

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *TRICHODERMA* SPP. DO CERRADO TOCANTINENSE E APLICAÇÃO COMO AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO CONTRA O FITOPATÓGENO *SCLEROTINIA SCLEROTIUM*

CHARACTERIZATION OF ISOLATES OF TRICHODERMA SPP. FROM CERRADO OF THE TOCANTINS AND APPLICATION AS A BIOLOGICAL CONTROL AGENT AGAINST THE PHYTOPATHOGEN SCLEROTINIA SCLEROTIUM

CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE TRICHODERMA SPP. DEL CERRADO DE TOCANTINS Y APLICACIÓN COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO CONTRA EL FITOPATÓGENO SCLEROTINIA SCLEROTIUM

Kamila Lourrane Carvalho Alencar¹, Vanice Conceição do Nascimento², Kárita Cristine Rodrigues dos Santos³, Fabyano Alvares Cardoso Lopes^{4*}

¹Laboratório de Microbiologia, Ciências Biológicas, Universidade Federal do Tocantins, Porto Nacional, Brasil, kamilalourrane@uft.edu.br.

²Laboratório de Microbiologia, Engenharia Agrônômica, Instituto Federal do Tocantins, Araguatins, Brasil, vanice.nascimento@uft.edu.br.

³Laboratório de Microbiologia, Ciências Biológicas, Universidade Federal do Tocantins, Porto Nacional, Brasil, karita.cristine@uft.edu.br.

⁴Laboratório de Microbiologia, Ciências Biológicas, Universidade Federal do Tocantins, Porto Nacional, Brasil, flopes@uft.edu.br.

*Correspondência: Laboratório de Microbiologia, Universidade Federal do Tocantins, Rua 3, Quadra 17, S/N Jardim dos Ipês, Porto Nacional, Tocantins, Brasil. CEP:77.500-000. e-mail flopes@uft.edu.br.

Artigo recebido em 15/12/2022 aprovado em 23/03/2023 publicado em 28/04/2023.

RESUMO

O fitopatógeno *Sclerotinia sclerotium*, causador da doença conhecida como mofo-branco acomete diversas culturas agrícolas em todo o mundo, seu alto grau de patogenicidade está associado à formação de escleródios que atuam como mecanismo de resistência e sobrevivência. Considerando a necessidade de métodos que contribuam no desenvolvimento agrícola sem promover danos ao ambiente e a população, os agentes de controle biológico são hoje vistos como um excelente artifício. Fungos do gênero *Trichoderma* são considerados agentes de biocontrole sagazes por apresentarem inúmeros mecanismos com alto potencial antagonico que prejudicam a germinação de esporos, o crescimento das hifas e o desenvolvimento de escleródios e clamidósporo de diversos fitopatógenos. Buscando avaliar a eficiência de isolados de *Trichoderma* spp. provenientes de áreas do Cerrado do Tocantins no biocontrole do fitopatógeno *S. sclerotium* foram realizados testes de pareamento, enzimáticos e de produção de metabólitos secundários. Através dos resultados obtidos, foi possível concluir que o isolado *Trichoderma* spp. 2, oriundo de áreas do Cerrado tocantinense, possui potencial para ser considerado

como um biocontrolador ao fitopatógeno *S. Sclerotiorum*, sendo seu antagonismo mais evidente por meio da produção dos metabólitos secundários voláteis.

Palavras-chave: Enzimas hidrolíticas; Micoparasitismo; Metabólitos secundários.

ABSTRACT

The phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum*, which causes the disease known as white mold, affects several crops worldwide; *Sclerotinia sclerotiorum*'s pathogenicity is associated with the formation of sclerotia that acts as a resistance and survival mechanism. Considering the need for methods that contribute to agricultural development without causing damage to the environment and the population, biological control agents are now seen as excellent artifices. Fungi of the genus *Trichoderma* are considered good biocontrol agents because they have several mechanisms with high antagonistic potential that impair spore germination, hyphal growth, and the development of sclerotia and chlamydospores of various phytopathogens. Seeking to evaluate the efficiency of *Trichoderma* spp. from areas of the Cerrado of Tocantins in the biocontrol of the phytopathogen *S. sclerotiorum*, pairing, enzymatic and secondary metabolite production tests were carried out. Through the obtained results it was possible to conclude that the isolate *Trichoderma* spp. 2 from areas of the Cerrado of Tocantins has a great potential to be considered as a biocontroller for the phytopathogen *S. sclerotiorum* and its antagonism being more evident through the production of volatile secondary metabolites.

Keywords: *Hydrolytic enzymes; Micoparasitism; Secondary metabolites.*

RESUMEN

El fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, causante de la enfermedad conocida como moho blanco, afecta a muchos cultivos agrícolas a nivel mundial, su alto grado de patogenicidad está asociado a la formación de esclerocios que actúan como mecanismo de resistencia y supervivencia. Estimando la necesidad de métodos que contribuyan al desarrollo agrícola sin causar daños al medio ambiente ya la población, los agentes de control biológico son ahora vistos como un excelente artificio. Los hongos del género *Trichoderma* son considerados buenos agentes de biocontrol debido a que poseen numerosos mecanismos con alto potencial antagónico que impiden la germinación de esporas, el crecimiento de hifas y el desarrollo de esclerocios y clamidosporas de diversos fitopatógenos. Buscando evaluar la eficiencia de *Trichoderma* spp. de áreas del Cerrado de Tocantins en el biocontrol del fitopatógeno *S. sclerotiorum*, se realizaron pruebas de apareamiento, enzimáticas y de producción de metabolitos secundarios. A través de los resultados obtenidos se pudo concluir que el aislado *Trichoderma* spp. 2, procedente de áreas del Cerrado de Tocantins, tiene potencial para ser considerada como biocontroladora del fitopatógeno *S. sclerotiorum*, siendo más evidente su antagonismo a través de la producción de metabolitos secundarios volátiles.

Descriptores: *Enzimas hidrolíticas; Micoparasitismo; Metabolitos secundarios.*

INTRODUÇÃO

O consumo de agrotóxicos no Brasil é bastante difundido, principalmente entre os agricultores ligados às monoculturas. De acordo com o relatório emitido pelo Ministério da Saúde, desde 2008, o Brasil tem sido o maior consumidor de agrotóxicos em todo o mundo (ALMEIDA, 2014). Seguindo essa mesma linha de consumo, Almeida (2014) relata que em 2012 o estado do Tocantins ocupou o

segundo lugar no ranking de consumo de agrotóxicos entre os estados da região Norte, sendo a aplicação desses químicos associada às monoculturas de soja, milho algodão e cana-de-açúcar. A grande utilização dos agroquímicos se dá pelo seu impacto na produtividade das culturas, entretanto, os efeitos colaterais causados pelo uso desses produtos tornam suas vantagens não notáveis (AMARAL *et al.*, 2016). Diversos trabalhos ressaltam ainda a ineficiência dos fungicidas em combate as estruturas de resistências fúngicas (escleródios e clamidósporos) presentes no solo das lavouras contaminadas (BREWER e LARKIN, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2003; TSROR e PERETZ-ALON, 2005).

Pensando em mecanismos de defesa sustentáveis contra os patógenos que atingem as culturas agrícolas, o controle biológico tem alcançado grande destaque devido ao emprego de organismos ou microrganismos vivos que reduzem ou eliminam um ou vários patógenos presentes nas plantas sem causar danos ao vegetal (COOK e BAKER, 1983; OWNLEY *et al.*, 2010; ALABOUVETTE e STEINBERG, 2006). Essas ações antagonistas podem ser empreendidas de inúmeras maneiras, entre elas pode-se destacar: o micoparasitismo, que por meio da secreção de enzimas hidrolíticas conseguem decompor a parede celular do fungo antagonista; a competição, seja ela por espaço ou nutrientes; e a produção de metabólitos que interferem no desenvolvimento da praga-alvo (BETTIOL, 2001). Vale ressaltar ainda que os Agentes de Controle Biológicos (ACBs) podem ser manuseados de forma direta (o antagonista é inserido de forma viva) ou de maneira indireta (introdução apenas os metabólitos liberados pelo ACB) (LAZZARETTI e BETTIOL, 1997; GRIGOLETTI JÚNIOR *et al.*, 2000; DI PIERO e GARDA, 2008; MORANDI e BETTIOL, 2009). Dentre os diversos ACBs já aplicados em campo, os fungos do gênero *Trichoderma* estão entre os mais comercializados e estudados (BENÍTEZ *et al.*, 2004).

