produção de sideróforos foi expressa pela absorvância relativa (A_a/A_{ref}), considerando A_a = Abs da amostra dividida pela A_{ref} = Abs de referência (testemunha) Schwyn e Neilands (1987).

A tipificação dos sideróforos em hidroxamatos, catecolatos e carboxilatos foi indicada pela presença (+) ou ausência (-) após testes propostos por Ghosh et al. (2017).

4.2.3.5 Solubilização de P (Fosfatos de cálcio, alumínio e ferro)

A solubilidade destes fosfatos é muito baixa e decresce na seguinte ordem: Ca-P > Al-P > Fe-P. Desta forma foram adotados dois protocolos para avaliar a solubilização do fósforo *in vitro* por *Trichoderma* em meio líquido, sendo:

- *Meio NBRIP (Fosfato de cálcio e alumínio)*

Optou-se pela metodologia de Nautiyal (1999) para o meio líquido NBRIP, sendo composto por 10 g de glicose, 5 g de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ou AlPO_4 , como fonte de fosfato de cálcio e de alumínio, respectivamente, 5 g de $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g de KCl, 0,1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dissolvidos em 1 litro de água miliq e pH=7, fracionado em erlenmeyer (250 mL) colocando 100 mL e tampado com gaze e alumínio, e autoclavado por 15 min a 120°C 1 atm.

Após resfriar, 5 discos de micélio foram adicionados em cada erlenmeyer e incubados sob agitação a 160 rpm a 28°C sem luminosidade.

Diariamente foram coletadas 1,5 mL do meio em crescimento e centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm, as coletas forma a partir do tempo zero até a observação na queda das leituras. Em eppendorf, foram adicionados 100 µL do reagente de Murphy e Riley (1962), composto por 12,5 mL ácido sulfúrico 5N, 3,75 mL da solução de molibdato de amônio, 7,5 mL da solução de ácido ascórbico e 1,25 mL da solução de tartarato de potássio e antimônio, juntamente adicionou-se 100 µL da amostra sobrenadante e 1,8 mL de água miliq, em quadruplicatas, todas foram homogeneizadas e incubadas por 40 minutos até leitura em espectrofotômetro a 725 nm.

- *Meio MS (Fosfato de ferro)*

Seguindo a metodologia de Barroso e Nahas (2008), adotou-se o meio líquido MS como meio de crescimento dos isolados de *Trichoderma*, meio esse contendo 0,1 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 0,1 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g de glicose, 1,25 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g de extrato de levedura, 10,1 g de manitol, 2 g de $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dissolvidos em 1 L água miliq. O meio foi homogeneizado e o pH ajustado em 7,0, seguido do fracionamento de 50 mL em erlenmeyers de 250 mL cobertos com gaze e alumínio e autoclavado 120°C a 1 atm. por 15 minutos.

Após autoclavagem e resfriamento realizou-se a inoculação de 2 discos (8 mm Ø) de micélio esporulado, os frascos foram incubados em BOD à 30°C, sem agitação e na ausência luminosa durante 11 dias. Para a determinação do fosforo inorgânico, em tubo de ensaio, foram adicionados uma alíquota de 100 µL do sobrenadante + 1,5 mL de água miliq + 1,4 mL de solução de Ames (1966) mod. Braz (2011), contendo a mistura de uma parte de solução pré-

preparada de 10 g de ácido ascórbico em 100 mL de água miliq e seis partes da solução de 1,25 g de molibdato de amônio em 30 mL de água miliq, acrescida de 7,3 mL de ácido sulfúrico concentrado e 300 mL de água miliq.

Os tubos foram então homogeneizados em vórtex e incubados por 1 hora a 37 °C, seguido de leitura (quatro repetições) em cubeta de vidro no espectrofotômetro a 820 nm.

Em ambos os protocolos os valores de pH foram coletados nas respectivas avaliações, permitindo correlacionar com os níveis de fosforo livre no meio ao longo do tempo. Os valores de absorbância foram corrigidos por meio de uma curva padrão de fosforo a base de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) de concentração conhecida, tendo seus valores de solubilização de P expressos em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.3.6 Solubilização de K

Para determinação ou isolamento de organismos solubilizadores de potássio, utiliza-se o meio de cultura Agar Pikovskaya Modificado (PVK – Mod) proposto por Velázquez-Gurrola et al. (2015), composto por 0,5 g de extrato de levedura, 10 g de glicose, 5 g de KNO_3 , 0,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 g de MgSO_4 , 0,0001 g de MnSO_4 , 0,0001 g de FeSO_4 , 0,0026 g de Verde de Bromocresol todos devidamente dissolvidos em 1 L de água destilada, pH ajustado em 7,0 e adicionado 15 g de ágar, seguido de autoclavagem por 10 min a 120°C e 1atm.

Ainda fundente, o meio foi vertido em tubos de ensaio (quatro repetições), formando uma coluna de 8 cm de altura, que após solidificação recebeu uma alíquota de 100 μL de uma suspensão de conídios obtida de um disco (8 mm Ø) contendo micélio e conídios agitados em vórtex com 1mL de água destilada estéril.

Em seguida os tubos foram tampados com alumínio e incubados em BOD a 30°C sob ausência luminosa. As avaliações ocorreram com intervalos de 24 horas até o quinto dia, por meio de régua milimetrada foi mensurada a zona de solubilização indicada pela alteração da cor do meio de cultura (azul para amarelo).

4.2.4 Compatibilidade com fungicidas e herbicida

Produtos químicos são usuais no manejo fitossanitário ao longo do desenvolvimento da cultura, desde a semeadura até fase final do ciclo, portanto, avaliou-se a sensibilidade dos isolados de *Trichoderma* spp. a moléculas de fungicidas e herbicidas, para isso foram propostas e adaptadas duas metodologias:

4.2.4.1 Teste de sensibilidade do *Trichoderma* spp. a fungicidas utilizados no tratamento de sementes (Ts) de soja

Em geral as formulações para essa finalidade são aplicadas sob doses recomendadas sobre uma quantidade de sementes ($L\ kg^{-1}$), por serem moléculas químicas esse procedimento pode vir a ser feito dias ou momentos antes da semeadura.

Diferentemente os produtos biológicos (inoculantes ou biofungicidas) como o *Trichoderma*, recomenda-se que seja realizado no momento da semeadura, seja via Ts ou sulco de semeadura, junto a linha de adubos ou dispersor de inoculante.

A proposta aqui é uma adaptação de Dalacosta (2019), a fim de simular a sobreposição do produto químico (fungicida) nas sementes com o *Trichoderma*, visto que seria uma prática próxima ao adotado no campo, logo, para o screening em laboratório, sementes de soja foram colocadas em tubo falcom, pesadas e autoclavadas a $120\ ^\circ C$ 1 atm por 15 min a fim de livrar qualquer contaminante e inviabilizar a germinação do embrião durante o ensaio.

Em seguida as sementes foram mantidas (12h) em estufa ($35^\circ C$) para perda de umidade, retomando ao peso inicial. Em câmara de fluxo laminar as sementes foram divididas em sacos de plástico, pesadas e tratadas com os fungicidas, conforme recomendação do produto (Tabela 01).

Tabela 01: Descrição das informações de classe, princípio ativo e dose de produtos comerciais (p.c.) adotados no tratamento de sementes de soja, conforme especificações do rótulo

Nome comercial	Classe de ação biológica	Princípios ativos e concentração	Dose p.c. (mL/100 kg semente)
Maxim XL [®]	Fungicida sistêmico e de contato	Metalaxil-M (10 g/L) Fludioxonil (25 g/L)	100
Standak Top [®]	Fungicida/Inseticida	Piraclostrobina (25 g/L) Tiofanato Metílico (225 g/L) Fipronil (250 g/L)	200

Após o tratamento químico (6h), essas sementes foram submersas (2 min) na suspensão de esporos do *Trichoderma* ($1,0 \times 10^8$), acrescido de 1% de CMC (carboximetilcelulose) para maior aderência ao tegumento da semente. Os tratamentos controles não receberam nenhum tipo de fungicida, apenas a suspensão de esporos.

Transcorrido o tempo, as sementes foram dispostas em placas contendo papel filtro autoclavado para retenção da umidade e posterior plaqueamento em BDA solidificado, neste,

ao centro, foi realizado uma perfuração a fim de retirar um disco ($\varnothing$ 4 mm) do meio, permitindo o posicionamento fixo e total da semente sobre o meio de cultura.

As placas foram vedadas com filme plástico e mantidas em BOD a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas por 7 dias, e as avaliações a cada 24h, mensurando o crescimento micelial (diâmetro da colônia) com o auxílio de régua milimetrada, até que o tratamento controle ou outro atingisse a borda da placa, e conidiogênese (conídios/mL) em câmara de Neubauer.

Adotou-se o índice de sensibilidade (IS), proposto por Moino Jr e Alves (1998) para classificar o nível de compatibilidade entre os isolados biológicos e as moléculas químicas. Esse sistema baseia-se em valores médios de porcentagem de conidiogênese ou esporulação e crescimento micelial das colônias dos fungos, realizados em meio de cultura sólido para testes *in vitro*. Para expressá-lo aplicou-se a fórmula:

$$IS = \frac{20 \cdot (Pc) + 80 \cdot (Pe)}{100}$$

Onde,

IS = valor corrigido para classificação do produto;

Pc = porcentagem de crescimento vegetativo relativo à testemunha (3 dias);

Pe = porcentagem de esporulação (conidiogênese) relativa à testemunha (10 dias).

Os valores de IS são classificados pelos seguintes limites:

0 a 30	-----	Muito tóxico
31 a 45	-----	Tóxico
46 a 60	-----	Moderadamente tóxico
> 60	-----	Compatível

O índice considera a produção de conídios como fator mais importante, quando comparado com o crescimento micelial, pois são os propágulos do fungo que serão responsáveis pela colonização de novas áreas.

4.2.4.2 Teste de sensibilidade de *Trichoderma* spp. ao herbicida Glifosato

Para o teste de sensibilidade dos isolados de *Trichoderma* ao herbicida Glifosato adaptou-se a proposta de Silva (2021), cuja exposição do antagonista ao herbicida simula o ocorrente em campo, na qual os produtos são misturados em um tanque, mantidos em agitação e depois pulverizados.

Assim, em um béquer adicionou-se o herbicida glifosato (Roundup Original DI®), usual no manejo de plantas invasoras na cultura da soja, na dose recomendada (Tabela 02) e a suspensão de conídios de cada isolado de *Trichoderma* ($1,0 \times 10^8$), considerando para todos os isolados a recomendação do produto comercial (TA - 5 L ha^{-1} em um volume de calda de 100 L ha^{-1}), sendo ambos diluídos em 100 mL água destilada estéril (volume final).

Tabela 02: Descrição da classe, princípio ativo, concentração e recomendações para aplicação de Roundup Original DI® em soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato, conforme especificações do rótulo do produto

Nome comercial	Classe de ação biológica	Princípios ativos e concentração	Dose p.c. (L ha^{-1})*
Roundup Original DI®	Herbicida não seletivo de ação sistêmica	Sal de Di-amônio de glifosato (445 g/L) Equivalente ácido de glifosato (370 g/L)	2,75

*A indicação do rótulo do produto recomenda que a aplicação seja realizada cerca de 25 dias após emergência, no estágio V3 da soja, com volume de calda de 100 L ha^{-1} .

Após completa homogeneização, 50 mL de cada isolado foram transferidas para erlenmeyers de 100 mL e mantidos em banho de ultrassom por 3 minutos, seguidas de agitação automática constante a 150 rpm por 2 horas em shaker. Ao término do tempo de exposição, uma alíquota de 1 mL foi retirada em eppendorf, homogeneizada em vortex por 1 minuto e levada para centrifugação a 10.000 rpm por 4 minutos para formar um pellet contendo os conídios do fungo.

Após esse procedimento, o sobrenadante foi descartado e o sedimento de conídio foi ressuspensão em 1 mL de água destilada estéril, vortexado e seguido para o plaqueamento em meio BDA já solidificado. Ao centro de cada placa de Petri, foi depositado um disco de papel filtro ($\varnothing 5 \text{ mm}$) e sobre esse foi pipetado $8 \mu\text{L}$ da suspensão de esporos ressuspensos. As placas foram então vedadas com filme plástico e mantidas em BOD a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, por 7 dias. Para os tratamentos controles, não houve a adição da dose do herbicida, tendo apenas os conídios do *Trichoderma* passado pelas mesmas etapas.

As avaliações foram diárias, para as mesmas variáveis conforme descrito no item anterior.

4.2.5 Registro fotográfico das placas de Petri

Todos os registros fotográficos foram realizados por meio do método PRHQ, proposto por Rodrigues et al. (2022).

4.2.6 Análises estatísticas

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

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Isolados biológicos

4.3.1.1 Identificação molecular dos isolados nativos de *Trichoderma* spp.

As sequências obtidas permitiram a classificação taxonômica dos microrganismos identificando-os como quatro isolados pertencentes a espécie *Trichoderma atroviride*.

As sequência de nucleotídeos foram registradas no GenBank[®] (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>), com os números de acesso: TB (SUB13526392 Seq1_Tb OR138044), TF (SUB13526392 Seq2_Tf OR138045), TP (SUB13526392 Seq3_Tp OR138046) e TQ (SUB13526392 Seq4_Tq OR138047).

4.3.2 Antagonismo

4.3.2.1 Pareamento de colônias

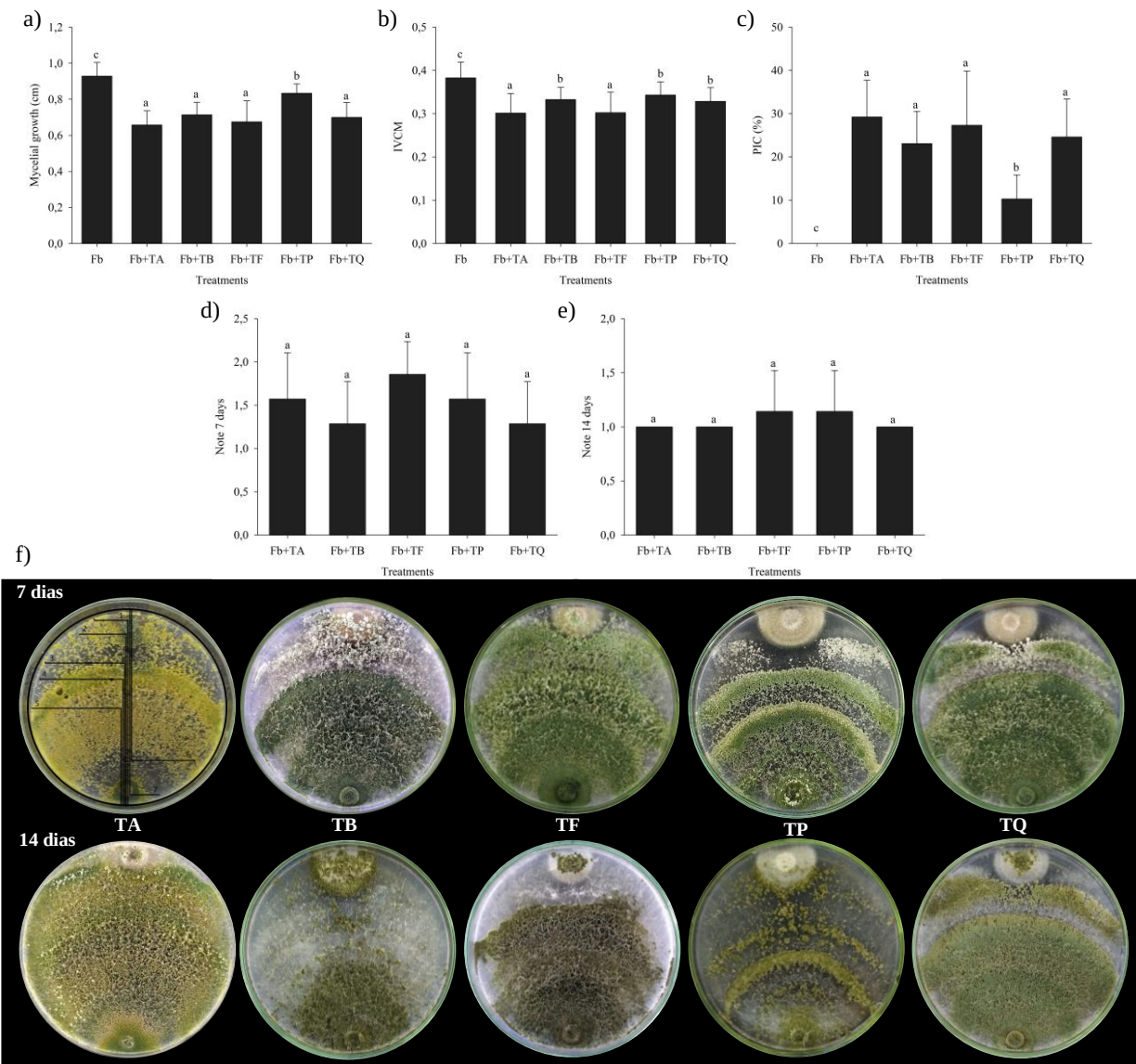
Para as variáveis analisadas no desenvolvimento micelial, como crescimento, índice de velocidade e porcentagem de inibição do crescimento todos os tratamentos com a presença do *Trichoderma* spp. diferiram da testemunha (Fb) e foram eficazes no controle do fitopatógeno, reduzindo em até 30% a taxa de crescimento do mesmo (Figura 6 a-c).

O antagonismo desencadeia uma série de mecanismos de ataque do *Trichoderma* spp. para com o *F. brasiliense*, dentre esses a capacidade competitiva, permitindo explorar e se estabelecer rapidamente no meio de cultivo (Chagas Junior et al., 2016).

Graças a elevada versatilidade metabólica que lhe permite crescer utilizando ampla gama de fontes de carbono e nitrogênio, possuem proteínas de membranas que possibilitam

uma maior absorção de nutrientes, o que afeta diretamente o desenvolvimento do *F. brasiliense* (Monte et al., 2019).

Figura 6 - Desenvolvimento fúngico (a) crescimento micelial, (b) IVCN e (c) PIC de *Fusarium brasiliense* em resposta ao antagonismo no pareamento de colônias com isolados de *Trichoderma* spp.; (d-e) escalas de notas aos 7 e 14 dias e (f) aspectos das colônias durante avaliação do antagonismo por meio da escala de notas proposta por Rodrigues (2010). Barras seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade.



Fonte: Elaboração do próprio autor

Sendo a competição um mecanismo indireto de ação sobre o patógeno, seu sucesso pode estar atrelado a outros processos como a antibiose por meio da liberação de metabólitos

secundários impedindo o avanço da colônia do fitopatógeno, ou estratégias que agem diretamente no confronto como o micoparasitismo.

Tal fato foi evidenciado quando aplicado a proposta de Rodrigues (2010), cuja escala de notas permitiu quantificar o nível do antagonismo promovido pelos diferentes isolados de *Trichoderma* spp. (Fig 6 d-e), não os diferindo estatisticamente, com notas em ambas as avaliações variando entre 1 e 2, onde o antagonista cresceu por toda a placa, sobrepondo, inclusive, o disco do patógeno, principalmente aos 14 dias, visto que três tratamentos detinham nota igual a 1.

Segundo Louzada et al. (2009), considera-se antagônicos todos os isolados de *Trichoderma* testados. Visto que notas inferiores a 3 caracterizam excelente habilidade competitiva antagônica em testes de pareamento de culturas, uma vez que o *Trichoderma* ocuparia mais de 75% da placa.

Para elucidar tamanha capacidade, foi montada uma prancha contendo placas representantes dos tratamentos (Fig 6 f).

O micoparasitismo é o principal mecanismo de ação durante o biocontrole, isso foi revelado pelas imagens da microscopia eletrônica de varredura (Fig 7). O contato físico entre as hifas, desencadeia sinalizações químicas que garantem ainda mais o sucesso no processo de controle, envolvendo uma série de eventos que culminam na morte do fitopatógeno (Benítez et al., 2004).

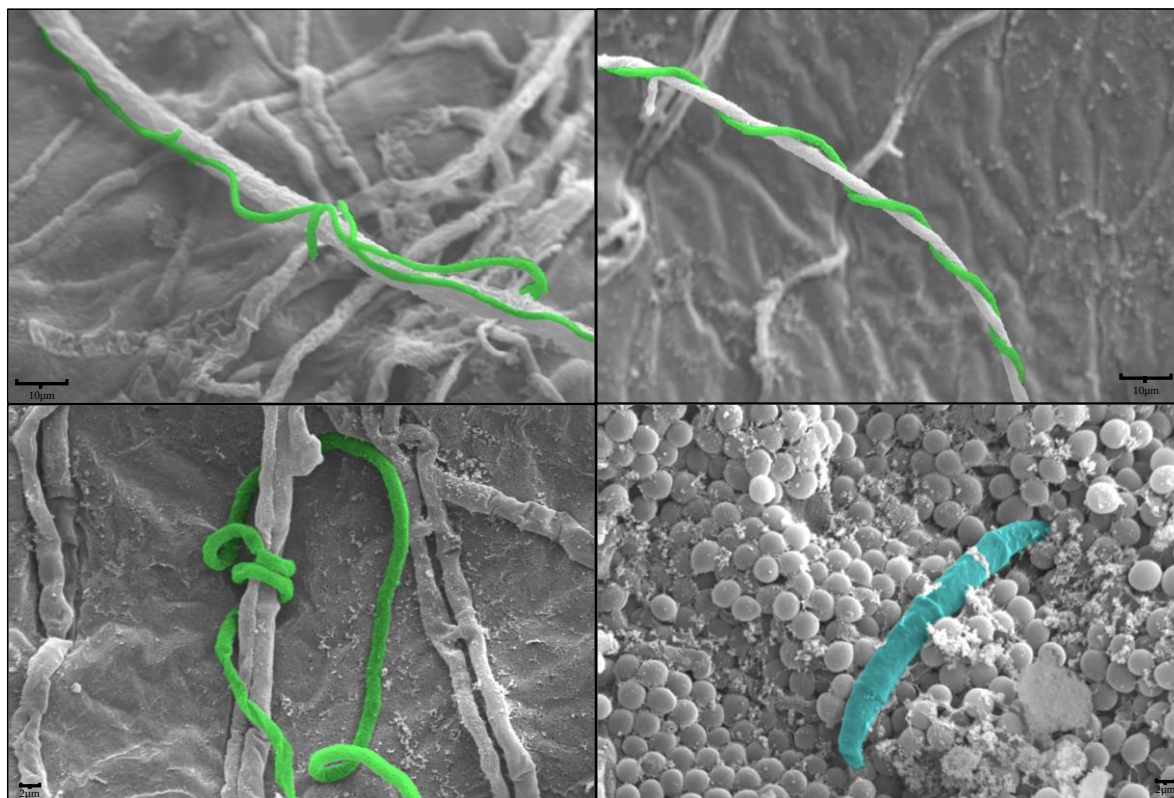
Diversas pesquisas envolvendo a metagenômica e a investigação dos processos relacionados ao micoparasitismo, revelaram elevado arsenal genético responsável pela produção de inúmeros compostos antifúngicos e pela codificação de várias enzimas hidrolíticas, justificando e inferindo ao *Trichoderma* variação no que tange aos mecanismos de biocontrole, intrínsecos a cada cepa (Steyaert et al., 2003; Kubicek et al., 2011; Alfiky; Weisskopf, 2021).

Durante essa interação ocorre orquestrada rede de ações de respostas um ao outro. O *Trichoderma* possui receptores e vias de sinalização intracelular para detecção e integração de sinais liberados pelo fitopatógeno, isso se dá graças a ação de um conjunto de genes presentes em receptores da superfície celular das hifas de *Trichoderma* (Ramada et al. (2019).

Fungos desse gênero, são capazes de detectar e crescer em direção aos fungos hospedeiros em relativas distâncias para suprimir seu desenvolvimento (Harman et al. 2004).

