



**NATHALYNA LÚCIA MOREIRA SOUZA**

**DIVERSIDADE DE *Trichoderma* spp. NO BIOMA  
CAATINGA E O POTENCIAL ANTAGONSTÍCO  
NO CONTROLE DE *Rhizoctonia solani***

**LAVRAS-MG  
2025**

**NATHALYNA LÚCIA MOREIRA SOUZA**

**DIVERSIDADE DE *Trichoderma* spp. NO BIOMA  
CAATINGA E O POTENCIAL ANTAGONISTÍCO CONTRA  
*Rhizoctonia solani***

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Agronomia/Fitopatologia, linha  
de pesquisa em Controle  
Biológico de Doenças de Plantas,  
para obtenção do título de  
mestre.

Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza  
Orientador

Dr Phellippe Mabarch- UFRB  
Coorientador

**LAVRAS-MG**

**2025**

**Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração  
de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com  
dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Souza, Nathalya Lúcia Moreira Souza .

Diversidade de Trichoderma spp. no bioma Caatinga e o potencial antagonístico  
no controle de Rhizoctonia solani / Nathalya Lúcia Moreira Souza Souza. - 2025.  
57 p.

Orientador: Jorge Teodoro De Souza Souza

Coorientador: Phellippe Arthur Santos Mabarch Mabarch

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2025.  
Bibliografia.

1. Controle biológico. 2. Diversidade Biológica . 3. Trichoderma spp.. I. Souza,  
Jorge Teodoro De Souza. II. Mabarch, Phellippe Arthur Santos Mabarch. III.  
Universidade Federal de Lavras. IV. Título.

**NATHALYNA LÚCIA MOREIRA SOUZA**

**DIVERSIDADE DE *Trichoderma* spp. NO BIOMA CAATINGA E O POTENCIAL  
ANTAGONISTÍCO CONTRA *Rhizoctonia solani***

**DIVERSITY OF *Trichoderma* spp. IN THE CAATINGA BIOME AND THEIR  
ANTAGONISTIC POTENTIAL AGAINST IN *Rhizoctonia solani***

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-graduação em  
Fitopatologia, para obtenção do  
título de Mestre.

APROVADO em 24/01/2025

Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza -UFLA

Prof. Dr. Phellippe Arthur Santos Mabarch-  
UFRB

Dra. Otília Ricardo de Farias- UFLA

Documento assinado digitalmente  
 **JORGE TEODORO DE SOUZA**  
Data: 16/06/2025 10:06:54-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza

Orientador

Documento assinado digitalmente  
 **PELLIPPE ARTHUR SANTOS MABARCH**  
Data: 30/06/2025 13:05:58-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Phellippe Arthur Santos Mabarch

Coorientador

Documento assinado digitalmente  
 **OTILIA RICARDO DE FARIAS**  
Data: 27/06/2025 11:25:23-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dra. Otília Ricardo de Farias.

**LAVRAS –MG  
2025**

## AGRADECIMENTOS

A realização deste mestrado foi um processo repleto de desafios, exaustão, aprendizados e crescimento. Chegar até aqui não teria sido possível sem o apoio de muitas pessoas, às quais sou profundamente grata. Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder força, saúde e sabedoria ao longo dessa caminhada. Ao meu orientador Jorge de Souza Teodoro, pela confiança, paciência e dedicação. Obrigada pelos ensinamentos, pelas críticas construtivas e pelo incentivo constante ao meu desenvolvimento acadêmico e profissional. Aos membros do meu grupo de pesquisa, colegas e amigos do laboratório, que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho, em especial Regiane Alves Belizário a quem dividi ao longo desses dois anos muito trabalho, angústia e caronas; José Manoel que me possibilitou entender que risos acompanhados de preocupação são os sapatos de quem sabe aproveitar o caminho; Brunno Cassiano que me acolheu como amigo, irmão e família, Obrigada pelo apoio técnico, discussões valiosas e, muitas vezes, palavras de encorajamento. À Universidade Federal de Lavras, pelo acolhimento e por proporcionar uma estrutura de excelência para a realização deste mestrado. Agradeço a CAPES pelo fomento a bolsa de pesquisa que foi essencial para a minha formação. Agradeço também aos professores do programa, pelas aulas, contribuições e avaliações cuidadosas. Agradeço a minha mãe Marcia de Lima Moreira por todo amor, incentivo incondicional e exemplo de força e determinação. Gostaria de agradecer a minha família de mulheres Lucimar Santana de Lima, Meire Moreira, Marcela Moreira, Vitória Moreira e Fernanda Moreira, aos meus amados irmãos Victor Moreira e Yuri Moreira a quem a falta do cotidiano e da troca foram sentidas; vocês são a base de tudo. À minha família gratidão, por correrem descalço para que eu tivesse a oportunidade de estudar sabendo que tenho para onde retornar, pelo carinho e apoio em todos os momentos, muito obrigada. Aos meus amigos; Karen Sales, Fagner Alves e Alliel Macêna que mesmo à distância ou no dia a dia, estiveram presentes com palavras de apoio, risadas e compreensão. E, por fim, a todos que, de alguma forma, fizeram parte desta jornada: meu sincero muito obrigada.

## RESUMO

O controle biológico é uma ferramenta importante para o manejo de doenças de plantas que vem sendo cada vez mais adotada. Os agentes de controle biológico podem ser encontrados naturalmente nos sistemas agrícolas ou podem ser introduzidos, visando o controle de patógenos. Dentre esses agentes, espécies do gênero *Trichoderma* têm sido amplamente utilizadas como a base para produtos biológicos com ação fungicida. Esse projeto visou conhecer a diversidade de fungos do gênero *Trichoderma* no bioma Caatinga em comparação com áreas agrícolas, e avaliar a sua eficácia contra *Rhizoctonia solani*. Amostras de solo foram coletadas de áreas de Caatinga natural e áreas convertidas em plantios de bananeira (*Musa* spp.) em Jaíba- Minas Gerais. A densidade populacional média de *Trichoderma* estimada em meio semisseletivo foi de 2,5 log UFC/g de solo em áreas de Caatinga, enquanto a densidade de outros fungos foi de 4,0 log UFC/g. Em áreas convertidas para o plantio de bananeira, a densidade média de *Trichoderma* foi de 1,4 log UFC/g, enquanto outros fungos foram de 3,7 log UFC/g de outros fungos. Portanto, as populações de *Trichoderma* representaram respectivamente, 8,5% e 3,4% do total de fungos em áreas de Caatinga e plantios de bananeira. Um total de 80 isolados, 26 de áreas convertidas para o plantio de bananeira e 54 de áreas de Caatinga foram analisados por meio de BOX-PCR para o estudo da diversidade genética. Esses isolados foram agrupados em 67 grupos genéticos de acordo com perfis de bandas amplificadas. Quinze isolados foram selecionados ao acaso com base nos grupos genéticos para a identificação por meio do sequenciamento da região *tefl*. Dentre esses isolados, 4 foram identificados como *T. longibrachiatum*, 1 como *T. neokoningii*, 6 como *T. pseudoasperelloides* e 4 como *T. hunanense*. Ensaios de antagonismo in planta contra *R. solani* mostraram que o isolado PEL39 de *T. neokoningii* reduziu a incidência da doença em 26% e o isolado RBS12 de *T. pseudoasperelloides* reduziu em 12% em relação ao controle não tratado, enquanto os isolados SW2-YU, e RB26 de *T. longibrachiatum* e SW2-59 de *T. hunanense* não reduziram a incidência da doença. Esses resultados evidenciam a variação na atividade dos isolados e os próximos estudos se concentrarão na avaliação do potencial antagonístico dos isolados ainda não testados in planta.

**Palavras-chave:** biocontrole; antagonismo; Caatinga; *Trichoderma* sp

## ABSTRACT

Biological control is an important tool for managing plant diseases and has been increasingly adopted in agricultural systems. Biological control agents can occur naturally or be introduced to suppress pathogens. Among these agents, species of the genus *Trichoderma* have been widely used as the basis for fungicidal biological products. This study aimed to assess the diversity of *Trichoderma* in the Caatinga biome compared with agricultural areas, and to evaluate their effectiveness against *Rhizoctonia solani*. Soil samples were collected from natural Caatinga and banana (*Musa* spp.) plantations in Jaíba, Minas Gerais, Brazil. The mean population density of *Trichoderma*, estimated on semi-selective medium, was 2.5 log CFU/g of soil in the Caatinga and 1.4 log CFU/g in banana plantations, representing 8.5% and 3.4% of total fungal populations, respectively. A total of 80 isolates 54 from Caatinga and 26 from banana plantations were analyzed by BOX-PCR for genetic diversity, resulting in 67 genetic groups based on amplified band patterns. Fifteen isolates were randomly selected based on genetic grouping and identified through sequencing of the *tefl* region: 4 were identified as *T. longibrachiatum*, 1 as *T. neokoningii*, 6 as *T. pseudoasperelloides*, and 4 as *T. hunanense*. *In planta* antagonism, assays against *R. solani* showed that isolate PEL39 (*T. neokoningii*) reduced disease incidence by 26%, and isolate RBS12 (*T. pseudoasperelloides*) reduced incidence by 12%, compared to the untreated control, while *T. longibrachiatum* and *T. hunanense* isolates showed no significant effect. These results highlight variability in the biocontrol activity among isolates, and future studies will focus on evaluating the antagonistic potential of untested isolates *in planta*.