Com traços fenotípicos de nítida percepção, o gênero *Trichoderma* abrange espécies de crescimento colonial rápido, com micélios brancos, conídios verdes e habitats diversificados, da rizosfera à parasitas de fungos macroscópicos (ABREU e PFENNING, 2019). Pertencentes ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes e família Hypocreaceae, os isolados do gênero *Trichoderma* são fungos mesófilos, apesar de estarem distribuídos em todo globo terrestre (MACHADO *et al.*, 2012; ABREU e PFENNING, 2019).

A absorção de nutrientes do gênero *Trichoderma* se dá por intermédio das suas hifas que ao secretarem enzimas hidrolíticas viabilizam sua entrada na parede celular do hospedeiro para, assim, desfrutarem dos substratos de alto peso molecular, logo que suceda a hidrólise (MONTE *et al.*, 2019). Os organismos do gênero *Trichoderma* possuem um amplo número de genes que codificam diferentes enzimas, tais como a β -glicanase (enzima que atua na degradação das glicanas), N-acetilglicosaminidase (NAGase), quitinase (enzimas que atuam na degradação da quitina) e protease (enzima que degrada proteínas), sendo traços que identificam o micoparasitismo como um caráter ancestral do

gênero (KUBICEK *et al.*, 2011; LOPES *et al.*, 2012). O micoparasitismo permite ao *Trichoderma* uma nutrição biotrófica e saprófita, assim, por meio desse artifício as enzimas secretadas pelos fungos do gênero *Trichoderma* impedem a germinação de esporos, o crescimento das hifas e o desenvolvimento de escleródios e clamidósporos de diversos patógenos (DRUZHININA *et al.*, 2018; MONTE *et al.*, 2019).

Ampliando seu papel antagonico, as espécies do gênero *Trichoderma* contam com a produção de metabólitos secundários que apresentam propriedades antibióticas e ao atuarem em conjunto com as enzimas hidrolíticas potencializam a eficácia do controle biológico inibindo o crescimento populacional de muitos patógenos, tais como espécies dos gêneros *Fusarium*, *Sclerotinia* e *Rhizoctonia* (HERMOSA *et al.*, 2014; MONTE *et al.*, 2019).

Diversos estudos relatam o uso do *Trichoderma* como ACB para o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, conhecido popularmente como o agente causador do mofo-branco que acomete diversas culturas em todo o mundo estando a soja como uma das monoculturas mais afetadas, sendo que sua conduta patológica pode levar a incidência de perda de até 70% na produtividade da cultura (MEYER *et al.*, 2016; MEYER *et al.*, 2017; MEYER *et al.*, 2018). O alto grau de patogenicidade da espécie *S. sclerotiorum* pode ser associado à sua capacidade de formar escleródios que atuam como mecanismo de resistência e sobrevivência podendo continuar viáveis por até mais de 10 anos. Quando em ambiente favorável os escleródios germinam, dão origem a novas colônias e contaminando as plantas ao seu redor (LEITE, 2005; HENSON *et al.*, 1999; BOLTON *et al.*, 2006).

Pesquisas sobre o potencial antagonico do gênero *Trichoderma* podem contribuir com o cenário socioeconômico tocantinense, visto que a agricultura é uma das principais fontes econômicas do estado. Entre as monoculturas cultivadas no Tocantins destaca-se a soja, evidenciando a necessidade de estudos que contribuam para a minimização do impacto que o patógeno *S. sclerotiorum* causa nessas lavouras. Portanto, a procura de novos ACBs que combatam ao *S. sclerotiorum* é fundamental para a obtenção de um menor emprego dos agroquímicos e da utilização mais racional dos recursos naturais. O objetivo do presente estudo é realizar o isolamento de novos isolados de fungos do gênero *Trichoderma* provenientes de áreas do Cerrado tocantinense com potencial uso contra o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados utilizados

Foram utilizados os organismos *Trichoderma harzianum* isolado ALL-42, *Trichoderma asperelloides* isolado TR-356 e o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, cedidos pelo Laboratório de Enzimologia – UFG, Goiânia (GO). Além dos isolados citados, outros dois isolados do gênero

Trichoderma também foram utilizados no estudo, sendo estes oriundos da coleta em áreas do Cerrado tocantinense realizada pelo Laboratório de Microbiologia – UFT, Porto Nacional (TO), e nomeados como *Trichoderma* spp. 1 e *Trichoderma* spp. 2. Todos os isolados foram mantidos em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) sólido a 24 °C, com a realização de novos repiques quinzenalmente.

Coleta e isolamento de novos fungos do gênero *Trichoderma*

Para a obtenção de novos isolados de fungos do gênero *Trichoderma*, foi realizado a coleta em áreas de plantio de açaí no Cerrado tocantinense situada na fazenda Natyrë Agrícola, Lagoa da Confusão – TO (-10.792104524669709, -49.7834063455589). Foram extraídas amostras do solo, da rizosfera e das raízes de plantas, sendo as amostras acondicionadas à temperatura de 4 °C para evitar perda da viabilidade no traslado do local de coleta ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Tocantins – Campus Porto Nacional/TO. O isolamento das colônias fúngicas do gênero *Trichoderma* presentes nas amostras coletadas, baseou-se na técnica descrita por Gams e Bissett (1998) com alterações.

Teste de pareamento

Em uma das extremidades da placa de Petri medindo aproximadamente 13,5 cm contendo meio BDA sólido, foi inserido um disco de ágar (5 mm de diâmetro) contendo micélio do fitopatógeno *S. sclerotiorum* e incubado até tomar 1/3 (um terço) da placa, cerca de dois dias. Após o crescimento do fitopatógeno, foi adicionado o disco de ágar (5 mm de diâmetro) do isolado de *Trichoderma* spp., depositados na extremidade oposta e armazenados em temperatura de 25°C por mais sete dias. Todo o teste foi realizado em triplicata (MELLO *et al.*, 2007).

A eficiência dos isolados perante o teste de pareamento foi baseada na escala de Bell *et al.* (1982), que se baseia em uma escala de um a cinco, onde o isolado que obtivesse uma nota inferior ou igual a 3,0 foi classificado como eficiente. As notas da escala de Bell *et al.* (1982) foram dadas de acordo com a análise do crescimento final do isolado de *Trichoderma*, sendo a mesma classificada conforme demonstra a Tabela 1. Por fim, as notas obtidas dos isolados foram comparadas por Teste T ($\alpha = 0,05$) no programa estatístico Sisvar®.

Tabela 1. DETERMINAÇÃO DA ESCALA DE BELL *ET AL.* (1982) EM RELAÇÃO À PLACA DE PETRI DE 13,5 CM.

Escala	Crescimento micelial em cm do isolado de <i>Trichoderma</i>
1	13,5 – 10,8
2	10,7 – 8,1
3	8,0 – 5,4
4	5,3 – 2,7
5	2,6 – 0

Teste da produção de metabólitos secundários

Metabólitos voláteis

Baseado no método descrito por Bharat *et al.* (1980), com modificações no tempo de incubação, o teste para análise da inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *S. sclerotiorum* por meio da produção de metabólitos voláteis de isolados de *Trichoderma* spp. consistiu na disposição frontal de duas partes inferiores de placa de Petri de, aproximadamente, 5 cm contendo meio BDA sólido, onde na placa inferior foi inserido o disco de ágar (5 mm) do isolado de *Trichoderma* e na placa superior foi inserido o disco de ágar (5 mm) do fitopatógeno *S. sclerotiorum*. Foi produzida, também, uma placa contendo apenas o disco de ágar do fitopatógeno servindo de controle para o teste. Por fim, as placas que foram acondicionadas por sete dias à 25°C. O teste foi realizado em triplicata e os dados obtidos foram comparados por análise de variância e Teste Tukey ($\alpha = 0,05$) no programa estatístico Sisvar®.