Os genes reconhecem oligocitosacarídeos e oligopeptídeos do fungo-presa liberando enzimas que degradam a parede celular desencadeando toda a ação do micoparasitismo como enrolar, penetrar e destruir o conteúdo citoplasmático (Seidl et al.; 2009; Druzhinina et al.; 2011; Druzhinina et al., 2018).

Figura 7 - Micoparasitismo de *Trichoderma atroviride* (ênfase nas hifas em destaque verde) em pareamento com *Fusarium brasiliense* (conídio em destaque azul) por meio de imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), os destaques foram coloridos com Photoshop



Fonte: Elaboração do próprio autor

4.3.3 Compostos Orgânicos Voláteis - COV's

Além do antagonismo direto o *Trichoderma* também secretou compostos orgânicos voláteis, que graças ao seu baixo peso molecular e não afinidade com a água, são altamente voláteis em temperatura ambiente (Guo et al., 2019), e exercem elevada atividade antifúngica, fato comprovado nesse experimento pelos testes de compartilhamento de atmosfera em placas invertidas (Fig 8).

Os isolados de *Trichoderma* spp. não diferiram entre si em nenhuma das variáveis analisadas. Para largura de hifas, comprimento de conídios e produção de conídios todos tratamentos foram semelhantes. Houve diferença estatística dos isolados de *Trichoderma* spp. com a testemunha para a variável crescimento micelial, com uma redução de 0,98 cm no tamanho das colônias do *F. brasiliense* (Fig 8 a-d).

A porcentagem de germinação dos conídios da testemunha diferiu dos demais tratamentos (Fig 8 e), chegando ao ponto de impedir a germinação dos conídios de *F. brasiliense*

quando na presença dos isolados de *Trichoderma* TP e TQ, a figura 8-f evidencia a eficiência dos compostos orgânicos voláteis (COV's) de cada cepa testada.

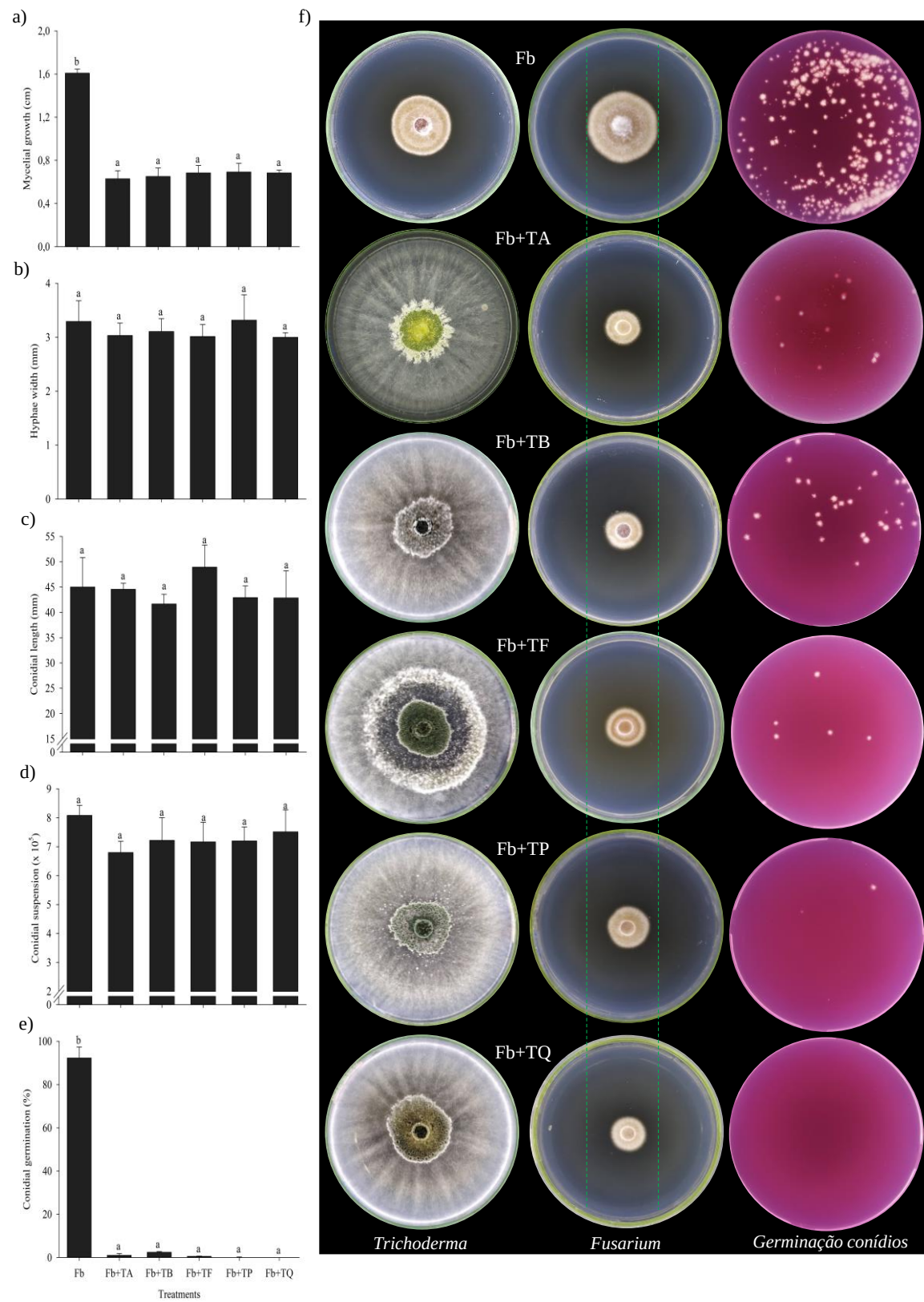
Mesmo havendo a produção dos conídios pela colônia de *F. brasiliense*, sua capacidade germinativa foi comprometida pela exposição aos COV's, uma excelente estratégia de ação quando se pensa no manejo desse importante fitopatógeno radicular, pois poderia reduzir a taxa de sobrevivência deste no ambiente rizosférico.

Não se observou, em microscopia, a presença de clamidósporos nas colônias de *F. brasiliense* que estiveram expostas aos compostos orgânicos voláteis, isso infere aos COV's ação direta sobre um dos principais mecanismos de sobrevivência do fitopatógeno, que possibilitaria nova infecção no ciclo da cultura em implantações futuras.

Silva (2021), constatou a inativação germinativa de escleródios de *S. sclerotiorum* após exposição aos compostos orgânicos voláteis liberados por *Trichoderma azevedoi* CEN1241.

Cepas de *Trichoderma* spp. são grandes produtoras de compostos orgânicos voláteis, há cerca de 480 COV's, com diferentes atividades antibióticas, e tem papel significativo na comunicação entre as espécies interativas da rizosfera, e graças a sua volatilidade e difusividade através dos espaços porosos, são ótimas moléculas de sinalização abaixo e acima do solo (Contreras-Cornejo et al. 2014; Siddiquee 2014).

Figura 8 - Influência dos compostos orgânicos voláteis (COV's) produzidos por isolados de *Trichoderma* spp. sobre o desenvolvimento (a) crescimento micelial, (b) largura de hifas, (c) comprimento, (d) produção e (e) porcentagem de germinação de conídios de *F. brasiliense*; (f) prancha evidenciando o diâmetro das colônias de *F. brasiliense*, sob atmosfera compartilhada com COV's de isolados de *Trichoderma* spp. após 7 dias de incubação em meio BDA; placas com meio Martin (rosa) revelando a germinação dos conídios oriundos das colônias de *F. brasiliense*. Barras seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade



Fonte: Elaboração do próprio autor

4.3.4 Atividades bioquímicas

Habilidades como a produção de enzimas que são capazes de degradar a parede celular (como quitinases, glucanases, proteases entre outras), tornam o *Trichoderma* um exímio antagonista (Harman et al., 2004).

4.3.4.1 Atividade Quitinolítica e Celulolítica

Os testes em laboratório mostraram potencialidades na atividade quitinolítica dos isolados de todos os *Trichoderma* spp. presentes no ensaio (Fig 9 a).

Dentre as cepas, os isolados TB, TF e TQ tiveram comportamento semelhante e não diferiram entre si, apresentando halos acima de 6,5 cm, todos superiores ao isolado comercial TA. O isolado TP revelou baixa atividade quitinolítica com menor média diametral (4,3 cm).

O meio sólido na placa permite a difusão da enzima de forma semiquantitativa, sensível, fácil, reproduzível e econômica, possibilitando determinar a atividade da quitinase por meio da formação de halos e alteração da coloração do meio de amarelo para laranja/vermelho (Agrawal; Kotasthane, 2012) (Fig 9 c).

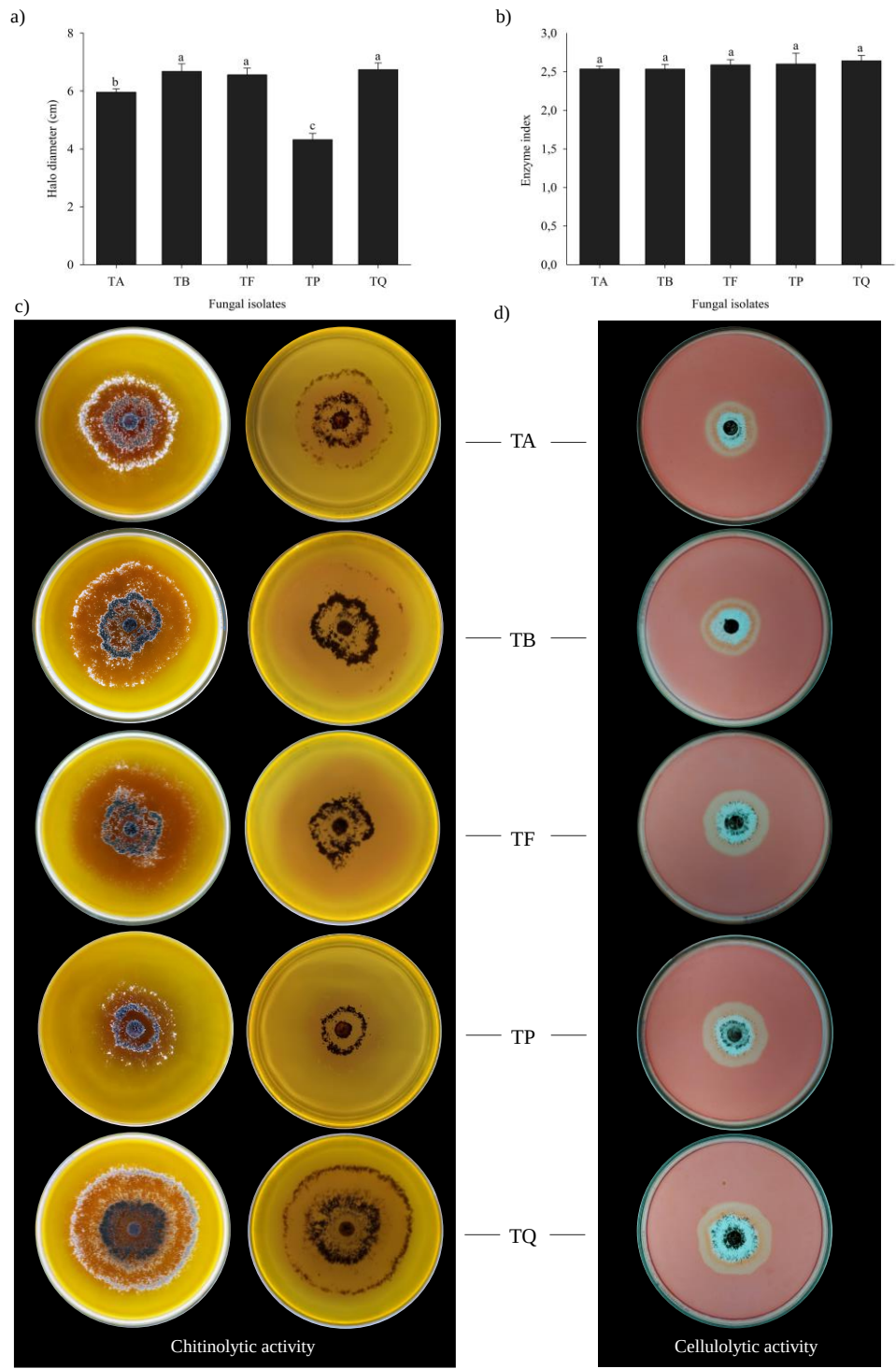
A quitinase se classifica em diferentes grupos e desempenha múltiplas funções na autólise de hifas, degradação da parede celular, aquisição de nutrientes, atuando principalmente no processo antagônico do micoparasitismo a fitopatógenos, ou ataque a insetos e nematoides (Seidl 2008), melhorando consideravelmente o processo micoparasitário, visto que nas paredes celulares das hifas dos fungos há mais de 20% de quitina em sua composição (Ruiz-Herrera, 1991).

Todos os isolados de *Trichoderma* expressaram atividade celulolítica, não diferindo entre si, conforme os valores do índice enzimático (Fig 9 b). A degradação da carboximetilcelulose em meio CMC revelou ação da celulase (Fig 9 d).

Organismos com tal potencialidade, atuam sobre inúmeros substratos ou materiais celulósicos, promovendo sua quebra. Consequentemente, a liberação de açúcares é considerada excelente biocatalizador, uma vez que dentre esses açúcares a glicose desperta grande interesse industrial, especialmente pela possibilidade de conversão em etanol. Cepas do gênero *Trichoderma* são amplamente utilizadas na indústria canavieira, de papel e celulose (Castro et al., 2010).

Figura 9 - *Screening* de isolados de *Trichoderma* spp. para verificação da atividade quitinolítica (a) (diâmetro do halo) e celulolítica (b) (índice enzimático) em meio suplementado com quitina coloidal e meio CMC, respectivamente; Aspectos das colônias de

Trichoderma spp. em placas de Petri (frente e verso) contendo meio sólido de quitina coloidal (c) para verificação da atividade de quitinase (diâmetro do halo); Aspectos das colônias de *Trichoderma* spp. em placas de Petri contendo meio sólido CMC (carboximetilcelulose) para determinação da atividade enzimática de celulase (d), após inundação salina e revelação em vermelho congo. Barras seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade



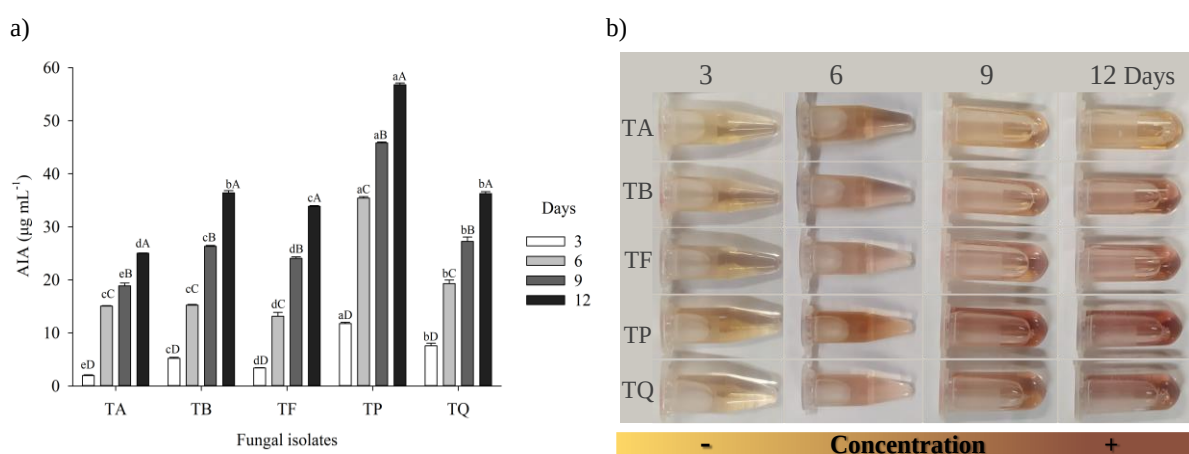
Fonte: Elaboração do próprio autor

4.3.4.2 Produção de ácido indol acético (AIA)

Na bioprospecção de cepas nativas de *Trichoderma* para produção de ácido indol acético (AIA), todos os isolados testados foram capazes de sintetizar AIA, a partir do precursor L-triptofano adicionado ao meio de cultivo caldo batata-dextrose (Fig 10 a).

Ao longo das avaliações (3, 6, 9 e 12 dias) as concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de AIA foram aumentando, comportamento comum a todos os isolados (Fig 10 a-b), com saltos expressivos a partir das primeiras 72h, isso porque nos primeiros dias o microrganismo procura se estabelecer e colonizar o meio que está sob agitação orbital.

Figura 10 - Produção de AIA por isolados de *Trichoderma* spp. em meio BD+L-Triptofano ao longo do tempo (a); Reação de leitura de acordo com isolado fúngico ao longo dos dias, a coloração “rosa” indica a produção de AIA pelo isolado, seja em maior ou menor concentração (b). Barras seguidas de mesma letra, maiúscula dentro do tratamento e minúscula entre os tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade



Fonte: Elaboração do próprio autor

Um destaque entre os isolados, em todas as avaliações foi o TP, cujas concentrações sempre foram superiores aos demais, com aumento dez vezes maior na primeira avaliação, em comparação ao isolado TA (comercial) cujas concentrações foram inferiores.

Aos 12 dias a menor concentração de AIA foi entorno de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a maior $56,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ atribuídas aos isolados TA e TP, respectivamente. Seguidos dos isolados TB e TQ, cujas médias não diferiram entre si, sucedido do TF, que ainda foi superior ao comercial TA.

A capacidade de sintetizar AIA pode ser maior ou menor em cada isolado, pois cepas nativas ou comerciais apresentam características intrínsecas da própria espécie. Nesse estudo,

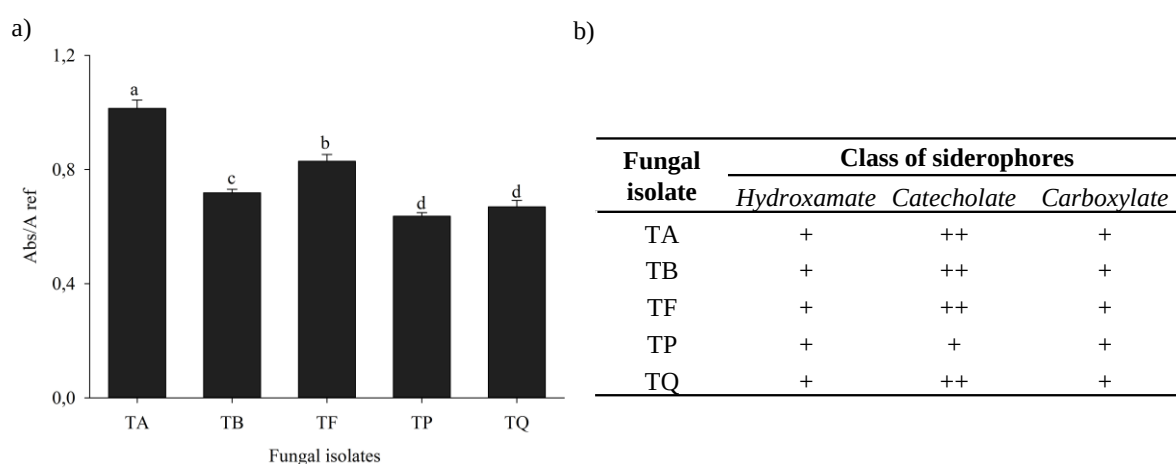
todas cepas apresentaram concentrações elevadas e potencialmente expressivas para o desenvolvimento do vegetal. Exsudados radiculares são fontes naturais de L-triptofano para a microbiota do solo contribuindo para a síntese auxinas na rizosfera (Ribas, 2014; Oliveira et al., 2012).

A maior exsudação de AIA na rizosfera pode promover maior crescimento radicular. Isso permite que o sistema radicular das plantas maior zona de absorção de água e nutrientes, consequentemente maior crescimento vegetal como observado em tomate (França et al., 2017), pepino (Zhang et al., 2013), cambara (Machado et al., 2015) e feijão-caupi (Chagas et al., 2017), além de aumentar a nodulação e fixação de N em plantas leguminosas como soja e caupi (Jaiswal et al., 2021).

4.3.4.3 Sideróforos

Todos os isolados de *Trichoderma* mostraram algum nível de produção de sideróforos, a cepa comercial TA foi superior as demais, cuja absorbância relativa foi de 1,01, seguido do isolado TF (0,82), as cepas TP e TQ não diferiram entre si e foram inferiores com valores de abaixo de 0,66 (Fig 11 a).

Figura 11 - Absorção relativa de e classes de sideróforos produzidos por isolados de *Trichoderma* spp. em meio líquido Grimm-Allen após 15 dias de incubação (a); Tipificação dos principais sideróforos presentes (+) nas amostras de *Trichoderma* (b). Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5 % de probabilidade



Fonte: Elaboração do próprio autor

Segundo Neilands (1995), os sideróforos são produzidos por *Trichoderma* devido às limitações de ferro no substrato de cultivo. Os sideróforos são capazes de quelar o Fe^{+3} , ou seja,

o ferro quelatizado atravessa a membrana da hifa do fungo e no citoplasma sofre redução a Fe^{2+} e o sideróforo retorna ao meio extracelular, onde pode se ligar novamente ao Fe^{3+} . Isso ocorre porque o Fe^{3+} tem baixa biodisponibilidade por reagir ao oxigênio transformando-se em hidróxidos férricos (Anke et al., 1991; Renshaw et al., 2002).

Algumas espécies fitopatogênicas como *Fusarium*, *Aspergillus* e *Ustilago* também desenvolveram essa capacidade de produzir sideróforos, uma vez que utilizam ferro para seu desenvolvimento. Os íons ferro servem como cofator para várias classes de enzimas e desempenham um papel fundamental como nutriente para o crescimento e desenvolvimento das plantas e microrganismos (Sood et al., 2020). Além de ser importante nutriente no processo de fixação biológica do nitrogênio, atuando como cofator da leghemoglobina e da enzima nitrogenase (Bonilla e Bolaños, 2010; Paudyal et al., 2007; Nakei et al., 2022)

Diferentes sideróforos são descritos na literatura, dentre eles coprógeno, coprógeno B, fusarinina C (fusígeno) e ferricrocina. Em geral são classificados em hidroxamatos, catecolatos e carboxilatos (Neilands, 1995).

Nesse estudo, uma tabela contendo a identificação desses grupos produzidos pelas cepas de *Trichoderma* foi elaborada (Fig 11 b), onde (+) indica baixa produção de hidroximato, catecolato e carboxilato de sideróforos; (++) sinal indica média quantidade de produção, (+++) significa alta produção desses grupos de sideróforos, considerando que (–) indica que não há produção desses grupos de sideróforos.

