



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO TOCANTINS

CAMPUS ARAGUATINS

CURSO SUPERIOR DE BACHARELADO EM ENGENHARIA AGRONÔMICA

EDUARDO CARVALHO DE ANDRADE

**ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ANTAGONISTA DE
Trichoderma spp. CONTRA FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ORIUNDOS DE SOLO
DO CAMPUS ARAGUATINS - IFTO, *IN VITRO***

**Araguatins
2023**

EDUARDO CARVALHO DE ANDRADE

**ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ANTAGONISTA DE
Trichoderma spp. CONTRA FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ORIUNDOS DE SOLO
DO CAMPUS ARAGUATINS - IFTO, *IN VITRO***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso Superior de Bacharelado em Engenharia Agrônômica, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, do Tocantins, *Campus Araguatins*, como exigência à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Agrônômica.

Orientador: Me. Timóteo de Sousa Oliveira Lemes

Coorientador: Dr. Ilsamar Mendes Soares

**Araguatins
2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas do Instituto Federal do Tocantins

- A554i Andrade, Eduardo Carvalho de
 Isolamento e avaliação do desempenho antagonista de *Trichoderma* spp.
 contra fungos fitopatogênicos oriundos de solo do Campus Araguatins - ifto,
 in vitro / Eduardo Carvalho de Andrade. – Araguatins, TO, 2023.
 39 p. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia
 Agrônômica) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do
 Tocantins, Campus Araguatins, Araguatins, TO, 2023.
- Orientador: Me. Timóteo de Sousa Oliveira Lemes
 Coorientador: Dr. Ilsamar Mendes Soares
1. Antagonismo de *Trichoderma*. 2. Controle biológico. 3. Isolamento de
 fungos de solo. I. Lemes, Timóteo de Sousa Oliveira. II. Soares, Ilsamar
 Mendes. III. Título.

CDD 630

A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio, deste documento é autorizada para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica do IFTO com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Educação
Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins
Campus Araguatins
Coordenação do Curso de Bacharelado em Engenharia Agrônoma

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ANTAGONISTA DE *Trichoderma* spp. CONTRA FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ORIUNDOS DE SOLO DO CAMPUS ARAGUATINS - IFTO, IN VITRO."

AUTOR (A): Eduardo Carvalho de Andrade
ORIENTADOR (A): Timóteo de Sousa Oliveira Lemes
COORDENADOR (A): Ilamar Mendes Soares

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins, Campus Araguatins, como parte das exigências para a conclusão do Curso de Bacharelado em Engenharia Agrônoma.

Aprovado em 02 de junho de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Timóteo de Sousa Lemes, Servidor**, em 23/06/2023, às 16:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Decio Dias dos Reis, Servidor**, em 27/06/2023, às 10:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ilamar Mendes Soares, Servidor**, em 29/06/2023, às 19:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.iftoc.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_externo=0, informando o código verificador 1999558 e o código CRC 9A7C669B.

A minha família, em especial a minha avó Ernestina
Carvalho da Silva e meu falecido avô Ricardo Pereira
da Silva, e a minha querida mãe Cleusirene Carvalho
Da Silva.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, e por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da realização deste trabalho.

A minha avó Ernestina Carvalho da Silva por sempre estar ao meu lado incondicionalmente nos momentos mais tensos da minha vida sempre acreditando no meu potencial mesmo em momentos em que eu mesmo duvidei da minha capacidade.

A minha mãe Cleusirene Carvalho da Silva pelo amor e confiança creditados na minha pessoa durante toda a minha vida, mesmo em alguns momentos não estando fisicamente perto sempre se fez presente na minha vida me dando exemplo e me incentivando a seguir em frente.

A meu pai Geon de Andrade Sousa e esposa Débora da Silva Gomes Sousa por todo o apoio e pela ajuda, que muito contribuíram para minha formação como ser humano.

Aos meus irmãos Elaine Carvalho da Silva e Marcos Vinícius da Silva Gomes que acreditaram em mim, pelo amparo, paciência e força em todos os momentos.

Aos meus colegas e amigos, Ana Paula Santana, Breno Alef, Celso Lucas Gonçalves, Cledyson Gabriel Oliveira, Danilo Gustavo, David Aimar, Matheus Carvalho, que tive o prazer de conhecer durante a graduação e que me auxiliaram ao longo da implantação deste projeto de pesquisa.

Ao meu orientador, Me. Timóteo de Sousa Oliveira Lemes, pelos conhecimentos compartilhados.

Ao prof. Dr. Ilsamar Mendes de Soares e ao prof. Me. Décio Dias dos Reis por constituírem a banca examinadora do meu trabalho de conclusão de curso- TCC.

A instituição pela oportunidade de cursar a graduação em engenharia agrônômica, por todo conhecimento repassado, apoio técnico e espaço cedido para a condução do experimento.

A todos amigos e familiares que de forma direta ou indireta contribuíram com a minha formação, e conclusão deste projeto.

“Fogo nos racistas. ”

Djonga

RESUMO

A conjuntura socioeconômica mundial tem se modificado e o consumo mundial de alimentos se expande, acompanhado pela crescente procura por bioinsumos, a procura por novas tecnologias de produção ambientalmente sustentáveis e economicamente acessíveis torna-se eminente, pois o uso indiscriminado de agrotóxicos é comprovadamente prejudicial a saúde e ao meio ambiente. O uso de microrganismos provenientes do solo para o controle de agentes prejudiciais fitopatogênicos é uma alternativa viável para melhorar a qualidade da produção vegetal, as espécies de *Trichoderma sp.* são os agentes de controle biológico mais utilizados na agricultura, possuindo seus principais mecanismos de ação a: antibiose, o micoparasitismo, a competição e a indução de crescimento. O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar fungos de importância agrícola provenientes de algumas áreas do IFTO-Campus Araguatins e avaliar a ação antagonista do isolado *Trichoderma sp.*, frente a isolados fitopatogênicos. Apartir de 5 amostras de solo foram isolados fungos dos seguintes gêneros: *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.* e *Fusarium sp.* Para avaliar a atividade antagônica foi realizado pareamento direto de culturas em placas de petri contendo meio BDA. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições e 4 tratamentos, sendo cada repetição representada por uma placa de petri. O isolado de *Trichoderma sp.* apresentou atividade antagônica proporcionando notas superiores a 3,0 em 3 tratamentos (75% dos tratamentos), sendo que o único isolado que apresentou resistência a atividade do mesmo foi do gênero *Aspergillus sp.* abrindo assim uma demanda para futuros testes *in vivo* usando o isolado.

Palavras-chave: *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Fusarium sp.*, Pareamento direto, Controle Biológico, Fungos de Solo.

ABSTRACT

The world socioeconomic situation has changed and the world consumption of food is expanding, accompanied by the growing demand for bioinputs, the search for new environmentally friendly and economical production technologies becomes eminent, since the indiscriminate use of pesticides is proven to be harmful to health. and to the environment. The use of microorganisms from the soil to control harmful phytopathogenic agents is a viable alternative to improve the quality of plant production, the species of *Trichoderma sp.* are the most used biological control agents in agriculture, having their main action switches to: antibiosis, mycoparasitism, competition and growth induction. The objective of this work was to isolate and identify fungi of agricultural importance from some areas of the IFTO-Campus Araguatins and to evaluate the antagonistic action of the isolate *Trichoderma sp.*, against phytopathogenic isolates. Fungi of the following genera were isolated from 5 samples of soil: *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.* and *Fusarium sp.* To evaluate the antagonistic activity, direct pairing of cultures in petri dishes containing PDA medium was performed. The experiment was carried out in a completely randomized design with 5 repetitions and 4 treatments, each repetition being represented by a petri dish. The *Trichoderma sp.* showed antagonistic activity providing scores greater than 3.0 in 3 treatments (75% of treatments), and the only isolate that showed resistance to its activity was the genus *Aspergillus sp.* thus opening a demand for future in vivo tests using the isolate.

Keywords: *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Fusarium sp.*, Direct Pairing, Biological Control, Soil Fungus.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Origem dos isolados obtidos a partir das amostras de solo.	29
Tabela 2- Resumo da análise de variância, para as duas características avaliadas no teste de antagonismo.	31
Tabela 3- Resumo do teste de médias pelo teste Scott-Knock a 5% de probabilidade para as 2 características avaliadas	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de vida assexual de trichoderma	15
Figura 2- Aspectos morfológicos de <i>Aspergillus flavus</i>	21
Figura 3- Características morfológicas de <i>Penicillium digitatum</i>	22
Figura 4- Características morfológicas do complexo de espécies <i>Fusarium solani</i>	23
Figura 5- Preparo da solução de Meio de cultura BDA	24
Figura 6- a) pesagem de solo destorreado; b) solo sendo misturado com água destilada; c) agitação da amostra em incubadora shaker;	25
Figura 7- a) Semeio das diluições em placas de petri; b) Culturas em duplicata.	26
Figura 8- a) Crescimento observado após sete dias de cultivo em BDA; B) Repicagem de possível fungo de interesse agrícola.	26
Figura 9- Isolado apresentando características morfológicas do complexo de espécies <i>fusarium solani</i> ;	29
Figura 10- Isolado apresentando características morfológicas do complexo de espécies <i>fusarium oxysporum</i>	29
Figura 11- Isolado apresentando características morfológicas do complexo de espécies <i>aspergillus flavus</i>	30
Figura 12- Isolado apresentando características morfológicas do complexo de espécies de <i>penicillium digitatum</i>	30
Figura 13- Isolado apresentando características morfológicas típicas do gênero <i>trichoderma</i> <i>sp.</i> : a-b: colônia em bda; c-d: conidióforo e conídios;	30
Figura 14- Caracterização do teste de antagonismo: a: Pareamento direto de culturas; b: repetição de testemunha aos 4 dias de cultivo	27
Figura 15- Escala diagramática para avaliação do teste de culturas pareadas	28
Figura 16- Placas de petri contendo pareamento direto aos 7 dias.....	32
Figura 17- Tratamento 1 Com Sete Dias Em BOD	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Controle biológico.....	14
2.2 Gênero <i>Trichoderma</i>	15
2.3 Doenças controladas por <i>Trichoderma</i>	15
2.4 Os mecanismos de ação utilizados por <i>Trichoderma</i>	16
2.4.1 Antibiose	16
2.4.2 Micoparasitismo.....	17
2.4.3 Competição	18
2.4.4 Indução de crescimento	18
2.5 Fungos de armazenamento	19
2.5.1 <i>Aspergillus Flavus</i>	20
2.5.2 <i>Penicillium sp</i>	21
2.6 Fungos do gênero <i>Fusarium sp</i>	22
2.6.1 <i>Fusarium solani</i>	22
2.6.2 <i>Fusarium oxysporum</i>	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Preparo de meio de cultura.....	24
3.2 Isolamento de fungos.....	25
3.2 Teste De Antagonismo.....	27
4 RESULTADO E DISCUSSÕES	29
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO

A conjuntura socioeconômica mundial tem se modificado, o consumo mundial de alimentos se expande, acompanhado pela crescente procura por bioinsumos, situação que afeta o equilíbrio entre oferta e demanda de agroquímicos e coloca em xeque o abastecimento do mercado pelos diversos tipos de insumos agrícolas. Neste contexto, novas formas de combate a pragas e doenças com atributos menos agressivos à saúde humana e ao meio ambiente, como bioinseticidas e fungicidas, são indispensáveis para o desenvolvimento sustentável desejado na produção (MARTINS, 2017; BORÉM, 2005).