Metabólitos não voláteis

Consistiu na preparação de 50 mL de meio BDA líquido, em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, acrescido de 0,25 g de glicose e, em alguns frascos, 0,5% de micélio macerado de *S. sclerotiorum*. O meio de cultura foi autoclavado e após resfriado inoculou-se a solução de 10^7 de esporos de isolados de *Trichoderma* spp. em todos os frascos de Erlenmeyer. Os frascos foram mantidos em agitação constante de 150 rpm por 120 horas em temperatura de 28 °C e, em seguida, recolheu-se o sobrenadante por meio de filtragem a vácuo. Foi adicionado 10 mL do sobrenadante a 60 mL de meio BDA sólido, contendo 1,2 g de glicose, em frasco de Erlenmeyer de 150 mL que foi autoclavado e vertido em três placas de Petri. Discos de 5 mm foram coletados de colônias ativas do fitopatógeno e inseridos às placas de Petri, que foram incubados a 27 °C por sete dias (FRIGHETTO e MELO, 1995). O crescimento controle foi usado como referência. Todo o teste foi realizado em três repetições e após finalizados os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) e Teste Tukey ($\alpha = 0,05$) no programa estatístico Sisvar®.

Produção de micélios do fitopatógeno *S. sclerotiorum*

Em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 300 mL de meio MYG [Extrato de malte 0,5%, extrato de levedura 0,25%, glicose 1,0%] foram inseridos discos de ágar (5 mm de diâmetro) contendo micélio do fitopatígeno *S. sclerotiorum*, para induzir a produção de massa micelial do mesmo. Os frascos de Erlenmeyer foram incubados em rotação constante de 180 rpm, a 24 °C por seis dias. Os micélios foram filtrados a vácuo, lavados, secados em estufa (65 °C *overnight*), macerados e armazenados a -20 °C.

Indução da produção de enzimas dos isolados de *Trichoderma* spp. frente ao *S. sclerotiorum*

Realizou-se o método descrito por Lopes *et al.* (2012), no qual 20 mL de meio TLE [Bactopeptona 1,0 g/L, Ureia 0,3 g/L, KH₂PO₄ 2 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1,4 g/L, MgSO₄ 0,3 g/L, CaCl₂ 0,3 g/L, glicose 3 g/L, solução elementos traços (0,1%) 1 mL/L] foi colocado em frasco de Erlenmeyer de 125 mL acrescido com 0,5% de micélio macerado do fitopatígeno *S. sclerotiorum* e levado para esterilização em autoclave (em temperatura de 121 °C, pressão 110 kPa durante 20 minutos). Após o resfriamento do meio, foi adicionado à solução de 10⁷ esporos dos isolados de *Trichoderma*. O recipiente foi conservado em agitação constante de 120 rpm por 48 horas à 28 °C. Em seguida, a solução foi filtrada a vácuo para a extração do sobrenadante, que foi armazenado em tubos cônicos do tipo Falcon e congelado para posterior leitura proteica e enzimática. Todo o teste foi realizado em três replicas para cada isolado de *Trichoderma*.

Dosagem de proteínas totais

Aplicou-se a técnica apresentada por Bradford (1976), usando a albumina de soro bovino como padrão para o reagente de Bradford. O teste consistiu na mistura de 100 µL do sobrenadante e 1 mL do reagente de Bradford. Após 15 minutos em temperatura ambiente, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro à 595 nm.

Dosagem das atividades enzimáticas

N-acetil-glicosaminidase (NAGase)

Procedeu-se com a metodologia descrita por Ulhoa e Peberdy (1992), com modificações, no qual 50 µL da amostra foi incorporado à 350 µL de solução tampão de acetato de sódio 50 mM pH 6,0 e a 100 µL de solução pnp-NAG 5 mM. Após 15 minutos em repouso a 37 °C, foi acrescentado a preparação 1 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M para realizar a leitura em espectrofotômetro à 405 nm. Uma unidade enzimática (U) foi estabelecida como quantia necessária para

gerar 1 μmol de ρ -nitrofenol por minuto. Os dados foram comparados por análise de variância e Teste Tukey ($\alpha = 0,05$) no programa estatístico Sisvar®

Quitinase

Inicialmente foi preparada a quitina coloidal, sua purificação foi realizada por meio da adição de 3 g de quitina à 30 mL de HCl 37% (v/v) e mantidos sob agitação constante por 50 minutos à 350 rpm. Em seguida, 1 L de água destilada gelada foi inserido à solução que foi centrifugada por 15 minutos à 7.000 rpm para remoção da quitina purificada (*pellet*). O *pellet* foi lavado com água destilada até o sobrenadante apresentar pH 5,0 (LIU *et al.*, 2014).

A atividade de quitinase foi realizada seguindo a metodologia de Wirth e Wolf (1992), com adaptações. Em tubos de ensaio, 50 μL de amostra foram inseridos juntamente com 150 μL de quitina coloidal 1% em tampão acetado de sódio 50 mM pH 5,5. A mistura permaneceu em repouso durante 2 h em banho-maria à 35 °C. Foi acrescentado 1 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (ADNS) e fervido por cinco minutos. Após resfriada, a solução foi levada para leitura em espectrofotômetro à 540 nm. Uma unidade enzimática (U) foi estabelecida como quantia necessária para gerar 1 μmol de açúcar redutor por minuto. Os dados foram comparados por análise de variância e Teste Tukey ($\alpha = 0,05$) no programa estatístico Sisvar®.

β -1,3-glicanase

A dosagem foi realizada de acordo com Bara *et al.* (2003), com alterações, no qual 50 μL da amostra foi incorporado a 100 μL de laminarina 0,25% em solução tampão de acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e aquecidos à 40 °C por 30 minutos. Após ao período de incubação, foi acrescentado 1 mL de ADNS e a mistura foi fervida por cinco minutos e lida em espectrofotômetro à 540 nm. Uma unidade enzimática (U) foi estabelecida como quantia necessária para gerar 1 μmol de açúcar redutor por minuto. Os dados foram comparados por análise de variância e Teste Tukey ($\alpha = 0,05$) no programa estatístico Sisvar®.

Protease

Para aferir a atividade de protease, seguiu-se a metodologia descrita por Cabral *et al.* (2004), com modificações. Foram utilizados 200 μL de amostra, 500 μL de azocaseína 0,25% em solução tampão Tris-HCl 50 mM pH 5,0, em microtubos do tipo *ependor*. e mantidos em banho-maria por 15 minutos à 37 °C. Em seguida, 700 μL de ácido tricloroacético (TCA) 20% foi incorporado à mistura e levada para centrifugação por 15 minutos à 12.000 rpm. Por fim, transferiu-se 1 mL da solução para tubos de ensaio acrescidos de 200 μL de solução de NaOH 3 M e foi realizada à leitura da absorbância

em espectrofotômetro à 440 nm. Uma unidade enzimática (U) foi estabelecida como quantia necessária para aumentar 1 abs por minuto. Os dados foram comparados por análise de variância e Teste Tukey ($\alpha = 0,05$) no programa estatístico Sisvar®.