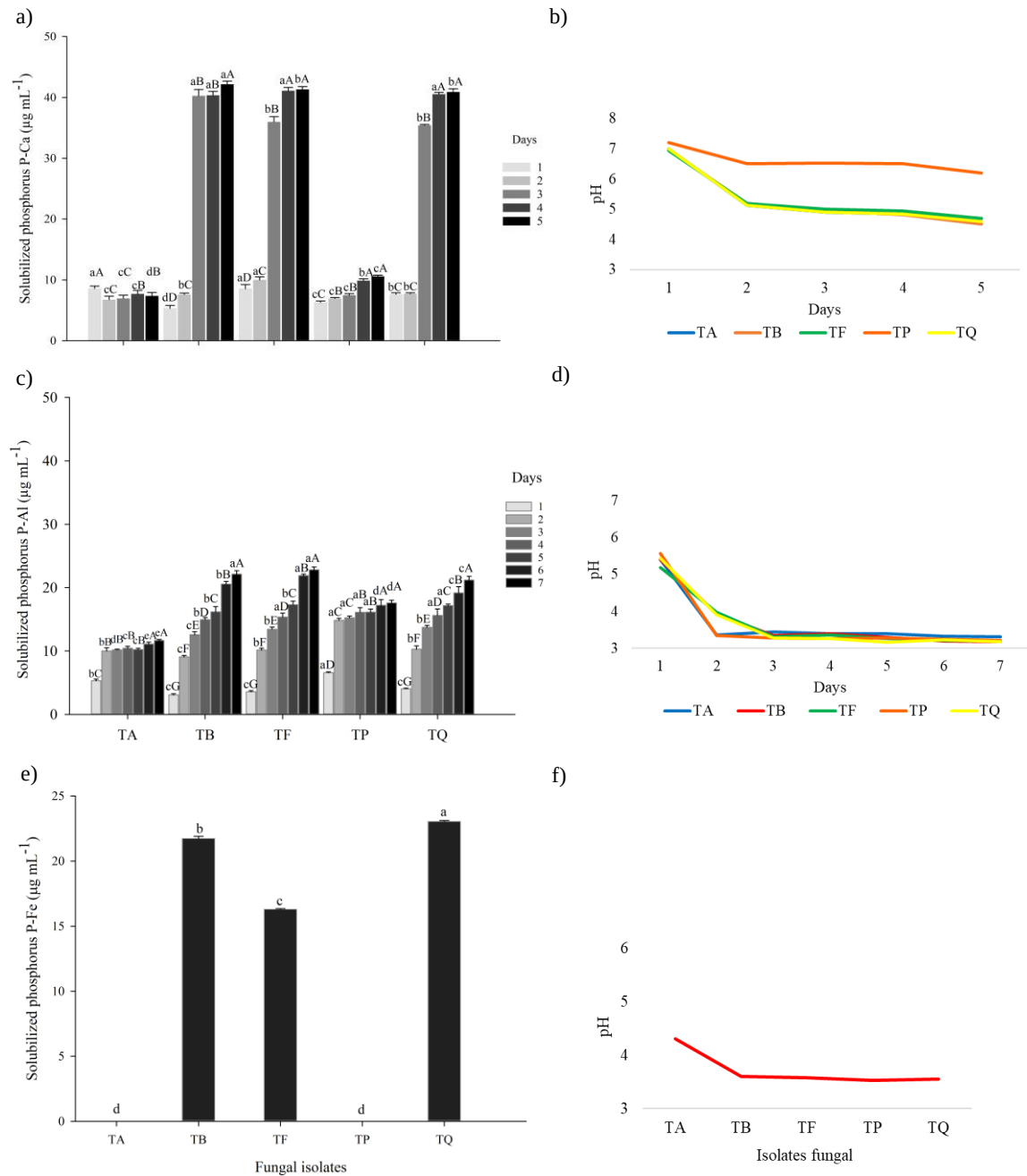
4.3.4.4 Solubilização de fósforo

Todos os isolados foram capazes de solubilizar o fósforo indisponibilizado no meio NBRIP com fosfato de tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), as avaliações diárias por cinco dias permitiram afirmar que há incremento gradativo dos níveis de P livre no meio, com picos expressivos a partir do terceiro dia, e máxima solubilidade ao quinto dia de avaliação (Fig 12 a).

As cepas dos isolados TB, TF e TQ, se mostraram mais eficientes na liberação do fósforo, com médias de P acima de $40,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, quando comparado aos isolados TP e TA com médias de P inferiores a $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, mesmo na última avaliação.

A solubilidade do fosfato de alumínio (AlPO_4) foi realizada por todos os isolados de *Trichoderma* com um comportamento muito semelhante ao observado na solubilidade do fosfato de cálcio, sendo crescente ao longo dos dias, neste caso estendendo-se até o 7º dia (pico máximo de solubilidade), no entanto, os valores foram cerca de 50% menores em relação ao P-Ca (Fig 12 c).

Figura 12 - Solubilização de P ($\mu\text{g mL}^{-1}$) por isolados de *Trichoderma* spp. a partir de fosfato tricálcico e fosfato de alumínio ao longo do tempo (a,c) e fosfato de ferro após 11 dias de incubação (e); leituras de pH de cada isolado de *Trichoderma* spp. no processo de solubilização de fosforo em meio NBRIP (b-d) e MS (f) ao longo das avaliações. Barras seguidas de mesma letra, maiúscula dentro do isolado e minúscula entre os isolados, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade



Fonte: Elaboração do próprio autor

No meio MS contendo fosfato férrico (FePO_4), a solubilização do P teve reduções com média máxima de $23 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o isolado TQ, seguido do isolado TB e TF ($21,7$ e $16,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Os isolados TA e TP, não foram capazes de solubilizar o fósforo adsorvido ao ferro após os 11 dias de incubação (Fig 12 e).

A solubilidade dos fosfatos é muito baixa e decresce na seguinte ordem: fosfato de cálcio (P-Ca) > fosfato de alumínio (P-Al) > fosfato de ferro (P-Fe), a maioria dos fungos filamentosos, como *Trichoderma*, são capazes de solubilizar fosfatos de cálcio, mas poucos são capazes de solubilizar fosfatos de alumínio e ferro (Barroso; Nahas, 2008).

Moreira e Siqueira (2006) descreveram transformações químicas dos nutrientes, e revelam que em solos cultivados do cerrado, cujas doses de recomendação geralmente variam de 50 a 150 kg ha^{-1} de fósforo por ano. A maior parte do P fica indisponível, fixado a minerais de argila, ao cálcio (5 a 10%) ou óxidos de Fe (30%) e Al (40%).

Cepas de *Trichoderma* com potencial de disponibilizar nutrientes essenciais as plantas podem reduzir os custos com adubações aumentando sua eficiência quando se utiliza em conjunto (Bononi et al., 2020), em especial o fósforo pela elevada atratividade química e baixa disponibilidade assimilativa nos solos.

Nahas (2007) descreve que a solubilização depende do microrganismo, do tipo de fosfato a ser solubilizado, da acidez e da natureza dos materiais orgânicos produzidos, e geralmente a solubilização promovida por muitos fungos está relacionada à redução do pH e/ou à produção de ácidos orgânicos.

A redução do pH nos meios de cultura a partir do crescimento dos isolados de *Trichoderma* foi observada neste estudo. Os valores de pH tenderam a diminuir ao longo das avaliações.

O meio NBRIP contendo P-Ca (sem inoculação) tinha o pH inicial médio de 7,0 e ao término (5 dias) os valores chegaram a 4,7 (TA), 4,5 (TB), 4,7 (TF), 6,2 (TP) e 4,6 (TQ) (Fig 12 b). para meio NBRIP contendo P-Al o pH inicial do meio por volta de 5,5 com redução média mínima até 3,1 (Fig 12 d). O mesmo ocorreu com meio MS (P-Fe), cujo pH inicial do meio ficou entorno de 5,4 e sofreu reduções para 4,31 (TA), 3,60 (TB), 3,58 (TF), 3,53 (TP) e 3,55 (TQ) após 11 dias de incubação (Fig 12 f).

A capacidade de solubilidade do P está relacionada a produção de enzimas denominadas fosfatases, que mediante os resultados são possivelmente ácidas. O pH do meio é reduzido possivelmente pela liberação de ácidos orgânicos durante o processo de solubilização. Bononi et al. (2020) trabalhando com cepas de *Trichoderma* na solubilização do P, identificaram a

produção de ácido glucônico, ácido lático, ácido fumárico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido d-isocítrico, ácido fítico e ácido d-málico.

Esses ácidos juntamente com seus prótons associados, atuam diretamente sobre o material fosfatado dissolvendo-o ou quelando os cátions (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+3} , Al^{+3} , Mn^{+2} e Zn^{+2}) que acompanham o ânion fosfato, liberando-o para o solo (Richardson et al., 2011).

A redução do pH e o aumento da solubilização de P podem influenciar no aumento da biomassa das raízes laterais, fato que aumentaria a zona pelífera, a interceptação radicular e consequentemente maior absorção do P pelas plantas (Naik et al., 2013; Bononi et al., 2020).

4.3.4.5 Solubilização de potássio

O teste indicativo para solubilização de potássio (K) em meio sólido ágar PVK – MOD demonstrou grande potencial na possível liberação do K, ocorrida de forma gradativa e crescente ao longo dos dias de avaliação (Fig 13 a).

A zona de solubilidade revelada pela alteração da cor do meio de cultura (azul para amarelo) indicou a produção de ácidos orgânicos pelos isolados de *Trichoderma*, visto que o corante acrescido ao meio revela alterações do pH na faixa de 3,7 a 5,5. Possivelmente esses ácidos foram os principais responsáveis pela disponibilidade de K ao meio, com destaque para as cepas TA e TP seguidas de TB, TQ e TF, cujas zonas médias do quinto dia foram 5,42, 4,65, 3,25, 3,17 e 1,82 cm, respectivamente (Fig 13 b).

Meena et al. (2016) compilaram inúmeros trabalhos com microrganismos solubilizadores de K, visando uma agricultura racional e moderna. Inúmeras bactérias são amplamente exploradas e menor quantidade de fungos, com destaque para os pertencentes ao filo Ascomycota, como diversas espécies do gênero *Aspergillus*.

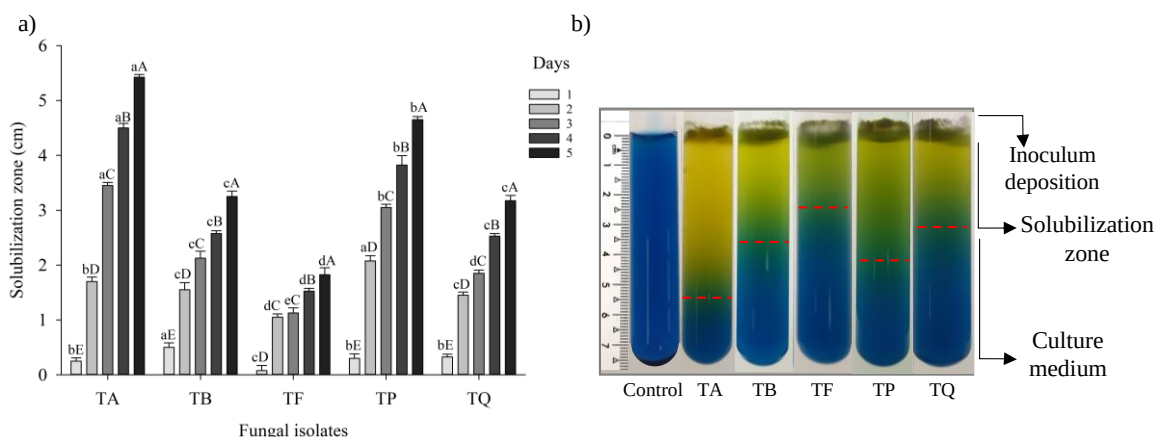
Os mecanismos de solubilização de K por microrganismos ainda não estão totalmente esclarecidos, o ponto comum a todos é a liberação de prótons e produção de ácidos orgânicos, especialmente, ácido oxálico, tartárico, glucônico, 2-ketoglucônico, cítrico, málico, cítrico, málico e succínico, logo, há redução do pH e aumento da solubilidade do K (Prajapati et al., 2012).

Proporcionando melhor desenvolvimento da planta e maiores produções, esses biossolubilizadores podem ser associados a rochas naturais ainda pouco exploradas, de baixa reatividade ou de grande potencial no fornecimento do K (Silva et al., 2015).

Atualmente os sistemas de produção utilizam o cloreto de potássio como principal fonte do elemento, porém, mais de 95% do potássio consumido no Brasil é importado, e sofre com as variações do mercado externo (Teixeira, 2023).

Figura 13 - Solubilização de potássio (K) por isolados de *Trichoderma* spp. ao longo do tempo (a), evidenciado pela zona de solubilização (cm) em tubos de ensaio (b) com meio PVK – Mod., a alteração da coloração azul do meio para amarelo, indica a solubilização do K.

Barras seguidas de mesma letra, maiúscula dentro do tratamento e minúscula entre os tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade



Fonte: Elaboração do próprio autor

Isso justifica a preocupação em se explorar outras fontes nutricionais fornecedoras de K, bem como a descoberta de cepas microbiológicas com capacidade de solubilizar elementos que possam estar fortemente adsorvidos ao solo ou disponibilizá-los a partir de outras fontes menos salinas como o cloreto de potássio.

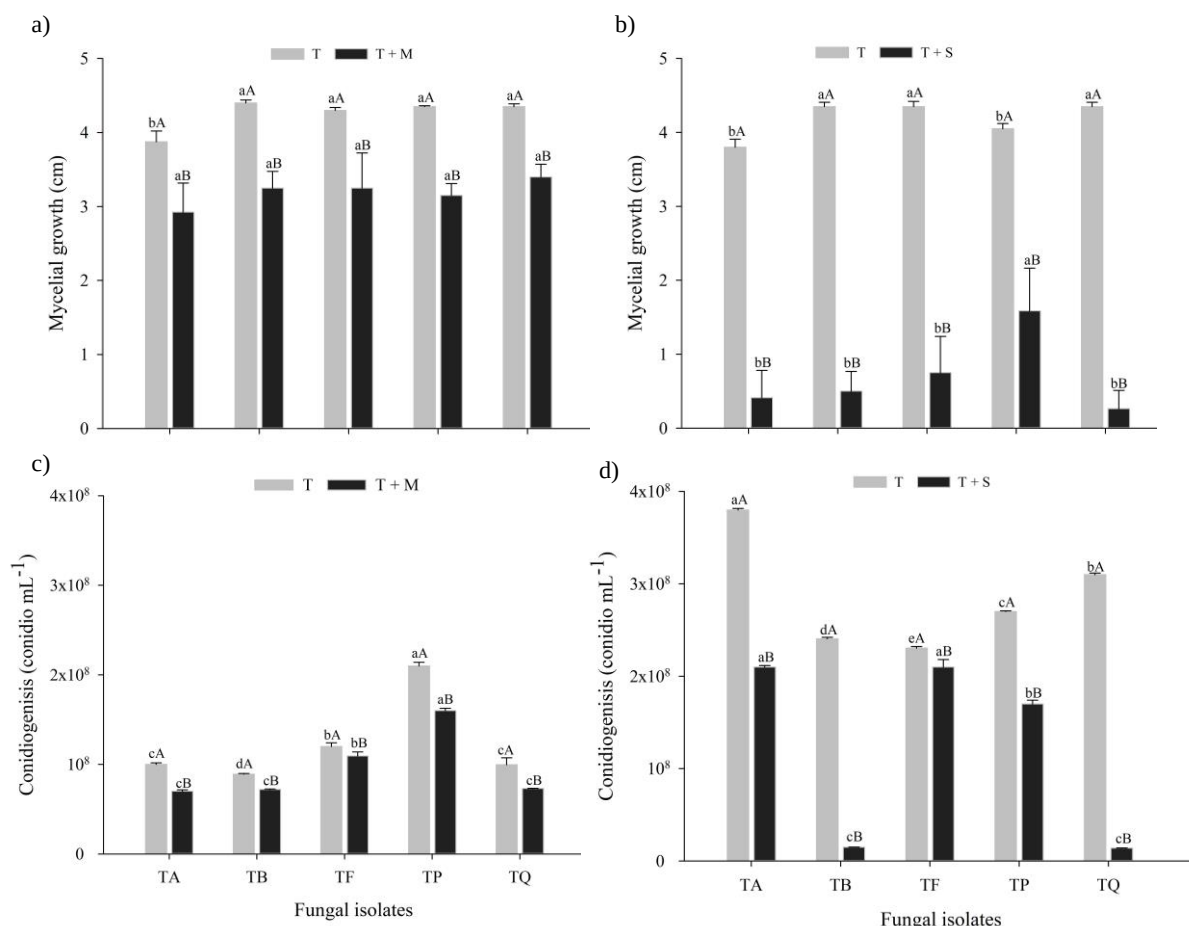
4.3.5 Compatibilidade com moléculas químicas

4.3.5.1 Compatibilidade no Tratamento de sementes - Fungicidas

As moléculas químicas presentes em ambos os produtos testados e indicados para o tratamento de sementes (Ts) de soja, exerceram efeito fungistático em todos os isolados de *Trichoderma* spp., reduzindo seu crescimento micelial (Fig 14 a-b) e consequentemente sua conidiogênese (Fig 14 d-e).

Notou-se efeito mais severo pelos princípios ativos piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil (Standak Top®) em relação ao metalaxil-M + fludioxonil (Maxim XL®), com reduções médias do crescimento micelial de todos os isolados em torno de 83% e 25%, respectivamente.

Figura 14 - Influência do tratamento de sementes com fungicidas Maxim XL[®] (a-c) e Standak Top[®] (b-d) no crescimento micelial e conidiogênese de isolados de *Trichoderma* spp. Barras escuras indicam tratamentos em que soluções de *Trichoderma* spp. sobrepuseram os fungicidas (T+M para Maxim, T+S para Standak Top). Barras seguidas de mesma letra, minúsculas entre os isolados e maiúscula entre os tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade



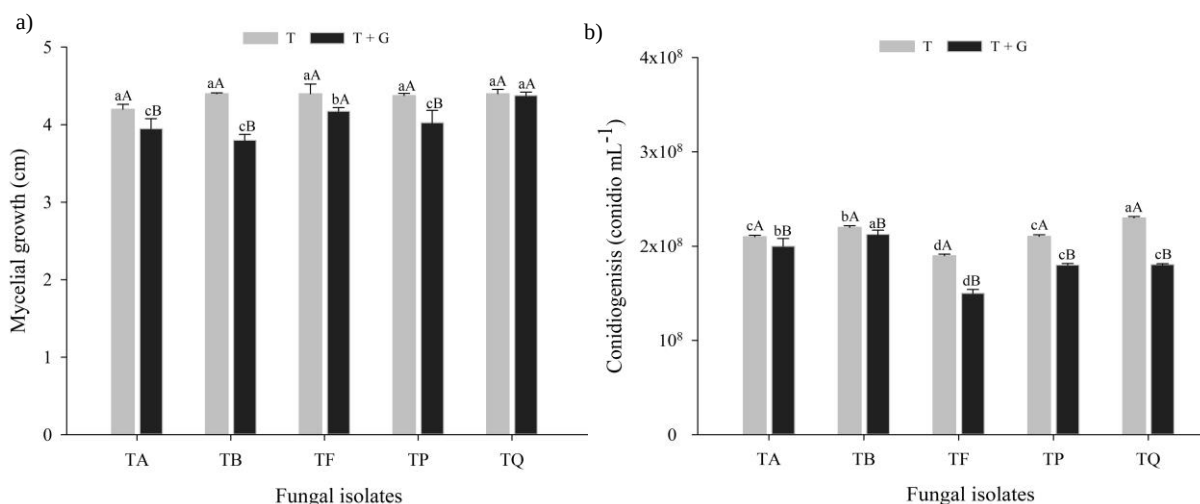
Fonte: Elaboração do próprio autor

Observando a média geral da taxa de conidiogênese nos isolados de *Trichoderma* spp. notou-se que o Standak Top[®] reduziu 34% a mais em comparação ao Maxim XL[®], uma possível explicação seria que de acordo com o rótulo, o produto possui composição de dois fungicidas do grupo das estrobilurinas e dos benzimidazóis e um inseticida do grupo pirazol, cuja finalidade é proteger as sementes e plântulas no início do desenvolvimento contra o ataque de pragas e fungos.

4.3.5.2 Compatibilidade com Herbicida – Teste de Tanque

Para o equivalente ácido de glifosato (Roundup Original DI®), as reduções foram menores em comparação as demais moléculas químicas, com inibição média geral do crescimento micelial dos isolados de *Trichoderma* spp. em 6,4% e 13% para conidiogênese (Fig 15 a-b). Sendo essa molécula de ação herbicida é compreensível sua baixa interferência (fungistática ou fungicida) sobre os isolados testados neste experimento.

Figura 15 - Sensibilidade de isolados de *Trichoderma* spp. no crescimento micelial e conidiogênese após simulação de mistura em tanque juntamente ao herbicida Roundup Original DI® (a-b). Barras escuras indicam tratamentos com soluções de *Trichoderma* em mistura com herbicida (T+G para o glifosato). Barras seguidas de mesma letra, minúsculas entre os isolados e maiúscula entre os tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade

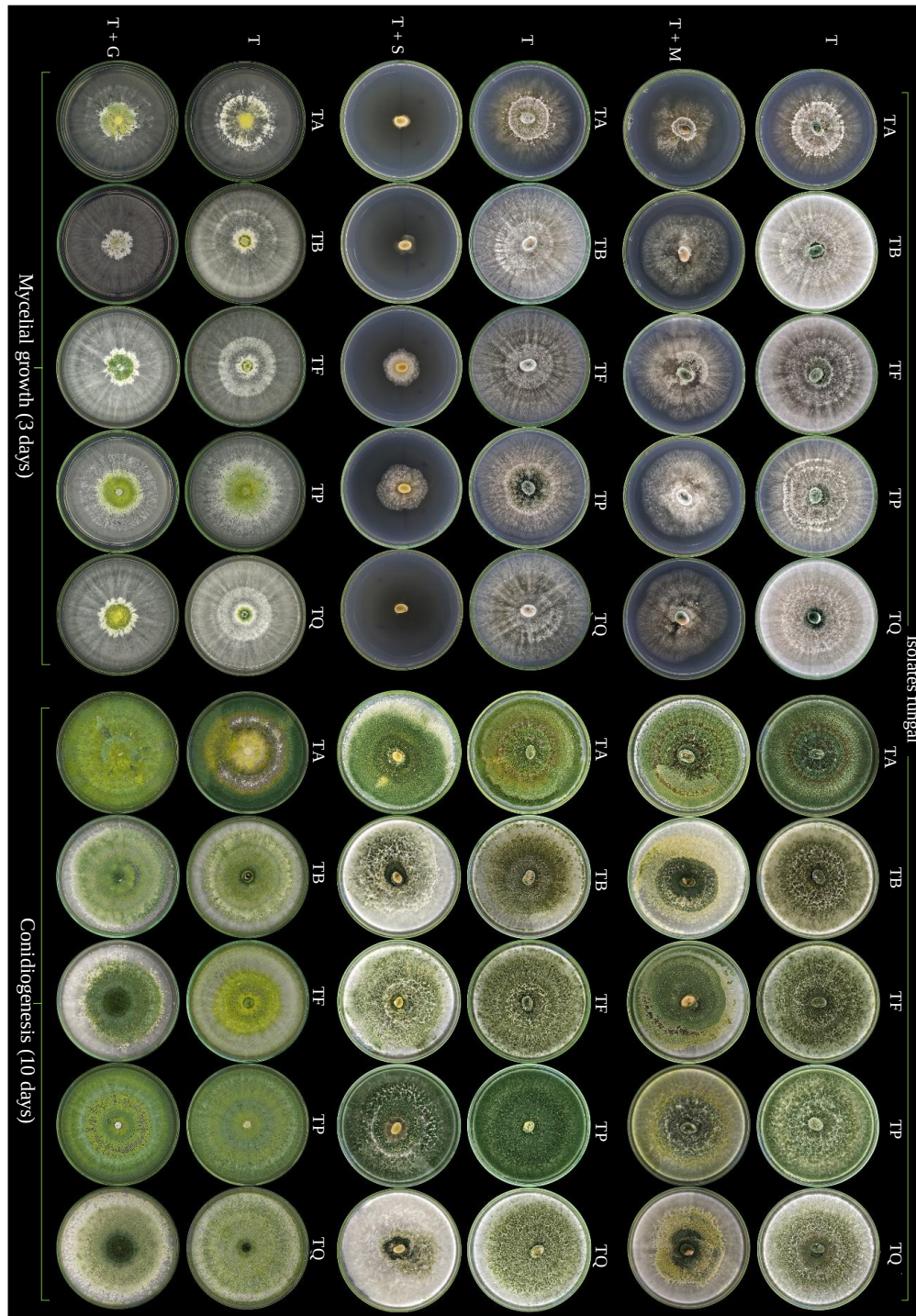


Fonte: Elaboração do próprio autor

O desenvolvimento fúngico de cada isolado (sem e com associação as moléculas químicas) foi registrado a fim de caracterizar o comportamento na fase micelial (3 dias após incubação) e reprodutiva (10 dias após incubação), observou-se fatos curiosos como o não crescimento do *Trichoderma* spp. sobre o tegumento de sementes tratadas com piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil, enquanto que para as demais moléculas o crescimento sobre o tegumento foi semelhante aos tratamentos controles (Fig 16).