**Keywords:** biological control; antagonism; Caatinga; *Trichoderma* spp.

## INDICADORES DE IMPACTOS

O uso de agentes de controle biológico como os fungos do gênero *Trichoderma* representa uma importante estratégia para promover a sustentabilidade agrícola, especialmente em regiões sensíveis como a Caatinga. Este bioma exclusivamente brasileiro, apesar de frequentemente associado à escassez hídrica e à degradação ambiental, abriga uma riqueza microbiológica ainda pouco explorada, mas com alto potencial para inovação no manejo de doenças de plantas. A utilização de isolados nativos de *Trichoderma* contribui para a preservação da biodiversidade funcional do solo, promovendo práticas agrícolas menos dependentes de produtos químicos e mais integradas ao equilíbrio ecológico local. Do ponto de vista ambiental, o controle biológico reduz a contaminação de solos e recursos hídricos, contribuindo para a conservação de ecossistemas. Em termos tecnológicos, a identificação de novos isolados com atividade antagonista contra patógenos como *Rhizoctonia solani* oferece oportunidades para o desenvolvimento de bioinsumos regionais, valorizando os recursos locais e incentivando a inovação agroecológica. Culturalmente, esse tipo de pesquisa valoriza o bioma Caatinga e promove uma agricultura adaptada às condições climáticas e ecológicas da região, respeitando os saberes locais e fortalecendo a identidade dos agricultores enquanto agentes de conservação. Socialmente, o uso de *Trichoderma* como agente de biocontrole pode reduzir custos com defensivos agrícolas, diminuir riscos à saúde dos produtores e aumentar a segurança alimentar por meio de práticas sustentáveis. A produção e o uso de bioinsumos locais também favorecem a geração de renda, a autonomia dos agricultores e o fortalecimento de redes de cooperação entre pesquisa, extensão rural e comunidades. Dessa forma, o estudo da diversidade de *Trichoderma* na Caatinga e sua aplicação no controle de fitopatógenos apresenta impactos integrados ambientais, sociais, culturais e tecnológicos que apontam para uma agricultura mais sustentável, resiliente e comprometida com o uso responsável da biodiversidade brasileira.

## IMPACT INDICATORS

The use of biological control agents such as fungi from the *Trichoderma* genus represents an important strategy for promoting sustainable agriculture, especially in environmentally sensitive regions like the Caatinga. This uniquely Brazilian biome, often associated with water scarcity and environmental degradation, harbors a rich and largely unexplored microbial diversity with high potential for innovation in plant disease management. Utilizing native *Trichoderma* isolates contributes to the preservation of soil functional biodiversity, encouraging agricultural practices that rely less on chemical inputs and are more aligned with local ecological balance. From an environmental perspective, biological control reduces soil and water contamination, aiding in the conservation of ecosystems. In technological terms, the identification of new isolates with antagonistic activity against pathogens such as *Rhizoctonia solani* creates opportunities for the development of regionally based bio-inputs, adding value to local resources and fostering agroecological innovation. Culturally, this type of research highlights the value of the Caatinga biome and promotes farming systems adapted to its climatic and ecological conditions, respecting traditional knowledge and strengthening the identity of farmers as agents of conservation. Socially, the use of *Trichoderma* as a biocontrol agent can reduce agricultural costs, decrease health risks for producers, and enhance food security through more sustainable practices. The local production and application of bio-inputs also support income generation, farmer autonomy, and the strengthening of cooperative networks between research institutions, extension services, and rural communities. Thus, studying the diversity of *Trichoderma* in the Caatinga and its application in pathogen control presents interconnected impacts environmental, social, cultural, and technological that point toward a more sustainable, resilient agriculture rooted in the responsible use of Brazilian biodiversity.

## SUMÁRIO

|                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                     | 11 |
| 2. JUSTIFICATIVA.....                                                                                   | 13 |
| 3. HIPÓTESES.....                                                                                       | 13 |
| 4. OBJETIVO GERAL .....                                                                                 | 14 |
| 5. REFERENCIAL TEÓRICO .....                                                                            | 14 |
| 5.1 O bioma Caatinga.....                                                                               | 14 |
| 5.2 <i>Rhizoctonia solani</i> .....                                                                     | 17 |
| 5.3 Características e importância do gênero <i>Trichoderma</i> .....                                    | 18 |
| 5.4 Taxonomia e filogenia molecular do gênero <i>Trichoderma</i> .....                                  | 21 |
| 5.5 Utilização de <i>Trichoderma</i> spp. no controle biológico de doenças de plantas.....              | 26 |
| 5.6 Produtos comerciais à base de <i>Trichoderma</i> spp. ....                                          | 28 |
| 6. MATERIAIS E MÉTODOS .....                                                                            | 30 |
| 6.1. Coleta e localização das amostras .....                                                            | 30 |
| 6.2. Isolamento de cepas de <i>Trichoderma</i> .....                                                    | 31 |
| 6.3. Extração de DNA dos isolados de <i>Trichoderma</i> .....                                           | 31 |
| 6.5. Análise da diversidade genética dos isolados de <i>Trichoderma</i> por meio de BOX-PCR.....        | 32 |
| 6.6. Sequenciamento dos isolados de <i>Trichoderma</i> .....                                            | 33 |
| 6.7 Patogenicidade e diferentes concentrações de inoculo de <i>R. Solani</i> em soja.....               | 33 |
| 6.8 Biocontrole de <i>Trichoderma</i> spp. a <i>R. Solani</i> .....                                     | 34 |
| 6.8 Análises estatísticas.....                                                                          | 35 |
| 7. RESULTADOS.....                                                                                      | 36 |
| 7.1 Coleta de solo e quantificação de UFC'S.....                                                        | 36 |
| 7.2 Obtenção dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....                                                | 37 |
| 7.3 Análise de BOX-PCR.....                                                                             | 40 |
| 7.5 Teste de patogenicidade .....                                                                       | 42 |
| 7.6 Avaliação do controle de <i>Rhizoctonia solani</i> por <i>Trichoderma</i> spp. <i>in vivo</i> ..... | 46 |
| 8. DISCUSSÃO.....                                                                                       | 50 |
| 9. CONCLUSÃO .....                                                                                      | 53 |
| REFERÊNCIAS .....                                                                                       | 54 |

## 1. INTRODUÇÃO

O bioma Caatinga se estende por uma vasta área no Nordeste do Brasil, cobrindo aproximadamente 826.411 km<sup>2</sup>, principalmente na região semiárida, abrangendo dez estados brasileiros: Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais (SILVA; LEAL & TABARELLI, 2018). É caracterizado por um mosaico de plantas de porte arbustivo espinhoso, xerófitas, caducifólias e florestas sazonalmente secas (LEAL et al., 2003). Reconhecida por sua rica diversidade de plantas, a Caatinga é subdividida em nove ecorregiões biogeográficas bastante heterogêneas, largamente influenciadas pelo grau de aridez (CASTELLETTI et al., 2004). Embora tenham sido alcançados avanços significativos na caracterização da Caatinga ao longo das últimas décadas, a documentação e a compreensão das comunidades microbianas, bem como o entendimento dos impactos do manejo do solo sobre a biodiversidade microbiana, ainda estão carentes de informações substanciais (LEAL et al., 2003).

Considerando o fato de que o bioma Caatinga ainda é pouco explorado do ponto de vista de conhecimento da biodiversidade, quando comparado a outros biomas brasileiros, esse ambiente pode abrigar diversos microrganismos ainda não conhecidos e com potencial biotecnológico ainda não explorado (LEAL et al., 2005). Além disso, as condições de alta temperatura e baixa pluviosidade fazem desse bioma um ambiente extremo, onde os microrganismos e plantas residentes precisam possuir estratégias de sobrevivência bem ajustadas às condições ambientais (PRADO, 2003). Para sobreviver a circunstâncias ecossistêmicas extremas, plantas e microrganismos precisam apresentar estratégias adaptativas que podem não ser as mesmas encontradas em outros ambientes (SILVA & SOUZA, 2018). Por conta disso, esses organismos podem ter componentes genéticos que sejam únicos e que possibilitem a expressão de produtos gênicos que sejam alinhados com as suas estratégias adaptativas (OP DE BEECK et al., 2020). Conhecer a biodiversidade desses ambientes, representa a possibilidade de descobrir novos microrganismos com potencial biotecnológico ainda não explorado, bem como novas espécies a serem descritas.

Entre os agentes de biocontrole mais amplamente utilizados em todo o mundo, destaca-se o gênero cosmopolita *Trichoderma*. Esses fungos são encontrados distribuídos principalmente em solos e material em decomposição, onde micoparasitam uma ampla variedade de fungos, incluindo os fitopatogênicos. Devido à sua eficiente atividade antagônica e à capacidade de colonizar as raízes das plantas, formando uma associação simbiótica, *Trichoderma* tem sido objeto de extensas pesquisas. As cepas selecionadas e altamente ativas

deste gênero são aplicadas em sementes, solo e tratamentos foliares, sendo utilizadas como biofungicidas, bioestimulantes de plantas e biofertilizantes, conforme vários estudos recentes (NAHER et al., 2014; SESAN et al., 2020; SILVA et al., 2019).