Celulase

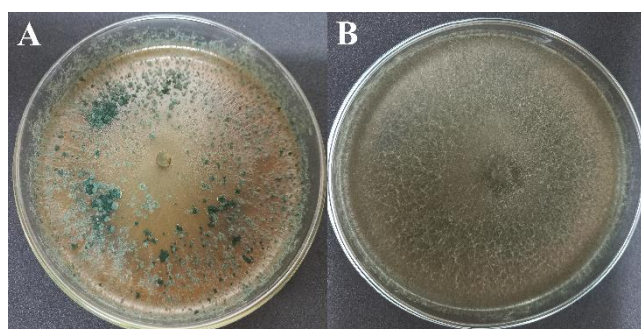
A atividade de celulase foi medida através da inserção de 10 mg de papel filtro (discos de 5 mm), em tubos de ensaio, seguidos da adição de 100 μ L da amostra e 100 μ L da solução tampão acetado de sódio 50 mM pH 5,0. A mistura permaneceu em banho-maria por 60 minutos à 50 °C. Posteriormente, foi inserido 1 mL de ADNS e fervida a solução por cinco minutos (MANDELS *et al.*, 1976). Uma unidade enzimática (U) foi estabelecida como quantia necessária para gerar 1 μ mol de açúcar redutor por minuto. Os dados foram comparados por análise de variância e Teste Tukey ($\alpha = 0,05$) no programa estatístico Sisvar®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Novos isolados de *Trichoderma* spp.

Após a realização da coleta e proceder com as técnicas de isolamento, obteve-se como resultado o isolamento de dois novos isolados do gênero *Trichoderma*, sendo denominados como *Trichoderma* spp. 1 (Figura 1 A) e *Trichoderma* spp. 2 (Figura 1 B). Os novos isolados foram identificados por meio de suas características fenotípicas que, de acordo com o observado, se enquadram dentro do gênero, tais como a presença dos conídios verdes e o rápido crescimento das colônias.

Figura 1. NOVOS ISOLADOS DE *TRICHODERMA* SPP. ORIUNDOS DE ÁREAS DO CERRADO TOCANTINENSE CONSERVADOS EM MEIO BDA. (A) *TRICHODERMA* SPP. 1. (B) *TRICHODERMA* SPP. 2.



O isolado *Trichoderma* spp. 1, crescido em meio BDA sólido, tem por característica micélios brancos e delgados, de crescimento linear e conídios de coloração verde. O nível de esporulação do

Trichoderma spp. 1 é baixo, quando comparado com os demais isolados estudados. O isolado *Trichoderma* spp. 2, crescido em meio BDA sólido, apresenta traços como micélios brancos com crescimento linear ou em forma de halos, presença de micélios aéreas que posteriormente se diferenciam em “ilhas” de conídios na tonalidade verde.

Teste de pareamento

Após a realização do teste de pareamento dos isolados de *Trichoderma* spp. em confronto com o fitopatógeno *S. sclerotiorum* (Figura 2), foi possível perceber que todos os isolados demonstraram capacidade antagonista ao fitopatógeno, apresentando notas abaixo de três na escala de Bell *et al.* (1982), sendo assim, pode-se afirmar que o crescimento micelial dos antagonistas se sobressaíram ao crescimento do fitopatógeno, sendo que os isolados de *Trichoderma* atingiram cerca de 60% a 80% do total da placa de Petri.

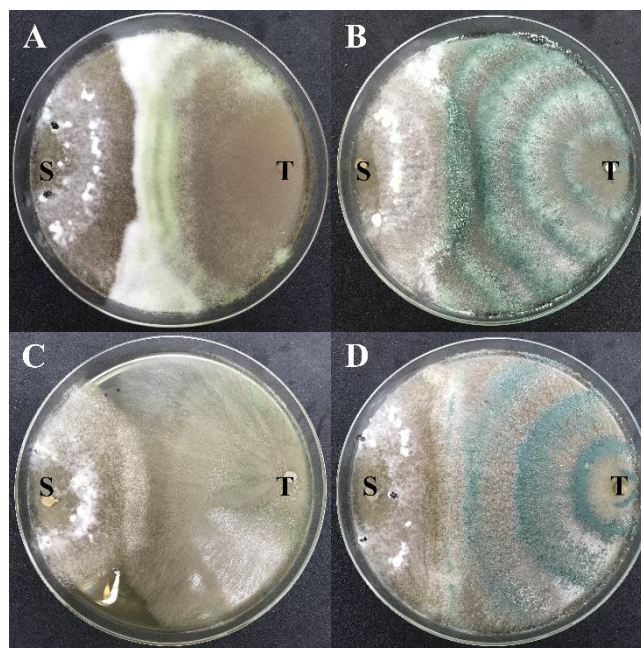
Tabela 2. ANÁLISE COMPARATIVA DA EFICÁCIA DOS ISOLADOS DE TRICHODERMA SPP. FRENTE AO FITOPATÓGENO *S. SCLEROTIORUM* PERANTE O TESTE DE PAREAMENTO COM NOTAS BASEADAS NA ESCALA DE BELL *ET AL.* (1982).

ISOLADOS	EFICIÊNCIA DO ISOLADO SEGUNDO ESCALA DE BELL <i>et al.</i> (1982)	
<i>T. harzianum</i> ALL-42	2,0 ± 0,0	a
<i>T. asperelloides</i> TR-356	2,0 ± 0,0	a
<i>Trichoderma</i> spp. 1	2,5 ± 0,7	a
<i>Trichoderma</i> spp. 2	2,0 ± 0,0	a

Almança *et al.* (2019) e Conto *et al.* (2021) observaram a capacidade inibitória de isolados do gênero *Trichoderma* spp. para distintos fitopatógenos, incluindo o *S. sclerotiorum*, por meio do confronto direto porque, conforme explica a análise ecofisiológica realizada por Druzhinina *et al.* (2018), as espécies pertencentes ao gênero *Trichoderma* tendem a ser hábeis parasitas de oomicetos e de fungos fitopatogênicos.

Gabardo *et al.* (2020) observaram que quando em confronto direto *in vitro* com o *S. sclerotiorum* os isolados de *Trichoderma* spp. não formam halo de inibição, havendo contato entre o antagonista e o patógeno, conforme pode ser observado na Figura 2, no entanto, alguns são capazes de inibir a formação dos escleródios resultado observado nos isolados *T. asperelloides* TR-356 e *Trichoderma* spp. 1.

Figura 2. TESTE DE PAREAMENTO *IN VITRO* ENTRE OS ISOLADOS DE *TRICHODERMA* SPP. E O FITOPATÓGENO *S. SCLEROTIORUM*, APÓS SETE DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO DE CULTURA BDA. (A) FITOPATÓGENO E *T. HARZIANUM* ALL-42. (B) FITOPATÓGENO E *T. ASPERELLOIDES* TR-356. (C) FITOPATÓGENO E *TRICHODERMA* SPP. 1. (D) FITOPATÓGENO E *TRICHODERMA* SPP. 2. S = *S. SCLEROTIORUM* E T = *TRICHODERMA*.



Teste de produção de metabólitos secundários voláteis e não voláteis

Os metabólitos secundários trata-se de inúmeros compostos químicos ligados ao desenvolvimento e interação do *Trichoderma* com outros organismos, entretanto, não são primordiais para o desenvolvimento e crescimento do fungo. Contudo, a presença desses metabólitos torna-se preeminente para a colonização e conquista de habitats (RAMADA *et al.*, 2019). Herbert (1989) e Vinale *et al.* (2014) descrevem os metabólitos secundários como elementos de baixo peso molecular, tendo seu emprego biotecnológico muito estimado nas áreas agrícolas e industriais.

Por meio da aplicação do teste para verificação da inibição do crescimento micelial do fitopatógeno através da produção de metabólitos voláteis por isolados de *Trichoderma* spp., foi possível observar que todos os antagonistas tiveram sucesso na inibição do crescimento micelial do *S. sclerotiorum* quando comparado com o controle (Tabela 3). Os isolados *T. harzianum* ALL-42 e *Trichoderma* spp. 2 foram os que alcançaram um maior grau de inibição do crescimento do fitopatógeno através do confronto indireto pela produção de metabólitos voláteis. Entretanto, quando avaliados a inibição por metabólitos não voláteis de isolados de *Trichoderma* spp. para inibir o crescimento de *S. sclerotiorum*, verificou-se a ineficiência da ação antagonônica (Tabela 4).