Os métodos adotados permitiram gerar dados confiáveis para investigação da sensibilidade dos isolados de *Trichoderma* spp., *in vitro*, às principais moléculas químicas usadas nos sistemas de produção da cultura.

Figura 16 - Aspectos morfológicos do desenvolvimento (crescimento micelial e conidiogênese) de isolados de *Trichoderma* spp. submetidos ao tratamento de sementes subsequente aos fungicidas Maxim XL[®] e Standak Top[®], indicado como T = controle e T+M ou T+S = presença do respectivo fungicida. Comportamento dos isolados de *Trichoderma* spp. após simulação de mistura da suspensão de conídios em tanque juntamente com herbicida glifosato, indicado como T = controle e T+G a mistura com herbicida



Fonte: Elaboração do próprio autor

Os percentuais de inibição das taxas de crescimento micelial e produção de conídios, permitiram classificar o grau de compatibilidade por meio do índice de sensibilidade (Tabela 03), atribuindo a este uma maior representatividade e importância para testes dessa natureza.

Tabela 03 - Classificação do índice de sensibilidade dos isolados de *Trichoderma* spp. na presença cada produto

Commercial product	Fungal isolate					Classification
	TA	TB	TF	TP	TQ	
Maxim XL [®]	Compatible					
Standak Top [®]	Moderately toxic	Very toxic	Compatible	Moderately toxic	Very toxic	
Roundup DI [®]	Compatible					

Fonte: Elaboração do próprio autor

Neste estudo, moléculas de piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil apresentaram efeito tóxico à quatro dos cinco isolados testados, com categorias de muito tóxico para os isolados TB e TQ a moderadamente tóxico para os isolados TA e TP, as demais moléculas testadas foram compatíveis a todos os isolados.

Ressalta-se que o índice considera a produção de conídios como fator mais relevante, quando comparado com o crescimento micelial, pois os propágulos do fungo serão responsáveis pela colonização de novas áreas, logo, pensando em manter ou reativar o microbioma do solo o índice seria de grande valia nas tomadas de decisão.

Evidenciou-se que isolados pertencentes a mesma espécie (*T. atroviride*) responderam diferentemente aos fungicidas, ora sendo tolerante ora mais sensível, muito ainda pode estar associado não somente a molécula, mas sim a tecnologia empregada na formulação do produto. Fato que fortalece ainda mais o intuito investigativo da bioprospecção nos estudos de compatibilidade química e biológica, indicando em alguns casos aplicações em momentos ou locais distintos (ex.: sulco, jato direcionado, linha de adubo, estágio fenológico e outros).

4.4 CONCLUSÃO

Os isolados nativos de *Trichoderma*, foram identificados como pertencentes a espécie *T. atroviride*.

Todos os isolados revelaram mecanismos de ação antagônicos e eficientes como competição e micoparasitismo ao *Fusarium brasiliense* e apresentaram uma série de atividades

bioquímicas de interesse agrícola, que permitiram caracterizar as peculiaridades de cada um dos isolados testados, com destaque ao isolado TQ.

O isolado TF foi compatível aos fungicidas e ao herbicida. Não é possível atribuir generalidades ao gênero, visto que quatro dos isolados estudados pertencem a mesma espécie e se comportam diferentemente.

Agradecimentos

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

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of insecticide. **Journal of Economic Entomology**, Cary, v.18, n.2, p.265-267, 1925.
- AGRAWAL, T., KOTASTHANE, A. S. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. **Springer Plus**, Heidelberg, v.1, p.1-10, 2012.
- AL-ANI, L. K. T. Bioactive secondary metabolites of *Trichoderma* spp. for efficient management of phytopathogens. In: SINGH, H. B., KESWANI, C., REDDY, M. S., SANSINENA, E., GARCÍA-ESTRADA, C. (Eds.) Secondary metabolites of Plant growth promoting rhizomicroorganisms. **Springer**, Singapura, p.125–143, 2019.
- ALFIKY, A., WEISSKOPF, L. Deciphering *Trichoderma*–Plant–Pathogen Interactions for Better Development of Biocontrol Applications. **Journal of Fungi**, Basel, v.7, n.1, p.61, 2021.
- ALVES, E. **Curso introdutório à microscopia eletrônica de varredura**. UFLA/FAEPE, Lavras, Brasil, 2005.
- AMES, B.N. Assay of inorganic phosphate, total phosphate, and phosphatases. In: Methods in enzymology. **Academic Press**, Estados Unidos, v.8, p.115-118, 1966.
- ANKE, H., KINN, J., BERGQUIST, K. E., STERNER, O. Production of siderophores by strains of the genus *Trichoderma*: isolation and characterization of the new lipophilic coprogen derivative, palmitoylcoprogen. **Biology of metals**, Dordrecht, v.4, p.176-180, 1991.
- BAAKZA, A., VALA, A. K., DAVE, B. P., DUBE, H. C. A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v.311, n.1, p.1-9, 2004.
- BARROSO, C. B., NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, p.529-535, 2008.

BELL, D. K., WELLS, H. D., MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, St. Paul, v. 72, n.4, p. 379-382. 1982.

BENÍTEZ, T., RINCÓN, A. M., LIMÓN, M. C., CODON, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Sevilha, v.7, n.4, p.249-260, 2004.

BONILLA, I., BOLAÑOS, L. Mineral Nutrition for Legume-Rhizobia Symbiosis: B, Ca, N, P, S, K, Fe, Mo, Co, and Ni: A Review. **Organic Farming, Pest Control and Remediation of Soil Pollutants**, Dordrecht, p.253–274, 2010.

BONONI, L., CHIARAMONTE, J. B., PANSÁ, C. C., MOITINHO, M. A., MELO, I. S. Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. **Scientific Reports**, London, v.10, n.1, p.2858, 2020.

BOSSOLA, J. J., RUSSEL, L. D. **Electron Microscopy**. 2 ed. Jones and Bartlett Publishers, Estados Unidos, 1998.

BRAZ, R. R. **Estímulo da solubilização de fosfato resultante da co-inoculação de *Aspergillus niger* e *Burkholderia cepacia***, 2011. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista - Faculdade de ciências agrárias e veterinárias, Jaboticabal, 2011.

CASTRO, A. M., PEDRO, K. C. N. R., CRUZ, J. C., FERREIRA, M. C., LEITE, S. G. F., PEREIRA, N. *Trichoderma harzianum* IOC-4038: a promising strain for the production of a cellulolytic complex with significant β -glucosidase activity from sugarcane bagasse cellulignin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Heidelberg, v.162, p.2111-2122, 2010.

CHAGAS JUNIOR, A. F., SILVA, G. V. H., OLIVEIRA, M. L., CARVALHO FILHO, M. R. Bioprospecção de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum cliviae* e *C. truncatum*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.14, n.4, p.238-242, 2016.

CHAGAS, L. F. B., CHAGAS JUNIOR, A. F., SOARES, L. P., FIDELIS, R. R. *Trichoderma* na promoção do crescimento vegetal. **Revista de Agricultura Neotropical**, Campo Grande, v.4, n.3, p.97-102, 2017.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A., MACÍAS-RODRÍGUEZ, L., LÓPEZ-BUCIO, J. S. Enhanced plant immunity using *Trichoderma*. **Biotechnology and Biology of Trichoderma**, Amsterdam, p.496-504, 2014.

CROP LIFE BRASIL - CLB. **Produtos biológicos registrados**. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/publicacoes/produtos-biologicos-registrados/> Acesso em: 10 de julho de 2023.

DALACOSTA, N. L. **Compatibilidade de *Trichoderma harzianum* associado ao controle químico no tratamento de sementes de soja**. 2019. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2019.

DAVE, B. P., DUBE, H. C. Chemical characterization of fungal siderophores. **India Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v.38, p.56-62, 2000.

DENNIS, C., WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I - Production of non-volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.57, n.1, p.25-IN3, 1971.

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

DRUZHININA, I. S., SEIDL-SEIBOTH, V., HERRERA-ESTRELLA, A., HORWITZ, B. A., KENERLEY, C. M., MONTE, E., MUKHERJEE, P. K., ZEILINGER, S., GRIGORIEV, I. V., KUBICEK, C.P. *Trichoderma*: The genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.9, n.10, p.749-759, 2011.

DURAIRAJ, K., VELMURUGAN, P., PARK, J. H., CHANG, W. S., PARK, Y. J., KUMAR, P. S., CHOI, K., LEE, J. H., OH, B. T. Potential for plant biocontrol activity of isolated *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus stratosphericus* strains against bacterial pathogens acting through both induced plant resistance and direct antagonism. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v.364, n.23, p.225, 2017.

FARIAS NETO, A. L. D., SCHMIDT, M., HARTMAN, G. L., SHUXIAN, L., DIERS, B. W. Inoculation methods under greenhouse conditions for evaluating soybean resistance to sudden death syndrome. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, p.1475-1482, 2008.

FERREIRA, D. F. SISVAR: Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.38, p.109-112, 2014.

FRANÇA, D. V. C., KUPPER, K. C., MAGRI, M. M. R., GOMES, T. M., ROSSI, F. *Trichoderma* spp. isolates with potential of phosphate solubilization and growth promotion in cherry tomato. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.47, p.360-368, 2017.

GHOSH, S. K., BANERJEE, S., SENGUPTA, C. Bioassay, characterization, and estimation of siderophores from some important antagonistic Fungi. **Journal of Biopesticides**, Tamilnadu, v.10, n.2, p.105-112, 2017.

GORDON, S. A., WEBER, P. R. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, Oxônia, v.26, n.1, p.192, 1951.

GUO, Y., GHIRARDO, A., WEBER, B., SCHNITZLER, J. P., BENZ, J. P., ROSENKRANZ, M. *Trichoderma* species differ in their volatile profiles and in antagonism toward ectomycorrhiza *Laccaria bicolor*. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v.10, p.891, 2019.

HARMAN, G. E., HOWELL, C. R., VITERBO, A., CHET, I., LORITO, M. *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.2, n.1, p. 43-56, 2004.

JAISWAL, S. K., MOHAMMED, M., IBNY, F. Y. I., DAKORA, F. D. Rhizobia as a Source of Plant Growth-Promoting Molecules: Potential Applications and Possible Operational Mechanisms. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, Lausanne, n.4, p.619676, 2021.

KUBICEK, C. P., HERRERA-ESTRELLA, A., SEIDL-SEIBOTH, V., MARTINEZ, D. A., DRUZHININA, I. S., THON, M., ZEILINGER, S., CASAS-FLORES, S., HORWITZ, B. A., MUKHERJEE, P. K., KREDICS, L., ALCARAZ, L. D., AERTS, A., ANTAL, Z., ATANASOVA, L., CERVANTES-BADILLO, M. G., CHALLACOMBE, J., CHERTKOV, O., MCCLUSKEY, K., COULPIER, F., DESHPANDE, N., DÖHREN, H. V., GRIGORIEV, I. V e outros. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral lifestyle of *Trichoderma*. **Genome Biology**, London, v.12, p.1-15, 2011.

LOBO JUNIOR, M., MACHADO-ROSA, T. A., GERALDINE, A.M. Uso de *Trichoderma* na cultura do feijão-comum In: MEYER, M. C., MAZARO, S. M., SILVA, J. C. (Eds.) **Trichoderma: uso na agricultura**. Brasília: Embrapa, 2019. p. 393-406

LOHBAUER, C., ALBUQUERQUE, A. **Atlas do agronegócio brasileiro uma jornada sustentável**, 2020. <https://materiais.croplifebrasil.org/atlas>. Acesso em: 20 de mar. de 2023.

LOUZADA, G. A. S., CARVALHO, D. D. C., MELLO, S. C. M., LOBO JÚNIOR, M., MARTINS, I., BRAUNA, L. M. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, São Paulo, n.9, p.145-149, 2009.

MACHADO, D. F. M., TAVARES, A. P., LOPES, S. J., SILVA, A. C. F. D. *Trichoderma* spp. na emergência e crescimento de mudas de cambará (*Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera). **Revista Árvore**, Viçosa, v.39, p. 167-176, 2015.

MEENA, V. S., MAURYA, B. R., VERMA, J. P., MEENA, R. S. Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture, **Springer**, Singapura, v.331, 2016.

MEYER, M. C., MAZARO, S. M., SILVA, J. C. **Trichoderma: uso na agricultura**. Embrapa Soja - Livro científico (ALICE) Embrapa, Brasil, p.538, 2019.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Programa Nacional de Bioinsumos, Brasil, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos>

MOINO JR, A.; ALVES, S.B. Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen), **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 27, n. 4, 1998.

MONTE, E., BETTIOL, W., HERMOSA, R. *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. In: Meyer, M.C., Mazaro, S.M., Silva, J.C. (Eds.) **Trichoderma: uso na agricultura**, Embrapa, Brasil, p.181-199, 2019.

MOREIRA, F. M. S., SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Editora UFLA, Lavras, Brasil, 2006.

MURPHY, J., RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.27, p.31-36, 1962.

NAHAS, E. Phosphate solubilizing microorganisms: Effect of carbon, nitrogen, and phosphorus sources In: Velázquez E, Rodríguez-Barrueco C (eds) **First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization**. p.111-115, 2007.

NAIK, S. K., MAURYA, S., KUMAR, R., SADHNA, K., GAGRAI, S., BHATT, B. P. Inorganic phosphate solubilization by phosphate solubilizing fungi isolated from acidic soils. **African Journal of Microbiology Research**, Sapele, v.7, p.4310-4316, 2013.

NAKEI, M. D., VENKATARAMANA, P. B., NDAKIDEMI, P. A. Soybean-Nodulating Rhizobia: Ecology, Characterization, Diversity, and Growth Promoting Functions. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, Lausanne, v.6, p.824444, 2022.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 170, n.1, p.265-270, 1999.

NEILANDS, J. B. Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. **Journal of Biological Chemistry**, New York, v.270, n.45, p.26723-26726, 1995.

OLIVEIRA, A. G., CHAGAS JUNIOR, A. F., SANTOS, G. R., MILLER, L. O., CHAGAS, L. F. B. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v.7, n.3, p.149-155, 2012

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.)**, 1991. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1991.

PAUDYAL, S. P., ARYAL, RISHI R., CHAUHAN, S. V. S., MAHESHWARI, D. K. Effect of heavy metals on growth of rhizobium strains and symbiotic efficiency of two species of tropical legumes. **Scientific World**, Sussex, v.5, n.5, 2007.

PRAJAPATI, K., SHARMA, M. C., MODI, H. A. Isolation of two potassium solubilizing fungi from ceramic industry soils. **Life Science Leaflets**, Danta, v.5, p.71-75, 2012.

RAMADA, M. H. S., LOPES, F. A. C., ULHOA, C. J. ***Trichoderma*: metabólitos secundários** In: Meyer MC (ed) *Trichoderma: uso na agricultura*, 1ª ed. Embrapa, Brasília, p 201-218, 2019.

RENSHAW, J. C., ROBSON, G. D., TRINCI, A. P. J., WIEBE, M. G., LIVENS, F. R., COLLISON, D., TAYLOR, R. J. Fungal siderophores: Structures, functions and applications. **Mycological Research**, London, v.106, n.10, p.1123-1142, 2002.

RIBAS P. P., RECH, R., MATSUMURA, A. T. S., VAN DER SAND, S. T. Potencial in vitro para solubilização de fosfato por *Trichoderma* spp. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.14, n.2, p.70-75, 2016.

RICHARDSON, A. E., SIMPSON, R. J. Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. **Plant Physiology**, Oxônia, v.156, n.3, p.989-996, 2011.

RODRIGUES, C., DAVID, G. Q., REIS, A. R. Photograph registration of petri dishes in high quality and image editing of microbiological assays. **International Microbiology**, Sevilha, v.25, n.3, p.561-570, 2022.

RODRIGUES, J. ***Trichoderma* spp. associados a níveis de adubação NPK no patossistema *Sclerotinia sclerotiorum***. Dissertação. (Mestre em agronomia), Universidade Federal de Santa Maria, 2010.

RUIZ-HERRERA, J. Biosynthesis of β -glucans in fungi. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v.60, p.73-81, 1991.

SCHWYN, B., NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical biochemistry**, Philadelphia, v.160, n.1, p.47-56, 1987.

SEIDL, V., SONG, L., LINDQUIST, E., GRUBER, S., KOPTCHINSKIY, A., ZEILINGER, S., SCHMOLL, M., MARTÍNEZ, P., SUN, J., GRIGORIEV, I., HERRERA-ESTRELLA, A., BAKER, S. E., KUBICEK, C. P. Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. **BMC Genomics**, London, v.10, n.1, p.1-13, 2009.

SIDDIQUEE, S. Recent advancements on the role and analysis of volatile compounds (VOCs) from *Trichoderma*. **Biotechnology and biology of *Trichoderma***, Amsterdam, p.139-175, 2014.

SILVA, L.C. **Herbicidas selectivity to *Trichoderma* spp. used in the control of white mold in soybean crop**, 2021. Dissertação. (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras, 2021.

SILVA, L. R. **Compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. no controle de mofo-branco e promoção de crescimento em alface**, 2021. Tese. (Doutorado em Agronomia). Universidade de Brasília, 2021.

SILVA, U. C., MARRIEL, I. E., PAIVA C. A. O., GOMES, E. A., RESENDE, A. V., LANA, U. G. P. **Biossolubilização de potássio in vitro a partir da rocha fonolito por microrganismos do solo**. Embrapa Milho e Sorgo, Brasil, 2015.

SOOD, M., KAPOOR, D., KUMAR, V., SHETIWIY, M.S., RAMAKRISHNAN, M., LANDI, M., ARANITI, F., SHARMA, A. *Trichoderma*: The “secrets” of a multitasking biocontrol agent. **Plants**, Basel, v.9, n.6, p.762, 2020.

STEYAERT, M., RIDGWAY, H. J., ELAD, Y., STEWART, A. Genetic basis of mycoparasitism: a mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Sciencia**, Nova Zelândia, v.31, n.4. p.281–291, 2003.

TEIXEIRA, F.L. Agronegócio globalizado: a importação de fertilizantes fundamentais para o agronegócio brasileiro. **Revista (re) Definições das Fronteiras**, Foz do Iguaçu, v. 1, n. 2, p. 174-194, 2023.

VELÁZQUEZ-GURROLA, A., RAMOS-ALEGRÍA, M. P. **Beneficios de microorganismos solubilizadores de P y K en la recuperación y mantenimiento de suelos agrícolas**. VIII Congreso Mundial de la Palta, Lima, p.495-499, 2015.

VIDAL, M., AMARAL, D., NOGUEIRA, J., MAZZARO, M., LIRA, V. Bioinsumos: a construção de um Programa Nacional pela Sustentabilidade do Agro Brasileiro. **Economic Analysis of Law Review**, Taguatinga, v.12, n.3, p.557-574, 2021.

VINALE, F., SIVASITHAMPARAM, K. Beneficial effects of *Trichoderma* secondary metabolites on crops. **Phytotherapy Research**, Oxford, v.34, n.11, p.2835-2842, 2020.

WHITE, T. J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White., PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications, **Academic Press**, New York, v.18, n. 1, p. 315-322, 1990.

WOO, SL, HERMOSA, R., LORITO, M., MONTE, E. *Trichoderma*: A multipurpose, plant beneficial microorganism for eco sustainable agriculture. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.21, n.5, p.312-326, 2023.

ZHANG, F., ZHU, Z., YANG, X., RAN, W., SHEN, Q. *Trichoderma harzianum* T-E5 significantly affects cucumber root exudates and fungal community in the cucumber rhizosphere. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.72, p.41-48, 2013.

5 **CAPÍTULO 4 - POTENCIAL BIOESTIMULANTE DE *TRICHODERMA* NO CRESCIMENTO, DESEMPENHO FISIOLÓGICO E PRODUTIVIDADE DA SOJA**

RESUMO

No cenário atual, os bioestimulantes têm se mostrado uma ferramenta promissora e eficaz para muitos sistemas de cultivo, aumentando o potencial fisiológico das plantas, reduzindo a dependência de insumos químicos e melhorando a eficiência do uso de recursos naturais. O *Trichoderma* tem surgido como uma abordagem inovadora na busca por soluções sustentáveis na agricultura, especialmente no cultivo da soja. Microrganismos que potencializem o setor produtivo agrícola como da soja, é de suma importância na bioprospecção. A presente pesquisa visa, avaliar o efeito bioestimulante de isolados de *Trichoderma*, nativos do bioma amazônico, no crescimento, desempenho fisiológico e produtividade de plantas de soja. O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação. Foram seis tratamentos compostos por cinco isolados fúngicos de *Trichoderma* e um controle, com oito repetições cada, em delineamento inteiramente casualizado. Foram feitas inoculações do *Trichoderma* na forma de arroz colonizado no solo de vasos de cinco litros, com incorporação antes da semeadura da soja, e aplicação foliar de suspensão de conídios em estágio V3. Determinou-se as variáveis relacionadas ao desenvolvimento vegetal, aos estímulos fisiológicos e a produtividade. Os *Trichoderma* exerceram efeito bioestimulante sobre o desenvolvimento das plantas de soja, com ganhos de biomassa aérea e radicular, e aumento de nodulação. Todos os isolados nativos elicitaram a atividade das enzimas de indução de defesa da planta, expressando um comportamento igual ou superior aos tratamentos a base de produtos comerciais presentes no mercado. A aplicação de *Trichoderma* possibilitou incremento de produtividade e elevou a qualidade grãos.

Palavras-chaves: bioprospecção; microbioma; *Glycine max*;

ABSTRACT

In the current scenario, biostimulants have proven to be a promising and effective tool for many cropping systems, increasing the physiological potential of plants, tolerating dependence on chemical inputs, and achieving efficient use of natural resources. *Trichoderma* has emerged as an innovative approach in the search for sustainable solutions in agriculture, especially in soybean cultivation. Microorganisms that enhance the agricultural production sector such as

soybean are of paramount importance in bioprospecting. This research aims to evaluate the biostimulant effect of *Trichoderma* isolates, native to the Amazonian biome, on the growth, physiological performance, and production of soybean plants. The experiment was carried out in a greenhouse. There were six treatments composed of five fungal isolates of *Trichoderma* and one control, with eight replications each, in a completely randomized design. Inoculations of *Trichoderma* in the form of colonized rice were made in the soil of five-liter pots, with incorporation before soybean sowing, and foliar application of conidial suspension at the V3 stage. Determine the variables related to plant development, physiological stimuli, and productivity. *Trichoderma* have a biostimulating effect on the development of soybean plants, with gains in aerial and root biomass, and increased nodulation. All isolated natives elicited the activity of plant defense induction enzymes, expressing a behavior equal to or superior to treatments based on commercial products present on the market. The application of *Trichoderma* makes it possible to increase productivity and improve grains quality.

Keywords: bioprospecting; microbiome; *Glycine max*

5.1 INTRODUÇÃO

Na agricultura moderna, os bioestimulantes têm se mostrado uma ferramenta valiosa para aumentar a resiliência das plantas, reduzir a dependência de insumos químicos e melhorar a eficiência do uso de recursos naturais. A bioprospecção com *Trichoderma* e seu efeito bioestimulante vem com uma abordagem inovadora na busca por soluções sustentáveis na agricultura, especialmente no cultivo da soja.

A soja é uma das principais *commodities* agrícolas do mundo e representa uma importante matriz energética, como base de muitos produtos relacionados a alimentação humana e animal, conferindo-lhe elevado papel econômico global (Campeão et al., 2020).