A microbiota do solo tem potencial para promover o crescimento das plantas e a tolerância dos organismos vegetais ao parasitismo realizado por fitopatógenos, apresentando uma solução sustentável e promissora para melhorar a qualidade da produção agrícola. Entre os distintos microrganismos que naturalmente habitam o solo, os fungos do gênero *Trichoderma* são reconhecidamente um dos grupos mais estudados e ultimamente estão sendo usados também como princípio ativo de biofungicidas e promotores de crescimento (BETTIOL e MORANDI, 2009; BERNARDO *et al.*, 2019).

O gênero *Trichoderma* pertence à classe Sordariomycetes do filo Ascomycota, são fungos normalmente encontrados no solo ou na rizosfera de plantas de clima tropical, as espécies deste gênero são dotadas de oportunismo diversificado. Se alimentam por meio das hifas liberando enzimas extracelulares para hidrolisar substratos, portanto a diversidade na combinação entre genes que codificam enzimas hidrolíticas definem a capacidade oportunista dos integrantes deste grupo de micróbios (MEYER *et al.*, 2019).

O biocontrole realizado por esse gênero de fungos pode ocorrer por mecanismos diversos, entre eles, competição por espaço e nutrientes, micoparasitismo e antibiose, que muitas vezes se desenvolvem de forma simultânea ou não. Segundo Hermosa *et al.*, (2014) a atividade antifúngica *in vitro* de muitos dos fungos do gênero *Trichoderma* é vastamente reconhecida frente a fungos dos seguintes gêneros: *Botrytis*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Stachybotrys*, *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Gaeumannomyces* entre outros.

Em decorrência da importância e dos aspectos benéficos do biocontrole de fungos, a criação de coleções de culturas puras é fundamental para o desenvolvimento de projetos ou programas de controle biológico, já que as mesmas disponibilizam estoque de amostras de isolados. O presente trabalho visou isolar a partir de 5 amostras de solo provenientes de áreas de cultivo ou pousio do IFTO - Campus Araguatins, e avaliar o desempenho antagônico de um

isolado de *Trichoderma sp.* em pareamento *in vitro* com isolados dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Controle biológico

O Controle biológico é um fenômeno natural, que regula o número de espécies de um determinado grupo de seres vivos através da ação de inimigos naturais, os quais são denominados agentes de mortalidade biótica. Todos os seres vivos de um ecossistema possuem inimigos os atacando durante seus ciclos de vida. Dentre tais inimigos naturais existem grupos bastante diversificados, como insetos, vírus, fungos, bactérias, nematoides, protozoários, rickétsias, micoplasmas, ácaros, aranhas, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (PARRA *et al.*, 2002).

Recentemente, o controle biológico vem assumindo importância cada vez maior em programas de manejo integrado de pragas (MIP), especialmente no contexto em que a produção integrada rumo a agricultura sustentável está sendo amplamente discutida. Nesse caso, o controle biológico constitui, ao lado da taxonomia, do nível de controle e da amostragem, um dos pilares de sustentação de qualquer programa de MIP (PARRA *et al.*, 2002).

Os fungos são o grupo com maior variedade de organismos fitopatogênicos. Todas as plantas são afetadas por patógenos do reino *fungi* e alguns deles podem causar doenças facilmente disseminadas em um amplo espectro de espécies de plantas. Diante disso, o modelo dominante da agricultura convencional que tem como base o retorno econômico imediato, prioriza o controle aos problemas fitossanitários quase exclusivamente pela aplicação continuada e em larga escala de defensivos agrícolas sintetizados a partir de fórmulas químicas. Acarretando assim diversos problemas de ordem ambiental como contaminação de alimentos, solo, água e animais, intoxicação de agricultores, resistência de patógenos a certos princípios ativos dos agrotóxicos, desequilíbrio biológico com alterações da ciclagem de nutrientes e da matéria orgânica (MO), eliminação de organismos benéficos e redução da biodiversidade (MORANDI, 2009).

A inquietação da sociedade com o impacto da agricultura no ambiente e a contaminação da cadeia alimentar com resíduos de agrotóxicos têm alterado o cenário agrícola, resultando no aparecimento de nichos de mercado para produtos diferenciados, tanto os produzidos sem o uso de agrotóxicos, como os portadores de selos que garantem que os agrotóxicos foram utilizados adequadamente. Além disso, o incremento dos custos com o controle químico, a perda de

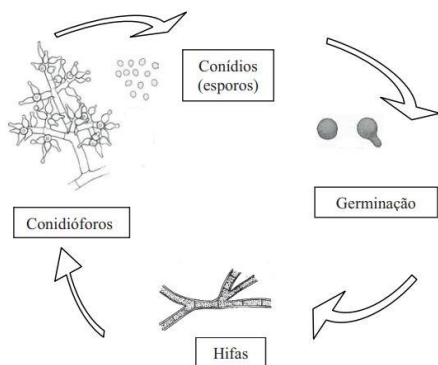
eficiência de alguns agrotóxicos, por causa da resistência dos organismos-alvo e os problemas ambientais advindos dessas práticas indicam a necessidade da busca de produtos biológicos compatíveis para o controle de fitopatógenos. (MORANDI, 2009).

2.2 Gênero *Trichoderma*

Trichoderma é um fungo filamentoso que pertence à classe Sordariomycetes do filo Ascomycota, vulgarmente chamado de bolor ou mofo, apresentando geralmente colônias de coloração verde. Tem distribuição cosmopolita pois é encontrado em diversas regiões do globo terrestre (Américas, Europa, Ásia, África e Oceania), pode ser encontrado em praticamente todos os tipos de solos, embora mais frequentemente nos de regiões de clima temperado e tropical, associado às raízes das plantas e à matéria orgânica morta. A versatilidade genética das espécies deste gênero lhe permite sobreviver em diferentes habitats, e tem chamado a atenção de pesquisadores que visam conhecer suas interações com a microbiota do solo (MEYER *et al.*, 2019.).

Weindling (1934) observou que espécies de *Trichoderma* produziam metabólitos tóxicos, que eram disseminados e afetavam de forma letal hifas jovens dos patógenos, sendo o primeiro a fazer registros neste sentido. Por serem espécies saprófitas, auxiliam na decomposição dos resíduos vegetais e animais do solo. Estes, depois de decompostos, retornam ao solo e servem de alimento para as plantas. Por colonizar com facilidade solos e raízes, o *Trichoderma* compete com os patógenos presentes, colaborando para que as plantas permaneçam saudáveis (LUCON, 2014).

Figura 1- Ciclo de vida assexual de trichoderma



Fonte: Machado *et al.* (2012)

2.3 Doenças controladas por *Trichoderma*

O termo antagonista é empregado para designar agentes biológicos com potencial para interferir nos processos vitais dos patógenos, estando esses agentes adaptados ecologicamente

ao mesmo nicho que os ocupados pelos patógenos. Nessa visão, o controle biológico pode ser acompanhado por práticas culturais, para criar um ambiente favorável aos antagonistas e à resistência da planta hospedeira, bem como pelo melhoramento da planta, para aumentar a resistência ao patógeno ou adequar o hospedeiro para as atividades dos antagonistas. De forma mais pragmática, o controle biológico de doenças de plantas pode ser conceituado como sendo o controle de um microrganismo por meio de outro microrganismo (MORANDI *et al.*, 2009).

Por via de regra as doenças causadas por fungos de solo, ou seja, aquelas causadas por patógenos que passam a maior parte de seu ciclo de vida neste ambiente e infectam raízes, a base dos caules e o sistema vascular das plantas, causando podridões e murchas. Dentre eles podem ser mencionados *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Verticillium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Armillaria* e *Roselinia*, *Penicillium*, *Aspergillus* entre outros. Estas doenças estão entre as principais causas de redução na produtividade das plantas cultivadas em todo o mundo, mas nem sempre recebem a devida atenção como as doenças foliares. Elas afetam principalmente as raízes, sendo o seu controle muito difícil, pois acredita-se que os patógenos evoluíram com as plantas por milhões de anos e estão altamente adaptados ao ambiente de solo e às plantas cultivadas. Alguns deles são capazes de sobreviver por muitos anos no solo, tais como algumas espécies de *Fusarium* e *Verticillium*, impossibilitando o cultivo de plantas suscetíveis em algumas regiões do Brasil (LUCON, 2014; HERMOSA *et al.*, 2014).

2.4 Os mecanismos de ação utilizados por *Trichoderma*

Espécies do gênero *Trichoderma* em geral são grandes oportunistas e colonizam a rizosfera das plantas e diversos substratos de composições variadas. Por apresentarem a capacidade de produção de estruturas de resistência, clamidósporos e microescleródios, podem se desenvolver em ambientes com condições insalubres como desertos ou até mesmo na Antártida, tornando as espécies do gênero cosmopolitas (MEYER *et al.*, 2019).

Mesmo em maior ou menor escala, todas as espécies de *Trichoderma* são agentes antagonistas eficazes de fungos fitopatogênicos e de oomicetos, como uma estratégia de nutrição biotrófica. Ao mesmo tempo, as espécies de *Trichoderma* também são capazes de se alimentar de biomassa de fungos e de oomicetos mortos, o que torna seu estilo de vida micotrófico (Druzhinina *et al.*, 2018).