Tabela 3. PRODUÇÃO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS DE ISOLADOS DE *TRICHODERMA* SPP. FRENTE AO *S. SCLEROTIURUM*.

TRATAMENTO	CRESCIMENTO MÉDIO DO FITOPATÓGENO (CM)	
Controle	5,20 ± 0,00	d
<i>T. harzianum</i> ALL-42	2,47 ± 0,29	a
<i>T. asperelloides</i> TR-356	3,51 ± 0,20	b
<i>Trichoderma</i> spp. 1	3,98 ± 0,07	c
<i>Trichoderma</i> spp. 2	2,45 ± 0,04	a

Abreu e Junior (2000) ressaltam que o efeito antibiótico através da liberação de metabólitos voláteis é uma característica muito comum nos isolados pertencentes ao gênero *Trichoderma*. Conto *et al.* (2021) que verificaram a eficiência de sete isolados de *Trichoderma* spp. em inibir o crescimento do *S. sclerotiorum* por meio dos metabólitos voláteis. Gabardo *et al.* (2020) constataram a eficiência inibitória do *Trichoderma asperellum* para diversos fitopatógenos por intermédio dos metabólitos voláteis.

Apesar da produção de metabólitos não voláteis por isolados de *Trichoderma* spp. não apresentarem resultado eficientes em inibir o *S. sclerotiorum* nesse estudo, Marques *et al.* (2018) demonstraram que é possível retardar o avanço micelial de *S. sclerotiorum* através dos metabólitos não voláteis produzidos por isolados de *Trichoderma*.

Tabela 4. PRODUÇÃO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS DE ISOLADOS DE *TRICHODERMA* SPP. FRENTE AO *S. SCLEROTIURUM*.

ISOLADOS DE <i>TRICHODERMA</i>	CRESCIMENTO MÉDIO DO FITOPATÓGENO EM MEIO BDA (CM) CONTROLE		CRESCIMENTO MÉDIO DO FITOPATÓGENO EM MEIO BDA (CM) METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS	
<i>T. harzianum</i> ALL-42	8,00 ± 0,56	a	8,36 ± 0,28	a
<i>T. asperelloides</i> TR-356	2,74 ± 0,65	a	3,26 ± 0,34	a
<i>Trichoderma</i> spp. 1	7,96 ± 0,35	a	7,17 ± 0,58	a
<i>Trichoderma</i> spp. 2	7,14 ± 1,19	a	6,58 ± 0,49	a

Vinale e Sivasithamparam (2020) acreditam que as espécies associadas ao gênero *Trichoderma* são vistas como as principais produtoras de metabólitos secundários relevantes para a agricultura, uma

vez que suas ações antagônicas promovem resistência ao vegetal contra os fitopatógenos como também induzem o crescimento da planta.

Dosagem das atividades enzimáticas

N-acetil-glicosaminidase (NAGase) e quitinase

Os isolados estudados secretaram enzimas quitinolíticas que são fundamentais para a degradação da quitina presente nos micélios do fitopatógeno *S. sclerotiorum* (Figura 3 A e B). Segundo Ulhoa e Peberdy (1991), a degradação integral da quitina presente na parede celular do hospedeiro ocorre por meio da ação hidrolíticas de NAGase e quitinase. Foi verificado que a maior atividade específica para NAGase foi observada na indução com o isolado *T. harzianum* ALL-42 (5,06 U/mg) e para quitinase as maiores atividade específicas foram vistas nos isolados *Trichoderma* spp. 2 (0,52 U/mg) e *T. asperelloides* TR-356 (0,40 U/mg).

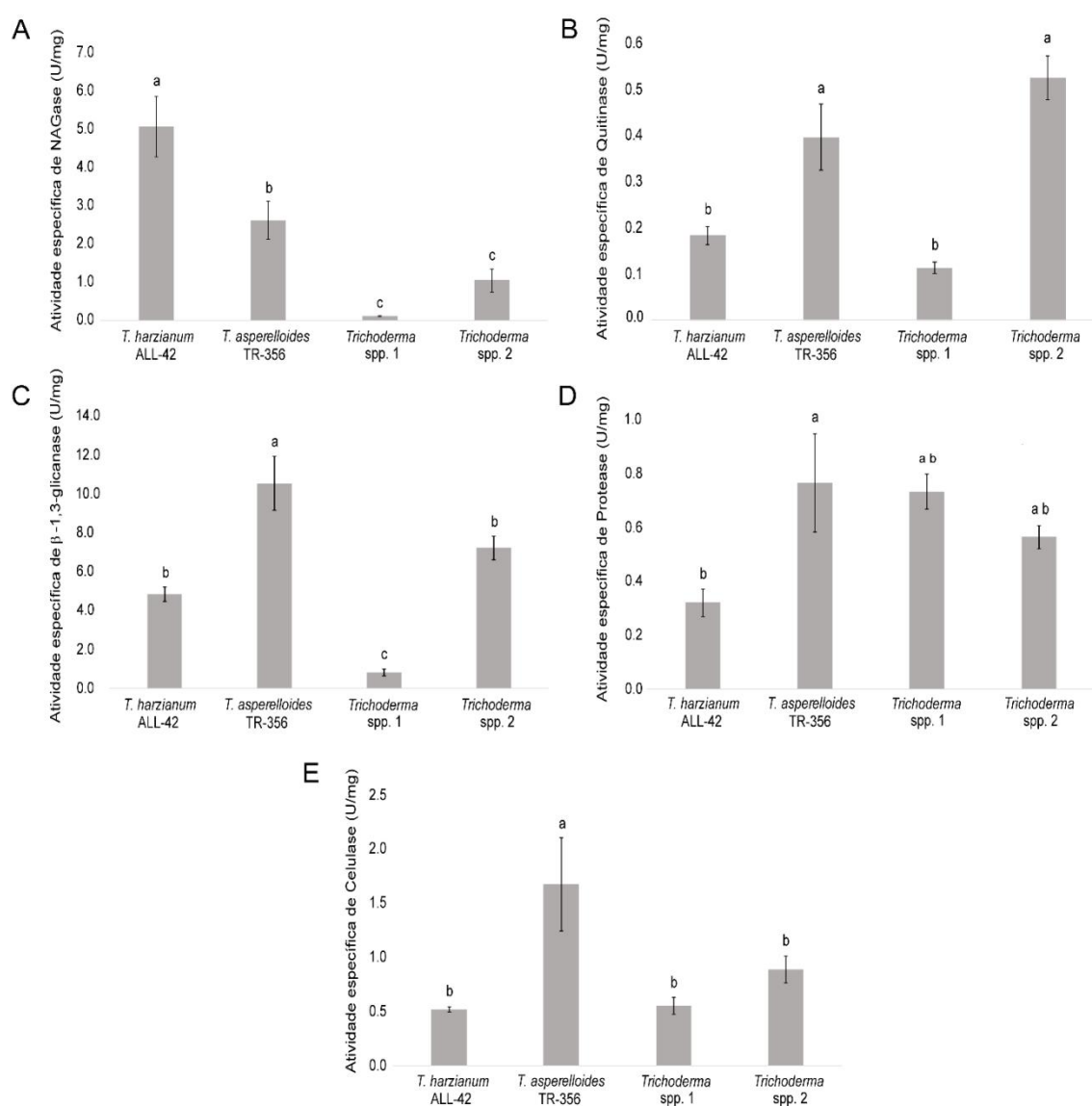
Guilger-Casagrande *et al.* (2019) notaram que o crescimento micelial do fitopatógeno *S. sclerotiorum* é controlada de modo mais efetivo quando as atividades de NAGase e quitinase, produzidas por isolados de *Trichoderma* spp. são mais altas. Para Silva *et al.* (2019), as atividades hidrolíticas de NAGase e quitinase são fundamentais na escolha de isolados do gênero *Trichoderma* para o uso como agentes biocontroladores de fitopatógenos.