Dada sua importância, a adoção de ferramentas que permitam otimizar e melhorar esse sistema produtivo é algo desafiador e necessário, principalmente no tocante as relações simbióticas a nível rizosférico.

O *Trichoderma*, é um fungo benéfico de vida livre no solo, e tem demonstrado a capacidade de estabelecer interações positivas com as plantas. Essas interações são mediadas por mecanismos fisiológicos complexos, que resultam na promoção do crescimento, na ativação do sistema de defesa das plantas, na tolerância a estresses abióticos e bióticos, na melhoria da absorção de nutrientes e consequentemente no ganho de produtividade (Sood et al., 2020).

A aplicação de *Trichoderma*, seja no solo, no tratamento de sementes ou foliar, pode levar a uma série de benefícios para a cultura. Em termos de desempenho fisiológico, o *Trichoderma* tem sido associado a melhoria da atividade fotossintética, ativação de respostas de defesa das plantas, resultando em maior resistência a patógenos e redução de doenças Rebolledo-Prudêncio et al. (2020).

Além disso, sua presença no sistema radicular pode promover a produção de ácidos orgânicos responsáveis pela atividade biossolubilizadora, melhorando a eficiência da absorção de nutrientes como P, K, Mg, Zn e Fe, há também a liberação de fitohormônios como AIA, que pode estimular o crescimento de raízes laterais, elevando os sítios de nodulação no caso da soja, contribuindo assim para o melhor desenvolvimento da planta (Richardson et al., 2011; Bononi et al., 2020)

Em termos de produtividade, vários estudos demonstraram que a aplicação de *Trichoderma* pode levar a um aumento significativo no rendimento das culturas, sendo esse um reflexo dos benefícios bioquímicos e fisiológicos, e de grande interesse para o cenário agrícola mundial, desempenhando um papel fundamental na maximização do rendimento das culturas e na promoção de sistemas agrícolas mais eficientes, buscando a promoção da segurança alimentar global e a redução do impacto ambiental associado à agricultura (Woo et al., 2023).

A bioprospecção com microrganismos que corroborem para esse contexto, atrelado a uma das principais *commodities*, possibilita a descoberta de várias potencialidades, além da compreensão de diversos mecanismos desencadeados por essa interação. Neste contexto, a presente pesquisa visa avaliar o efeito bioestimulante de isolados de *Trichoderma*, nativos do bioma amazônico, no crescimento, desempenho fisiológico e produtividade de plantas de soja.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em casa de vegetação no ano agrícola de 2021/22 nas dependências da Faculdade de Ciências e Engenharia da Universidade Estadual Paulista no Campus de Tupã-SP.

5.2.1 Preparo do solo

Amostras do solo destinado ao experimento foram coletadas da camada superficial (0-20 cm) e encaminhadas ao laboratório especializado para determinação do estado nutricional. Posteriormente, coletou-se o solo da área experimental, fracionando-o a cada 5kg em embalagens plásticas transparentes.

Conforme a recomendação necessária a fim de corrigir a acidez presente, dentro de cada porção de solo foram adicionados 2,45 g de calcário dolomítico filler (PRNT 100%). Por 40 dias as embalagens foram mantidas fechadas no interior da casa de vegetação a fim de otimizar o processo da correção do pH e solarizar o substrato.

Durante esse período de solarização, observou-se a elevação da temperatura (chegando a 60 °C), fato que contribuiu para redução de possíveis contaminantes fitopatogênicos, bancos de sementes ou ovos de insetos pragas indesejadas ao longo do experimento.

Transcorrido o tempo (40 dias), realizou-se a adubação de semeadura indicada para cultura da soja, conforme Boletim 100 para o estado de São Paulo. Forneceu-se P₂O₅, K₂O e S por meio de superfosfato simples, cloreto de potássio e enxofre elementar e solução nutritiva suprimindo os micronutrientes, então esse solo foi homogeneizado e depositado em vasos de 5 L.

Sobre o solo no vaso, colocou-se uma camada de palhada (*Brachiaria* sp.) e manteve-se úmido, simulando a prática do plantio direto e melhorando as condições de microbioma, com intuito de elevar a estabilidade do *Trichoderma* spp. após sua inoculação.

5.2.2 Preparo do inóculo

Foram adotados quatro isolados fúngicos de *Trichoderma atroviride*, oriundos da micoteca da Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus de Alta Floresta, e um isolado comercial de *Trichoderma asperellum* URM 5911, esses foram codificados como TB, TF, TP, TQ e TA, respectivamente.

Todos os isolados fúngicos foram multiplicados inicialmente em meio de cultura batata-dextrose-água (BDA) e, mantidos em câmara de germinação do tipo BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 h.

5.2.3 Multiplicação em fermentação sólida (arroz)

A fim de facilitar a incorporação do inóculo de *Trichoderma* spp. no solo, adotou-se a fermentação sólida em arroz parboilizado. Em erlenmeyers de 250 mL foram adicionados cerca de 100 g de arroz e o mesmo volume de água (p:v), acrescida com amoxicilina (0,03 g L⁻¹), a fim de evitar a contaminação por bactérias, os frascos foram fechados com tampo de gaze e alumínio e autoclavados a 120 °C e 1 atm por 20 min.

Após o resfriamento foram depositados 5 discos (Ø 8 mm) do isolado fúngico contendo micélio e conídios, a fim de otimizar a colonização do arroz, estes foram mantidos em BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 h por 10 dias. A finalização da incubação foi programada para culminar com as etapas de preparo na casa de vegetação.

5.2.3.1 Inoculação de *Trichoderma spp.* no solo

O arroz colonizado foi incorporado nos primeiros 10 cm de solo da camada superficial de cada vaso (25 g vaso⁻¹, correspondendo a suspensão de $2,0 \times 10^8$), visto que essa seria a primeira zona de exploração radicular após germinação e emergência das plântulas (Fig 1). Em seguida recobriu-se com a palhada e mantido com umidade, por 72h até a semeadura (De Conto et al., 2021; Bononi, 2020)

Figura 1 – Etapas de condicionamento do solo com palhada (a), inoculação dos grãos de arroz com os tratamentos (b – controle; c – *Trichoderma spp.*), incorporação em camada superficial (d), semeadura em solo colonizado (e) e emergência de sementes de soja em meio a palhada e colônia do *Trichoderma spp*



Fonte: Elaboração do próprio autor

Foram preparados 48 vasos, sendo 8 repetições para cada tratamento, das quais quatro foram conduzidas até o estágio R1 (amostras destrutivas) e demais mantidas até o final do ciclo da cultura para coleta de demais variáveis.

5.2.4 Semeadura da soja

Sementes de soja da cultivar IPRO M8372, sem tratamento químico ou industrial, foram inoculadas com produto comercial contendo *Bradyrhizobium japonicum* – SEMIA 5079 e 5080, conforme recomendação do fabricante.

Em seguida, quatro sementes foram depositadas (3 cm de profundidade) e cobertas com solo e palhada, sendo mantidas apenas duas por vaso após a emergência até o momento das avaliações.

As regas foram realizadas manualmente, direcionada ao solo, conforme a necessidade, evitando o ponto de murcha permanente da cultura.

5.2.4.1 *Aplicação de Trichoderma spp. via foliar*

No estágio fenológico V3, realizou-se a aplicação foliar de uma suspensão de conídios ($1,0 \times 10^8$) de cada isolado de *Trichoderma*, por meio da lavagem de grãos de arroz multiplicados previamente conforme descrição anterior.

Com o auxílio de pulverizador manual de pressão constante a suspensão foi aplicada até o momento em que houvesse o princípio de escorrimento das gotas na superfície do limbo foliar.

5.2.5 *Análises agronômicas*

As variáveis agronômicas foram determinadas em dois momentos: em R1 (início da floração) e final de ciclo (colheita).

No estágio R1 determinou-se:

5.2.5.1 *Altura parte aérea (cm)*

Por meio de régua milimetrada, considerando a base, o colo da planta, e o ápice a inserção do pecíolo do último trifólio;

5.2.5.2 *Comprimento raiz (cm)*

Com auxílio de régua milimetrada, a partir do colo da planta até extremidade da raiz;

5.2.5.3 *Massa seca da parte aérea e da raiz (g)*

Após coleta biométrica as partes foram separadas, alocadas em sacos de papel e acomodadas em estufa de circulação de ar forçada sob aquecimento de 60° C por 72 h. Em seguida, em balança de precisão, pesou-se a massa de amostra.

5.2.5.4 *Número de nódulos e peso dos nódulos (g)*

As plantas em vaso foram destinadas a lavagem das raízes para remoção do solo, a fim de preservar suas estruturas e manter a integridade dos nódulos formados, para tanto procedeu-se a lavagem em água corrente sobre peneira e em seguida, após a coleta biométrica, os nódulos foram retirados cuidadosamente contabilizados, registrados e pesados em balança analítica de precisão.

No final do ciclo da cultura determinou-se:

5.2.5.5 Número de vagens

Com umidade entorno de 13% realizou-se a colheita manual contabilizou-se todas as vagens presentes nas plantas em cada vaso;

5.2.5.6 Produtividade por vaso (g) e o peso de 100 grãos (g)

Após beneficiamento manual obteve-se o peso total dos grãos, possibilitando estimar a produtividade por vaso e o peso de 100 grãos, ambas variáveis respostas indicadoras para o incremento de produtividade na investigação do efeito bioestimulante.

5.2.6 Análises fisiológicas

As variáveis bioquímicas foram determinadas no estágio R1, a partir do material vegetal (folhas ou nódulos mantidos e preservados em nitrogênio líquido) a fim compreender os efeitos bioestimulantes do *Trichoderma*. Todas as análises foram realizadas em quadruplicatas.

5.2.6.1 Pigmentos fotossintéticos

Para determinação de clorofila, feofitina e carotenoides adotou-se os procedimentos de Lichtenthaler (1987), com adaptações, nas quais 0,2 g de material fresco vegetal foram mantidos por 24h em acetona 80%, seguida de leituras em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1900) e resultados expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ de massa fresca.

5.2.6.2 Malondialdeído (MDA) e Peroxido de hidrogênio (H_2O_2)

Para a peroxidação lipídica preparou-se o extrator a base de ácido tricloroacético (1%) e neste foram macerados 1 g de material foliar moído em nitrogênio líquido, seguido de centrifugação e uso do sobrenadante para as análises do teste de MDA e H_2O_2 , ambas determinadas em espectrofotômetro e expressas em nmol g^{-1} de massa fresca e $\mu\text{mol g}^{-1}$ de massa fresca, conforme Heath e Packer (1968) e Alexieva et al. (2001), respectivamente.

5.2.6.3 Metabolismo antioxidante

Foram utilizados 1,5 g de folhas e extraídas em 10 mL tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), seguidos de centrifugação refrigerada e sobrenadante usado para determinar atividade da superóxido dismutase - SOD (Giannopolitis; Ries, 1977), atividade da catalase – CAT (Azevedo et al., 1998) atividade da ascorbato peroxidase – APX (Moldes et al., 2008) e proteínas totais (Bradford, 1976).

5.2.6.4 Compostos nitrogenados

Pesou-se 1 g de material vegetal, este foi macerado em 10 mL de solução extratora a base de metanol, clorofórmio e água (MCW), então mantidos em geladeira para separação de fases por 48h. Transcorridos o tempo o sobrenadante foi retirado e acrescido de clorofórmio e água (4:1:1,5 v/v/v), a partir do sobrenadante desse processo determinou-se os teores de nitrato (Cataldo et al., 1975), amônia (McCullough, 1967), aminoácidos (Yemm et al., 1955), ureídeos (ácido alantoico e alantoína) e concentração de açúcar total e sacarose (Vogels; Van der Drift, 1970), com adequações necessárias.

Os teores de ureídeos e açúcar total também foram determinados nos nódulos seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente.

Os níveis de açúcar total também foram determinados nos grãos produzidos (geração F1), conforme método proposto e descrito anteriormente.

5.2.6.5 Indução de resistência

Foram determinadas as principais enzimas responsáveis pelos mecanismos de indução de resistência, sendo: peroxidase (POD), polifenol oxidase (PPO), lipoxigenase (LOX), b-1,3-glucanase, quitinase, fenilalanina amônia liase (PAL), e o teor da fitoalexina gliceolina estimulado pela presença de eliciadores a base de *Trichoderma*, determinadas conforme especificações abaixo:

- Peroxidase (EC 1.11.1.7): Em almofariz, folhas de soja (1,5 g) foram maceradas em 8 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0). O homogeneizado foi centrifugado e o sobrenadante obtido armazenado (4° C) até momento de uso. Seguindo a proposta de Lusso e Pascholati (1999), na qual 2,9 mL de uma solução, composta por 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0), mais 25 µL do sobrenadante, mantido a 30° C foi determinada a atividade em espectrofotômetro a 470 nm. Os resultados foram expressos em variação de unidades de absorbância/min/mg de peso fresco.

- Polifenol oxidase (EC 1.10.3.1): Foram maceradas 0,5 g de folhas frescas em 4 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) em almofariz refrigerado. Seguindo de centrifugação (4 °C) 10000 RPM por 15 min. Conforme proposta de Duangmal et al. (1999) e Kuhn (2007), para a reação foi usado 900 µL de substrato (catecol 20mM dissolvido em tampão fosfato de sódio 10mM (pH 6,8)) e 100 µL de extrato enzimático. A leitura foi realizada durante 1 min em espectrofotômetro a 420 nm e o valor de delta foi utilizado para determinação da atividade e expresso em Abs min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

- Lipoxigenase (EC 1.13.11.12): Adotou-se o método de Axelrold et al. (1981), na qual foram adicionados 1 mL de tampão de fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0), mais 20 μ L de ácido linoleico (linoleato de sódio 10mM, pH 9,0) e 10 μ L extrato vegetal. As leituras de absorbância a 234 nm foram realizadas a 30 segundos por 10 minutos, em seguida os valores foram adequados via equação proposta pelos autores. A atividade da lipoxigenase foi expressa em μ mol de hidroperóxido do ácido linoleico min^{-1} mg de proteína $^{-1}$.

- β -1,3-glucanase (EC 3.2.1.6): Conforme Lever (1972) foram pesados 1,5 g de tecido foliar macerado em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) acrescido de polivinilpirrolidona (PVPP) – 1% (p/v). O homogenato foi centrifugado a 14000 rpm durante 25 min a 4 °C. Uma alíquota de 25 μ L desse sobrenadante, 150 μ L de laminarina 0,2%, dissolvida no tampão de extração, foram incubadas a 37 °C por 1 h (A). Outra alíquota de 150 μ L do sobrenadante permaneceu em incubação a 37 °C por 1 h e somente recebeu 150 μ L de laminarina 0,2% dissolvida no tampão de extração, após o aquecimento (B). As misturas de reação incubadas (sobrenadante+laminarina) recebeu 1,5 ml de hidrazida do ácido p-hidroxibenzóico (PAHBAH) e foram aquecidas em banho-maria a 100 °C por 5 min. Após esse período, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 410 nm. A quantidade de glicose liberada da laminarina foi obtida com base na subtração (A)-(B), sendo que os resultados foram expressos em μ g de glicose min^{-1} mg de proteína $^{-1}$.

- Quitinase (EC 3.2.1.14): Adotou-se a metodologia descrita por Guzzo e Martins (1996), na qual 1 g de tecido foliar foi macerado em almofariz juntamente com 0,1 g de resina Dowex 1-X8 e 0,5 g de PVPP, acrescidos de 4 mL de tampão borato de sódio 0,1M (pH 8,8) contendo EDTA 1mM, DTT 1mM e ácido ascórbico 50mM, mantido sobre banho de gelo por 5 minutos. Em seguida centrifugado a 20.000 RPM, a 4 °C por 30 minutos.

Para determinação da quitinase 500 μ L do sobrenadante foi adicionado a 0,1 g de quitina coloidal, previamente preparada, mais 500 μ L tampão fosfato de sódio 0,2 M e mantidos em banho maria (50 °C) por 1 h, em seguida mantido por 5 minutos em banho maria (100 °C). Após resfriar o material foi centrifugado a 7000 rpm por 10 minutos e lido em espectofotômetro a 595 nm, expressa em UE mg^{-1} proteína.

- Fenilalanina amônia liase (FAL) (EC 4.3.1.5): A atividade enzimática foi determinada pelo método “stop assay”, proposto por Zucker (1965), na qual 1,5 g de folhas foram macerados em 8 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. Em tubo de ensaio foram adicionados 350 μ L de tampão borato de sódio 0,1 M (pH 8,8), 550 μ L de solução de L-fenilalanina 0,1 M, 25 μ L de extrato proteico e foi homogeneizado em vórtex. As amostras foram colocadas em banho-maria durante 3 h a 35 °C. Em seguida foi adicionado 60 μ L de HCl 6N aos tubos, homogeneizado

novamente e mantidos em banho de gelo por 5 min. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 290 nm. A atividade enzimática foi expressa utilizando-se o coeficiente de extinção do ácido trans-cinâmico nas presentes condições de ensaio (igual a $10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e o resultado expresso em mol de ácido trans-cinâmico $\text{h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

- Gliceolina: foram determinadas em cotilédones de soja, seguindo o método de Labanca (2002). Preparou-se uma solução elicitora a base de BD estéril, inoculada com um disco do isolado de *Trichoderma* e mantida na ausência luminosa sob agitação a 160 rpm a 28 °C por 5 dias. Após esse período, coletou-se 12 mL e centrifugou a 10000 rpm a 4 °C por 15 min, seguido de filtração do sobrenadante (filtro millipore 0,2 μm). Cotilédones de soja, livres de injúrias, com 9 dias de semeadura em areia autoclavada, foram retirados das plântulas e lavados em água destilada e uma última lavagem em água destilada estéril, e mantido sobre papel estéril em fluxo laminar.

Na face inferior do cotilédone foi efetuado um corte superficial em formato de “cunha” com lâmina estéril (Gillet[®]) curvada. Após a retirada da porção superficial, de maneira asséptica todos os cotilédones, juntos, foram pesados em balança analítica de precisão. Em placas de Petri com papel umedecidos foram alocados os cotilédones (5/placa), em seguida sobre o corte realizado, depositou-se 50 μL da solução elicitora fúngica ou demais controles compostos por: água miliq estéril e Acibenzolar-S-Metílico (50 mg L^{-1} p.c. BION[®]).

As placas foram tampadas, mas não vedadas e mantidas no escuro por 20 h, aleatorizadas na BOD a 26 °C. Transcorridos o tempo, 5 cotilédones foram retirados e depositados em frascos de vidro de 50 mL contendo 10 mL de água destilada estéril e agitados com por 1 hora a 160 rpm 28 °C na ausência de luminosidade para a extração da gliceolina.

Em seguida filtrou-se a solução em papel de filtro Whatman n° 41, realizando a leitura em espectrofotômetro a 285 nm com cubeta de quartzo (Figura 2). O teor da gliceolina foi obtido pela divisão do valor da absorbância pela massa dos cotilédones, expressos em $\text{Abs g}^{-1} \text{ MF}^{-1}$.

Figura 2 – Procedimentos para determinação da gliceolina em cotilédones de soja



Fonte: Elaboração do próprio autor

5.2.6.6 Proteínas de reserva

Determinou-se os teores de proteínas de reserva, nos grãos colhidos (geração F1), obtidas conforme proposta de Suda e Giorgini (2000) por meio da extração seriada com diferentes solventes: a albumina, globulina, prolamina e glutelina e quantificação destas pelo método de Bradford (1976) com leituras a 595 nm em espectrofotômetro.

5.2.7 Teste de colonização radicular

Em R1, fragmentos das raízes foram coletados aleatoriamente de cada tratamento, lavados em água destilada, seguidos de imersão em álcool 70% (1 min), hipoclorito de sódio 1% (1 min) e tríplice lavagem em água destilada estéril, e depositada ao fim sobre papel filtro estéril, para absorção do excesso de umidade.

Em seguida dois fragmentos foram dispostos sobre meio de cultura BDA e incubados a 28°C em BOD e fotoperíodo de 12 h por sete dias, procedimento esse realizado individualmente para cada tratamento e em triplicata no interior da câmara de fluxo laminar. A avaliação se deu pela observação do crescimento micelial do *Trichoderma* spp. associado a raiz, indicativo de interação endofítica com a planta (Bononi, 2020).

5.2.8 Análises estatísticas

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

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Desenvolvimento vegetativo e nodulação

A presença do fungo *Trichoderma* demonstrou impactos significativos no desenvolvimento vegetativo e na nodulação da planta de soja. O aumento médio da altura da parte aérea foi notável. Nos tratamentos TA, TB, TF e TQ, destacando-se o isolado TB com incremento de 20% em relação ao controle de 45 cm. O isolado TP não diferiu estatisticamente do controle (Fig 3 - a).

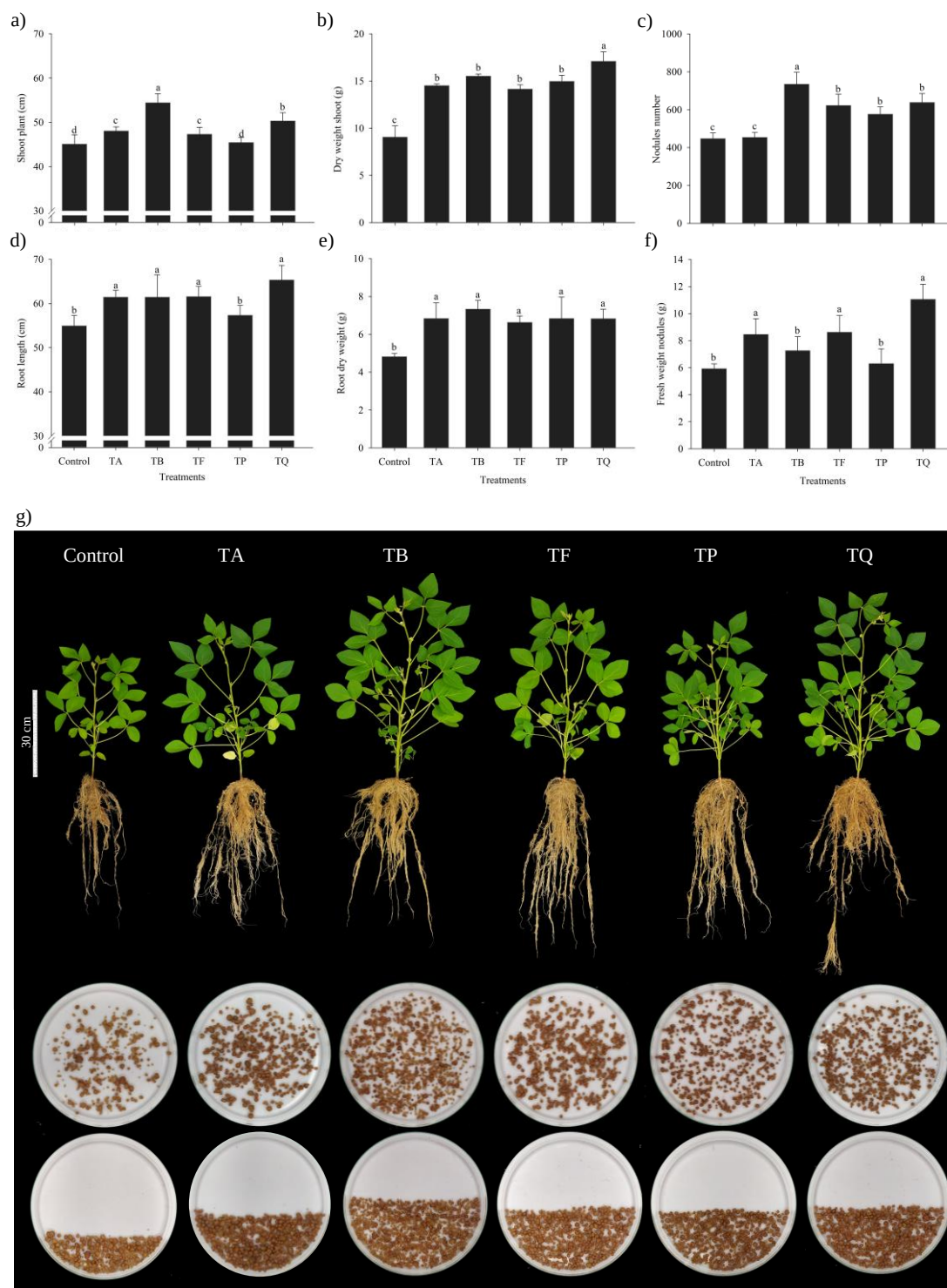
Semelhantemente, o comprimento médio da raiz foi beneficiado pelos isolados de *Trichoderma*. Quando comparados ao controle (55 cm), houve incrementos de até 18% no crescimento da raiz de plantas de soja tratadas com isolado TQ, enquanto o isolado TP também não diferiu estatisticamente do controle (Fig 3 - d).