2.4.1 Antibiose

Antibiose é estabelecida como a interação entre organismos na qual indivíduos de uma população secretam metabólitos capazes de inibir ou impedir o desenvolvimento dos indivíduos

de uma população de outra espécie. As interações entre espécies de *Trichoderma* e outros fungos, envolvem compostos difusíveis de baixo peso molecular ou antibióticos, inibidores de crescimento micelial de fungos alvo. Há vários exemplos de antibiose entre microrganismos habitantes do solo. Espécies do gênero *Trichoderma* são capazes de secretar 100 diferentes antibióticos, com capacidade de inibição sobre diferentes espécies de fungos fitogênicos. *T. virens*, por exemplo, produz dois antibióticos efetivos contra patógenos de solo: gliotoxina, que inibe o crescimento de *Rhizoctonia* e de *Sclerotium*, e gliovirina, capaz de inibir *Pythium* e *Phytophthora*. Pode-se citar também outros metabólitos como o ácido harziânico, alameticinas, tricolinas, massoilactona, harzianopiridona, glisopreninas, ácido heptelídico (BENÍTEZ *et al.* 2004; AMORIM, 2011)

Espécies de *Trichoderma* produzem compostos voláteis e fixos capazes de inibir o crescimento micelial de uma variedade de gêneros de fungos, e a produção de substâncias antifúngicas varia de acordo com o isolado. A capacidade produção de metabólitos secundários é dependente da linhagem e inclui substâncias antifúngicas pertencentes a uma variedade de classes de compostos químicos (PEREIRA, 2009).

A antibiose antecede o micoparasitismo e colonização do hospedeiro e por consequência na competição por espaço na rizosfera, provocando efeitos diversos nas células dos hospedeiros, tais como: retração do plasmalema, quebra de organelas, desintegração do citoplasma e perda de turgor (PEREIRA, 2009).

2.4.2 Micoparasitismo

Parasitismo é a relação nutricional entre dois seres vivos onde o parasita, se alimenta totalmente ou parcialmente às custas do hospedeiro, em casos onde o indivíduo parasitado é um fitopatógeno, o parasita é designado como hiperparasita pois o mesmo é um parasita de um fitoparasita (AMORIM, 2011).

Fungos do gênero *Trichoderma* realizam hiperparasitismo no qual os mesmos são capazes de detectar e localizar o crescimento de hifas de fungos susceptíveis em seu entorno, e presumidamente formam estruturas semelhantes a apressórios e enrolam-se fortemente em toda a extensão do micélio do hospedeiro penetrando na parede celular pelo efeito de quitinases e glucanases, e posteriormente digerindo a hifa. Os fungos atravessam a parede celular do hospedeiro para absorver componentes de alto valor nutricional, substratos com alto peso molecular precisam sofrer hidrólise para formar moléculas menores, com essa finalidade os fungos liberam enzimas extracelulares que, quanto mais diversas e numerosas, proporcionam maiores vantagens no ambiente (MACHADO *et al.* 2012; AMORIM, 2011).

2.4.3 Competição

Na competição o patógeno e o antagonista disputam os mesmos recursos para sobreviver. Sendo assim a aptidão de competir pela ocupação dos locais de infecção do patógeno é um requisito importantíssimo para qualquer agente de controle biológico. O agente biocontrolador tem que ser capaz de se desenvolver de maneira mais eficiente que o patógeno no local da infecção, para que o controle seja adequado. A competição entre o antagonista e o patógeno no solo ou na rizosfera pode, por exemplo, evitar que as estruturas de infecção do patógeno que estão presentes no solo se desenvolvam em contato com a planta (AMORIM, 2011; LUCON, 2014.).

Uma forma natural da planta se defender de microrganismos fitopatogênicos é dificultando o desenvolvimento de tais colônias ao redor de seus tecidos, provocando estresse oxidativo na rizosfera através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Fungos do gênero *Trichoderma sp* possuem proeminente tolerância a estresse oxidativo, fato que confere a possibilidade de competir nestes ambientes com certa vantagem tendo em vista que algumas cepas conseguem tolerar níveis de ROS que outros fungos não toleram (MEYER *et al.* 2019; MORÁN-DIEZ *et al.*, 2010).

A competição se dá através da capacidade de produção enzimática que várias espécies de *Trichoderma* possuem, a capacidade de produção de uma quantidade de enzimas líticas, por exemplo, celulases, glucanases, tanto na via extra quanto intracelular, atribuindo-lhe uma excelente capacidade de degradação de celulose e, inevitavelmente, a degradação das paredes celulares de fungos, tornando-o um potencial competidor. Espécies de *Trichoderma*, acrescentadas ao solo ou aplicadas como tratamento de sementes, crescem rapidamente junto com o sistema radicular, isto é comprovado facilmente através de segmentos de raiz em plantas tratadas em meio ágar. Em solos com grande incidência de compostos à base de celulose há um favorecimento ao aumento da densidade das populações de *Trichoderma sp*. o estado ubíquo do gênero em solos tanto naturais como também naqueles que tiveram modificação agrícola, em todas as partes do mundo, é um fato que corrobora a visão de que essas espécies de fungos possuem uma capacidade de competição interespecífica por recursos naturais muito importante (MEYER *et al.*, 2019; LUCON, 2014).

2.4.4 Indução de crescimento

Relações de simbiose de fungos com plantas foram identificadas em fósseis, há mais de 400 milhões de anos. Tais interações são resultado de uma série de processos biológicos, que sucedem em uma variedade de efeitos benéficos tanto em ecossistemas naturais quanto em

sistemas agrícolas, manifestando fortes efeitos na estrutura da comunidade e na diversidade de organismos associados (MARCHETTI, 2021).

Um incentivo ao uso de *Trichoderma* em controle biológico em defronte a outros agentes biocontroladores é a capacidade que o mesmo possui de promover o crescimento da parte aérea das plantas e o desenvolvimento das raízes. A indução de crescimento nas plantas promovida pela aplicação de *Trichoderma* foi primordialmente associada ao controle de microrganismos fitopatogênicos presentes no solo. Contudo, na ausência de fitopatógenos, esse mecanismo de ação tem sido relacionado à produção de hormônios e metabólitos que melhoram os fatores de crescimento, promovendo maior eficiência no uso de alguns nutrientes e aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes pela planta. Múltiplos trabalhos vêm sendo realizados visando promover a germinação, o crescimento e a produtividade em diversas culturas (MACHADO *et al.* 2012; LUCON 2009).

O *Trichoderma* provoca uma redução dos níveis de etileno (C_2H_4) nas plantas, por intermédio da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase, que degrada o ACC que por sua vez é precursor de etileno (C_2H_4), resultando em maior crescimento das plantas (MEYER *et al.*, 2019). Contreras-Cornejo *et al.* (2009) estudaram o papel da auxina na regulação do crescimento e desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana* após inoculação de *T. virens* e *T. atroviride*, observando as interações fungo-planta. Por fim, constatou-se características fenotípicas relacionadas com auxina, como maior produção de biomassa e estimulação do desenvolvimento das raízes laterais.

A promoção de crescimento pode da mesma forma ser consequência da solubilização de macro e micronutrientes necessários às plantas. Altomare *et al.* (1999) observaram que um isolado de *T. harzianum* teve a capacidade de solubilizar nutrientes a partir dos seguintes compostos como rochas de fosfato (em sua maioria $Ca_3(PO_4)_2$), dióxido de manganês (MnO_2), óxido de ferro (Fe_2O_3) e zinco metálico. Altomare *et al.* (1999) não detectaram a solubilização desses compostos relacionada à acidificação do meio, todavia foi observada a atividade quelante do isolado.

2.5 Fungos de armazenamento

A presença de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, nas sementes e grãos, pode indicar certo grau de deterioração, tal processo é dependente da atividade das variáveis bióticas, que por sua vez, sofrem influência, principalmente, pelas variáveis abióticas, destacando-se entre elas a temperatura e a umidade. A degradação pode ser baixa no início, porém, quando

ocorrem combinações dessas variáveis, podem ser geradas perdas significativas na qualidade dos produtos (DIAS, 2016)

Além dos prejuízos econômicos devido à perda na qualidade ligadas a descoloração dos grãos, reduções nos conteúdos de carboidratos, de proteínas e de açúcares totais e consequentemente na produtividade, durante o processo de colonização dos grãos, muitas espécies de fungos, denominados toxigênicos, podem sintetizar substâncias tóxicas nomeadas como micotoxinas. As micotoxinas são responsáveis por diversos danos à saúde animal e humana, sendo relacionadas até mesmo a alguns tipos de câncer. Entre as espécies que causam grãos mofados, *Aspergillus flavus* são produtoras de aflatoxinas e *Penicillium spp.*, produzem ocratoxinas (SANTIAGO, 2017).

2.5.1 *Aspergillus Flavus*

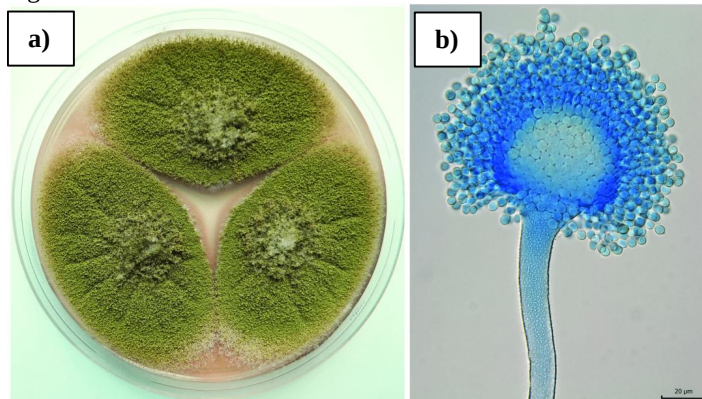
O *Aspergillus* é um gênero de fungos anamórficos conidiais saprófitas muito comuns, que se reproduzem através da produção de fialoconídios. São patógenos fracos que atacam órgãos de reserva vegetal como sementes e frutos causando bolores e mofos nestes órgãos (AMORIM, 2011).

O nome *Aspergillus* foi estabelecido, devido a sua característica microscópica, por Micheli (1729). De acordo com o autor, seu conidióforo se assemelhava a um *apergillum* ou *asperge*, que é um objeto usado pela igreja com o objetivo de aspergir água benta (DIAS, 2016).

Tem boa versatilidade metabólica e habilidade para dispersar seus conídios no ambiente. Podendo manter-se em desenvolvimento mesmo submetidos a condições adversas, como baixa umidade e pouca disponibilidade de água. Dominam especialmente em áreas mais quentes e são mais comuns nos trópicos. Várias espécies de *Aspergillus* têm especial importância para humanos e animais pela sua capacidade de produzir metabólitos tóxicos quando presentes nos alimentos (principalmente, *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. ochraceus*). São mais encontradas como contaminantes de alimentos e outros materiais nas áreas de clima tropical e subtropical. Devido ao fato de se tratar de um patógeno, deve-se apresentar uma maior atenção às práticas durante o armazenamento de sementes não só de milho, mas também amendoim, arroz, feijão, soja e outros grãos. Muitas espécies têm grande capacidade de crescimento e apresentam metabolismo mesmo em baixa atividade (PEREIRA, 2019).