β -1,3-glicanase

Foi apontado por Gruber e Seidl-Seiboth (2012) que o segundo composto mais presente na parede celular dos fungos é o polissacarídeo β -1,3-glicana, sendo que a hidrólise do polímero é efetuada pela enzima β -1,3-glicanase, deixando como produto a glicose. Portanto, a eficácia do micoparasitismo realizado pelo gênero *Trichoderma* está intimamente relacionado com a sua capacidade de produção dessa enzima como também das enzimas vista anteriormente. A β -1,3-glicanase desempenha, ainda, função morfológica e age na ausência de carbono e energia (ADAMS, 2004; PITSON *et al.*, 1993).

As maiores atividades específicas para β -1,3-glicanase na presença de micélio do fitopatógeno *S. sclerotiorum* foi observada no isolado *T. asperelloides* TR-356 (10,55 U/mg), contudo, os isolados *Trichoderma* spp. 2 (7,22 U/mg) e *T. harzianum* ALL-42 (4,83 U/mg) também tiveram desempenho considerável para uma futura aplicação biotecnológica ou afim (Figura 3 C). A secreção da β -1,3-glicanase por fungos do gênero *Trichoderma* acontece no decorrer do processo de infecção com o objetivo de hidrolisar as β -1,3-glicanas presentes na parede celular do hospedeiro o que potencializa o controle biológico (CHALLACOMBE *et al.*, 2019; JAVERIA *et al.*, 2020; FERREIRA, 2018).

Figura 3. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE ISOLADOS DE *TRICHODERMA* SPP. FRENTE AO FITOPATÓGENO *S. SCLEROTIORUM*. (A) ATIVIDADE ESPECÍFICA DE NAGASE. (B) ATIVIDADE ESPECÍFICA DE QUITINASE. (C) ATIVIDADE ESPECÍFICA DE B-1,3-GLICANASE. (D) ATIVIDADE ESPECÍFICA DE PROTEASE. (E) ATIVIDADE ESPECÍFICA DE CELULASE.



Estudos relatam que a ação de enzimas como a β -1,3-glicanase é mais expressa quando em presença da parede celular de fitopatógenos como o *S. sclerotiorum* reafirmando a importância da expressão dessa enzima para o micoparasitismo (NAOUM, 2022; FERREIRA, 2018).

Proteases

As proteases são as enzimas responsáveis pela hidrólise das proteínas presentes na parede e na membrana celular do hospedeiro (GRUBER e SEIDL-SEIBOTH, 2012; SUÁRES *et al.*, 2007). As ações hidrolíticas das proteases são fundamentais no processo de degradação da parede celular de fungos e nematódeos de solo e o emprego do isolado do *T. harzianum* ESALQ-1306., hábil na produção dessa enzima, pode ser observado no biofungicida TRICHODERMIL SC que tem como praga-alvo o *S. sclerotiorum* além de outros fitopatógenos (BETTIOL *et al.*, 2019). No entanto, neste ensaio os testes mostraram que o isolado *T. asperelloides* TR-356 foi o que apresentou a maior atividade específica para proteases (0,77 U/mg) quando em contato com micélio do fitopatógeno *S. sclerotiorum*, ainda assim os isolados *Trichoderma* spp.1 (0,73 U/mg) e *Trichoderma* spp. 2 (0,56 U/mg) foram também considerados bons indutores para essa atividade específica (Figura 3 D).

As proteases em conjunto com as glicanases e as enzimas quitinolíticas promovem as espécies de *Trichoderma* alto grau de antagonismo por meio do micoparasitismo e sua expressão torna-se mais significativa quando em presença da parede celular do fitopatógeno *S. sclerotiorum* (NAUOM *et al.*, 2018; NAOUM, 2022).

Celulase

Mesmo a celulose não sendo um composto presente na parede celular dos fungos, a verificação da atividade específica de celulase se faz importante devido sua aplicação biotecnológica como produção de bioetanol, papel e materiais têxtil, tendo assim grande visibilidade econômica (LYND *et al.*, 2002 e BUCHERT *et al.*, 1998).

Silva *et al.* (2011) e Tiwari, Misra e Sangwan (2013) citam que dentro do gênero *Trichoderma* existem espécies capazes de produzir a enzima celulase, tal ação pode ser observada nos quatro isolados em estudo. De acordo com os resultados, todos os isolados apresentaram atividade para essa enzima (Figura 3 E). Todavia, a atividade específica para celulase com presença da parede celular do fitopatógeno *S. sclerotiorum* foi mais evidente no isolado *T. asperelloides* TR-356 (1,68 U/mg).

Além do potencial biotecnológico visado para a atividade da celulase, a hidrólise da celulose presente na parede celular vegetal propicia à planta resistência à fungos fitopatogênicos, pois acredita-se que a celulase pode acionar o sistema de defesa do vegetal (SARROCCO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2019, SARAVANAKUMAR *et al.*, 2016; BILESKY-JOSÉ *et al.*, 2021).

CONCLUSÃO

Neste estudo foi realizado o isolamento e identificação de dois novos isolados do gênero *Trichoderma*, sendo eles *Trichoderma* spp. 1 e *Trichoderma* spp. 2, ambos oriundos de áreas do Cerrado do Tocantins.

Dentre os isolados de *Trichoderma* spp. estudados, verificamos que todos tiveram resultados positivos na inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *S. sclerotiorum* por meio da produção de metabólitos voláteis, sendo que os isolados *T. harzianum* ALL-42 e *Trichoderma* spp. 2 foram os que apresentaram melhores resultados quando comparado com os demais isolados utilizados. Já no teste de produção de metabólitos não voláteis não foi percebido nenhuma inibição significativa do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* com nenhum dos isolados de *Trichoderma* spp. em estudo.

O isolado *T. asperelloides* TR-356 teve maior eficiência na síntese das enzimas hidrolíticas responsáveis pela degradação da parede celular do fitopatógeno *S. sclerotiorum*. Com isso, pode-se sugerir que dentre os isolados oriundos de coletas do Cerrado tocantinense, o isolado *Trichoderma* spp. 2, pode ser visto como um potencial agente de controle biológico ao fitopatógeno *S. sclerotiorum* e que estudos mais abrangentes sobre a atuação desse isolado devem ser realizados.

AGRADECIMENTO

Nós agradecemos, em especial, ao Sr. Wilson Grison, proprietário da fazenda Natyrê Agrícola, Lagoa da Confusão – TO por permitir a coleta do material estudado. Kamila Lourrane Carvalho Alencar agradece a bolsa de Iniciação Científica - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Vanice Conceição do Nascimento agradece a bolsa de estudos provida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Kárita Cristine Rodrigues dos Santos agradece a bolsa de Iniciação Científica UFT/CNPq. Fabyano Alvares Cardoso Lopes agradece o suporte provido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Tocantins (FAPT).

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L.M; PFENNING, L.H. O gênero *Trichoderma*. In: MEYER, M.C.; MAZARO, S.M; DA SILVA, J.C. ***Trichoderma: uso na agricultura***. Embrapa. Brasília, DF. p. 163-179, 2019.

ABREU, M.S.; JUNIOR, M.L. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. ***Ciências e agrotecnologia***. Lavras, v.24, n.2, p.521-526, 2000.

ADAMS, D.J., Fungal cell wall chitinases and glicanases. ***Microbiology***, Reading, v. 150, n.7, p.2029-2035, 2004.

ALABOUVETTE, C.; STEINBERG, C. The soil as a reservoir for antagonists to plant diseases. In: EILENBERG, J.; HOKKANEN, H.M.T., eds. **An ecological and societal approach to biological control**. Dordrecht, the Netherlands: Springer. p. 123-144, 2006.

ALMEIDA, M.D. Relatório: vigilância em saúde de populações expostas a agrotóxicos no estado do Tocantins. **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador**. Brasília, p. 1-17, 2014. Disponível em: < <http://www.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/08/Relat--rio--Tocantins.pdf> >. Acesso em 29 de maio de 2020.