A massa seca da parte aérea revelou incrementos no acúmulo de massa em todos os tratamentos que receberam a inoculação do *Trichoderma*, na qual todos foram superiores ao controle, diferindo-os estatisticamente deste. Destacou-se plantas que foram inoculadas com isolado TQ, observando-se a presença de vários ramos laterais, fato que justifica sua superioridade estatística com relação aos demais, com 8 g a mais no peso seco comparado ao controle (9,1 g) (Fig 3 - b).

A massa seca radicular foi superior nos tratamentos que receberam aplicação de *Trichoderma*, quando comparado ao controle (4,8 g), incrementos no peso médio das raízes, foram entorno de 50% em tratamentos com isolado TB (Fig 3 - e).

Resultados semelhantes foram observados por Junior et al (2019), trabalhando com doses de *T. asperellum* na cultura da soja em condições de campo, observaram que a altura da parte aérea teve aumento entorno de 14 % em comparação ao controle, corroborando com resultados obtidos neste trabalho.

Figura 3 - Desenvolvimento de plantas de soja (estádio R1) avaliado por meio da altura de parte aérea (a), massa seca de parte aérea (b), número de nódulos (c), comprimento de raiz (d), massa seca de raiz (e), e massa fresca de nódulos (f), em resposta a inoculação de isolados de *Trichoderma* spp. Prancha das plantas representativas de cada tratamento, bem como a nodulação por *Bradyrhizobium* potencializada pela presença do *Trichoderma* spp. (g). Barras seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade



Fonte: Elaboração do próprio autor

Bononi et al. (2020), obtiveram incremento de 41% nos parâmetros biométricos de parte aérea em plantas de soja, em comparação ao seu tratamento controle, graças ao efeito bioestimulante de isolados de *Trichoderma* spp., nativos do bioma amazônico.

O amplo espectro de ação e eficiência na relação tripartite do *Trichoderma* tanto na planta hospedeira como nos fitopatógenos presentes, é documentada na literatura (Kumari et al., 2020). O estímulo ao crescimento da parte aérea, bem como aumento da malha radicular é o reflexo dos inúmeros metabolitos secundários, incluindo os compostos orgânicos voláteis, produzidos pelo *Trichoderma* durante a colonização das raízes das plantas (Estrada Rivera et al. 2019).

Alguns autores atribuem a promoção do crescimento vegetal a capacidade do *Trichoderma* sintetizar compostos e fitohormônios (como o etileno e a auxina), além de possibilitar o aumento da solubilização, absorção e translocação de nutrientes na zona rizosférica, e por seus metabolitos serem reguladores de genes envolvidos no processo fotossintético, de modo que esses poderiam induzir ao ganho de biomassa, estímulos de raízes laterais, melhorar a arquitetura aérea e radicular e consequentemente gerar um efeito bioestimulante a planta (Salas-Marina et al., 2011; Contreras-Cornejo et al., 2009; Zhou et al., 2018; Yuan et al., 2019; Rebolledo-Prudencio et al., 2020).

O número de nódulos é o reflexo da interação simbiótica, responsável ativamente pela capacidade da fixação biológica do nitrogênio (FBN), os isolados nativos aumentaram o número de nódulos, com destaque ao isolado TB com incremento de 63% em relação ao tratamento controle (450 nódulos) (Fig 3 - c).

O peso fresco dos nódulos foi superior para os tratamentos cujos isolados foram TA, TF e TQ, esses não diferiram entre si e apresentaram ganho máximo de 5 g (TQ) em comparação ao controle (5,9 g), que por sua vez não diferiu dos demais tratamentos (TB e TP, com 7,3 e 6,2 g respectivamente) (Fig 3 - f).

Foram observados nódulos maiores para os tratamentos TA, TF e TQ, mesmo não sendo destaques em números de nódulos, esses foram mais pesados, enquanto o isolado TB muitos tamanhos pequenos.

É notório que o estímulo do desenvolvimento radicular possibilita um aumento na zona de absorção de água e nutrientes. A presença do *Trichoderma* pode liberar fitohormônios como AIA e ácidos orgânicos ou sideróforos capazes de disponibilizar nutrientes a exemplo do ferro, potássio e do fósforo, atividades essas comprovadas previamente durante screening.

Tais potenciais desempenhados por esses isolados de *Trichoderma* podem explicar, além do crescimento das plantas, o aumento no número e massa de nódulos, isso porque a exsudação

de AIA na rizosfera pode promover maior crescimento radicular, e conforme observado por Jaiswal et al. (2021), há aumento na nodulação e fixação de nitrogênio em plantas de soja e caupi.

O fato desses isolados serem capazes de produzir sideróforos também ajuda a explicar o comportamento observado na nodulação deste experimento, uma vez que o Fe atua como um cofator da leghemoglobina e da enzima nitrogenase, responsável pela atividade do nódulo e conversão inicial do N_2 em NH_3 , gerando os ureídeos (alantoína e ácido alantoico) como consequência desse processo (Nakei et al., 2022).

A capacidade biossolubilizadora dos isolados de *Trichoderma* de liberar P, conferem a estes uma vantagem adaptativa, e beneficia ainda mais as plantas, pois o P atua diretamente no processo de fixação biológica do nitrogênio, visto que a utilização de energia (ATP) pelas plantas leguminosas durante a fixação do N_2 é requerida em grandes quantidades (Mfilinge et al., 2014).

Assim como o K, que atua diretamente na absorção de água e no crescimento das raízes, logo aumenta a zona pelífera e sítios de nodulação, conferindo uma melhor fixação de N na presença de K (Ababe, 2017).

A deficiência nutricional, principalmente desses elementos, causam em plantas leguminosas, a redução da massa dos nódulos, afetando diretamente a fixação de N_2 , expressando em um baixo rendimento produtivo a cultura (Nakei et al., 2022).

De modo geral a presença dos isolados de *Trichoderma* elevaram a nodulação, expressando compatibilidade com o *Bradyrhizobium* adotado na inoculação do tratamento de sementes. Uma prancha com desenvolvimento das plantas conforme seus respectivos tratamentos, juntamente com o registro dos nódulos, sendo observados sobre uma placa de Petri, possibilitando inferir área ocupada em cada tratamento (Fig 3-g).

Os incrementos observados para essas variáveis agronômicas, caracterizam o efeito bioestimulante dos isolados testados nesse experimento, permitindo afirmar que quando aplicados no solo e posteriormente via foliar, desencadearam uma série de reações fisiológicas na planta que a possibilitou estabelecer-se, desenvolver-se e otimizar outros vários processos metabólicos investigados a partir de então.

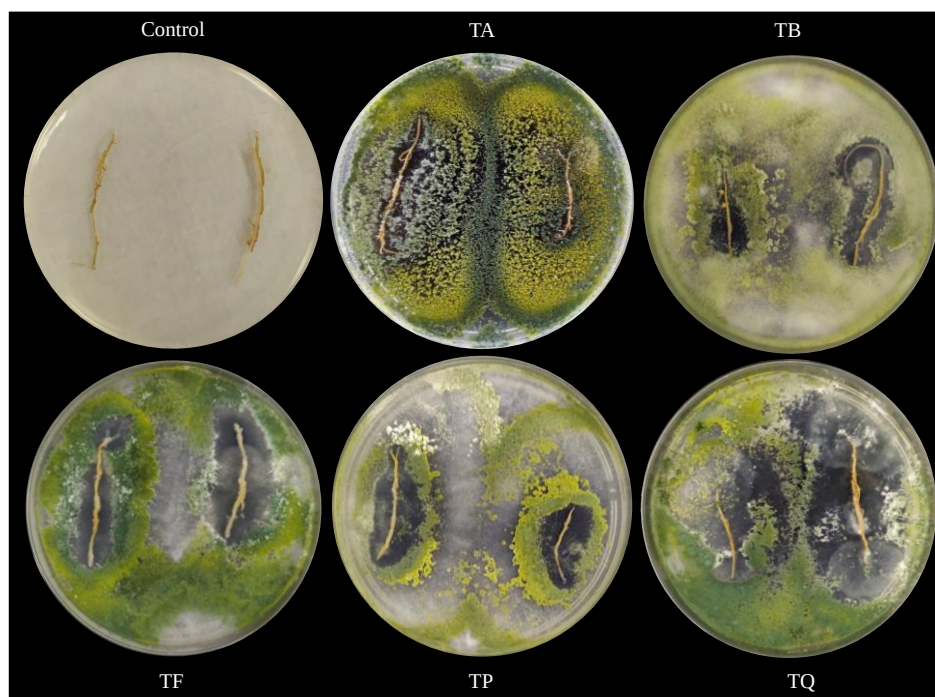
No estágio R1, quando se desfez os vasos para as análises, raízes laterais foram coletadas e incubadas em meio de cultura e foi possível observar que os isolados adotados no experimento permaneceram endofiticamente, visto os indicativos de crescimento micelial de *Trichoderma* observados nos fragmentos radiculares, coletados aos 60 dias após semeadura (DAS). A figura 4 evidencia o crescimento micelial durante o teste de colonização radicular.

A interação entre plantas e microrganismos benéficos como o *Trichoderma*, é reflexo de um processo co-evolutivo, na qual revela uma série de reações cronológicas e simultâneas a iniciar-se pela sinalização, reconhecimento e contato. Antes da interação física (planta-*Trichoderma*) há uma liberação de exsudatos radiculares (principalmente sacarose), peroxidases e oxilipinas, que atuam como sinalizadores químicos e estimulam o crescimento do fungo (Rebolledo-Prudêncio et al., 2020; Vargas et al. (2011).

Com o contato, há a produção de diversos metabólitos secundários e enzimas hidrolíticas que degradam a parede celular e possibilitam a penetração nas raízes (Yedidia et al. 2003; Hermosa et al. 2012).

Provavelmente, o *Trichoderma* possua moléculas efetoras como proteínas e RNAs, que em um primeiro momento são capazes de neutralizar a defesa da planta, permitindo seu crescimento na epiderme e no córtex externo, adentrando aos espaços intercelulares e intracelulares das raízes, regulando posteriormente o metabolismo de carboidratos e os genes relacionados a fotossíntese e seus fotoassimilados (Rebolledo-Prudêncio et al., 2020).

Figura 4 - Placas de Petri com meio BDA para teste de colonização de raízes de soja após a inoculação de isolados de *Trichoderma* spp. no solo



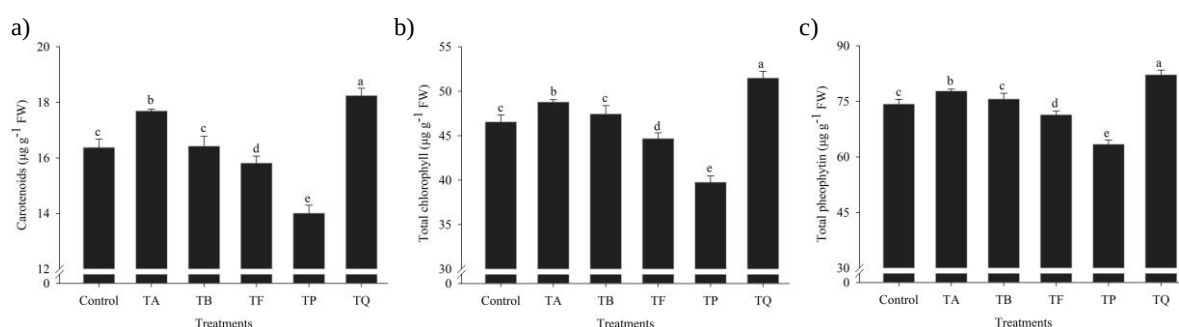
Fonte: Elaboração do próprio autor

5.3.2 Pigmentos fotossintéticos

No presente experimento os pigmentos fotossintéticos (carotenoides, clorofilas e feofitinas) nas folhas de plantas de soja tiveram comportamento de modo geral semelhante. Destaca-se o isolado TQ, como evidenciado na figura 5.

A concentração de carotenoide variou entre 13,9 e 18,2 ($\mu\text{g g}^{-1}$ FW), para os tratamentos TP e TQ, respectivamente, diferindo-os estatisticamente entre si e com o tratamento controle (16,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ FW) (Fig 5 a). O tratamento TQ aumentou cerca de 10% a concentração de clorofila total em comparação com o controle (Fig 5 b). O teor de feofitina total seguiu mesmo padrão para os demais pigmentos, com uma concentração reduzida para o tratamento com isolado TP (Fig 5 c).

Figura 5 - Produção de pigmentos fotossintetizantes carotenoide (a), clorofila total (b), e feofitina total (c) em plantas de soja (estádio R1), submetidas a inoculação de isolados de *Trichoderma* spp. Barras seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade



Fonte: Elaboração do próprio autor

Pesquisas anteriores de Zhang et al. (2016) e Orojnia et al. (2021) corroboram com os achados deste estudo, demonstrando aumentos semelhantes no incremento de pigmentos fotossintéticos como clorofilas e carotenoides em plantas de soja tratadas com *Trichoderma* spp.

Considerando todo o aparato fotossintético estruturado nos cloroplastos, Pacheco-Trejo et al. (2022) detalham em sua revisão vários trabalhos que descrevem diferentes mecanismos, nos quais algumas cepas de *Trichoderma* tem demonstrado aumento na capacidade fotossintética das plantas, elevando o teor dos pigmentos ou a expressão de genes que atuam diretamente na biossíntese de clorofila, proteínas do complexo antena ou componentes do ciclo de Calvin.

Elevar os níveis de carotenoides no tecido vegetal permite reduzir os efeitos do estresse fotooxidativo severo, como afirmam Gill e Tuteja (2010), visto que os carotenoides desempenham um papel muito importante na proteção do tecido vegetal como antioxidantes biológicos que extinguem as espécies reativas de oxigênio (EROs), como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), e capturam os radicais superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

A feofitina atua na dissipação da energia solar excessiva, podendo aumentar a tolerância do tecido vegetal, reduzindo assim os efeitos danosos das EROs (Kitajima; Hogan, 2003).

5.3.3 MDA e H_2O_2 e Enzimas antioxidantes

As EROs foram determinadas pela concentração de MDA e H_2O_2 , que para ambas as variáveis, revelaram atividade elevada nas folhas das plantas que receberam os isolados de *Trichoderma*, visto que o controle apresentou baixa concentração de MDA e H_2O_2 , no entanto os isolados TA e TQ não diferiram estatisticamente do controle para MDA (Fig 6 a, b).

Diferentemente das repostas fisiológicas obtidas por Zhang et al. (2016) e Orojnia et al. (2021), quando aplicado tratamentos a base de *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma* sp. em plantas de soja, com finalidade de controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Macrophomina phaseolina*, respectivamente, nas quais observaram uma redução nas concentrações de MDA e H_2O_2 quando comparados aos tratamentos controles (somente fitopatógeno).

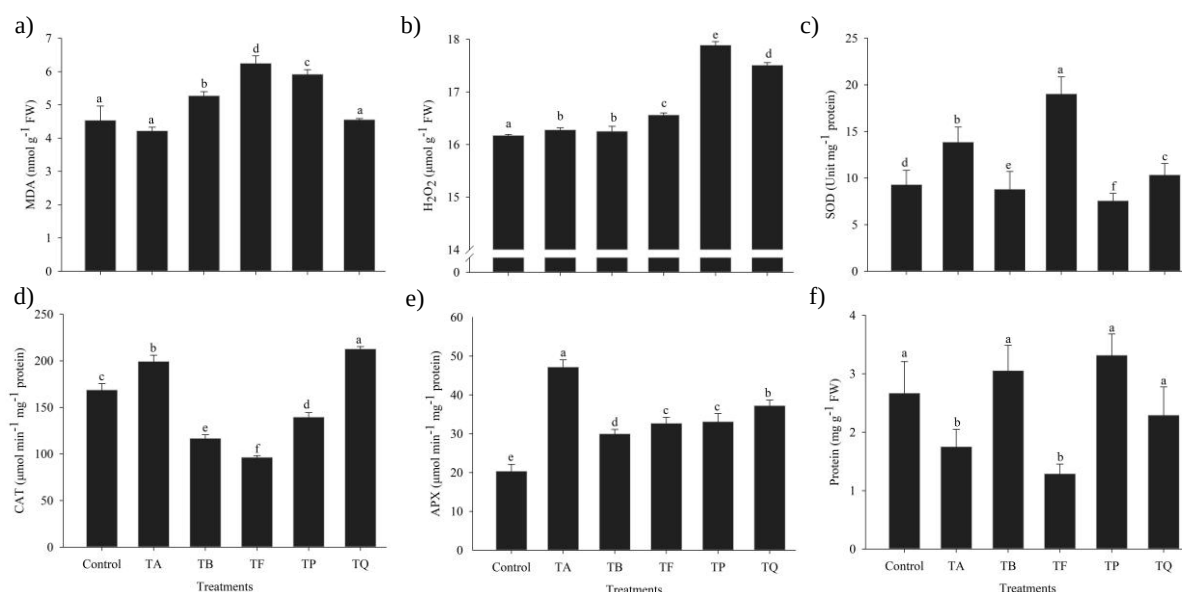
Gill e Tuteja (2010), apontam em seus levantamentos dualidade no papel fisiológico do H_2O_2 no tecido vegetal, que em baixas concentrações o H_2O_2 é tido como uma molécula sinalizadora que desencadeia tolerância a vários estresses abióticos e bióticos. Outra atribuição ao H_2O_2 é a regulação de vários processos fisiológicos, como a senescência, a fotossíntese e a fotorrespiração, a movimentação estomática e o crescimento e desenvolvimento do tecido vegetal.

Nesta pesquisa os indicativos de peroxidação lipídica e EROs, mostra que plantas já no estágio R1, ainda apresentam nível de estresse pela presença do fungo *Trichoderma* spp., uma vez que o estabelecimento do processo simbiótico mutualístico na zona radicular ainda é ativo e contínuo, dado a presença do fungo durante o teste de colonização das raízes (60 DAS), ou seja, na ausência de algum outro fungo em associação (patogênico ou não) ou qualquer outro condicionamento abiótico estressante (água, salinidade, temperatura ou outro) é compreensivo que o tratamento controle (sem a presença do *Trichoderma*) tenha menores concentrações de MDA e H_2O_2 .

Desta forma, são possibilitadas muitas interpretações e essas são muito intrínsecas as espécies envolvidas (planta-fungo) ou outros fatores, dificultando assim generalidades no comportamento dessas variáveis.

As atividades das enzimas do aparato antioxidante (SOD, CAT e APX) presentes nas folhas da soja, mostraram que cada tratamento respondeu de maneira na expressão da atividade enzimática, considerando os papéis de cada uma das enzimas antioxidantes notou-se que muitos tratamentos a base de *Trichoderma* spp. não diferiram ou foram inferiores ao controle (Fig 6 c,d,e).

Figura 6 - Concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROS) através do malondialdeído (MDA) (a) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (b), e enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD) (c), catalase (CAT) (d) e ascorbato peroxidase (APX) (e), e nível de proteína total (f) presentes em folhas de plantas de soja (estádio R1) submetidas a inoculação de isolados de *Trichoderma* spp. Barras seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade



Fonte: Elaboração do próprio autor

No processo antioxidante a SOD é a primeira enzima atuante e é responsável pela remoção do $^1O_2$ gerado pelo estresse oxidativo, catalisando sua dismutação, reduzindo-o em H_2O_2 e um O_2 . Em seguida a CAT é responsável por dismutar diretamente o H_2O_2 em H_2O e O_2 , sendo indispensável para a desintoxicação de EROS em alguma situação de estresse (Gill; Tuteja, 2010).

Na sequência a APX desempenha o papel mais essencial na eliminação de EROs e na proteção de células vegetais, sendo responsável pela eliminação de H_2O_2 gerando água, glutathiona reduzida e ascorbato, utilizando este último como doador de elétrons.

Geralmente a maior atividade da APX está associada a condições de estresse presente no tecido, logo ao observar a figura 4 (e), notou-se médias superiores ao controle, condizendo com os indicativos de estresse MDA e H_2O_2 , que também foram maiores nos tratamentos com a presença do *Trichoderma*, conforme justificado anteriormente.

A concentração de proteína total solúvel nos tecidos foliares da soja não diferiu estatisticamente do controle para os isolados TB, TP e TQ, observando inclusive incremento máximo de 25% na concentração de proteína presente tratamento com isolado TP ($3,31 \text{ mg g}^{-1} \text{ FW}$) (Fig 6 f).

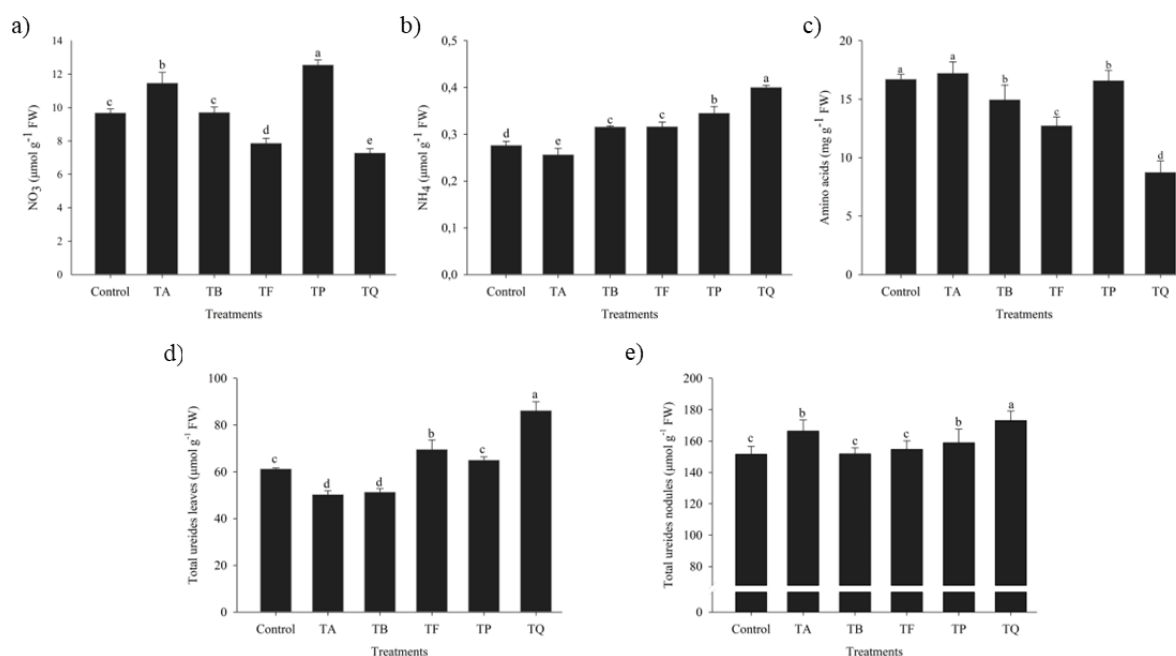
5.3.4 Compostos nitrogenados

Observando o conjunto de gráficos relacionados aos compostos nitrogenados (NO_3 , NH_3 , amino ácidos e ureídeos totais) presentes nas plantas de soja no estágio R1, notou-se, baixas concentrações de nitrato e amônia, corroborando com a literatura, onde as células vegetais evitam a toxicidade do NH_4 (gerado a partir da assimilação do NO_3 ou da fotorrespiração) convertendo-o rapidamente em aminoácidos (Taiz et al., 2017), cuja concentração do tratamento TA não diferiu do controle (Fig 7 a,b,c).