O cultivo extensivo em grandes áreas, especialmente por meio do sistema de monocultura, pode levar ao desenvolvimento de doenças e estresses que têm o potencial de causar impactos significativos na produtividade (LOPES et al., 2018). Entre a série de doenças às quais tem sido associada a grandes perdas econômicas, a *Rhizoctonia solani* tem capacidade de causar tombamento de pré e pós-emergência, podridão da raiz e do hipocótilo e queima foliar (EMBRAPA, 1999). O manejo eficaz desta doença se baseia na implementação de várias medidas de controle, incluindo o uso de sementes certificadas e tratadas com fungicidas ou produtos biológicos. O uso de cultivares resistentes é uma estratégia importante, mas a escassez de variedades comerciais com altos níveis de resistência tem sido um obstáculo significativo no controle da doença. Como resultado, os tratamentos de sementes com fungicidas têm sido amplamente adotados como o principal método de controle de *R. solani*, oferecendo proteção, tanto à semente quanto à muda durante os estágios iniciais de crescimento (MICHEREFF et al., 2005; MAZZOLA; FREILICH, 2016; TIMMUSK et al., 2017).

Dentre as diferentes abordagens de controle de doenças de plantas, o controle biológico emerge como uma alternativa ecológica e eficiente no controle de *R. solani*. Esse método constitui uma importante ferramenta no manejo de fitopatógenos radiculares, agindo de forma preventiva ou direta sobre as estruturas do patógeno ao longo do ciclo da cultura. Além disso, a literatura vem mostrando que essa abordagem contribui de maneira significativa para uma agricultura segura, econômica e sustentável (MICHEREFF et al., 2005; MAZZOLA; FREILICH, 2016; TIMMUSK et al., 2017).

Conforme destacado por Carvalho et al. (2015), os solos brasileiros são reconhecidos por abrigar uma vasta diversidade de espécies de *Trichoderma*. Esse rico ambiente é alvo constante de pesquisas, pois constitui um reservatório vasto de cepas com potencial para serem usadas no controle biológico de fitopatógenos em uma variedade de sistemas agrícolas (MARCUIZZO; CARVALHO, 2018; REDDA et al., 2018). Embora possua uma rica biodiversidade, a Caatinga permanece como um dos ecossistemas menos estudados e compreendidos no Brasil, diante disso este trabalho tem como objetivo isolar, identificar e descrever novas cepas do gênero *Trichoderma*, oriundos da caatinga e avaliar o potencial de biocontrole contra *Rhizoctonia solani*.

## 2. JUSTIFICATIVA

A Caatinga é um bioma ainda pouco explorado do ponto de vista de conhecimento da biodiversidade. Por conta disso, são necessários esforços para conhecimento da diversidade de microrganismos presentes nesse ambiente. Esses ecossistemas podem ser reservatórios de novos microrganismos, incluindo novas espécies de *Trichoderma* com potencial para utilização no biocontrole de doenças de plantas. A pesquisa sobre a diversidade fúngica nos solos do bioma Caatinga ainda é uma área pouco explorada. Embora os fungos desempenhem funções ecossistêmicas cruciais, como a decomposição de matéria orgânica e ciclagem de nutrientes, seu isolamento, caracterização e identificação não têm recebido a devida atenção no Brasil, especialmente quando comparados a outros biomas do país (BAIL et al., 2022; LEITE et al., 2023). Além disso, os poucos estudos de diversidade na Caatinga costumam concentrar-se na preservação da fauna e flora, enquanto o microbioma do solo é frequentemente negligenciado (RIBEIRO et al., 2019; DOS SANTOS et al., 2019; DA SILVA; LEAL & TABARELLI, 2018).

O monitoramento recente revelou uma considerável redução na extensão dos fragmentos de Caatinga. Atualmente, esses fragmentos cobrem apenas 53% da área original. O declínio na cobertura vegetal é um indicador das pressões ambientais e das mudanças no uso da terra que afetam esse ecossistema único (RIBEIRO et al., 2015). A redução ou perda da diversidade fúngica em áreas alteradas por ações antropogênicas pode resultar na completa extinção de linhagens de fungos (NIC LUGHADHA et al., 2020). O isolamento, caracterização taxonômica e identificação de novas espécies são fundamentais para aprimorar nosso conhecimento e a gestão adequada do bioma, além de contribuir para a documentação da biodiversidade micológica da Caatinga. É importante salientar que, tais ações são vitais para proteger as espécies fúngicas. O presente estudo visa a bioprospecção de cepas de *Trichoderma* com potencial para o controle de *R. solani* em soja, bem como o reconhecimento da biodiversidade de novas espécies oriundas da Caatinga. O acesso a biodiversidade do gênero permitirá conhecer novos reservatórios de recursos e características individuais ainda inexploradas.

## 3. HIPÓTESES

- O ambiente da Caatinga é rico em uma diversidade de espécies de *Trichoderma* com potencial para serem usadas no biocontrole de *Rhizoctonia solani* em soja;
- O bioma Caatinga abriga espécies de *Trichoderma* ainda não descritas.

#### 4. OBJETIVO GERAL

- Analisar a diversidade de isolados de *Trichoderma* do ambiente da Caatinga, utilizando análises das características morfológicas e moleculares, e avaliar o potencial de biocontrole dessas cepas no controle de *R. solani* em soja.

#### 5. REFERENCIAL TEÓRICO

##### 5.1 O bioma Caatinga

O Brasil abriga cerca de 20% da biodiversidade global e possui seis biomas distintos, entre os quais a Mata Atlântica e o Cerrado estão incluídos nos 34 “hotspots” de biodiversidade prioritários para conservação (ABRANCHES et al., 2020; MYERS, 2000). Cada bioma brasileiro é caracterizado por ecossistemas únicos, tipos específicos de vegetação, condições climáticas particulares e interações ecológicas distintas (ABRANCHES et al., 2020). Alguns desses biomas, como a Mata Atlântica, o Cerrado e a Caatinga, são exclusivos do Brasil (MYERS et al., 2000).

A Caatinga se refere a vasta região que abrange os estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e parte de Minas Gerais, situada no vale do Jequitinhonha, é um complexo ecossistema composto por arbustos espinhosos e florestas sazonalmente secas. Sua extensão alcança aproximadamente 826.411 km<sup>2</sup>. Limitada a leste e oeste pelas florestas Atlântica e Amazônica, e ao sul pelo Cerrado, a Caatinga caracteriza-se por sua localização em depressões interplanálticas, com altitudes entre 300 e 500 metros, constituídas por sedimentos do Cretáceo ou Terciário, que originalmente cobriam o escudo basal do Pré-Cambriano (AB’SABER, 1977). É também reconhecida como a maior floresta tropical seca da América do Sul e é a única ecorregião brasileira de grande extensão que não compartilha território com outros países (MORO et al., 2016).

Esse bioma está sujeito a secas periódicas, marcadas por longos períodos de escassez de chuvas e altas temperaturas (DA SILVA; LEAL & TABARELLI, 2018). A precipitação anual é inferior a 1000 mm, porém, o aspecto mais distintivo da região é a variação na quantidade e distribuição das chuvas ao longo do tempo e do espaço, o que torna as médias pluviométricas pouco representativas (NIMER, 1972). Simplificadamente, cerca de 20% da precipitação anual ocorre em um único dia, enquanto aproximadamente 60% acontecem ao longo de apenas um mês. Em contrapartida, as temperaturas médias anuais são consideravelmente altas, variando

entre 25 e 30 °C, e a umidade relativa do ar costuma ser inferior a 50%, resultando em uma evapotranspiração potencial elevada, frequentemente excedendo 1500 mm por ano. Apesar dessas condições adversas, a vegetação da Caatinga desenvolveu estratégias de adaptação, como a capacidade de armazenar água em suas raízes (HOLBROOK, 1995).

Contudo, o bioma enfrenta desafios crescentes, como o desmatamento e as mudanças climáticas globais, que ameaçam sua sobrevivência (SILVA et al., 2019). Estudos realizados por Miles et al. (2006) revelaram que aproximadamente 97% da área remanescente das florestas tropicais secas, como a Caatinga, está em situação de risco devido a diversas ameaças, incluindo a ocupação humana desordenada, fragmentação do habitat, incêndios, conversão de áreas para uso agrícola e pastagens, e os efeitos das alterações climáticas. Esse cenário coloca em risco a perda da biodiversidade da fauna, flora e do microbioma do solo da Caatinga.

Em 1984, a cobertura vegetal original da Caatinga ocupava 68% de sua extensão total, com o restante sendo convertido para agricultura ou sofrendo alterações significativas devido às atividades humanas. Contudo, registros de monitoramento indicam uma considerável redução na área dos fragmentos de Caatinga, os quais abrangem 41.399,196 hectares, representando apenas 53,6% da área original (LEAL et al., 2003). Em comparação com florestas tropicais como a Amazônia e a Mata Atlântica, a Caatinga ainda carece de uma quantidade proporcionalmente menor de áreas de conservação ambiental (CASTELETTI et al., 2004).