Dentre as espécies isoladas de sementes e grãos, *Aspergillus flavus* é o mais frequente, o mesmo possui uma colônia de coloração verde oliva e os conídios, em geral, apresentando coloração verde amarela (figura 2) (DIAS 2016).

Figura 2- Aspectos morfológicos de *Aspergillus flavus*. a) Visão macroscópica de *Aspergillus flavus* em ágar extrato de levedura Czapek (25 °C, 7 dias); b) Microscopia óptica de *Aspergillus flavus* com lactofenol azul de algodão.



Fonte: PICKOVA, 2021

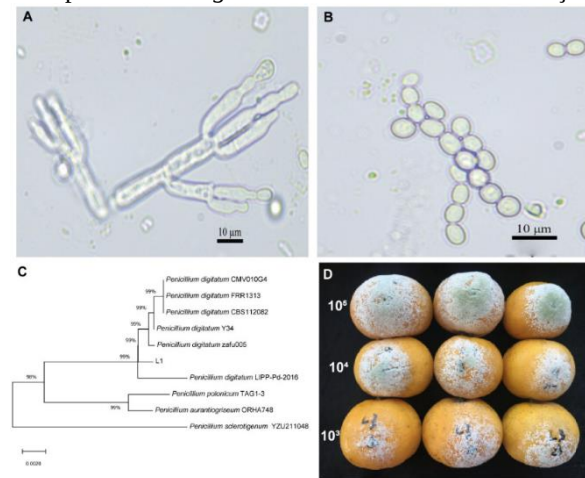
2.5.2 *Penicillium sp*

As espécies do gênero *Penicillium* são altamente prejudiciais às sementes pois se associam-se a condições inadequadas de colheita e armazenamento, podem causar perda do poder germinativo, descoloração e apodrecimento, aquecimento da massa de sementes e produção de micotoxinas (oncratoxina A) (DIAS, 2016).

Borém *et al.* (2006) observaram a ocorrência de *Penicillium* em sementes recém-colhidas, e o aumento do índice de ocorrência ao longo do armazenamento, resultando em uma intensa deterioração das sementes. Os efeitos de patógenos na qualidade das sementes são variáveis e podem ser percebidos durante o processo de germinação e nas fases subsequentes ao desenvolvimento das plantas (MACHADO *et al.*, 2012).

As colônias de *Penicillium*, geralmente, são de crescimento rápido, de coloração esverdeada, às vezes branca, que se constitui, principalmente, de uma massa de conidióforos. As principais características culturais, utilizadas na identificação de espécies de *Penicillium*, são a cor e textura da colônia, taxa de crescimento, tolerância térmica, grau de esporulação, presença de pigmentos solúveis e exsudados. O *Penicillium* se multiplica vegetativamente por conídios produzidos em cadeia em conidióforos que se ramificam na extremidade, lembrando uma vassoura. Estes conídios, após disseminados, produzirão novo micélio (DIAS, 2016).

Figura 3- Características morfológicas de *Penicillium digitatum*. (A) conidióforos; (B) esporos. (C) Árvore filogenética molecular da sequência parcial do gene 18S rRNA de *P. digitatum*. (D) Sintomas da Patogenicidade de esporos de *P. digitatum* em diferentes concentrações em frutas cítricas.



Fonte: LI *et al.*, 2022

2.6 Fungos do gênero *Fusarium* sp

As espécies do gênero *Fusarium* geralmente possuem classificação baseada nas suas características morfológicas. As principais características consideradas para designar espécies são: morfologia da colônia, pigmentação e taxa de crescimento, especificidade de hospedeiros e perfil de metabólitos secundários (PADOVANI, 2010).

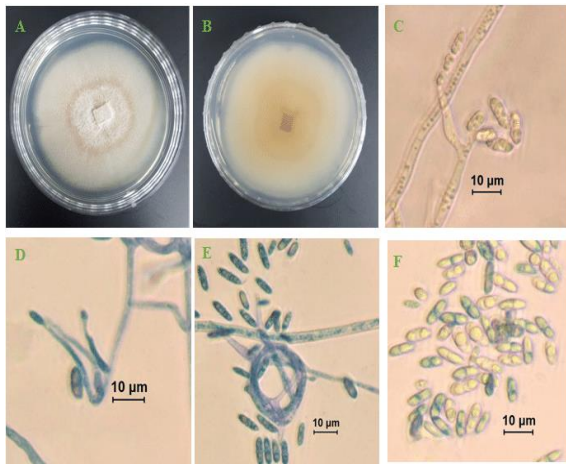
2.6.1 *Fusarium solani*

O fungo *F. solani* corresponde a fase anamórfica (assexual) do ascomiceto *Haematonetria haematococca*, em placas de petri apresenta micélio branco, difuso e abundante, com gotículas de coloração branco leitosa e brilhante formado por hifas bem ramificadas, septadas; dois tipos de conídios: macro e microconídios. Seus microconídios podem ser cilíndricos ou ovais com dimensões de aproximadamente 8-16x2-4 μ . As fiálides apresentam-se longas e eretas, o que representa a principal medida de diferenciação de *F. solani* da espécie similar *F. oxysporum*, que apresenta fiálides curtas. As culturas que mais sofrem com injúrias causadas por este ascomiceto pertencem aos seguintes gêneros: *Allium* sp., *Arachis* sp., *Capsicum*, *Eupatorium*, *Foeniculum*, *Glycine*, *Gossypium*, *Hibiscus*, *Linum*, *Phaseolus* sp., *Sesamum*, *Trifolium*, *Zea* (PADOVANI, 2010; AMORIM, 2011).

Este fungo é o agente causador da podridão radicular seca do feijoeiro, doença que ataca a as plântulas e raízes primárias causando inicialmente estrias longitudinais de coloração avermelhada no hipocótilo e raiz primária de plântulas jovens. Logo em seguida, surgem lesões avermelhadas, de formato irregular, que podem se juntar conforme o desenvolvimento da

doença, tornando-se marrons, tais lesões não possuem margens definidas e se estendem até a parte aérea da planta. É possível observar, na raiz primária, fissuras longitudinais que se tornam necróticas, no entanto a necrose é restrita às células do córtex. As raízes secundárias são geralmente destruídas, podendo haver o desenvolvimento de raízes adventícias acima da área lesionada. Quando a planta consegue desenvolver novas raízes, a produtividade é pouco afetada. No entanto, quando o crescimento das raízes é limitado, o patógeno pode destruir todo o sistema radicular. O resultado é um estande irregular, formado por plantas subdesenvolvidas, com as folhas prematuramente senescentes. Plantas severamente afetadas podem ser facilmente retiradas do solo (KIMATI *et al*, 1997).

Figura 4- Características morfológicas do complexo de espécies *Fusarium solani* A-B: Colônia em PDA; C: Microconídios; D: Macroconídios; E-F: Clamidosporos.



Fonte: HASSAN & CHANG, 2021

2.6.2 *Fusarium oxysporum*

Segundo Agrios (2004), *Fusarium oxysporum* é um fungo que pertence ao Filo *Ascomycota* e a ordem *Hypocreales*. O seu micélio apresenta-se incolor inicialmente, mas conforme o avançar da idade torna-se colorido, podendo expressar as colorações, amarelo pálido, cor-de-rosa pálido, ou um tanto púrpura. O fungo produz três tipos de esporos assexuais, os microconídios, os quais têm uma ou duas células, são os esporos mais frequentes e abundantes produzidos sob todas as circunstâncias, mesmo no interior de plantas infectadas. Os macroconídios são os esporos típicos do gênero *Fusarium sp.*, têm de três a cinco células e possuem extremidades gradativamente curvadas. Os clamidósporos possuem uma ou duas células, possuem esporos arredondados que são produzidos no meio ou na extremidade de um micélio mais velho ou em um macroconídio. Os três tipos de esporos são produzidos nas culturas *in vitro* do fungo e provavelmente no solo, embora somente os clamidósporos possam sobreviver no solo por um longo tempo. O fungo *Fusarium oxysporum* é um habitante do solo

e vive saprofiticamente sobre a matéria orgânica e restos culturais de plantas mortas (PANDOLFO, 2007).

Fusarium oxysporum é o causador de murchas vasculares em diversas culturas como maracujazeiro, tomate, banana e feijão (MONTEIRO, 2004), na murcha do feijoeiro ou podridão basal. O patógeno coloniza o sistema vascular da planta hospedeira, causando amarelecimento e murcha das folhas. Conforme a severidade da doença avança, as folhas secam e caem precocemente. Os sintomas observáveis iniciam-se pelas folhas inferiores progredindo para as superiores. As plantas que são severamente afetadas e cultivadas em locais úmidos apresentam uma massa cotonosa branca ou rosada na parte externa do caule, a qual é composta de micélios e conídios do fitopatógeno. Como consequência da colonização pelo fungo nota-se na região do xilema, manchas de coloração marrom-escuro, que se estendem no caule principal, ramos laterais e pecíolos das folhas (PANDOLFO, 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparo de meio de cultura

Para o preparo dos meios de cultura Batata dextrose ágar (BDA) foi utilizada a metodologia adaptada de Carollo & Santos Filho (2016), na qual foram pesadas 39 g de BDA em pó com auxílio de um Becker, em sequência transferiu-se o mesmo para um erlemeyer contendo 1L de água destilada com auxílio de uma proveta. A solução foi autoclavada a 121° C de temperatura e 1 atm de pressão por vinte minutos. Após resfriamento da solução a mesma foi vertida para placas de petri em uma câmara de fluxo laminar esterilizada (Figura 5).