A principal forma de nitrogênio na planta de soja são os ureídeos, neste experimento observou-se acúmulo de ureídeos totais (alantoína e ácido alantoico) tanto nas folhas quanto nos nódulos. Os teores de ureídeos totais nos nódulos foram 2 vezes maior que nos níveis encontrados nas folhas, e superiores em comparação ao controle para os tratamentos com os isolados TA, TP e TQ (Fig 7 d,e).

No interior do nódulo, durante a fixação do N_2 , os bacteroides reduzem o N_2 em NH_3 , gerando por fim os ureídeos, sendo alantoína e ácido alantoico os principais representantes, esses ocupam cerca de 90% do N total da planta de soja. Os ureídeos são transportados dos nódulos radiculares através do xilema, e metabolizados em aminoácidos que são acumulados na vagem e outros órgãos da planta (Ohyama et al., 2013; Raso et al., 2007; Bosse et al., 2021; Ohyama et al., 2023)

Figura 7 - Determinação de nitrato (NO_3) (a), amônia (NH_3) (b), aminoácidos (c), ureídeo total (d) em folhas e ureídeo total em nódulos (e) de plantas de soja (estádio R1), submetidas a inoculação de isolados de *Trichoderma* spp. Barras seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade



Fonte: Elaboração do próprio autor

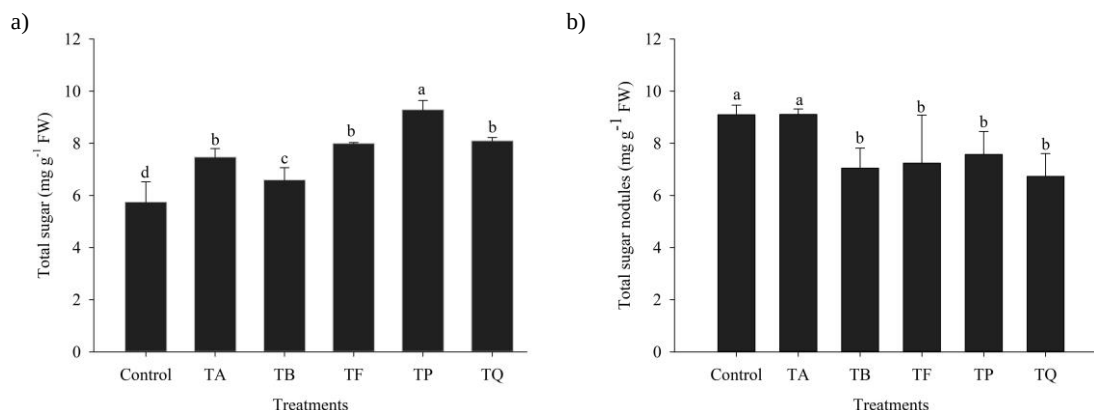
5.3.4.1 Teor de açúcar total em folhas e nódulos

Todos os isolados elevaram a concentração de açúcar nas folhas, com acréscimo máximo de 60% no teor de açúcar total para o isolado TP em relação ao tratamento controle ($5,75 \text{ mg}^{-1} \text{ g FW}$). O teor de açúcar total nos nódulos foi semelhante as concentrações foliares. Notou-se médias superiores para os tratamentos controle e TA, não diferindo-os entre si, enquanto os isolados nativos foram inferiores e semelhantes estatisticamente (Figura 8 a-b).

Nas plantas, o açúcar é resultado do processo fotossintético, podendo ser nas mais diversas formas como glicose, frutose, sacarose, sendo essa última a principal forma de fotoassimilados. Os açúcares no tecido vegetal possibilitam um melhor estabelecimento das relações simbióticas (planta-fungo), em especial na rizosférica (Vargas et al., 2011).

Observando o gráfico da figura. 8 (b) e correlacionando ao de números de nódulos, isso pode explicar a redução da concentração de açúcar nos segmentos radiculares de plantas que receberam aplicação de *Trichoderma* spp., visto que a presença destes juntamente com *Bradyrhizobium* consumiu (mutualisticamente) parte desses compostos.

Figura 8 - Concentrações de açúcar total em folhas (a) e açúcar total em nódulos (b) de plantas de soja (estádio R1), submetidas a inoculação de isolados de *Trichoderma* spp. Barras seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade



Fonte: Elaboração do próprio autor

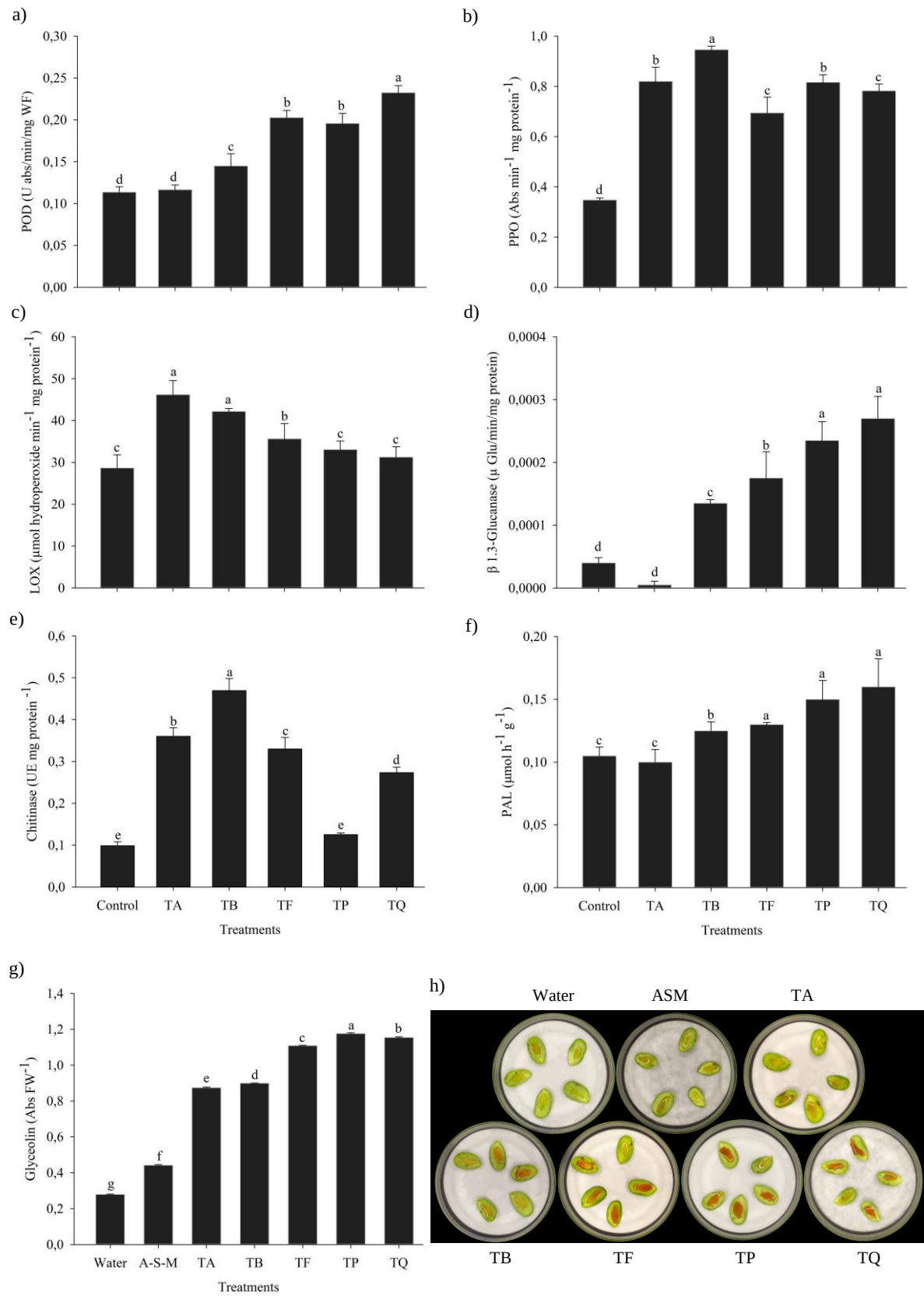
5.3.5 Enzimas de indução de resistência e fitoalexina

As principais enzimas responsáveis pelos mecanismos de indução de resistência (IR), aqui representadas pela peroxidase (POD), polifenol oxidase (PPO), lipoxigenase (LOX), β -1,3-glucanase, quitinase, fenilalanina amônia liase (PAL), e a fitoalexina gliceolina estimulada pela presença de eliciadores a base de *Trichoderma*, revelaram tendência à promoção da IR, onde observou-se comportamento superior para a maioria dos isolados de *Trichoderma*, quando comparado ao tratamento controle (Figura 9).

Observou-se aumento da atividade da peroxidase (POD) na presença dos tratamentos com *Trichoderma*, sendo o isolado TQ superior aos demais, com incremento de 109 % em comparação ao controle (0,11 U abs min⁻¹ mg WF) (Fig 9 a).

Figura 9 - Concentração das principais enzimas e metabolitos associados a indução de resistência, como peroxidase (POD) (a), polifenol oxidase (PPO) (b), lipoxigenase (LOX) (c), β -1,3-glucanase (d), quitinase (e) e fenilalanina amônia liase (PAL) (f) em folhas de plantas de soja, submetidas a inoculação de isolados de *Trichoderma* spp., e o teor da fitoalexina gliceolina (g) promovida por eliciadores a base de *Trichoderma* spp. em cotilédones de soja.

Aspectos visuais dos cotilédones em *screening* para determinação de gliceolina (h). Barras seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade.



Fonte: Elaboração do próprio autor

A polifenol oxidase (PPO) foi elevada pela presença dos isolados de *Trichoderma*, atingindo concentração máxima para o isolado TB que foi 2,7 vezes superior ao controle ($0,34 \text{ Abs min}^{-1} \text{ mg proteina}^{-1}$) (Fig 9 b)

A lipoxigenase (LOX), foi superior ao controle, diferindo-o significativamente dos isolados TA, TB e TF, com aumento máximo de 62%, promovido pelo isolado TA, quando comparado ao controle ($28,4 \mu\text{mol hydroperoxide min}^{-1} \text{ mg proteina}^{-1}$) (Fig 9 c).

A β -1,3 glucanase do tratamento controle não diferiu para o isolado TA, porém, foi inferior todos os demais isolados nativos, com destaque ao TQ, que possibilitou incremento 6,6 vezes a mais na concentração final em relação ao controle ($0,000039 \mu \text{ Glu min}^{-1} \text{ mg proteina}$) (Fig 9 d).

A concentração da quitinase foi elevada na presença do *Trichoderma*, com 4,6 vezes de aumento observada no isolado TB, em comparação ao controle ($0,10 \text{ UE mg proteina}^{-1}$), enquanto o isolado TP não diferiu estatisticamente (Fig 9 e).

A atividade da fenilalanina amônia liase (PAL) foi semelhante estatisticamente entre o controle e o isolado TA, enquanto os demais tratamentos aumentaram a atividade de enzima, com incremento máximo de 50 %, observado para o isolado TQ (Fig 9 f).

Sabe-se que muitas das atividades enzimáticas relacionadas a IR e observadas neste experimento, desencadeiam ou estão relacionadas a rotas fisiológicas que são responsáveis pelo acúmulo de compostos fenólicos e produção de inúmeros metabólitos secundários, que podem prevenir ou agir de forma curativa perante a infecção.

Alfiky e Weisskopf (2021), compilaram diversos processos fisiológicos decorridos para a indução de defesa em diferentes cultivos quando aplicado o *Trichoderma* spp., nos quais muitos são capazes de elicitar genes da via biossintética do ácido jasmônico (JA) e do ácido salicílico (SA) e modular a expressão de lipoxigenase e fenilalanina amônia liase, polifenol oxidase, peroxidase e glucanases, além de promover a lignificação da parede celular (Shoresh et al., 2005), conferindo ao hospedeiro capacidade de resistir a presença de um fitopatógeno.

Todos os isolados de *Trichoderma* induziram a produção da fitoalexina gliceolina nos cotiledones da soja, com destaque ao isolado TP que foi superior aos demais, seguido pelo TQ, TF e TB, sendo todos superiores aos tratamentos controles como: água e Acibenzolar-S-Metílico (produto comercial para tal finalidade) (Fig 9 g).

Comumente as plantas possuem inúmeras substâncias para proteção, que podem estar ativas ou inativas, logo, a planta precisa ser induzida para que possa produzir resposta de defesa, ou seja, elicitores (abióticos ou bióticos), como no caso dos preparados de *Trichoderma*. Estes elicitores se ligam a receptores específicos na membrana celular vegetal (Stangarlin et al. 2010),

induzindo assim a produção das fitoalexinas, que possuem estrutura química diversa, sendo relatado os flavonoides cumarinas, diterpenos, luteolinidina, apigenidina e apigeninidina, com ação antimicrobiana (Mazaro et al., 2008).

Os cotilédones de soja apresentam arquitetura ideal para estes estudos, pois são constituídos de células uniformes, alinhadas em colunas de forma compacta, o que permite medir a resposta celular e a comunicação célula-célula durante as interações nos tecidos infectados (Graham, 1995).

A gliceolina é um pterocarpanoide (flavonoide) e tem grande importância na interação hospedeiro-patógeno, sendo a principal via de defesa sistêmica da planta, ativada pelos mecanismos de resistência em respostas ao ataque de fitopatógenos (Bertoldo; Mazaro, 2018).

Sua síntese se inicia, em parte, na via dos fenilpropanoides, que durante a infecção da planta hidrolisam isoflavonas pré-formadas (malonilglucosil-daidzeína e malonilglucosil-genisteína), liberando a daidzeína (molécula precursora da gliceolina) e genisteína (molécula inibidora de crescimento) (Simões, 2004).

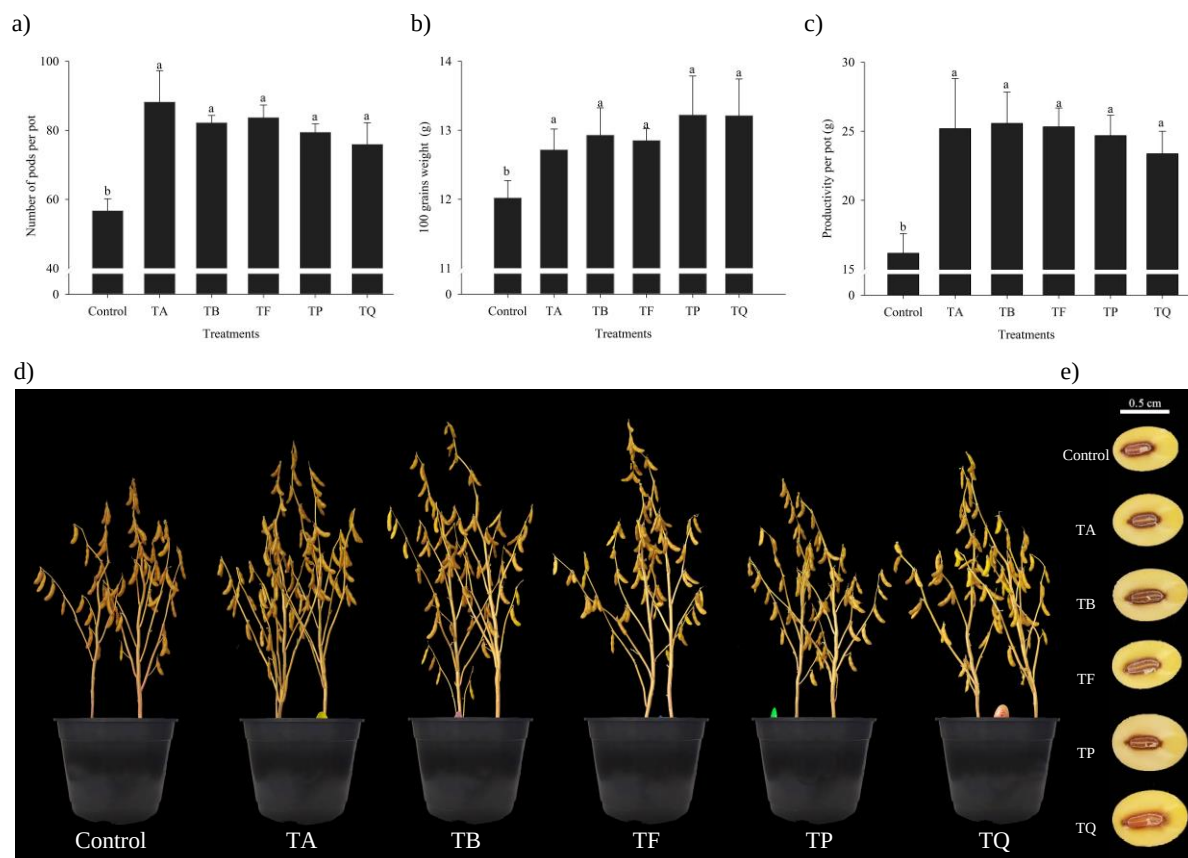
Geralmente, a indução de gliceolinas nos tecidos de soja é acompanhada pela intensa coloração vermelha no ponto de infecção com o patógeno ou no tratamento com eliciadores. Simões (2004), descreve que a coloração se deve à presença de pterocarpanos, como o glicinol, precursores das gliceolinas; tais características puderam ser evidenciadas neste experimento (Fig 9 h), na qual sobre as áreas centrais dos cotilédones, onde o tecido foi removido e a solução eliciadora depositada, houve a pigmentação indicativa da presença e formação da gliceolina, quando na presença de *Trichoderma atroviride*.

5.3.6 Indicadores de produtividade e qualidade grãos

A aplicação de *Trichoderma* aumentou o número de vagens em todos os tratamentos, com incremento máximo de 57% observado para o isolado TA, quando comparado ao controle (56 vagens) (Fig 10 a). Os tratamentos com *Trichoderma* spp. não diferiram entre si, para variável peso de 100 grãos, e expressaram ganho entre 5,8 e 10% em relação ao controle (12 g) (Fig 10 b).

Todos os tratamentos com *Trichoderma* spp. elevaram o peso total de grãos por vaso, e revelaram um aumento entre 46 e 60% de incremento de produtividade quando comparado ao controle (16 g) (Fig 10 c). A prancha da figura 10 (d), permite observar a arquitetura final das plantas e seus respectivos tratamentos, além dos aspectos visuais dos grãos colhidos evidenciados na figura 10 (e).

Figura 10 – Indicadores de produtividade a partir do número de vagens por vaso (a), massa de 100 grãos (b), produtividade por vaso (c) e aspectos morfológicos das duas plantas de soja em vaso (final do ciclo) submetidas a inoculação com isolados de *Trichoderma* spp. (d). Barras seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade



Fonte: Elaboração do próprio autor

Marra et al. (2019), avaliando o efeito da aplicação de cepas e metabólitos de *Trichoderma* spp. em plantas de soja em condições de casa de vegetação, obtiveram incrementos de 26% no número de vagens, 8% no peso de 100 grãos e 39% no peso total de grãos produzidos por vaso, considerando duas plantas por vaso.

Os efeitos bioestimulantes observados no desenvolvimento vegetativo (crescimento da parte aérea e raiz), refletem diretamente nos rendimentos de produtividade, uma vez que, há o aumento na absorção de água, nutrientes e consequentemente produção de fotoassimilados, que são direcionados a drenos como as vagens e grãos, expressando em ganhos produtivos.

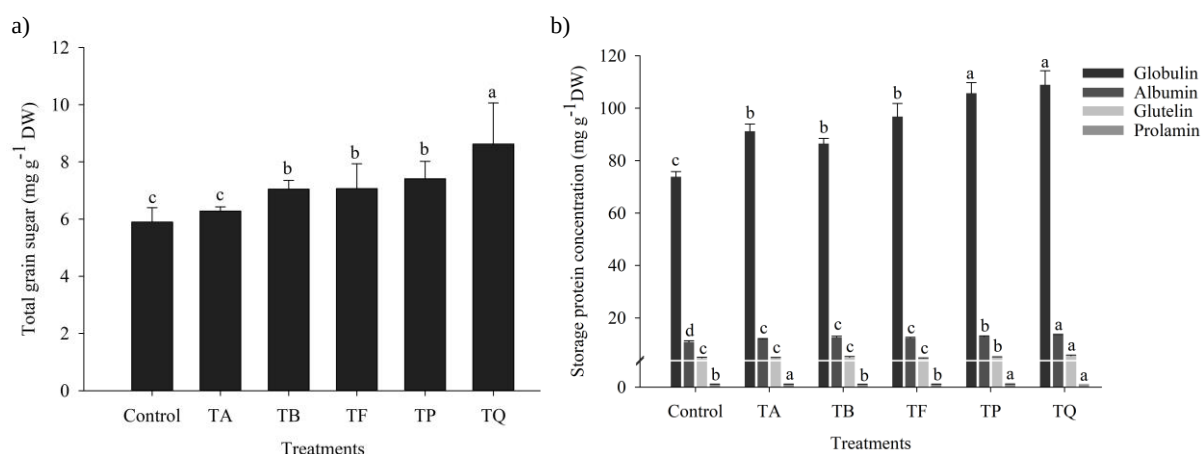
O peso nos grãos de soja está relacionado a sua composição, que pode sofrer alterações a depender do manejo e tratos culturais, mas geralmente possuem concentrações em torno de 40-45% de proteína, 18-26% de açúcares, 18-24% de óleo e cerca de 5% de minerais (Bellaloui

et al., 2020), a deposição desses compostos confere aos grãos maior qualidade bioquímica e nutricional.

5.3.6.1 Qualidade bioquímica dos grãos produzidos

Justificando os expressivos ganhos em peso nos grãos, constatou-se que a concentração de açúcar total presente nos grãos de soja colhidos, aumentaram entre 19 e 45% na presença dos tratamentos com *Trichoderma atroviride* em relação ao controle (5,9 mg g⁻¹ DW), com destaque ao isolado TQ (8,6 mg g⁻¹ DW), o tratamento com *T. asperellum* (TA) não diferiu estatisticamente do controle (Figura 11 a).

Figura 11 - Concentrações de açúcar total e proteínas de reserva (globulina, albumina, glutelina e prolamina) presentes em grãos de soja (geração F1) de plantas submetidas a inoculação com isolados de *Trichoderma* spp. Barras seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade



Fonte: Elaboração do próprio autor

Como descrito em literatura, o teor proteico corresponde a cerca de 40% do peso do grão, logo, verificou-se que as concentrações de proteínas de reserva, tiveram um aumento na presença do *Trichoderma*, sendo os teores de globulina superiores as demais, conforme o esperado, seguido de albumina, glutelina e prolamina.

Observou-se incremento máximo no teor de globulina de 46% em relação ao controle, cujas médias superiores foram para os tratamentos com os isolados TP e TQ. A albumina foi superior para o isolado TQ, com incremento de 27% em comparação ao tratamento controle (10,7 mg g⁻¹ DW), sendo esse inferior aos demais (Figura 11 b).