É crucial destacar que as Caatingas estão entre os ecossistemas mais vulneráveis às mudanças climáticas. A falta de medidas efetivas de gestão e regulamentação para a região pode resultar na perda de biodiversidade e na redução dos serviços ecossistêmicos fornecidos por esse bioma (SILVA; LEAL & TABARELLI, 2018). A área da Caatinga possui apenas 47 unidades de conservação, com diferentes formas de gestão, distribuídas entre 16 federais, 7 estaduais e 24 privadas, totalizando aproximadamente 4.956 km<sup>2</sup>, o que corresponde a cerca de 6,4% do bioma (The Nature Conservance do Brasil & Associação Caatinga, 2004). No entanto, apenas 11 dessas áreas, cobrindo menos de 1% da região, são classificadas como de proteção integral, como parques nacionais, estações ecológicas e reservas biológicas. A Caatinga apresenta o menor número e a menor extensão de áreas protegidas em comparação com outros biomas brasileiros. Além disso, as unidades de conservação existentes enfrentam desafios na proteção de toda a sua biodiversidade (PRADO, 2003).

O uso insustentável dos recursos naturais ao longo do tempo resultou na desertificação e salinização do solo, aumentando a pressão sobre a biodiversidade local (LEAL et al., 2005; SILVA; LEAL & TABARELLI, 2018). Assim, é crucial realizar pesquisas aprofundadas na

Caatinga não apenas para preservar esse ecossistema singular, mas também para desenvolver estratégias eficazes de conservação e manejo que assegurem sua resiliência frente às crescentes ameaças (TABARELLI et al., 2000).

Apesar dos avanços significativos na caracterização da Caatinga ao longo das últimas décadas, a documentação e a compreensão das comunidades microbianas, bem como dos impactos do manejo do solo sobre essa biodiversidade, ainda carecem de informações substanciais. Os fungos, por exemplo, desempenham um papel crucial na conservação e no funcionamento dos ecossistemas do solo (OP DE BEECK et al., 2020). São responsáveis pela decomposição da matéria orgânica, reciclagem de nutrientes e estabelecimento de associações simbióticas mutualistas, seja com as raízes das plantas ou com outros organismos (OP DE BEECK et al., 2020). A microbiota do solo desempenha um papel essencial em diversas funções ecológicas e representa uma parte significativa da biodiversidade global (SCHLOTTER et al., 2003; TEDERSOO, 2014). No entanto, há alguns esforços especiais para compreender a riqueza, diversidade, dinâmica e funções dos fungos no solo, especialmente em ecossistemas secos como a Caatinga, um bioma frequentemente estigmatizado pela sociedade, governo e até mesmo pela comunidade científica (MARINHO et al., 2019; TEIXEIRA et al., 2021; SANTOS et al., 2011). A falta de ações de preservação adequadas ameaça tanto as espécies fúngicas já conhecidas quanto aquelas ainda não foram identificadas.

Os impactos na degradação da microbiota são graves e podem ter consequências amplas, afetando não apenas o desenvolvimento das plantas, mas também toda a cadeia alimentar (TABARELLI; VICENTE, 2004). A conversão de áreas nativas em plantações ou pastagens tem causado perdas de biodiversidade, alterações no ciclo hidrológico e manipulação do solo (SPERA et al., 2016; DA COSTA et al., 2022). Apesar disso, pouco se sabe sobre como a conversão de florestas em monoculturas impacta as comunidades fúngicas do solo, especialmente em florestas tropicais secas. Estudos realizados em outros biomas, como a Mata Atlântica, a Floresta Amazônica e o Cerrado, apontam que a conversão de florestas nativas em áreas agrícolas ou pastagens afetando a diversidade microbiana (TRENTINI et al., 2020; MERLOTI et al., 2019; RODRIGUES VIANA et al., 2013; contudo, pesquisas semelhantes ainda não foram realizadas na Caatinga.

Apesar dos avanços significativos na caracterização da Caatinga ao longo das últimas décadas, a documentação e a compreensão das comunidades microbianas, bem como dos impactos do manejo do solo sobre essa biodiversidade, ainda carecem de informações substanciais. A relevância da Caatinga não se restringe à sua rica biodiversidade e abundantes endemismos. Como uma região árida altamente imprevisível, circundada por biomas tropicais

úmidos, a Caatinga representa uma peculiaridade climática e serve como um importante campo de estudo para compreender como plantas, fungos, invertebrados e vertebrados se adaptam a um regime de chuvas extremamente variável e estressante.

## 5.2 *Rhizoctonia solani*

Entre a série de doenças às quais tem sido associada a grandes perdas econômicas, a *Rhizoctonia solani* tem capacidade de causar pré-tombamento pós emergência, podridão da raiz e do hipocótilo, e queima foliar (Embrapa, 1999). Segundo Ceresini e Souza (1997), no Brasil, *R. solani* ocasiona perdas consideráveis em várias plantas cultivadas, como pimentão (*Capsicum annuum* L.), soja (*Glycine max* (L.) Merr.), amendoimzeiro (*Arachis hypogaea* L.) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).

De acordo com Ribeiro (1984), *R. solani* já foi identificado em várias regiões do Brasil, destacando-se o Sul, especialmente no Rio Grande do Sul, e a região Sudeste, com registros em São Paulo (AMARAL et al., 1979). No estado do Amazonas, foi encontrado em diversas hortaliças, incluindo o tomateiro (SANTOS e GALVÃO, 1989; REIS e MADEIRA, 2009). Além disso, na região Nordeste, o fungo é conhecido por causar doenças radiculares em culturas como melão (ANDRADE, 2004). No estado de Roraima, no Norte do país, o fungo foi relatado em várias culturas, como feijão-caupi, melancia, soja, alface, seringueira e feijão-guandu (ZILLI et al., 2007). Portanto, *R. solani* está amplamente disseminado pelo país, tornando o seu controle desafiador devido à complexidade de seu comportamento ecológico, que envolve a formação de estruturas de resistência, como clamidósporos e escleródios, sua capacidade de sobreviver como saprófito e sua ampla gama de espécies hospedeiras (FENILLE et al., 2002; ZILLI et al., 2007).

Devido à capacidade deste fitopatógeno de ser transmitido pelo solo e, em particular, sua habilidade de sobreviver neste ambiente, há dificuldades na aplicação de medidas de controle eficazes (KATAN; SHTIENBER; GAMLIEL, 2012). É crucial considerar um conjunto de medidas básicas para evitar que o inóculo se propague por toda a área e se dissemine para outras regiões (erradicação). Assim, métodos como controle físico, cultural, químico e biológico podem ser adotados para manejar essa disseminação e reduzir os danos causados pela doença.

As opções de manejo eficazes para a doença têm dependido principalmente de uma combinação de estratégias de controle cultural e químico. Isso é realizado por meio do manejo integrado de doenças de plantas, que visa otimizar medidas para reduzir a incidência ou

severidade das doenças e manter o potencial produtivo das culturas agrícolas. Essas medidas incluem práticas de exclusão, utilização de variedades resistentes, aplicação de fungicidas químicos, implementação de adubação verde, adoção de cultivares resistentes, rotação de culturas e emprego de controle biológico (PAULA JÚNIOR et al., 2008). Essa abordagem integrada visa maximizar a eficácia do manejo das doenças, reduzindo assim os danos causados aos cultivos e garantindo uma produção agrícola mais sustentável.

Dentro das medidas de controle biológico, o gênero *Trichoderma* (*Hypocreales: Hypocreaceae*) se destaca como um dos principais microrganismos utilizados. Espécies de *Trichoderma* constituem hoje um dos grupos de agentes de biocontrole de fungos fitopatogênicos mais estudados. Fatores como o rápido crescimento micelial, a alta produção de conídios, a síntese de diversos antibióticos e a capacidade de viver de diversas formas (saprotrófica, simbiote ou micoparasita) são características primordiais em sistemas de produção orgânica e agroecológicas, preenchendo requisitos não atendidos pelos agroquímicos (SAMUELS, 2006). A adoção desse agente de biocontrole tem impulsionado a aplicação em solos para controlar doenças causadas por fungos fitopatogênicos (HARMAN et al., 2004).

Diante desse cenário, avaliar a eficácia de novas cepas de *Trichoderma* spp. contra *R. solani* se torna uma oportunidade para encontrar agentes de biocontrole adaptados às condições de solos brasileiros, que possam ser tão ou mais eficazes que os produtos à base de *Trichoderma* já empregados no Brasil. Essa estratégia poderá contribuir para ampliar as opções de agentes de biocontrole no manejo de fitopatógenos habitantes do solo.

### 5.3 Características e importância do gênero *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* abriga mais de 370 espécies distintas (CAI; DRUZHININA, 2021) que são encontradas em grande parte dos solos ao redor do mundo, especialmente em áreas de clima temperado e tropical (MACHADO et al., 2012). Geralmente, as cepas de *Trichoderma* são isoladas de solos cobertos por vegetação florestal ou agrícola e podem ser cultivados em condições controladas de laboratório (BROTMAN et al., 2010). Embora as espécies do gênero *Trichoderma* sejam considerados fungos com ampla distribuição geográfica, sua presença varia consideravelmente, tendo a capacidade de interagir com uma diversidade de organismos, incluindo plantas, bactérias, nematóides e outros fungos (BRAITHWAITE et al., 2017; JIANG et al., 2016; MUKHERJEE et al., 2013; ZACHOW et al., 2016).