Figura 5- Preparo da solução de Meio de cultura BDA



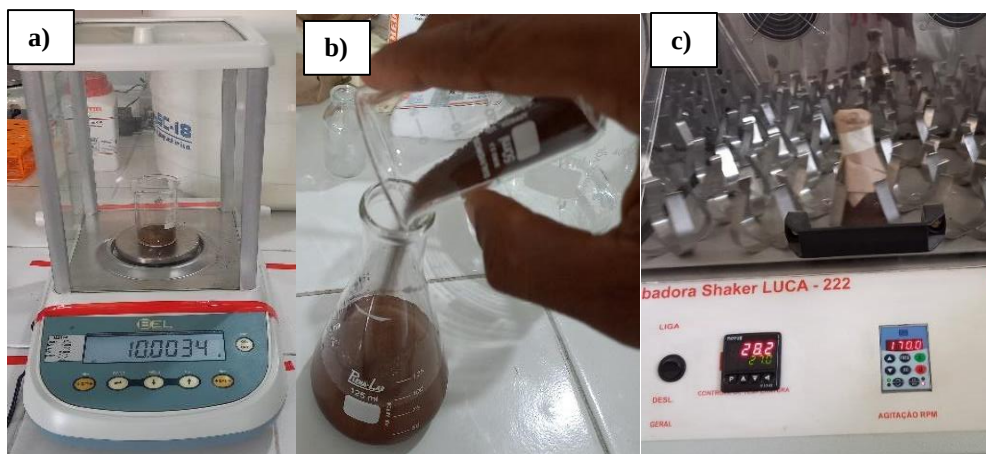
Fonte: Autor

3.2 Isolamento de fungos

Cinco amostras de solo foram coletadas em diferentes áreas de atividade agrícola nas dependências do IFTO-Campus Araguatins (5°38'45.76"S 48° 4'19.57"O), a coleta foi realizada no dia 4 de agosto de 2022, foram selecionadas cinco áreas onde havia a suspeita da presença de fungos do gênero *Trichoderma spp* ou de fungos que têm seu crescimento afetado pela relação antagônica com o mesmo. As amostras foram retiradas a uma profundidade de 0-10 cm no perfil do solo, e armazenadas em temperatura ambiente até o momento da realização das posteriores diluições. As áreas usadas foram as seguintes: canteiros da horticultura, pomar de citros no setor fruticultura, plantio de maracujá também no setor fruticultura, área em pousio, e plantio de mamão no setor fruticultura.

Transferiu-se 10 g de solo destorroado de cada amostra para frascos do tipo erlenmeyer de 250 mL, aos quais foram adicionados 90 mL de água destilada. Após agitação por 40 minutos a 170 rpm em incubadora shaker, quotas de 0,1 mL dessas suspensões foram transferidas para tubos Eppendorf de 1,5 mL, posteriormente iniciando-se as diluições seriadas em água destilada esterilizada (Figura 6).

Figura 6- a) pesagem de solo destorroado; b) solo sendo misturado com água destilada; c) agitação da amostra em incubadora shaker;

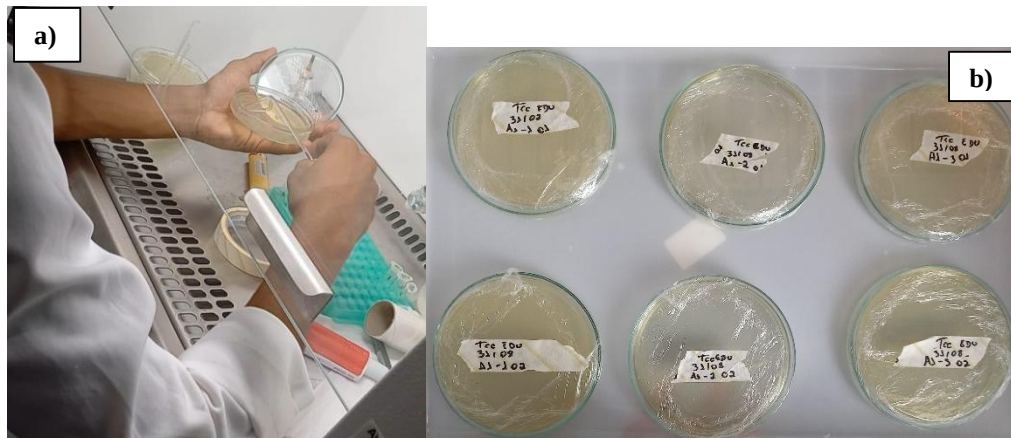


Fonte: Autor

Para o isolamento utilizou-se a metodologia adaptada de Louzada *et al.* (2009). Onde as alíquotas das diluições seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} g de solo/mL de água, foram semeadas em placas de Petri contendo o meio BDA (Batata dextrose ágar). As culturas foram preparadas em duplicata e posteriormente foram transferidas para uma incubadora BOD, onde permaneceram durante sete dias a 25 °C de temperatura e com fotoperíodo de 12 horas (Figura 7). Após esse intervalo de tempo, colônias que se assemelhavam a gêneros de interesse agrícola

foram repicadas para placas de petri contendo meio BDA e mantidas a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas, para obtenção das culturas puras (Figura 8). As características macroscópicas de cada colônia (micélio, pigmentação e esporulação) e microscópicas dos isolados foram analisadas aos cinco dias com auxílio de microscópio óptico, para a identificação de cada gênero.

Figura 7- a) Semeio das diluições em placas de petri; b) Culturas em duplicata.



Fonte: Autor

Figura 8- a) Crescimento observado após sete dias de cultivo em BDA; B) Repicagem de possível fungo de interesse agrícola.



Fonte: Autor

Foram obtidas culturas puras de fungos do gênero *Trichoderma* Sp., 2 do gênero *Fusarium* sp., 7 indivíduos do gênero *Penicillium* Sp. e 5 pertencentes ao gênero *Aspergillus* sp. (Tabela 1).

Em um momento posterior a identificação dos fungos isolados, as culturas puras foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA juntamente ao meio houve o acréscimo de cloridrato de oxitetraclina (100 mg L⁻¹) (Terramicina® - Pfizer) com a finalidade de inibir o crescimento de bactérias no meio. Após a obtenção de culturas puras

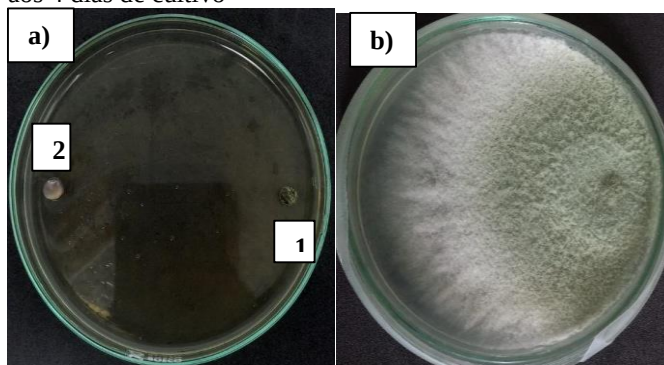
houve o armazenamento das mesmas em incubadoras de crescimento, tipo BOD na temperatura de 25 °C com fotoperíodo de 12 horas, por sete dias, período necessário para o fungo colonizar a placa por inteiro (Dianese *et al.*, 2012).

3.2 Teste De Antagonismo

Após o processo de isolamento dos fungos foi realizado o teste de antagonismo envolvendo o isolado de *Trichoderma sp* obtido e mais 4 isolados fitotoxigêncios selecionados dentre os obtidos. Com isso foram utilizados no experimento um isolado do gênero *Aspergillus flavus*. Um isolado do gênero *Penicillium sp*. E dois isolados do gênero *Fusarium sp* (Figuras 9 – 13). Para fins catalográficos foram estabelecidos códigos de identificação para os isolados utilizados no experimento, sendo FIS33 para o isolado da figura 9, FIS34 para o isolado da figura 10, AIS19 para o isolado da figura 11, PIS25 para o isolado da figura 12, TIS01 para o isolado da figura 13.

Para realizar o experimento de confronto direto foi concretizado o teste de pareamento de culturas descrito por Bomfim *et al.* (2010). Onde foi retirado um disco de meio BDA com 5 mm de diâmetro, proveniente de uma placa do patógeno que foi previamente cultivada por 7 dias em incubadora BOD com fotoperíodo de 12h e temperatura aproximada de 25 °C. Esse disco contendo conídios e micélio foi transferido para uma outra placa de petri de 9 cm de diâmetro contendo meio BDA a 5 mm de distância da borda da placa e na posição diametralmente oposta também foi adicionado um disco de mesmo diâmetro e na mesma distância da borda que continha micélio e conídios do isolado antagonista *Trichoderma sp*. com a mesma idade e cultivado nas mesmas condições do fungo fitopatogênico. A testemunha foi constituída de um disco de *Trichoderma sp*. a distância de 5 mm da borda, no intuito de observar o crescimento do isolado na ausência dos fungos fitotoxigênicos (Figura 14).

Figura 9– Caracterização do teste de antagonismo: a: Pareamento direto de culturas; b: repetição de testemunha aos 4 dias de cultivo



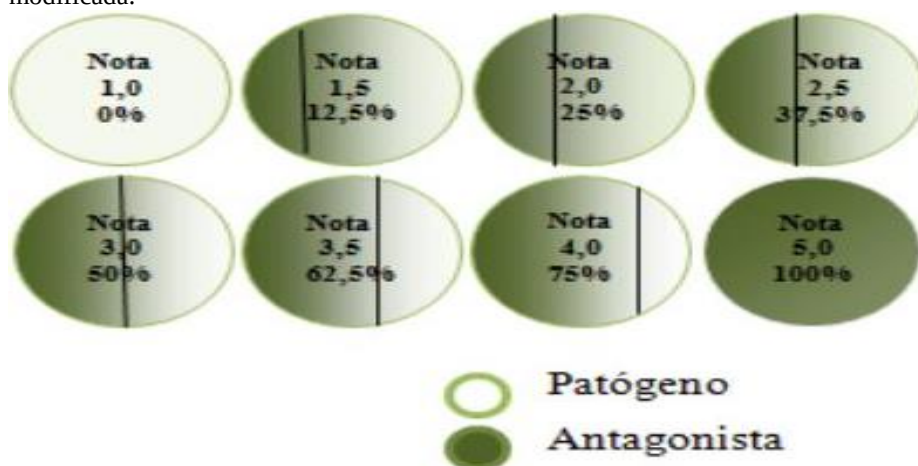
Fonte: Autor

Após a montagem dos pareamentos de confrontação direta, as placas foram conduzidas para incubadora BOD e lá foram mantidas por 7 dias submetidas a uma temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12h de luz diárias. E posteriormente a este período foram realizadas as medições de crescimento do diâmetro usando um paquímetro analógico.

O Experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 5 repetições, onde cada fungo fitopatogênico representa um tratamento e cada placa de petri representa uma repetição. Os dados foram submetidos a análises de variância e as médias das notas e dos diâmetros foram comparadas pelo teste de média Scott e Knott com 5 graus de liberdade. O programa estatístico usado foi o programa estatístico Genes.

O antagonismo dos isolados de *Trichoderma sp.* foi avaliado utilizando-se escala diagramática, para avaliação dos testes de cultura pareada, proposta por Bell *et al.* (1982) modificada por Santos (2018). O isolado foi definido como antagônico ou eficiente no antagonismo quando a nota foi maior que 3,0 (Santos, 2018).

Figura 10- Escala diagramática para avaliação do teste de culturas pareadas, proposta por Bell et al. (1982), modificada.