ALMANÇA M.A.K.; TONELLO, J.C.; RUSIN, C.; BOTELHO, R.V. Uso do *Trichoderma* na cultura da uva. In: MEYER, M.C.; MAZARO, S.M; DA SILVA, J.C. **Trichoderma: uso na agricultura**. Embrapa. Brasília, DF. Cap. 26, p. 507-520, 2019.

AMARAL, L.O.; GUARDA, P.M.; GUALBERTO, L.S.; GUARDA, E.A. Panorama da utilização de agroquímicos em cultura de abacaxi no estado do Tocantins e possíveis problemas de contaminação. **Revista Desafios**. v. 03, n. Especial, p. 70-79, 2016 (Suplemento).

BARA, M.T.F.; LIMA, A.L.; ULHOA, C.J. Purification and characterization of an exo- β -1,3 glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 219, n. 1, p. 81-85, 2003.

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

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

BETTIOL, W. Métodos Alternativos para o Controle de Doenças de Plantas. In: MICHEREFF, S.J.; BARROS, R. **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: UFRP, Imprensa Universitária, p. 123-139, 2001.

BETTIOL, W.; PINTO, Z.V.; SILVA, C.J.; FORNER, C.; FARIA, M.R.; PACIFICO, M.G.; COSTA, L.S.A.S. Produtos comerciais à base de *Trichoderma*. In: MEYER, M.C.; MAZARO, S.M; DA SILVA, J.C. **Trichoderma: uso na agricultura**. Embrapa. Brasília, DF. Cap. 2, p. 45-160, 2019.

BHARAT, R.; SINGH, V.N.; SINGH, D.B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. **Plant and Soil**, v.57, p.131-135, 1980.

BILESKY-JOSÉ, N. MARUYAMA, C.; GERMANO-COSTA, T.; CAMPOS, E.; CARVALHO, L.; GRILLO, R.; FRACETO, L.F.; LIMA, R. Biogenic α -Fe₂O₃ Nanoparticles Enhance the Biological Activity of *Trichoderma* against the Plant Pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **ACS Sustainable Chemistry e Engineering**, v. 9, n. 4, p. 1669-1683, 2021.

BOLTON, M.D.; THOMMA, B.P.H.J.; NELSON, B.D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**. v. 7, p. 1-16, 2006.

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

BREWER, M.T, LARKIN, R.P. Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. **Crop Protection**. v. 24. p. 939-950, 2005.

BUCHERT, J.; OKSANEN, T.; PERE, J.; SIIKA-AHO, M.; SUURNÄKKI, A.; VIKARI, L. Applications of *Trichoderma reesei* enzymes in the pulp and paper industry. In: HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. *Trichoderma and Gliocladium*. v. 2. London: Taylor and Francis, London, p. 343–363, 1998.

CABRAL, C.M.; CHERQUI, A.; PEREIRA, A.; SIMÕES, N. Purification and characterization of two distinct metalloproteases secreted by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus* sp. strain Az29. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 7, p. 3831-3838, 2004.

CHALLACOMBE, J. F., HESSE, C. N., BRAMER, L. M., MCCUE, L. A., LIPTON, M., PURVINE, S., NICORA, C., GALLEGOS-GRAVES, V., PORRAS-ALFARO, A., & KUSKE, C. R. Genomes and secretomes of Ascomycota fungi reveal diverse functions in plant biomass decomposition and pathogenesis. *BMC Genomics*, v. 20, n. 1, p. 976, 2019.

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

COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St Paul: American Phytopathological Society, 539, p., 1983.

DI PIERO, R.M.; GARDA, M.V. Quitonasa reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 43, n. 9, p. 1121-1128, 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.; KOPCHINSKLY, A.G.; HENRISSAT, B.; KUO, A.; HUNDLEY, H.; WANG, M.; AERTS, A.; SALAMOV, A.; LIPZEN, A.; LaBUTTI, K.; BARRY, K.; GRIGORIEV, I.V.; SHENG, 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*. v. 14, n. 4, e1007322, 2018.

FERREIRA, G.A. **Análise comparativa de glicanas e quitinas da parede celular de espécies de *Trichoderma* e a relação desses polissacarídeos no pareamento com fitopatógenos**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde), Universidade Estadual do Goiás, Programa de Pós-Graduação Mestrado Acadêmico em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde, Anápolis, 60 p., 2018.

FRIGHETTO, R.T.S.; MELO, I.S. Produção de antibióticos por microrganismos. In: MELO, I.S.; SANHUEZA, R.M.V., coords. **Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos: manual técnico**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, p. 40-46, 1995.

GABARDO, G.; PRIA, M.D.; PRESTES, A.M.C; SILVA, H.L. *Trichoderma asperellum* e *Bacillus subtilis* como antagonistas no crescimento de fungos fitopatogênicos in vitro. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v. 6, n. 8, p. 55870-55885, 2020.

GAMS, W.; BISSETT, J. Morphology and Identification of *Trichoderma*. In: KUBICEK, C.P.; HARMAN, G.E. Eds., *Trichoderma and Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics*. London: Taylor& Francis Led, v. 1, p. 3–34, 1998.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SANTOS A.F.; AUER, C.G. Perspectiva do uso do controle biológico conta doenças florestais. *Floresta*. 30:155-165, 2000.

GRUBER, S.; SEIDL-SEIBOTH, V. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. **Microbiology**, v. 158, n. 2, p. 26–34, 2012.

GUILGER-CASAGRANDE, M.; GERMANO-COSTA, T.; PASQUOTO-STIGLIANI, T.; FRACETO, L.F.; LIMA, R. Biosynthesis of silver nanoparticles employing *Trichoderma harzianum* with enzymatic stimulation for the control of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Scientific Reports**. v. 9, n. 14351, 9 p., 2019.

HENSON, J.M.; BUTLER, M.J.; AND DAY, A.W. The dark side of mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**. v. 37, p. 447-471, 1999.

HERBERT, R.B. The biosynthesis of secondary metabolites. New York: **Springer Science & Business Media**, p. 232, 1989.

HERMOSA, R.; CARDOZA, R.E.; RUBIO, M.B.; GUTIÉRREZ, S.; MONTE, E. Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma*. In: GUPTA, V.K.; SCHMOLL, M.; HERRERA-ESTRELLA, A.; UPADHYAY, R.S.; DRUZHININA, I.; TUOHY, M. (Ed.). **Biotechnology and biology of Trichoderma**. Amsterdam: Elsevier. p. 125-137, 2014.

JAVERIA, S.; KUMAR, A.; KHARKWAL, A.C.; VARMA, A.; SRINIVASA, N.; SHARMA, P. Evaluation of rhizospheric *Trichoderma* species strains for producing cell wall degrading and defense related enzymes in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. lentis. **Indian Phytopathology**. v. 73, p. 461-467, 2020.

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.; MUKHERJEE, M.; KREDICS, L.; ALCARAZ, L.D.; AERTS, A.; AN-TAL, S.; ATANASOVA, L.; CERVANTES-BADILLO, M.G.; CHALLACOMBE, J.; CHERTKOV, O.; MCCLUSKEY, K.; COULPIER, F.; DESHPANDE, N.; HANS VON DÖHREN, H. von; EBBOLE, D.J.; ESQUIVEL-NARANJO, E.U.; FEKETE, E.; FLIPPHI, M.; GLASER, F.; GÓMEZ-RODRÍGUEZ, E.Y.; GRUBER, S.; HAN, C.; HENRISSAT, B.; HERMOSA, R.; HERNÁNDEZ-OÑATE, M.; KARAFFA, L.; KOSTI, I.; LE CROM, S.; LINDQUIST, E.; LUCAS, S.; LÜBECK, M.; LÜBECK, P.S.; MARGEOT, A.; METZ, B.; MISRA, M.; NEVALAI-NEN, E.; OMANN, M.; PACKER, N.; PERRONE, G.; URESTI-RIVERA, E.E.; SALAMOV, A.; SCHMOLL, S.; SEIBOTH, B.; SHAPIRO, H.; SUKNO, S.; TAMAYO-RAMOS, J.A.; TISCH, D.; WIEST, A.; WILKINSON, H. H.; ZHANG, M.; COUTINHO, P.M.; KENERLEY, C.M.; MONTE, E.; BAKER, S.E.; GRIGORIEV, I.V. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. **Genome Biology**. v. 12, n. 4, R40, 2011.