Os integrantes do gênero *Trichoderma* são reconhecidos por possuírem alta capacidade adaptativa, que favorece a sua presença em diversificados ambientes da natureza e

ecossistemas, sob diferentes condições climáticas (HARMAN et al., 2004; CHAVERRI; GAZIS; SAMUELS, 2011; LÓPEZ-QUINTERO et al., 2013); característica que pode ser atribuída às diversas capacidades metabólicas das espécies de *Trichoderma* e sua competitividade na natureza (KUBICEK; HARMAN, 1998). A alta versatilidade desse gênero está associada a várias formas de adquirir nutrientes através da absorção de açúcares originados da interação biotrófica com plantas ou através de saprotrofia e micotrofia (LÓPEZ-BUCIO; PELAGIO-FLORES; HERRERA ESTRELLA, 2015).

O gênero é conhecido por oferecer uma ampla gama de capacidades e habilidades entre suas diferentes espécies, agindo como fungos multifuncionais (HARMAN et al., 2004). As cepas de *Trichoderma* podem ser distinguíveis por características morfológicas, como o pigmento conidial verde brilhante, e seu crescimento rápido com ramificações repetidas. De acordo com (KUBICEK; HARMAN, 1998), os termos descritivos comumente empregados para identificar variações na cor ou padrão podem não ser adequados para distinguir entre diferentes espécies, pois a variação morfológica dentro do gênero é limitada. No entanto, observações morfológicas detalhadas são frequentemente empregadas como auxílio na identificação do gênero. As espécies pertencentes ao gênero *Trichoderma* são fungos filamentosos típicos, caracterizados pela presença de elementos multicelulares em forma de tubos chamados hifas, que se agrupam para formar o micélio (KUBICEK; HARMAN, 1998). As hifas são septadas, e a partir delas surgem os conidióforos e clamidósporos, estruturas associadas, respectivamente, à reprodução assexuada e à resistência a condições adversas (DOMSH et al., 2007).

Quando observados ao microscópio, os conidióforos típicos de *Trichoderma* apresentam uma estrutura geralmente piramidal, com diferentes padrões de ramificação. A conformação dessa estrutura pode variar, com alguns apresentando muitas ramificações com numerosas fiálides, outros com poucas ramificações contendo muitas ou poucas fiálides, e ainda outros com poucas ramificações que têm fiálides em sua base e estruturas mais longas, geralmente férteis em seu ápice (SALES, et al., 2021). As fiálides são marcadores morfológicos importantes, sendo caracterizadas por sua forma, que pode variar de oval a subglobosa, ou de cilíndrica e alongada. Além disso, o número e a disposição das fiálides podem variar, assim como sua disposição espacial ao longo do conidióforo (CHAVERRI; SAMUELS, 2003).

A produção de conídios, que são estruturas unicelulares, geralmente esféricas, ovais ou alongadas e de cor verde na maioria das espécies, ocorre a partir de conidióforos efundidos ou de conidióforos agrupados em fascículos ou pústulas. Essa característica costumava ser comumente utilizada para a caracterização e identificação das espécies do gênero (BISSETT,

1991). Embora esses caracteres morfológicos não sejam mais amplamente empregados para identificação de espécies do gênero *Trichoderma*, eles ainda são importantes, pois alguns deles podem ser úteis para distinguir grupos dentro do gênero (REYNOLDS, 1987).

Como parte da classe *Sordariomycetes* do filo *Ascomycota*, o gênero *Trichoderma* é caracterizado pelo seu ciclo de vida, que inclui uma fase sexual conhecida. Nessa fase, ocorre o desenvolvimento de corpos de frutificação do tipo peritécio, os quais são formados em estromas que podem variar em coloração, podendo ser marrom, verde, amarelada ou creme, e são produzidos sobre o substrato colonizado (JAKLITSCH, 2009). Dentro dos peritécios, são formados ascos cilíndricos contendo oito ascósporos bicelulares, que eventualmente se dividem em 16 esporos, os quais podem ser esverdeados ou hialinos (JAKLITSCH, 2009).

As espécies de *Trichoderma* geralmente apresentam um crescimento micelial rápido em diferentes tipos de meios de cultura, cobrindo toda a superfície do meio em menos de uma semana. Além disso, são capazes de crescer em uma ampla faixa de temperaturas e sob diferentes condições de iluminação (CHEN; ZHUANG, 2017; KUBICEK; HARMAN, 2004). Esses fungos podem ser facilmente reconhecidos pelo micélio branco e algodinoso. A temperatura ideal de crescimento varia entre 25°C e 30°C para a maioria das espécies. Outra característica distintiva é o surgimento, após 48 horas de cultivo, de pústulas ou círculos verdes, formados devido à grande produção de esporos sub-hialinos, que adquirem uma coloração verde em massa e conferem à colônia um aspecto granular ou pulverulento (DOMSCH et al., 2007).

O gênero *Trichoderma* é notável não apenas por sua importância ecológica, mas também pelo seu potencial de aplicação biotecnológica, devido à sua capacidade de desempenhar funções antagônicas através de diversos mecanismos, como hiperparasitismo, antibiose e competição (MBARGA et al., 2012); e por ser um exímio produtor de enzimas que podem ser utilizadas em diversos processos (SALES, et al., 2021). Este destaque é ainda mais enfatizado pela presença de espécies que têm habilidades como a degradação de matéria orgânica vegetal, micoparasitismo e endofitismo, estas últimas envolvidas na proteção das plantas através da supressão de doenças e/ou promoção de crescimento (RUIZ et al., 2013; KHAMTHONG et al., 2012).

Conservando diversos mecanismos exercidos na planta, desde impedir ataques de fitopatógenos, até melhorar a saúde e as defesas vegetais, os fungos que do gênero *Trichoderma* produzem metabólitos secundários que são capazes de induzir resistência contra fitopatógenos, promover o crescimento e melhorar a atividade fotossintética das plantas, concentrando diversas aplicações no campo da agricultura, indústria e biorremediação (CONTRERAS-

CORNEJO, 2016). Os metabólitos gerados a partir da interação entre planta e *Trichoderma* spp. também agem sobre a estrutura radicular das plantas aumentando o comprimento da raiz primária e das raízes laterais, o que resulta na maior eficiência de absorção de nutrientes pela planta (NUR et al, 2020). Além disso, os metabólitos voláteis produzidos por espécies desse gênero, também são capazes de inibir o crescimento de importantes fitopatógenos, bem como são capazes de modificar a estrutura das raízes de plantas (CRUZ-MAGALHÃES., 2018).

Diversos estudos têm investigado o efeito do crescimento radicular e o desenvolvimento vegetal de várias culturas que utilizam *Trichoderma* spp. (LÓPEZ BUCIO; ESPARZA-REYNOSO; PELAGIO-FLORES, 2022; ORTUÑO et al., 2017; SINGH et al., 2018; STEWART; HILL, 2014). MARTÍNEZ-MEDINA et al. (2014) mostraram que certos isolados de *Trichoderma* foram capazes de aumentar o teor de auxina e induzir alterações hormonais em plantas de melão, estimulando o crescimento radicular e conferindo proteção contra *F. oxysporum*. Resultados positivos também foram observados em estudos envolvendo plantas de alface, nos quais a aplicação de cepas de *Trichoderma* favoreceu tanto o crescimento inicial das raízes, quanto o controle de doenças (SILVA et al., 2021). Esses achados destacam o potencial promissor de *Trichoderma* como biopesticida e agente de promoção de crescimento vegetal em diversas culturas agrícolas.

O considerável interesse econômico na utilização de produtos à base de *Trichoderma* spp., nesse microrganismo muitas vezes é atrelado ao potencial efeito de seus metabólitos secundários, bem como na produção de enzimas que desempenham papel importante na promoção de crescimento de plantas (KASHYAP et al., 2017). Além disso, outros efeitos associados ao uso de *Trichoderma* envolvem fenótipos como a maior tolerância das plantas a estresses abióticos, a redução da toxicidade de pesticidas, herbicidas e biofertilizantes no solo, e ao seu uso como fonte de genes para a biotecnologia ou como micomediadores (NUR et al., 2020).

#### **5.4 Taxonomia e filogenia molecular do gênero *Trichoderma***

O gênero *Trichoderma* pertence ao Filo *Ascomycota*, Classe *Sordariomycetes*, subclasse *Hypocreomycetidae*, Ordem *Hypocreales* e Família *Hypocreaceae*. Foi descrito por Christian Hendrik Persoon (Pers.) em 1794 em seu manuscrito *Neuer Versucheiner systematischen Eintheilung der Schwämme*, cujo as primeiras espécies descritas, nessa época foram, *T. viride*, *T. aureum*, *T. nigrescens*, *T. roseum* resultados de materiais coletados na Alemanha. Atualmente apenas *T. viride* permanece no gênero, sendo os demais realocados em outros

gêneros (SALES, et al., 2021).

Outro marco no histórico taxonômico do gênero *Trichoderma* ocorreu em 1825, quando Ellias Freis (Fr.) descreveu o gênero *Hypocrea* baseado na amostra de *Sphaeria rufa* Pers. que, por sua vez, foi renomeada para *Hypocrea rufa* (Pers) Fr. Embora nessa época os dois gêneros não estivessem relacionados entre si, mesmo representando fases de vida diferentes de um único gênero. Foi então que somente em 1865, os irmãos Ludovicus Renatus Tulasne e Carolus Tulasne, explicitam que *T. viride* era o anamorfo de *H. Rufa*. Essa descoberta fez com que Bisby, em 1939, sugerisse reduzir todas as espécies do gênero a *T. viride* (SALES, et al., 2021).