Fonte: SANTOS, 2018

Foi calculada a percentagem de inibição (% I) dos tratamentos em relação às testemunhas dos fungos fitopagênicos, utilizando a seguinte fórmula:

$$\% I = (C-T)/C \times 100, \text{ em que:}$$

$$\% I = \text{Percentagem de inibição;}$$

C = Diâmetro do crescimento micelial da testemunha;

T = Diâmetro do crescimento micelial do tratamento.

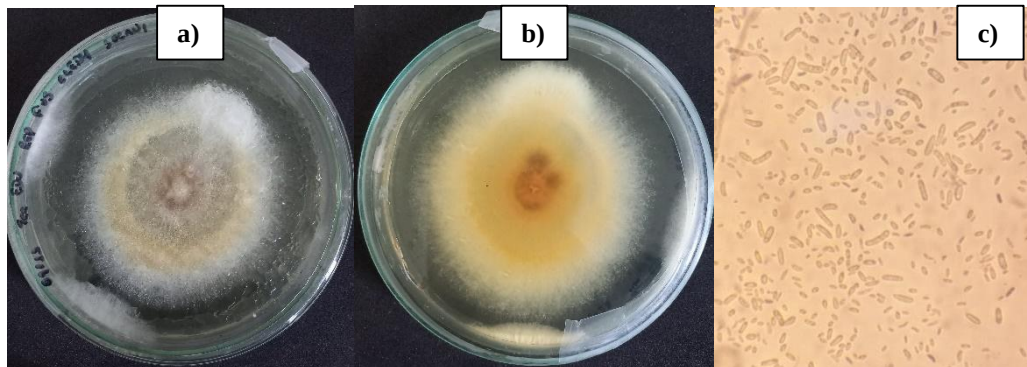
4 RESULTADO E DISCUSSÕES

Os fungos isolados a partir da diluição seriada das amostras de solo coletadas foram identificados até nível de gênero, são eles: *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, e *Trichoderma sp.*

Tabela 1- Origem dos isolados obtidos a partir das amostras de solo.

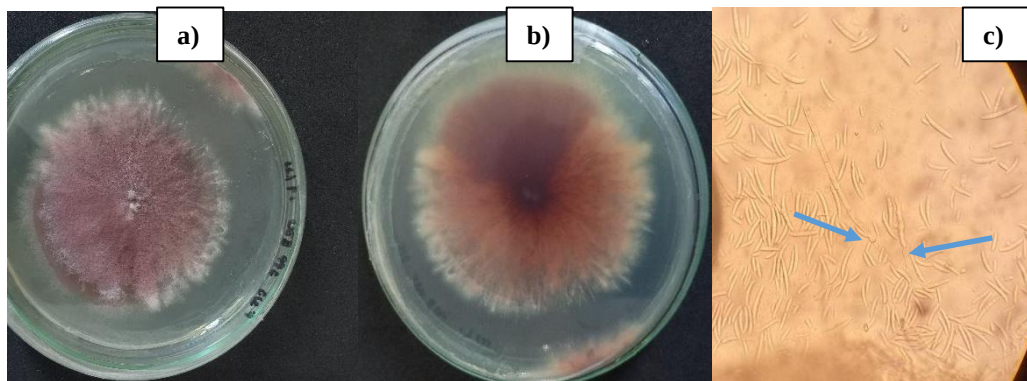
Cultura de Origem	Gênero	Quantidade de Isolados
Horticultura	<i>Aspergillus sp.</i>	4
	<i>Penicillium sp.</i>	1
Citros	<i>Aspergillus sp.</i>	1
	<i>Penicillium sp.</i>	3
Maracujá	<i>Fusarium sp.</i>	1
	<i>Penicillium sp.</i>	1
Pousio	<i>Fusarium sp.</i>	1
	<i>Trichoderma sp.</i>	1
Mamão	<i>Penicillium sp.</i>	1

Figura 11- Isolado apresentando características morfológicas do complexo de espécies *fusarium solani*: a-b: colônia em bda; c: microconídios e macroconídios;



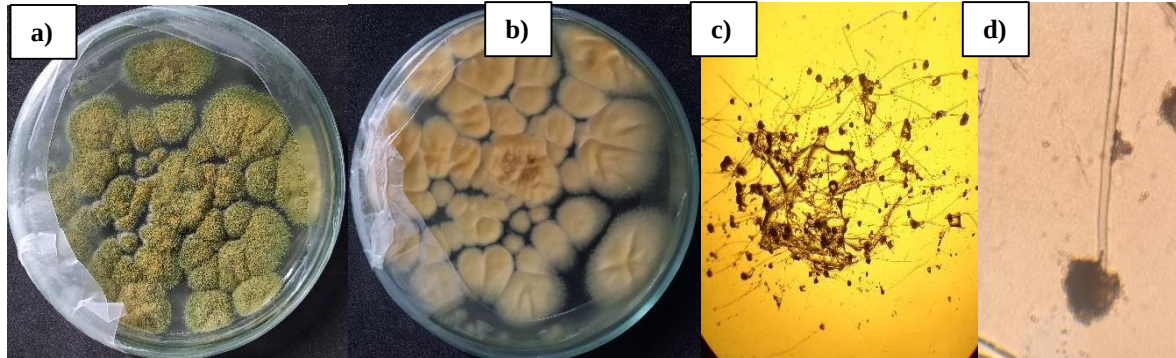
Fonte: Autor

Figura 12- Isolado apresentando características morfológicas do complexo de espécies *fusarium oxysporum*: a-b: colônia em bda; c: microconídios, macroconídios e em destaque fiálides;



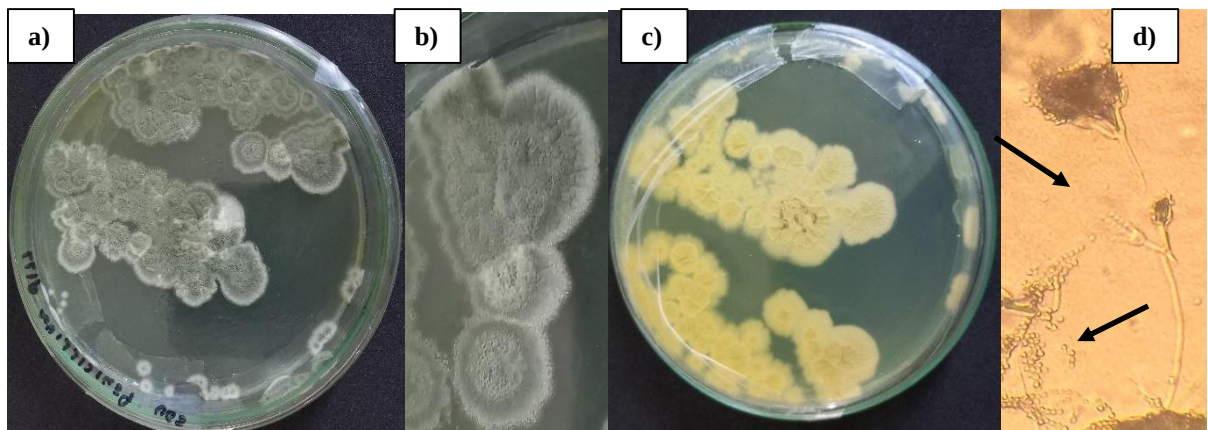
Fonte: Autor

Figura 13- Isolado apresentando características morfológicas do complexo de espécies *Aspergillus flavus*: A-B: Colônia em BDA; C: Conidióforos; D: Conidióforo e conídios.



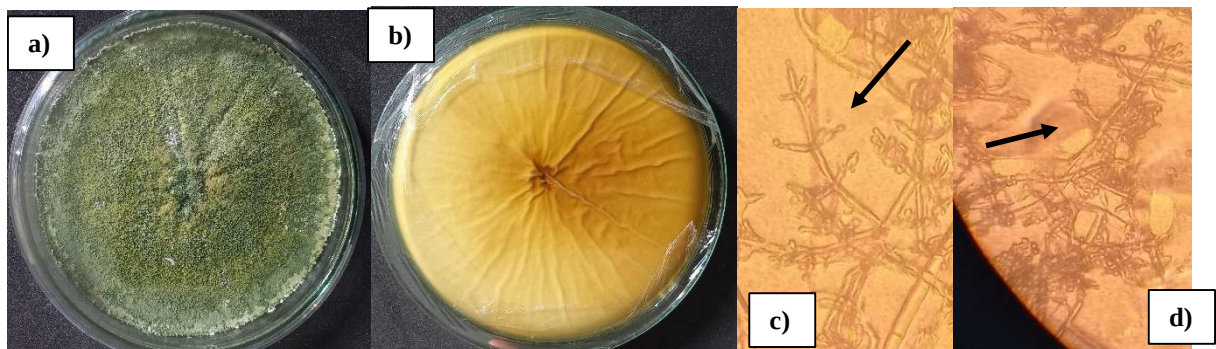
Fonte: Autor

Figura 14- Isolado apresentando características morfológicas do complexo de espécies de *penicillium digitatum*: a-c: cultura em meio BDA aos sete dias após a inoculação; b: detalhe da margem esbranquiçada da cultura; d) conidióforos e conídios característicos do fungo;



Fonte: Autor

Figura 15- Isolado apresentando características morfológicas típicas do gênero *trichoderma* sp.: a-b: colônia em BDA; c-d: conidióforo e conídios;



Fonte: Autor

Nos resultados do teste de antagonismo *in vitro* entre os isolados de *Trichoderma sp.*, contra os isolados fitopatogênicos foi observada interação a nível de 5% de significância, tanto para os resultados de diâmetro da colônia quanto para a variável notas da escala diagramática.

Os valores de CV% (coeficiente de variação) são utilizados para indicar a precisão experimental, vale ressaltar que quanto menor o CV% mais homogêneo é o conjunto de dados, segundo Gomes (1985) valores de CV% inferiores a 10% são considerados baixos, entre 10 a 20% médios, de 20 a 30% altos, e valores superiores a 30% muito altos. Com isso observou-se que os valores CV% obtidos foram 7,69% para a variável notas e 10,67% para variável diâmetro do micélio (mm), indicando precisão experimental nos dois casos.

A acurácia (r) também foi proposta como uma maneira de estimar a precisão experimental (Resende, 2002), a mesma é obtida seguindo a seguinte expressão algébrica: $r = (1-F)^{0.5}$, onde F corresponde ao valor do teste F obtido através da ANOVA para os efeitos dos tratamentos. Resende & Duarte (2007) propuseram uma classificação que consiste no seguinte: valores de até 0,40 são considerados de baixa precisão, valores no intervalo entre 0,50 e 0,65 são considerados de moderada precisão, já valores entre 0,70 e 0,85 são de alta precisão e valores maiores que 0,90 são classificados como de muito alta precisão experimental. Com isto pode-se constatar que o experimento apresentou precisão muito alta para as variáveis em estudo.