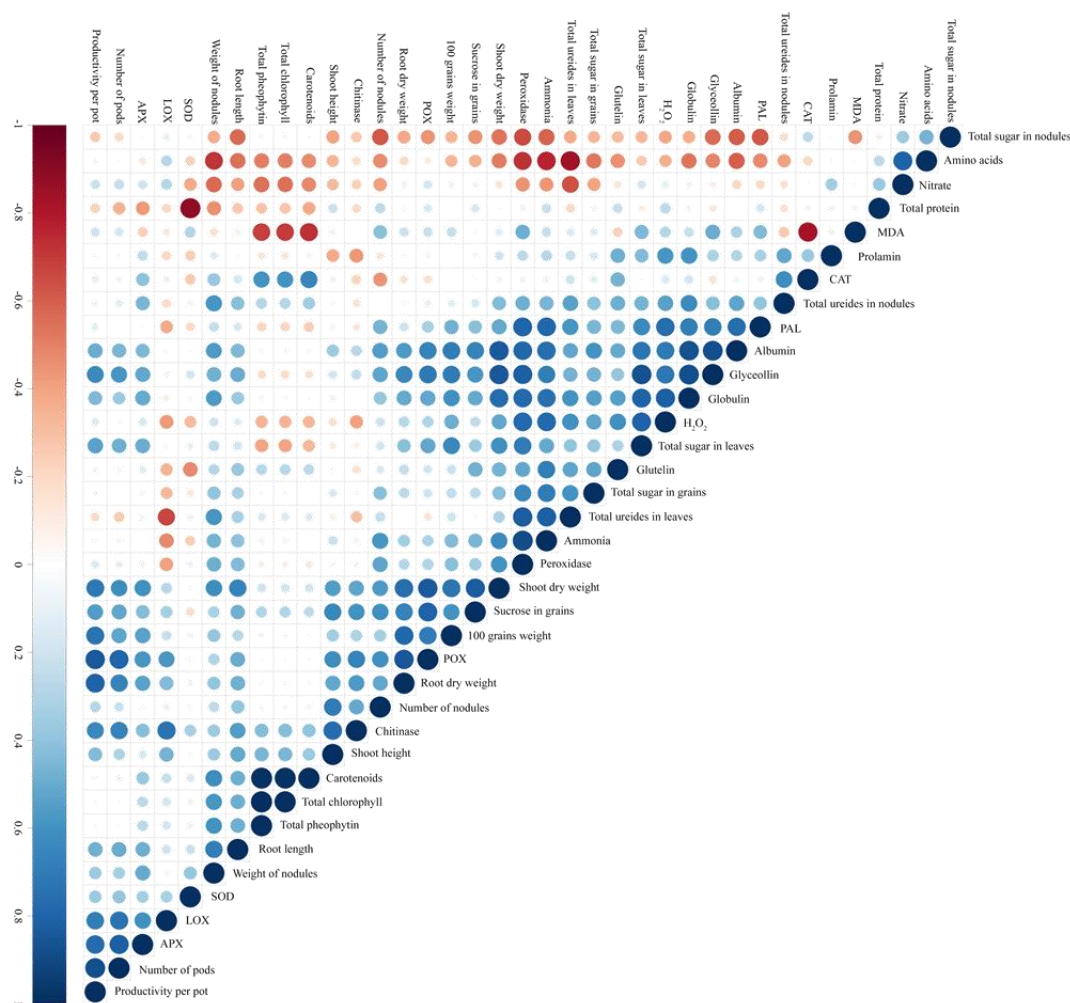
Para os teores de glutelina os isolados TA, TB e TF não diferiram do controle, sendo o tratamento TQ superior a todos ($5,6 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$). As concentrações de prolamina foram semelhantes para os tratamentos TA, TP e TQ, cuja média entre esses foi de $0,23 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$, diferindo significativamente do controle ($0,22 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) (Figura 11 b).

O incremento desses componentes, por meio da aplicação de *Trichoderma* spp., possibilita atender os anseios de uma agricultura moderna pautada na sustentabilidade e a crescente demanda por alimentos, visto que a soja faz parte do cenário agrícola mundial e seus grãos são uma excelente fonte proteica para alimentação animal.

5.3.7 Correlação dos dados

Possibilitando compreender as interações ocorridas dentro deste experimento, consolidou-se um agrupamento de dados, correlacionando (Pearson) as múltiplas variáveis analisadas (Fig 12).

Figura 12 - Heatmap para correlação (Pearson) das variáveis fisiológicas, bioquímicas e agrônômicas em resposta ao efeito bioestimulante do *Trichoderma* spp. sobre plantas de soja



Fonte: Elaboração do próprio autor

Através deste observou-se que há correlação positiva (círculos azuis) entre a maioria das variáveis, isso significa que há interação entre todas, por exemplo, variáveis atribuídas aos incrementos de produtividade (número de vagens, produtividade por vaso) são dependentes e respondem diretamente as demais variáveis analisadas na pesquisa.

5.4 CONCLUSÕES

Os isolados de *Trichoderma atroviride*, nativos de agroecossistemas amazônicos, exerceram efeito bioestimulante sobre o desenvolvimento das plantas de soja, com ganhos de biomassa aérea e radicular, e aumento de nodulação, com destaque os isolados TB e TQ.

Os isolados de *Trichoderma* spp. tiveram resultados superiores ao controle, considerando as variáveis fisiológicas analisadas. Todos os isolados de *T. atroviride* elicitaram a indução de defesa da planta, expressando comportamento igual ou superior aos tratamentos a base de produto comercial, com destaque ao isolado TQ.

A aplicação de *Trichoderma* spp. possibilitou incremento positivo para as variáveis de produtividade, e elevou a qualidade bioquímica dos grãos produzidos, com destaque ao isolado TB, TP e TQ.

Agradecimentos

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

REFERÊNCIAS

- ABEBE, Z. On-farm yield variability and responses of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties to rhizobium inoculation with inorganic fertilizer rates. **Journal of Animal and Plant Sciences**, Nairobi, v.32, n.2, p.5120-5133, 2017.
- ALEXIEVA V., SERGIEV I., MAPELLI S., KARANOV E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell & Environment**, West Sussex, v.24, p.1337-1344. 2001.
- ALFIKY, A., WEISSKOPF, L. Deciphering *Trichoderma*–Plant–Pathogen Interactions for Better Development of Biocontrol Applications. **Journal of Fungi**, Basel, v.7, n.1, p.61, 2021.
- AXELROD, B., CHEESBROUGH, T. M., LAAKSO, S. Lipoxygenase from soybeans: EC 1.13.11.12 Linoleate: oxygen oxidoreductase. In: LOWENSTEIN, J.M., **Methods Enzymology**. Elsevier, v.71, p. 441-451. 1981.

AZEVEDO, R.A., ALAS, R.M., SMITH, R.J., LEA, P.L. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Hoboken v. 104, p.280–292. 1998.

BELLALLOUI, N., MCCLURE, A. M., MENGISTU, A., ABBAS, H. K. The influence of agricultural practices, the environment, and cultivar differences on soybean seed protein, oil, sugars, and amino acids. **Plants**, Basel, v.9, n.3, p.378, 2020.

BERTOLDO, E., MAZARO, S. M. β -1,3 Glucanases: uma revisão sob a ótica da defesa vegetal. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v.17, p.1-13, 2018.

BONONI, L. **Bioprospecção de *Trichoderma* spp. envolvido na solubilização de fosfato e no controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja**. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade de São Paulo. 2020.

BONONI, L., CHIARAMONTE, J. B., PANSA, C. C., MOITINHO, M. A., MELO, I. S. Phosphorus solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. **Scientific Reports**, London, v.10, n.1, p.2858, 2020.

BOSSE, M. A., SILVA, M. B., OLIVEIRA, N. G. R. M., ARAUJO, M. A., RODRIGUES, C., AZEVEDO, J. P., REIS, A. R. Physiological impact of flavonoids on nodulation and ureide metabolism in legume plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Issy les Moulineaux, v.166, p.512-521, 2021.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 72, n. 2, p. 248-254. 1976.

CAMPEÃO, P., SANCHES, A. C., MACIEL, W. R. E. Mercado Internacional de Commodities: uma análise da participação do Brasil no mercado mundial de soja entre 2008 e 2019. **Desenvolvimento em Questão**, Rio Grande do Sul, v.18, n.51, p.76-92, 2020.

CATALDO, D.A., HAROON, M., SCHRADER, L.E., YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Nova York, v.6, p.71-80. 1975.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A., MACÍAS-RODRÍGUEZ, L., CORTÉS-PENAGOS, C., LÓPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Oxônia, v.149, n.3, p.1579-1592, 2009.

DE CONTO, L. M., COSTA, F. A., DA COSTA, A. C., ULHOA, C. J. Potencial de isolados de *Trichoderma* spp. nativos em controlar o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* e como promotor de crescimento na cultura da soja. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 3, p. 30616-30632. 2021.

DUANGMAL, K., APENTEN, R.K. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. *Romano*). **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 64, n. 3, p. 351-359, 1999.

ESTRADA-RIVERA, M., REBOLLEDO-PRUDENCIO, O. G., PÉREZ-ROBLES, D. A., ROCHA-MEDINA, M. C., GONZALEZ-LOPEZ, M. C., CASAS-FLORES, S. Histone deacetylase HDA-2 is essential in *Trichoderma* to modulate multiple responses in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Oxônia, v.179, n.4, p.1343-1361, 2019.

FERREIRA, D. F. SISVAR: Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.38, p.109-112, 2014.

GIANNOPOLITIS, C.N., RIES, S.K. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Oxônia, v. 59, p. 309-314. 1977.

GILL, S. S., TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Issy les Moulineaux, v.48, n.12, p.909-930, 2010.

GRAHAM, T. L. **Cellular Biochemistry of phenylpropanoid responses of soybean to infection by *Phytophthora sojae***. In: Marcel Dekker (ed) Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action, p.85-116, 1995.

GUZZO, S. D., MARTINS, E. M. F. Local and systemic induction of β -1,3 glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.144, p.449-454. 1996.

HEATH R.L., PACKER L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives in Biochemistry and Biophysics**, Maryland Heights, v 125, p.189-198. 1968.

HERMOSA, R., VITERBO, A., CHET, I., MONTE, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, Nova Iorque, v.158, n.1, p.17-25, 2012.

JAISWAL, S. K., MOHAMMED, M., IBNY, F. Y. I., DAKORA, F. D. Rhizobia as a Source of Plant Growth-Promoting Molecules: Potential Applications and Possible Operational Mechanisms. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, Lausanne, n.4, p.619676, 2021.

JUNIOR, A. F. C., CHAGAS, L. F. B., COLONIA, B. S. O., MILLER, L. D. O., OLIVEIRA, J. C. *Trichoderma asperellum* (UFT201) functions as a growth promoter for soybean plant. **African Journal of Agricultural Research**, Sapele, v.14, n.33, p.1772-1777.

KITAJIMA, K., HOGAN, K. P. Increases of chlorophyll a/b ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation and high light. **Plant, Cell Environment**, Chichester, v.26, n.6, p.857-865, 2003.

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade de São Paulo. 2007.

KUMARI, I., SHARMA, S., AHMED, M. **Tripartite interactions between plants, *Trichoderma* and the pathogenic fungi**. In: Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture, p.391-401, 2020.

LABANCA, E.R.G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade de São Paulo. 2002.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia. v.47, p. 273-279. 1972.

LICHTENTHALER H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: LOWENSTEIN, J.M., **Methods Enzymology**. Elsevier, v. 148, p.350-382. 1987.

LUSSO, M. F. G.; PASCHOLATI, S.F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, n. 3, p. 244-249, 1999.

MARRA, R., LOMBARDI, N., D'ERRICO, G., TROISI, J., SCALA, G., VINALE, F., WOO, L., BONANOMI, G., LORITO, M. Application of *Trichoderma* strains and metabolites enhances soybean productivity and nutrient content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.67, n.7, p.1814-1822, 2019.

MAZARO, S. M., CITADIN, I., GOUVÊA, A., LUCKMANN, D., GUIMARÃES, S. S. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, p.1824-1829, 2008.

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

MFILINGE, A., MTEI, K., NDAKIDEMI, P. A. Effects of *Rhizobium* inoculation and supplementation with P and K, on growth, leaf chlorophyll content and nitrogen fixation of bush bean varieties. **American Journal of Research Communication**, San Antonio, v.2, n.10, p.49-87, 2014.

MOLDES, C.A., MEDICI, L.O., ABRAHÃO, O.S., TSAI, S.M., AZEVEDO, R.A. Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelber, v. 30, p. 469-479. 2008.

NAKEI, M. D., VENKATARAMANA, P. B., NDAKIDEMI, P. A. Soybean-Nodulating Rhizobia: Ecology, Characterization, Diversity, and Growth Promoting Functions. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, Lausanne, v.6, p.824444, 2022.

OHYAMA, T., MINAGAWA, R., ISHIKAWA, S., YAMAMOTO, M., HUNG, N. V. P., OHTAKE, N., SUEYOSHI, K., TAKASHI, S., NAGUMO, Y., TAKAHASHI, Y. **Soybean seed production and nitrogen nutrition**. In A comprehensive survey of international soybean research-Genetics; physiology, agronomy, and nitrogen relationship. p.115-157, 2013.

OHYAMA, T., KAHORI, M., HARUKA, G., AKIHIRO, S., KYOKO, H. Nitrogen metabolism in non-nodulated and nodulated soybean plants related to ureide synthesis. **Nitrogen**, London, v.4, n.2, p.209-222, 2023.

OROJNIA, S., HABIBI, D., SHAHBAZI, S., PAKNEJAD, F., ILKAEI, M. N. Investigation of biological control of *Trichoderma* formulations and its mutant type related to chemical treatments in the control of soybean charcoal rots. **Romanian Agricultural Research**, Fundulea, v.38, p.419-427, 2021.

PACHECO-TREJO, J., AQUINO-TORRES, M. A., REYES-SANTAMARÍA, M. I., ISLAS-PELCASTRE, M., PÉREZ-RÍOS, S. R., MADARIAGA-NAVARRETE, A., SAUCEDO-GARCÍA, M. Plant Defensive Responses Triggered by *Trichoderma* spp. as Tools to Face Stressful Conditions. **Horticulturae**, Basel Suíça, v.8, n.12, p.1181, 2022.

RASO, M. J., MUÑOZ, A., PINEDA, M., PIEDRAS, P. Biochemical characterization of an allantoate-degrading enzyme from French bean (*Phaseolus vulgaris*): the requirement of phenylhydrazine. **Planta**, Heidelberg, v.226, p.1333-1342, 2007.

REBOLLEDO-PRUDENCIO, O. G., DAUTT-CASTRO, M., ESTRADA-RIVERA, M., DEL CARMEN GONZÁLEZ-LÓPEZ, M., JIJÓN-MORENO, S., CASAS-FLORES, S. ***Trichoderma* in the rhizosphere: an approach toward a long and successful symbiosis with plants**. In: New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Elsevier, p.3-38, 2020.

RICHARDSON, A. E., SIMPSON, R. J. Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. **Plant Physiology**, Oxônia, v.156, n.3, p.989-996, 2011.

SALAS-MARINA, M. A., SILVA-FLORES, M. A., URESTI-RIVERA, E.E., CASTRO-LONGORIA, E., HERRERA-ESTRELLA, A., CASAS-FLORES, S. Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.131, p.15-26, 2011.

SIMÕES, K. **Caracterização do eliciador do fungo *Mucor ramosissimus* e estudo da supressão de sua atividade indutora em soja por fragmentos de polissacarídeos pécticos**. Tese (Doutorado em Biologia), Universidade Estadual de Campinas, 2004.

SHORESH, M., YEDIDIA, I., CHET, I. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. **Phytopathology**, St. Paul, v.95, n.1, p.76-84, 2005.

SOOD, M., KAPOOR, D., KUMAR, V., SHETIWIY, M.S., RAMAKRISHNAN, M., LANDI, M., ARANITI, F., SHARMA, A. *Trichoderma*: The “secrets” of a multitasking biocontrol agent. **Plants**, Basel v.9, n.6, p.762, 2020.

STANGARLIN, J. R., SCHULZ, D. G., FRANZENER, G., ASSI, L., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., KUHN, O. J. Indução de fitoalexinas em soja e sorgo por preparações de *Saccharomyces boulardii*. **Instituto Biológico. Arquivos**, São Paulo, v.77, p.99, 2010.

SUDA, C.N.K. GIORGINI, J. F. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 12, p. 226-245, 2000.

TAIZ, L., ZEIGER, E., MOLLER, I. M., MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, Brasil, 2017.

VARGAS, W. A., CRUTCHER, F. K., KENERLEY, C. M. Functional characterization of a plant-like sucrose transporter from the beneficial fungus *Trichoderma virens*. Regulation of the symbiotic association with plants by sucrose metabolism inside the fungal cells. **New Phytologist**, Chichester, v.189, n.3, p.777-789, 2011.

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

YEDIDIA, I., SHORESH, M., KEREM, Z., BENHAMOU, N., KAPULNIK, Y., CHET, I. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.69, n.12, p.7343-7353, 2003.

YEMM E.M., COCKING E.C. The Determination of Amino Acids with Ninhydrin. **Analyst**, Evanston, v.80, p. 209-213. 1955.

YUAN, M., HUANG, Y., GE, W., JIA, Z., SONG, S., ZHANG, L., HUANG, Y. Involvement of jasmonic acid, ethylene and salicylic acid signaling pathways behind the systemic resistance induced by *Trichoderma longibrachiatum* H9 in cucumber. **BMC Genomics**, London, v.20, n.1, p.144, 2019.

WOO, SL, HERMOSA, R., LORITO, M., MONTE, E. *Trichoderma*: A multipurpose, plant beneficial microorganism for eco sustainable agriculture. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.21, n.5, p.312-326, 2023.

ZHANG, F., GE, H., ZHANG, F., GUO, N., WANG, Y., CHEN, L., JI, X., LI, C. Potencial de biocontrole do isolado T-aloe de *Trichoderma harzianum* contra *Sclerotinia sclerotiorum* em soja. **Plant Physiology and Biochemistry**, Issy les Moulineaux, v.100, p.64-74, 2016.

ZHOU, D., HUANG, X. F., GUO, J., SANTOS, M. L., VIVANCO, J. M. *Trichoderma gamsii* affected herbivore feeding behaviour on *Arabidopsis thaliana* by modifying the leaf metabolome and phytohormones. **Microbial biotechnology**, Sheffield, v.11, n.6, p.1195-1206.

ZUCKER, M. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. **Plant Physiology**, Rockville, v. 40, p. 779 – 784. 1965.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O potencial demonstrado pelos isolados de *Trichoderma* como agentes de biocontrole eficazes, aliado aos benefícios de suas atividades bioquímicas na promoção do crescimento das plantas, insere-os como protagonistas no avanço de práticas agrícolas sustentáveis.

A exploração minuciosa das atividades bioquímicas desses isolados nativos possibilita enxergar o quão rico são nossos biomas, e o quanto há a se descobrir, os screening in vitro permitem avaliar e compreender o potencial antagônico desses microrganismos contra vários fitopatógenos, gerando informações valiosas para bioprospecção, revelando complexos que podem revolucionar o manejo de doenças.

A capacidade do *Trichoderma* de não apenas combater patógenos, mas também estimular características benéficas nas plantas, abre portas para uma era de práticas agrícolas racionais e sustentáveis, além de contribuir para a redução da dependência de agroquímicos, sua utilização pode mitigar os efeitos adversos no ambiente e, ao mesmo tempo, maximizar a produtividade das culturas.

Perspectivas futuras promissoras se desenharam à medida que a bioprospecção dos isolados de *Trichoderma* é aprofundada. A exploração contínua das atividades bioquímicas poderá levar à identificação de novos compostos bioativos e mecanismos de ação, impulsionando a criação de produtos ainda mais eficazes e direcionados.

No contexto do mercado agrícola, a crescente demanda por soluções mais sustentáveis abre portas para a expansão dos bioinsumos, incluindo produtos baseados em *Trichoderma*. Esse conhecimento também oferece plataforma para a manipulação genética de microrganismos, potencialmente ampliando seu arsenal de habilidades benéficas.

A disseminação de práticas agrícolas de baixo impacto ambiental e a conscientização sobre a importância da biodiversidade regional também podem abrir oportunidades para o uso de isolados específicos de *Trichoderma*, como os amazônicos.

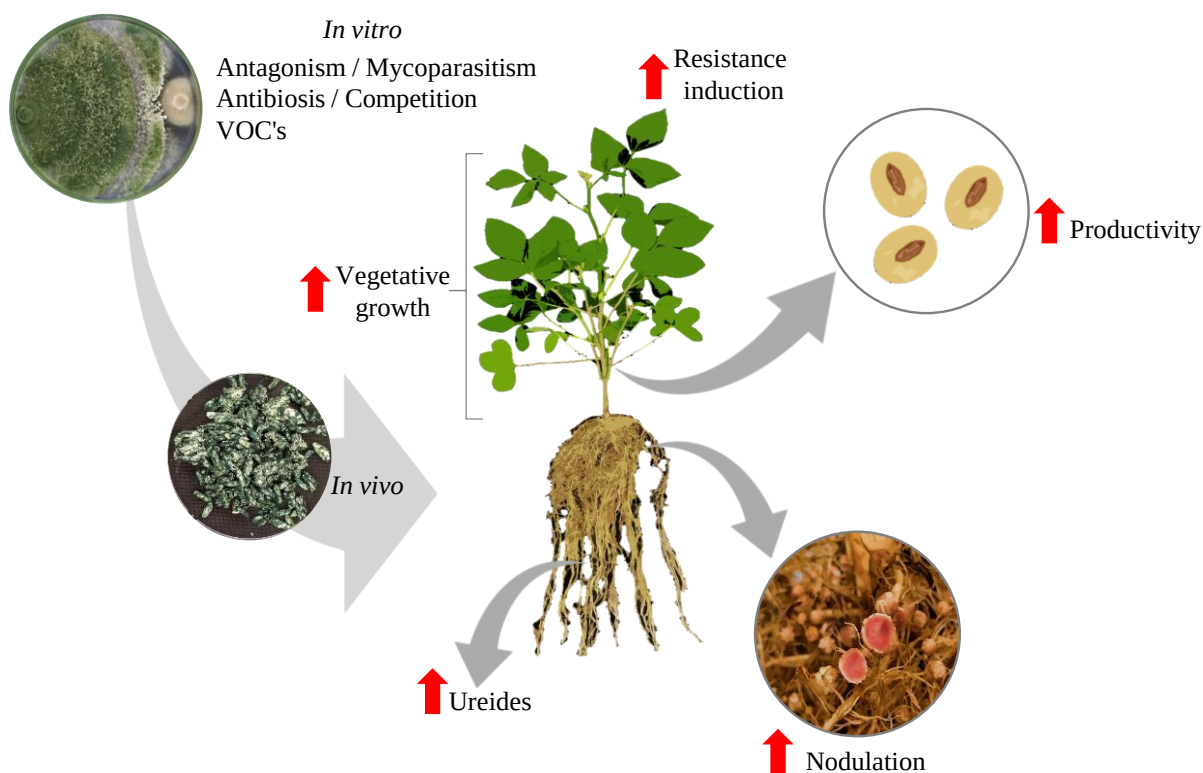
A incorporação estratégica de *Trichoderma* na agricultura traz múltiplos benefícios, à medida que avançamos para um futuro agrícola mais sustentável, a bioprospecção desses microrganismos e suas aplicações no mercado podem contribuir para moldar uma abordagem mais equilibrada e eficaz para a produção de alimentos.

Consolidando a presente pesquisa, podemos atribuir aos isolados nativos de *Trichoderma atroviride* amplo espectro de ação, cujas respostas obtidas para as mais diversas

variáveis analisadas, foram singulares a cada material biológico, mesmo pertencentes a mesma espécie.

Em resumo, os principais benefícios do efeito bioestimulante de isolados de *T. atroviride* levaram a incrementos produtivos e melhorias no desempenho fisiológico e bioquímico de plantas de soja, desta maneira foi possível confirma-se as hipóteses inicialmente determinadas.

Figura 1 – Esquema resumido dos efeitos antagônicos ao *F. brasiliense* em condições *in vitro* e bioestimulantes em plantas de soja após aplicação, *in vivo*, de *Trichoderma atroviride*.



Fonte: Elaboração do próprio autor