O nome *Trichoderma viride* era utilizado para todos os fungos formadores de colônias com aparência típica do gênero, isso desde o final do século XIX; independentemente se estes eram oriundos de amostras de solo e restos vegetais ou obtidos de ascósporos isolados de peritécios de diferentes espécies de *Hypocrea*, o pouco interesse e a simplicidade taxonômica do gênero até a época, eram resultados de acordo com Samuels (2006), do consenso geral de que, microscopicamente, todos os isolados possuíam muitas similaridades. Esta designação postergou até o fim da década de 1960, quando o gênero foi classificado em nove ‘agregados de espécies’ por Mien A. Rifai, sendo reconhecidos por diferenças morfológicas da fase assexuada em cultura pura (RIFAI, 1969). Mudança que foi acarretada por identificações como características de disposição das ramificações dos conidióforos, disposição das fiálides e características dos conídios e como estas poderiam vir a serem utilizadas para a diferenciação dos isolados de *Trichoderma*, um dos exemplos, demonstrados por rifai é o de *T. viride* que tem como característica ser a única espécie, dentre as analisadas, com conídios verrucosos e globosos. Devido à sua relativa simplicidade, o sistema taxonômico com nove ‘espécies’ foi amplamente adotado (DOMSHET et al., 2007).

O método de rifai foi utilizado posteriormente por Bissett (1984) que revisou sistematicamente os agregados de espécies que haviam sido propostos, utilizando a mesma metodologia. Além de acrescentar em sua análise caracteres microscópicos e fisiológicos, como por exemplo, taxa de crescimento, largura das células que antecedem as fiálides, comprimento e largura dos ápices das fiálides, comprimento e largura da base da fiálide, e tipo de pigmento solúvel. O que resultou no reagrupamento dos nove agregados de rifai, em cinco seções definidas como: *Longibrachiatum*, *Pachybasium*, *Trichoderma*, *Saturnisporum*, *Hypocreanum* e algumas outras linhagens solitárias, defendendo a existência de 27 espécies morfológicas. (SALES, et al., 2021).

A inserção de ferramentas moleculares nos estudos de diversidade de *Trichoderma* modificou ainda mais o conhecimento acerca da taxonomia do gênero, as conclusões de alguns

estudos de diversidade genética usando marcadores moleculares eram desconexas com a taxonomia vigente do gênero; exemplo disso é relatado por Druzhinina et al. (2010), nos resultados obtidos por Fujimori e Okuda (1994) usando marcadores moleculares do tipo Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) que indicaram que *T. harzianum* era um táxon polifilético, o que mais tarde, verificou-se, tratar-se de um complexo de espécie.

Com a inclusão da filogenia molecular nos estudos de sistemática e taxonomia do gênero, o número de espécies descritas cresceu abruptamente a partir dos anos 2000, o que evidenciou que a teórica simplicidade morfológica de *Trichoderma* se tratava de uma grande diversidade de linhagens filogenéticas, que divergiram há milhões de anos e originaram centenas de espécies com capacidade de colonizar os mais diferentes substratos e habitats na Terra (DRUZHININA et al., 2011). O número de espécies, com base em filogenia molecular chegou a 100 em 2006 (DRUZHININA et al., 2006).

A definição de Seções passa a perder a utilidade, isso se dá mediante ao número e à proliferação de espécies descritas nos últimos anos. Segundo Chaverri e colaboradores (2015), as espécies de *Trichoderma* são informalmente classificadas em grupos monofiléticos ou clados bem definidos dentro da filogenia do gênero e recebem a nomenclatura de acordo com a espécie mais conhecida em cada clado, já especificações como o tamanho, os limites e a nomenclatura desses clados podem variar entre os autores, de acordo com a pesquisa e o enfoque em diferentes grupos taxonômicos (CHAVERRI; SAMUEL, 2003, MONTOYA et al., 2015).

A revisão do sistema taxonômico proposto por Bisset, entre os anos de 1984 e 1991, ocorreu pouco tempo após a sua implementação, e isso aconteceu, pois, análises filogenéticas utilizando sequências de nucleotídeos foram adotadas nos estudos de taxonomia e diversidade de *Trichoderma*. De acordo com (KUHLIS et al., 1996) as primeiras filogenias moleculares do gênero foram realizadas com sequências nucleotídicas da região espaçadora interna transcrita 1 e 2 (ITS1 e ITS2) do operon dos RNAs ribossomais e o gene que codifica o RNA ribossomal 5.8S. Estudos que mostraram que *Hypocrea jecorina* era o teleomorfo de *T. reesei*, o que posteriormente ajudou a explorar o uso de recombinantes genéticos da espécie na otimização e aperfeiçoamento da produção industrial de enzimas celulolíticas (SALES, L. S. et al., 2021).

Ainda acerca da implementação de ferramentas moleculares na época; a filogenia molecular com o ITS1 e ITS2 não apresentaram suporte à separação das seções *Longibrachiatum* e *Saturnisporum*, indicando assim que ambas deveriam ser fusionadas (KUHLIS et al., 1997). Além disso, esse método molecular possibilitou mostrar que a seção *Pachybasium* não era monofilética (KINDERMANN et al. 1998). De fato, *Longibrachiatum* e *Trichoderma* foram as únicas seções do esquema taxonômico proposto por Bisset que tiveram

suporte nas filogenias com os ITS1 e ITS2 ou outros genes (KUHLS et al., 1997; KULLNIG-GRADINGER et al., 2002), resultados que comprovaram que a taxonomia de *Trichoderma* ainda era uma questão pouco resolvida e conhecida.

Embora as sequências dos espaçadores de ITS, sejam de fácil amplificação e terem sido utilizadas nos primeiros estudos de filogenia e caracterização molecular de fungos, incluindo *Trichoderma* (KINDERMANN et al., 1998; KUHLS et al., 1997). esta apresenta algumas desvantagens. Por ser muito conservada e não oferecer resolução suficiente para o delineamento de espécies muito próximas de *Trichoderma* e outros ascomicotas (SCHÖCH et al., 2012). A solução encontrada para atingir maior precisão na identificação e definição das espécies do gênero foi incluir outras regiões genômicas nas análises para alcançar sinal filogenético suficiente para diferenciar espécies (KULLING-GRADINGER et al., 2002) A nova filogenia molecular combinou os ITS1 e ITS2, com as regiões D1 e D2 do gene que codifica o rRNA 28S, com o gene que codifica a subunidade menor do rRNA mitocondrial, com um fragmento do fator de transcrição e alongação 1-alfa (*teF1*) e com um fragmento do gene que codifica a endoquitinase 42 (*ech42*) para concluir sobre as relações filogenéticas das espécies de *Trichoderma*. E dessa forma foi possível confirmar a monofilia do gênero *Trichoderma* e das seções *Longibrachiatum* e *Trichoderma*, além de fornecer a primeira base filogenética para a subdivisão das seções *Hypocreanum* e *Pachybasium*, que posteriormente com a inclusão de novas espécies, estes subclados viriam a ser identificados, como subclado *Harzianum*, clado *Spirale*, clado *Polysporum* entre outros (DRUZHININA et al., 2010; JAKLITSCH, 2011; CHEN; ZHUANG, 2017).

A utilização da filogenia molecular na distinção de espécies foi estritamente necessária para o gênero *Trichoderma*, isso porque existem grandes complexos de espécies crípticas, ou seja, impossíveis de serem distinguidas morfológicamente (KUBICEK et al., 2008; DRUZHININA et al., 2010; SAMUELS et al., 2010; CHAVERRI et al., 2015). Constatando que a maioria dos nomes aplicados a isolados de *Trichoderma* até recentemente, baseados em grande parte em morfologia, não estão corretos, o que explica as atuais mudanças na taxonomia e a importância do uso de ferramentas moleculares na distinção de espécies (DRUZHININA; KUBICEK, 2005).

Testes realizados nas duas últimas décadas, permitiram a designação de um conjunto de genes codificadores de proteína úteis para taxonomia de fungos, e que podem contribuir para a diferenciação de espécies que são indistinguíveis por caracteres morfológicos. No caso de *Trichoderma*, as regiões utilizadas com esse objetivo são: *actina* (*act*), calmodulina (*cal*), endoquitinase CHI18-5 (*chi18-5*), fator de alongação 1-alfa (*tef1*) e a segunda subunidade maior

da RNA polimerase II (rpb2). Essa abordagem utiliza a concordância filogenética de diferentes genes, que não são relacionados, visando reconhecer a ausência de troca genética e a independência evolutiva das linhagens ao longo do tempo (TAYLOR et al., 2000). Atualmente, essa abordagem é interessante para a diferenciação de espécies de *Trichoderma*, levando em vista ao fato de que o sequenciamento do genoma completo é uma abordagem mais onerosa do ponto de vista financeiro.