Tabela 2- Resumo da análise de variância, para as duas características avaliadas no teste de antagonismo.

Fontes de variação	GL	Quadrados Médios	
		Notas	Diâmetro do micélio (mm)
Tratamentos	4	5,565**	2335.34**
Resíduo	20	0,07	38.66
Medias		3,54	59.84
CV%		7,69	10.67
$r=(1-F)^{0.5}$		0,9937	0,9917

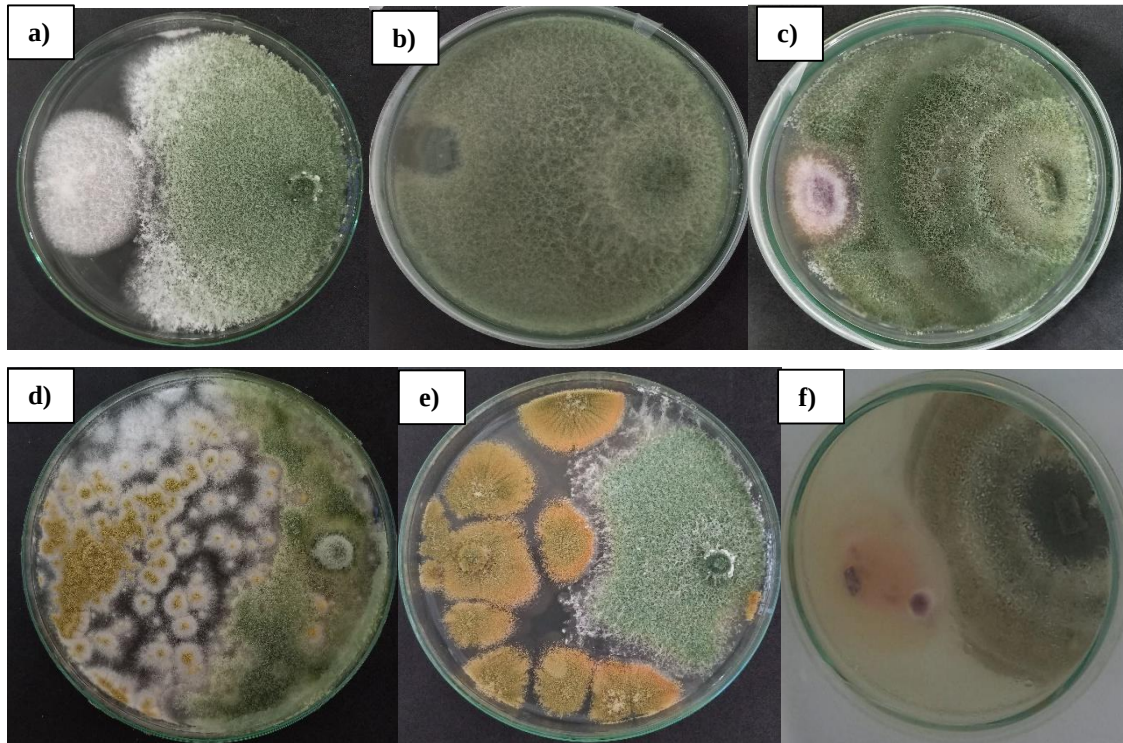
**Significativo pelo teste Scott-Knock a 1% de probabilidade.

Tabela 3- Resumo do teste de médias pelo teste Scott-Knock a 5% de probabilidade para as 2 duas características avaliadas nos 4 fungos isolados nas dependências do IFTO - Campus araguatins

Tratamentos	Características		
	(%) Inibição	Notas	Diâmetro do micélio (mm)
1 - FIS34 x TIS01	70,19	3.6 b	59.0 b
2 - PIS25 x TIS01	80,61	4.0 b	67.6 b
3 - AIS19 x TIS01	39,42	2.1 d	30.2 d
4 - FIS33 x TIS01	57,14	3 c	50.4 c
5 –Testemunha TIS01		5 a	90.0 a

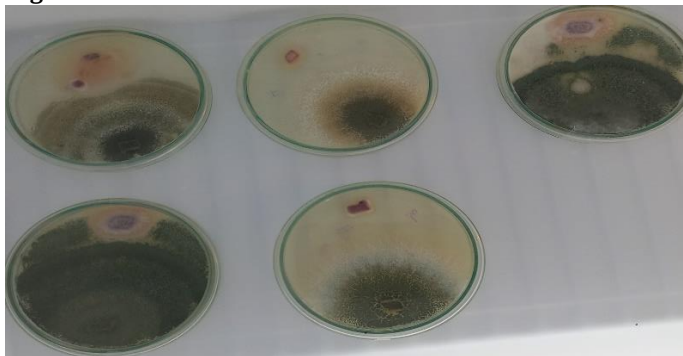
Médias na mesma coluna seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knock a 1% de probabilidade

Figura 16- placas de petri contendo pareamento direto aos 7 dias. a: tratamento 4 (*F. solani*); b: tratamento 2 (*Penicillium sp.*); c-f: tratamento 1 (*Fusarium sp.*); d-e: tratamento 3 (*Aspergillus flavus*);



Fonte: Autor

Figura 17- Tratamento 1 Com Sete Dias Em BOD



Fonte: Autor

Tendo em vista que os tratamentos são qualitativos, e levando em consideração a significância dos mesmos no teste F, faz-se necessário a comparação entre médias pelo teste Scott-Knock a 5% de probabilidade (Tabela 3).

Na tabela 3 e na figura 16 estão apresentados os resultados obtidos, onde é possível observar que as maiores médias foram alcançadas nos pareamentos com os fungos dos gêneros *Penicillium sp.* e *Fusarium sp.* onde os tratamentos 1 e 2 (FIS34 e PIS25) não difeririam

estatisticamente entre si, sendo estes tratamentos onde observou-se o melhor desempenho inibitório do isolado TIS01. As médias com valores mais altos foram observadas no pareamento com *Penicillium sp* (nota 4,0 e 67.6 mm de diâmetro micelial). Tais resultados estão de acordo com o observado nas pesquisas realizadas por Quiroz-Sarmiento *et al.* (2008) e Astorga-Quirós *et al.* (2014) que observaram que cepas de *Trichoderma sp* inibiram significativamente o crescimento micelial de fungos do gênero *Penicillium sp. in vitro*.

Os resultados obtidos nos tratamentos 1 e 4 que são pareamentos com cepas do gênero *Fusarium sp.*, diferiram estatisticamente entre si. Os valores de notas do tratamento 1 estão em conformidade com os observados por Santos (2008) onde os isolados CEN 151, CEN 209, CEN 240 e CEN 523, colonizaram pelo menos dois terços das placas de petri em pareamento realizado entre cepas de *Trichoderma sp* e fungos da espécie *F. oxysporum*.

O tratamento 4 (FIS33xTIS01) apresentou resultados que diferiram estatisticamente dos demais, todavia o isolado TIS01 obteve um desempenho inibitório eficiente em sua ação como antagonista. Em estudo realizado na UFT – Campus Gurupi, Hoffmann *et al.* (2015) verificou que 12 isolados tiveram relação antagônica significativa contra fungos do gênero *Fusarium sp*. A eficiência na inibição do crescimento micelial *in vitro* de *Fusarium solani*, também foi observada por Silva (2011) utilizando as espécies *Trichoderma harzianum*, *T. viride* e *T. longibrachiatum* a autora constatou taxas de inibição na ordem de 42,7 a 69,8%, sendo que os resultados com valores mais próximos dos obtidos no presente estudo foram obtidos nas cepas de *Trichoderma harzianum* (57,9%) e *T. viride* (56,7 e 51,9%).

Quiroz-sarmiento (2008) investigou microscopicamente a ação antagonista de cepas de *Trichoderma sp.* contra duas cepas dos gêneros *Fusarium sp.* e *Penicillium sp.* e constatou que os antagonistas apresentaram tendência a agrupar os conídios de *Fusarium*, causando deformações, septos muito marcados e depois a lise. É importante salientar que o autor observou que ocorreram processos de deformação, enrolamento, estrangulamento, ruptura, fragmentação e lise nos micélios e no conídeos. No pareamento com *Penicillium sp.* notou-se o estrangulamento das fiálides, e a atividade antagônica pode estar relacionada com as rupturas da parede celular causadas mediante a produção de enzimas como quitinases, β -glucanases, ou celulases. Logo o mecanismo de controle utilizado pelo isolado foi micoparasitismo.

O tratamento 3 (AIS19 x TIS01) não apresentou resultados eficientes no desempenho de antagonismo, porquanto as médias de notas não atingiram a nota mínima (3). Os resultados verificados apresentam semelhanças com os de Santos (2018), onde três isolados também não atingiram a nota mínima de inibição (nota 3), verificou-se ainda que os fungos do gênero *Aspergillus sp.* apresentaram maior resistência ao efeito inibitório dos isolados de *Trichoderma*

sp. No entanto, Guédez *et al.* (2009) obteve resultados no teste de pareamento que indicaram efeito antagonista significativo no pareamento de culturas entre *Trichoderma sp.* e *Aspergillus sp.* contrastando assim com resultados obtidos no presente estudo. Logo, é possível constatar que alguns isolados de *Trichoderma sp.* podem não apresentar efeito inibitório eficiente contra *Aspergillus sp.*

Possivelmente, a cepa TIS01 não apresentou efeito inibitório satisfatório em relação ao pareamento com a cepa AIS19, devido ao fato do isolado de armazenamento possuir grande capacidade competitiva por nutrientes e alta capacidade de produção de metabólitos tóxicos, como as aflatoxinas, tornando-os mais resistentes a predação e inibição realizada por fungos antagonistas. Fungos deste gênero normalmente apresentam crescimento micelial rápido, tornando a relação de competição com *Trichoderma sp.* mais equilibrada quando comparada com outros fungos fitopatogênicos, dificultando assim, a relação inibitória no pareamento direto.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cepa TIS01 apresentou efeito antagônico eficiente em três tratamentos (1, 2 e 4), observando-se melhores resultados nos tratamentos 1 e 2 (FIS34, PIS25), assim, pode-se constatar que o mesmo possui potencial para uso em controle biológico contra enfermidades causadas por fungos dos gêneros *Fusarium sp.* e *Penicillium sp.*

Entre os tratamentos inibidos, dois são do mesmo gênero. No entanto o efeito de antagonismo diferiu estatisticamente entre eles, isto nos leva a inferir que a variabilidade genética entre os isolados do gênero *Fusarium spp.* É bem acentuada. Após observação das características macro e microscópicas, foi verificada a semelhança do isolado FIS33 com cepas da espécie *Fusarium Solani*, e a semelhança do isolado FIS34 com cepas da espécie *Fusarium oxysporum*. Entretanto é necessário o uso do sequenciamento molecular para se ter considerável segurança na especiação destes fungos.