LAZZARETTI, E.; BETTIOL, W. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado a base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. **Scientia Agricola**. v. 54, n. 1/2, p. 89-96, 1997.

LEITE, R.M.V.B.C. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. Londrina: **Embrapa Soja**. p. 3. (Embrapa Soja Comunicado Técnico, 76). 2005.

LIU, C.L.; LAN, C.Y.; FU, C.C.; JUANG, R.S. Production of hexaoligochitin from colloidal chitin using a chitinase from *Aeromonas schubertii*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 69, p. 59-63, 2014.

LOPES, F.A.C.; STEINDORFF, A.S.; GERALDINE, A.M.; BRANDÃO, R.S.; MONTEIRO, V.N.; JÚNIOR, M.L.; COELHO, A.S.G.; ULHOA, C.J.; SILVA, R.N. Biochemical and metabolic profiles of

Trichoderma strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Biology**, v. 116, p. 815-824, 2012.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN-ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.66. p. 506 – 577. 2002.

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

MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulase. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**. v. 6, p. 21-33, 1976.

MARQUES, E.; MARTINS, I.; MELLO, S.C.M. Antifungal potential of crude extracts of *Trichoderma* spp. **Biota Neotropica**. v. 18, n. 1, 5 p., 2018.

MELLO, S.C.M., ÁVILA, Z.R., BRAÚNA, L.M., PÁDUA, R.R., GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Fitosanidad**. v. 11, n. 1, p. 3-9, 2007.

MEYER, M.C.; CAMPOS, H.D.; GODOY, C.V.; UTIAMADA, C.M. (Eds.). Ensaio cooperativos de controle biológico de mofo branco na cultura da soja - safras 2012 a 2015. Londrina: **Embrapa Soja**. 46 p. (Embrapa Soja, Documentos, 368). 2016.

MEYER, M.C.; CAMPOS, H.D.; GODOY, C.V.; UTIAMADA, C.M.; PIMENTA, C.B.; JACCOUD FILHO, D.S.; BORGES, E.P.; JULIATTI, F.C.; NUNES JUNIOR, J.; CARNEIRO, L.C.; SILVA, L.H.C.P.; SATO, L.N.; GOUSSAIN, M.; MARTINS, M.C.; TORMEN, N.R.; BALARDIN, R.S.; VENANCIO, W.S. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2016/17: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: **Embrapa Soja**. 5 p. (Embrapa Soja. Circular técnica, 133). 2017.

MEYER, M.C.; GODOY, C.V.; UTIAMADA, C.M.; SEIL, A.H.; DIAS, A.R.; JACCOUD FILHO, D.S.; BORGES, E.P.; JULIATTI, F.C.; NUNES JUNIOR, J.; SILVA, L.H.C.P.; SATO, L.N.; MARTINS, M.C.; VENANCIO, W. S. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2017/18: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: **Embrapa Soja**. 5 p. (Embrapa Soja. Circular técnica, 140). 2018.

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; DA SILVA, J.C. **Trichoderma: uso na agricultura**. Embrapa. Brasília, DF. p. 181-199, 2019.

MORANDI, M.B.A; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.B.A. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectiva**. Embrapa Meio Ambiente. p. 341, 2009.

NAOUM, S. **Análise da dinâmica do glicoproteoma de *Trichoderma asperelloides* durante o micoparasitismo**. 2022. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Goiânia, 110 p., 2022.

NAUOM, S.; SILVA NETO, B.R.; RIBEIRO, M.S.; PEDERSOLI, W.R.; ULHOA, C.J.; SILVA, R.N.; MONTEIRO, V.N. Biochemical and Molecular Study of *Trichoderma harzianum* Enriched Secretome

Protein Profiles Using Lectin Affinity Chromatography. **Applied Biochemistry Biotechnology**. v. 187, n. 1, p. 1-13, 2019.

OWNLEY, B.H.; GWINN, K.D.; VEJA, F.E. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. **BioControl**. v. 55, p. 113-128, 2010.

PITSON, S.M., SEVIOUR, R.J., MCDUGALL, B.M., Noncellulolytic fungal β -glucanases: their physiology and regulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 178-192, 1993.

RAMADA, M.H.S.; LOPES, F.A.C.; ULHOA, C.J. *Trichoderma*: metabólitos secundários. In: MEYER, M.C.; MAZARO, S.M; DA SILVA, J.C. **Trichoderma: uso na agricultura**. Embrapa. Brasília, DF. Cap. 5, p. 201-218, 2019.

SARAVANAKUMAR, K.; FAN, L.; FU, K.; YU, C.; WANG, M.; XIA, H.; SUN, J.; LI, Y.; CHEN, J. Cellulase from *Trichoderma harzianum* Interacts with Roots and Triggers Induced Systemic Resistance to Foliar Disease in Maize. **Scientific Reports**. v. 6, n. 35543, 18 p., 2016.

SARROCCO, S.; MATARESE, F.; BARONCELLI, R.; VANNACCI, G.; SEIDL-SEIBOTH, V.; KUBICEK, C.P.; VERGARA, M. The constitutive endopolygalacturonase TvPG2 regulates the induction of plant systemic resistance by *Trichoderma virens*. **Phytopathology**. v. 107, p. 537-544, 2017.

SILVA, B.D.S.; ULHOA, C.J.; BATISTA, K.A.; YAMASHITA, F.; FERNANDES, K. Potential fungal inhibition by immobilized hydrolytic enzymes from *Trichoderma asperellum*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.59. p.8148-8154, 2011.

SILVA, R.N.; MONTEIRO, V.N.; STEINDORFF, A.S.; GOMES, E.V.; NORONHA, E.F.; ULHOA, C.J. *Trichoderma*/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security. **Fungal Biology**, v. 123, n. 8, p. 565-583, 2019.

SILVEIRA, S.F.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.; SUZUKI, M.S. Controle químico de queima de folhas e da mela de estacas de eucaliptos, causadas por *Rhizoctonia* spp. **Fitopatologia Brasileira**. v. 28. p. 642-649, 2003.

SUÁREZ, M.B.; VIZCAÍNO, J.A.; LLOBELL, A.; MONTE, E. Characterization of genes encoding novel peptidases in the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413 using the TrichoEST functional genomics approach. **Current Genetics**. v. 51, p. 331-342, 2007.

TIWARI, P.; MISRA, B.N.; SANGWAN, N.S. β -Glucosidases from the fungus *Trichoderma*: an efficient cellulase machinery in biotechnological applications. **BioMed Research International**, vol. 2013, n. 203735, 10 p., 2013.

TSROR, L.; PERETZ-ALON, I. The influence of the inoculums source of *Rhizoctonia solani* on development of black scurf on potato. **Journal of Phytopathology**. v. 153. p. 240-244, 2005.

ULHOA, C. J.; PEBERDY, J. F. Regulation of Chitinase Synthesis in *Trichoderma harzianum*. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 137, p. 2163-2169, 1991.

ULHOA, C.J.; PEBERDY, J.F. Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. **Enzyme Microbial Technology**. v. 14, n. 3, p. 236-240, 1992.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; WOO, S.L.; NIGRO, M.; MARRA, R.; LOMBARDI, N.; PASCALE, A.; RUOCCO, M.; LANZUISE, S. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. **The Open Mycology Journal**, v. 8, n. 1, p. 127-139, 2014.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K. Beneficial effects of *Trichoderma* secondary metabolites on crops. **Phytotherapy Research**, p. 1-8, 2020.

WIRTH, S.J.; WOLF, G.A. Micro-plate colourimetric assay for endoacting cellulase, xylanase, chitinase, 1,3- β -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, p.511-519, 1992.