A metodologia utilizada após a definição de espécies filogenéticas por meio de multi-loci, segundo Sales, et al., 2021. é a de fazer o “raciocínio inverso”, cujo objetivo é verificar se existe, entre os genes usados para filogenia, algum que tenha capacidade de delimitar todas ou a maioria das espécies que foram identificadas na análise conjunta de vários genes, podendo esse gene vir a ser definido como código de barras para a identificação molecular de isolados, através de análise comparativa de sequências de referência de espécies já conhecidas e que são disponibilizadas em bancos, como exemplo, o GenBank. O código de barras para a identificação de *Trichoderma* segundo Chaverri et al., 2015 é *tefl*, seguido de perto por *rpb2*, com resolução semelhante.

A instauração pelo International Nomenclature Code (ICN) que espécies individuais de fungos pleomórficos, como *Trichoderma/Hypocrea*, devesse ter apenas um nome (BARRIE et al., 2012) fez com que o gênero *Trichoderma/Hypocrea*, passasse por uma revisão na sua nomenclatura (BISSETT et al. 2015). O nome *Trichoderma* foi atribuído primeiro e teve preferência sobre *Hypocrea*, e dessa forma, todas as espécies que antes eram conhecidas como pertencentes ao gênero *Hypocrea* foram renomeadas para *Trichoderma*. A lista com os nomes de *Trichoderma* unificados, conforme as diretrizes do ICN para algas, fungos e plantas (Código de Melbourne, Art. 14.13), foi publicada em 2015 e possuía 254 nomes de espécies de *Trichoderma* (BISSETT et al. 2015). Atualmente, são reconhecidas mais de 350 espécies do gênero e, recentemente, HU et al. (2019) sugeriram que ainda existem aproximadamente 300 espécies que ainda não foram descritas.

Embora exista um esforço para a redução de seções de *Trichoderma* em clados, por motivos históricos, alguns autores seguem utilizando a nomenclatura anterior (JACKLISTCH; VOGLMAYR, 2015). Segundo os esquemas taxonômicos propostos por Jacklistch e Voglmayr (2015) e Chen e Zhuang (2017), o gênero *Trichoderma* possui 10 seções/clados, que estão subdivididas em 24 subclados e 13 linhagens solitárias. Nesse sentido, é necessário que mais esforços sejam feitos para a correta identificação de cepas de *Trichoderma*, visando melhorar a compreensão de aspectos evolutivos desse gênero.

### 5.5 Utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas

Historicamente, as técnicas agrícolas para o controle de fitopatógenos têm sido baseadas principalmente no uso de formulações químicas, que podem apresentar efeitos secundários diretos e/ou indiretos prejudiciais, como toxicidade para animais e seres humanos, bem como poluição ambiental. Como alternativa, o uso do controle biológico por meio de microrganismos antagonistas, como os do gênero *Trichoderma*, tem se tornado cada vez mais favorável e promissor (RAMIREZ-VALDESPINO et al., 2019). Essa abordagem oferece uma alternativa mais segura e sustentável para o controle de doenças de plantas, minimizando os impactos negativos ao meio ambiente e à saúde humana.

De maneira geral, o controle biológico de doenças de plantas pode ser definido como a redução da quantidade de inóculo ou das atividades que causam a doença, por meio do uso de um ou mais organismos que não o homem (COOK; BAKER, 1983). Resumidamente, segundo BETTIOL, (1991), o controle biológico envolve a utilização de microrganismos para controlar outros microrganismos, sendo que os agentes com potencial para interferir nos processos vitais dos patógenos são denominados de antagonistas. Esses organismos devem estar adaptados ao mesmo nicho ecológico que os patógenos, o que permite a integração fácil deste método com métodos culturais e genéticos (MORANDI et al., 2009).

Um dos exemplos mais importantes do uso de fungos antagonistas contra patógenos do solo é o experimento pioneiro de Weindling e Fawcett (1936), citado por LIMA et al. (2000), cujo trabalho com o fungo *Trichoderma* spp. no controle de doenças em citros causadas por *Rhizoctonia solani* possibilitou uma maior atenção e investimento em pesquisas voltadas para o isolamento de cepas de fungos eficientes no controle de doenças fúngicas em plantas.

A capacidade antagônica de *Trichoderma* spp. tem sido extensivamente estudada, e os mecanismos associados incluem várias estratégias. Isso abrange desde micoparasitismo e hiperparasitismo até competição por espaço e nutrientes, antibiose e solubilização de nutrientes inorgânicos para absorção radicular, o que estimula o crescimento do sistema radicular das plantas. Além disso, *Trichoderma* também demonstra habilidade na indução de resistência e na inativação de enzimas do patógeno envolvidas no processo de infecção, além de ser capaz de inibir o crescimento ou a infecção de patógenos na rizosfera (PAULITZ; BÉLANGER, 2001). Essa ampla gama de mecanismos torna *Trichoderma* uma ferramenta valiosa no controle biológico de doenças de plantas.

Uma outra propriedade importante de algumas espécies é a de atuar também sobre fungos que produzem estruturas de resistência difíceis de serem atacadas por microrganismos.

Dentro do gênero, a espécie *T. harzianum* é a mais pesquisada com a finalidade do seu uso como agente de biocontrole, entretanto existem outras espécies que respondem a mesma função como, por exemplo, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* e *T. pseudokoningii* (MELO, 1998). Um exemplo dessas interações é relatado por Durmans et al. (2003), que mostram diminuição no crescimento de *R. solani* e da viabilidade dos escleródios pela ação de diferentes isolados de *Trichoderma* sp. Além destas, as espécies mais frequentemente estudadas são os micoparasitas *T. virens* e o saprófito *T. reesei* (CONTRERAS-CORNEJO, 2016).

As ações desses microrganismos vão além de simples mecanismos de oposição, envolvendo também a solubilização de nutrientes para torná-los acessíveis às raízes das plantas, melhoria na germinação e vigor das sementes, e produção de hormônios envolvidos na promoção de crescimento relacionados ao crescimento das plantas e, conseqüentemente, o aumento na produtividade das culturas (PAULITZ; BÉLANGER, 2001). Sua capacidade de interagir com outros organismos inclui a secreção de diversas moléculas, como enzimas que degradam a parede celular e metabólitos secundários especializados (HERMOSA et al., 2014; LORITO; WOO, 2015; MENDOZA MENDOZA et al., 2003; MORÁN-DIEZ et al., 2009; VINALE et al., 2014). Essas moléculas secretadas são fundamentais para a sobrevivência desses microrganismos em diferentes ambientes e para a interação com uma variedade de organismos (DRUZHININA et al., 2011; LORITO; WOO, 2015).

A interação entre *Trichoderma* e a planta geralmente ocorre nas raízes, e pode ocorrer em diferentes níveis. Algumas linhagens do gênero são capazes de colonizar apenas regiões específicas das raízes, enquanto outras espécies, denominadas rizosfera competentes, colonizam toda a superfície radicular e permanecem associadas às raízes por longos períodos (METCALF; WILSON, 2001). De acordo com Machado et al. (2012) e Pereira (2012), é nessa área que importantes eventos que auxiliam no processo de promoção de crescimento, que está relacionado com a produção de hormônios vegetais, que podem auxiliar numa melhor absorção de água e nutrientes. Essa interação benéfica contribui para o desenvolvimento saudável das plantas hospedeiras e pode ter efeitos positivos significativos na produtividade agrícola.

A zona de contato entre *Trichoderma* e a planta forma uma região de interação química, onde ocorre uma comunicação entre a planta e o fungo por meio da troca de moléculas bioativas. Os metabólitos produzidos por cepas de *Trichoderma* utilizadas como agentes de biocontrole, induzem o espessamento das paredes celulares das plantas e a produção de compostos fenólicos. Esses compostos fenólicos delimitam o crescimento do fungo fitopatogênico à área de infecção, dificultando, assim, a infecção da planta (SHORESH; HARMAN, 2008). Essa interação química é uma estratégia importante utilizada por *Trichoderma* para promover a resistência das

plantas às doenças, reforçando a defesa natural das plantas contra patógenos.

Outra característica de *Trichoderma* spp. é sua capacidade de influenciar positivamente a resposta da planta ao ataque de patógenos. Espécies do gênero *Trichoderma* são capazes de induzir uma resposta mais robusta na planta quando comparadas à resposta desencadeada pelos próprios patógenos (FU; DONG, 2013). Essa habilidade em potencializar as defesas das plantas contra os patógenos contribui significativamente para a proteção das culturas agrícolas contra doenças, para o aumento da resistência das plantas às infecções, e consequentemente para aumento da produção agrícola.

Assim, os fungos do gênero *Trichoderma* têm a capacidade de colonizar tanto a superfície quanto o interior dos tecidos vegetais da planta sem causar doenças, sendo denominados como fungos simbiossiontes oportunistas avirulentos (MACHADO et al., 2012). Além disso, *Trichoderma* é reconhecido por apresentar outros mecanismos de ação biorreguladores de forma indireta. Segundo Harman (2004), esses mecanismos incluem a indução de mecanismos de defesa fisiológica e bioquímica na planta, como a ativação de compostos relacionados à resistência, a desintoxicação de toxinas excretadas por patógenos e a inibição de enzimas desses patógenos durante o processo de infecção. Em suma, *Trichoderma* é capaz de solubilizar elementos nutricionais que, em sua forma original, não são facilmente acessíveis às plantas. Esses diferentes mecanismos contribuem para a promoção do crescimento das plantas e para o aumento de sua resistência a doenças.