Embora o isolado AIS19 tenha apresentado resistência a atividade inibitória do antagonista *in vitro*, em estudos *in vivo*, devido a influência do ambiente, este desempenho pode ser diferente, sendo assim de grande importância a continuidade de pesquisas.

No geral, o isolado de *Trichoderma sp.* foi eficiente no controle de 75% dos fungos utilizados nos testes, abrindo assim uma demanda para futuros testes *in vivo* usando o isolado.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. ed. **Plant Pathology**. Fifth Edition. Academic Press Inc. New York. 2004. 922p.
- ALTOMARE, C. *et al.* Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 65, n. 7, p. 2926–2933, 1999.
- AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. & BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia. Volume 1 - Princípios e Conceitos**. 4ª Edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo. 2011. 704p.
- ASTORGA-QUIRÓS, K. *et al.* Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. **Revista Tecnología en Marcha**, v. 27, n. 2, p. 82, 2014.
- BELL, D.K. *et al.* In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, [s. l.], v. 72, ed. 4, p. 379-382, 1982.
- BENÍTEZ, T. *et al.* Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 249–260, 2004.
- BERNARDO, J. T. *et al.* Isolamento on farm de *Trichoderma*: uma ferramenta no controle de doenças de solo para os agricultores no Brasil. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 263-270, 2019.
- BETIOL, W.; MORANDI M. A. B. Controle Biológico De Doenças No Brasil. In: BETIOL, W.; MORANDI M. A. B. **Biocontrole de doenças e plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 8-14.
- BONETT, L. P.; CORRÊA, M. S. G.; POZZA-JÚNIOR, M. C.; ROSA, T. B.; SILVA, L. I. Antagonismo in vitro de trichoderma spp. contra agente causal da antracnose em feijoeiro comum. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.** [s. l.], v. 8, n. 1, p. 27 – 35, 2013.
- BORÉM, F. M. *et al.* Controle de fungos presentes no ar e em sementes de feijão durante armazenamento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, p. 651-659, 2006.
- BORÉM, A. A. História da biotecnologia. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. [s. l.], a. viii. n. 34, p. 10 – 12, 2005.
- BRESSAN, W.; FIGUEIREDO, J. E. F. **Controle de fusarium moniliforme em sementes de milho por actinomicetos**. Sete Lagoas: 1ª edição, Embrapa milho e sorgo, 2003. p 1 - 4.
- CAROLLO, E. M., SANTOS FILHO, H. P. **Manual básico de técnicas fitopatológicas**. Cruz das Almas - BA: 1ª edição, Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2016. 109 p.
- CONTRERAS-CORNEJO, H. A. *et al.* *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in arabidopsis. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 149, n. 3, p. 1579–1592, 2009.

COSTA, E. C. Sintomas e sinais do bolor verde da laranja (*Citrus sinensis*) causado por *Penicillium digitatum*. 1 setembro 2016. 1 imagem. Disponível em: https://3.bp.blogspot.com/-i_7RnqFdZdI/V8jrTo6BaTI/AAAAAAAAAF1s/rQ3uZorFYLAHmzasRrQDb5sv1ImziAIgCLcB/s640/Erica1.jpg. Acesso em 01 abril 2023.

CRUZ, C. D. **Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen**. FELDENS, L. Homem a Agricultura a História. Univantes. 2018.

DIANESE, A.C.; Blum, L.E.B. & Mello, S.C.M. **Uso de Trichoderma spp. para o manejo da podridão do pé do mamoeiro causada por Phytophthora palmivora Butler**. Planaltina-DF:1ª edição, Embrapa Cerrados, 2012. p. 18

DIAS, I. E. **Interação de Penicillium spp e Aspergillus flavus com sementes e grãos de milho e soja**. 2016. 150 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG. 2016.

GOMES, F. P. **Curso de Estatística Experimental**. 11. ed. Piracicaba, SP: Nobel, p. 466, 1985.

GUEDEZ, C. *et al.* Efecto antagónico de Trichoderma harzianum sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (Fragaria spp). **Rev. Soc. Ven. Microbiol.**, Caracas, v. 29, n. 1, p. 34-38, 2009. Disponível em <http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562009000100007&lng=es&nrm=iso>. Acesso em 05 fev. 2023

HASSAN, O. CHANG, T. Julho 2021. 1 imagem. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/353594379/figure/fig3/AS:1051451656769538@1627697018926/Morphological-characteristics-of-Fusarium-solani-species-complex-isolate-SJB222A-B.ppm>. Acesso em 10 abril 2023.

HOFFMANN, C. A. *et al.* Potencial de antagonismo de isolados de *Trichoderma sp.* contra o isolados de *Fusarium sp.* **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 10, n. 1, p. 236–242. 2015.

HERMOSA, R. *et al.* Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of Trichoderma. In: GUPTA, V. K. *et al.* (Ed.). **Biotechnology and biology of Trichoderma**. Amsterdam: Elsevier, p. 125-137. 2014.

KIMATI, H. *et al.* **Manual de Fitopatologia. Volume 2 - doenças das plantas cultivadas**. 4ª Edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo. 1997. 663p.

LI, Y. *et al.* Developing Penicillium digitatum Management Strategies on Post-Harvest Citrus Fruits with Metabolic Components and Colonization of Bacillus subtilis L1-21. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 1, 2022.

LOUZADA, G. A. S. *et al.* Potencial antagônico de *Trichoderma spp.* originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, Brasília, v. 9, n. 3, p. 145 – 149, 2009.

- LUCON, C. M. M. **Promoção de crescimento de plantas com o uso de *Trichoderma* spp.** 2009. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_1/trichoderma/index.htm>. Acesso em: 26/3/2023
- LUCON, C. M. M. *et al.* **Trichoderma: o que é, para que serve e como usar corretamente na lavoura.** São paulo: Instituto biológico, 2014. p. 7-12.
- MACHADO, D. F. M. *et al.* **TRICHODERMA NO BRASIL: O FUNGO E O BIOAGENTE.** *Revista de Ciências Agrárias*, Santa Maria, v. 35, ed. 1, p. 274-288, 2012.
- MARCHETTI, C. R. **Controle Biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* (lib.) De Bary e Indução de Crescimento de Feijão por Cepas de *Trichoderma* spp. Isoladas de Plantas e Ambiente do Cerrado e Pantanal.** 2021. 136 p. Tese (Doutorado em ecologia.) - Universidade Federal de Mato Grosso Do Sul, Campo Grande, 2021.
- MARTINS, L. S. Biotecnologia e agricultura no Brasil contemporâneo. *Revista UFG*, Goiânia, v. 7, n. 1, 2017. Disponível em: <<https://revistas.ufg.br/revistaufg/article/view/49100>>. Acesso em: 05 fev. 2023.
- MARTINS – CORDER, M. P.; MELO, I. S. Antagonismo in vitro de trichoderma spp. A verticillium dahliae kleb. *Scientia agrícola*, Piracicaba v. 55, n. 1, 1998. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/sa/a/4xSwwkhzZHNfrgRn5MCDVJk/?lang=pt>>. Acesso em 15 fev. 2023
- MEYER, M. C. *et al.* **Trichoderma: uso na agricultura.** P. 166-167. Embrapa, 2019.
- MONTEIRO, A. S. **Análise genômica e sequenciamento automático de rDNA em populações de fusarium oxysporum.** 2004. 126 p. Dissertação (Mestrado em Química; Biotecnologia) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2004.
- MORANDI, M. A. B. Controle biológico de fungos fitopatogênicos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 251, p. 73-82, jul 2009.
- MORÁN-DIEZ, E. *et al.* TvDim1 of *Trichoderma virens* is involved in redox-processes and confers resistance to oxidative stresses. *Current Genetics*, v. 56, n. 1, p. 63-73, 2010.
- PADOVANI, G. A M. Aspectos Gerais e morfológicos do fungo *Fusarium solani*. **Estudos em Doenças de Plantas – IF goiano – Campus Urataí**, Urataí, 2010. Disponível em: <<https://fitopatologia1.blogspot.com/search?q=fusarium+solani>>. Acesso em 24: 10 mar. 2023
- PANDOLFO, J. D. **Associação de *Trichoderma* sp. e fungicidas no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli.** 2007. p. 78, Dissertação (Mestrado em fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2007.
- PARRA, J. R. P. *et al.* **Controle Biológico no Brasil - Parasitoides e Predadores.** P. 1-3. Manole, 2002.

PEREIRA, C. O. F. **Estudo Da Patogenicidade E Controle Biológico De *Fusarium Sp.* Com *Trichoderma Sp.*** 2009. 74 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia.) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2009.

PICKOVA, D.; OSTRY, V.; TOMAN, J. Aflatoxins : History , Significant Milestones , Recent Data on Their Toxicity and Ways to Mitigation. **Toxins**. v. 13, n. 6, p. 1–23, 2021.

RESENDE, M. D. V. de. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes**. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, p. 975, 2002.

RESENDE, M. D. V. de; DUARTE, J. B. Precisão E Controle De Qualidade Em Experimentos De Avaliação De Cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 3, p. 182–194, 2007. Disponível em: <<https://revistas.ufg.br/pat/article/view/1867>>. Acesso em: 24 fev. 2023

SANTIAGO, E. S. *et al.* Incidência de *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.* em grãos de milho em fase experimental de desenvolvimento. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PIBIC/BIC JÚNIOR, 12., 2017, Sete Lagoas. [Trabalhos apresentados]. Sete lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2017.

SANTOS, H. A. **Trichoderma spp. como promotores de crescimento em plantas e como antagonistas a *Fusarium oxysporum***. 2008. P. 94. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

SANTOS, I. S. **Antagonismo de isolados de *Trichoderma* frente a fungos associados a sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L .) Walp.)**. 2018. p. 39 Monografia (Bacharelado em Agronomia) - Universidade Federal Rural Do Semiárido, Mossoró 2018.

SILVA, A. N. **Efeito de produtos químicos e de *trichoderma spp.* No controle de *fusarium solani* do maracujazeiro**. 2011. 55 p. Dissertação (Mestrado em agronomia.) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2011.

TOLEDO – SOUZA, E. D. *et al.* Fusarium wilt incidence and common bean yield according to the preceding crop and the soil tillage system. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 8, p. 1031 – 1037, 2012.

WEINDLING, R. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. **Phytopathology**, v. 24, p. 1153-1179, 1934.