Segundo Babu et al. (2015), o *Trichoderma* spp. é considerado uma alternativa natural e ambientalmente aceitável às práticas agrícolas tradicionais, tanto para o manejo de doenças quanto para a promoção do crescimento de culturas agrícolas. Sobretudo, o biocontrole tornou-se uma estratégia importante para apoiar a agricultura sustentável. É significativo ressaltar que os efeitos benéficos proporcionados por *Trichoderma* spp., variam de acordo com o genótipo da planta, o isolado fúngico e as concentrações aplicadas (ISLAM et al., 2014), destacando a necessidade de pesquisas que ampliem o banco de dados de plantas hospedeiras para esse antagonista, bem como de isolados com eficiência comprovada contra patógenos virulentos, o que facilitaria o entendimento dos mecanismos envolvidos no controle do patógeno. Tais pesquisas são essenciais para maximizar o potencial de *Trichoderma* como ferramenta eficaz no manejo integrado de doenças nos sistemas agrícolas.

## **5.6 Produtos comerciais à base de *Trichoderma* spp.**

Dentre as principais espécies que compõem os produtos comercializados pode se

destacar *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. stromaticum* e *T. koningiopsis*, que se encontram disponíveis em diferentes tipos de formulações: pós-molháveis, grânulos dispersíveis, gel, óleo e concentração emulsionável, suspensão concentrada e suspensão concentrada em óleo. Esses produtos são indicados para o controle de *Fusarium* spp., *Moniliophthora* sp., *Thielaviopsis* sp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* sp., *Macrophomina* sp. *Sclerotinia* spp., e *Sclerotium* spp., e recomendados para diversas espécies vegetais, podendo ser utilizados através do tratamento de sementes ou incorporação ao solo (GROFIT, 2021), e em alguns casos pulverizados na área foliar das plantas. A maioria dos produtos comerciais à base de *Trichoderma* são produzidos por meio da fermentação em estado sólido, durante a qual o fungo produz conídios aéreos. Esses conídios são então extraídos e utilizados em formulações que são destinados ao uso comercial (BETTIOL, 2011; WOO et al., 2014).

Em 2022, haviam registrados 42 produtos à base de espécies de *Trichoderma* no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2022). Dessas formulações, 66% são à base de *Trichoderma harzianum*, 24% à base de *Trichoderma asperellum*, 5% à base de *Trichoderma koningiopsis* e 5% à base de *Trichoderma stromaticum* (AGROFIT, 2022). Esses produtos são amplamente utilizados em culturas como, soja, algodão, milho, hortaliças, entre outras. Além da sua ação no biocontrole de doenças, esses produtos também atuam como promotores de crescimento, ressaltando a importância de políticas vigentes que incentivem o uso desses biofungicidas. Tais políticas podem incluir apoio para a divulgação do uso de produtos de baixa toxicidade e periculosidade, conforme destacado por Meyer et al. (2019). Essas medidas podem contribuir significativamente para a adoção generalizada de práticas agrícolas mais sustentáveis ao meio ambiente.

Dos produtos à base de *Trichoderma*, a espécie *Trichoderma harzianum* é a mais comercializada mundialmente, sendo encontrada em 38,8% dos produtos comerciais quando considerados os produtos sem mistura de microrganismos. No entanto, quando considerados os produtos com mistura de espécies de *Trichoderma*, esse valor sobe para 50% dos produtos disponíveis no mercado global, e aumenta para 60% quando incluídos todos os produtos, inclusive aqueles em que espécies de *Trichoderma* são misturadas com outros fungos, bactérias e fungos micorrízicos. Ainda nesse sentido, produtos à base de *T. viride* ocupam o segundo lugar entre os comercializados, estando presente em 16,1% dos produtos. *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma* spp., compõem 6,5%, 4,4% e 3,2%, respectivamente dos produtos comercializados. Outras espécies comercializadas individualmente incluem *Trichoderma lignorum* (1,2%), *Trichoderma catenulatum* (0,8%), *Trichoderma koningiopsis* (0,8%), *Trichoderma virens* (0,8%), *Trichoderma fertile* (0,4%),

*Trichoderma stromaticum* (0,4%). Espécies como *Trichoderma gamsii*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma polysporum*, *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma longibrachiatum* e *Trichoderma parceramosum* também são comercializadas, sendo que estas últimas são encontradas apenas em misturas de produtos. Considerando o número de espécies conhecidas de *Trichoderma* (BISSETT et al., 2015), o número utilizado em controle biológico representa aproximadamente 4% das espécies conhecidas.

Na bula dos produtos formulados registrados é informada a concentração de propágulos do fungo, que consiste no ingrediente ativo. As unidades de medida utilizadas para indicar a concentração não são padronizadas. Há produtos registrados considerando a concentração de conídios e ou esporos viáveis e unidades formadoras de colônia. Além disso, as metodologias de análise de conformidade e controle de qualidade de produtos biológicos não são padronizadas para todos os antagonistas. Este panorama dificulta a análise adequada da qualidade dos produtos, a comparação de resultados, a realização de testes e a emissão de laudos no processo de registro (TEIXEIRA et al., 2010).

## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no período de outubro de 2023 a dezembro de 2024 no Laboratório de Fitopatologia Molecular na Universidade Federal de Lavras.

### 6.1. Coleta e localização das amostras

As coletas de solo foram realizadas durante a estação seca, no mês de outubro de 2023, na cidade de Jaíba, localizada em Minas Gerais (15° 20' 16" S, 43° 40' 26" O). Foram coletadas amostras de solo em áreas de vegetação natural de Caatinga e em áreas de Caatinga convertidas para o cultivo de banana. Cada área foi subdividida em seis talhões, com cinco pontos de amostragem cada, totalizando 60 amostras compostas de solo. As áreas naturais compreendem o Parque Lagoa do Cajueiro, a Reserva Biológica do Jaíba e a Reserva Biológica Serra Azul. As amostras de solo foram coletadas utilizando um trado a uma profundidade de 0 a 20 cm ao longo de um transecto com espaçamento de 50 metros entre os pontos de amostragem. As amostras coletadas foram conservadas em um freezer a -20 °C e em uma câmara fria a 4 °C para fins de análise molecular, processamento e isolamento dos fungos.

O isolado de *R. solani* foi retirado de plantas de soja no Estado do Paraná e cedido pelo laboratório de Controle Biológico do departamento de Fitopatologia da Universidade Federal

de Lavras.

## 6.2. Isolamento de cepas de *Trichoderma*

Amostras de solo foram utilizadas para o isolamento de *Trichoderma*. Para cada amostra, 10g de solo foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL de água destilada e esterilizada. Após agitação a 180 rpm por 10 minutos, foi utilizada a técnica de diluição seriada, seguida de plaqueamento no meio de cultura semisseletivo de Martin (18 g de ágar, 10 g de dextrose, 1,0 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5 g de peptona, 0,03 g de rosa de bengala, 0,25 g de cloranfenicol e 1000 mL de água destilada), e incubadas a 28°C com monitoramento diário por sete dias. As colônias com morfologia típica de *Trichoderma* foram transferidas para meio BDA (200g de batata, 20g de dextrose, 20g de ágar, e 1000 mL de água destilada). Após a purificação dos isolados, eles foram preservados em glicerol 30% e armazenadas em freezer a -80°C, além disso os isolados também foram conservados pelos métodos Castellani e em glicerol.

Foram conduzidas também diluições em série do solo coletado para quantificar as unidades formadoras de colônias (UFCs) de *Trichoderma* spp. As amostras de solo, cada uma contendo 10 g, foram diluídas em 90 mL de água destilada esterilizada. Os frascos contendo a suspensão foram agitados por 10 minutos e, a partir dessa etapa, foram feitas diluições seriais até o fator 10<sup>-4</sup>. Em seguida, foram inoculados 0,1 ml dessas diluições em quatro placas de Petri contendo 15 ml de meio BDA, que foram incubadas por 5 dias a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas em uma incubadora do tipo BOD. A contagem das colônias de *Trichoderma* spp. realizada com base no fator de diluição serial 10<sup>-3</sup>, por meio de observação visual das colônias conforme descrito em bibliografia especializada (BARNETT; HUNTER, 1999). Após a contagem das UFCs, o gênero *Trichoderma* foi identificado através da visualização de estruturas em microscópio óptico.

## 6.3. Extração de DNA dos isolados de *Trichoderma*

Para a extração de DNA fúngico foi utilizado o método CTAB, seguindo o protocolo utilizado por Ingles et al. (2006). Os isolados foram cultivados em meio BD por 2 a 3 dias em agitador a 180 rpm. Os micélios foram coletados em papel filtro até secagem. O micélio foi macerado em cadinho de porcelana com nitrogênio líquido. Em seguida, aproximadamente 20 mg do macerado foi transferido para microtubos de 2ml, aos quais foram adicionados 800 µL

do tampão composto por: Tris-HCl 200 mM, pH 8,0, EDTA 0,5M, pH 8,0, NaCl 5M, SDS 10% e  $\beta$ -mercaptoetanol 1%. Os tubos foram incubados em banho-maria (70 °C) por 1 h, sendo agitados a cada 20 min.

Após a incubação, foi realizada a precipitação das proteínas, adicionando-se 700  $\mu$ L de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v). Posteriormente, as amostras foram agitadas, por inversões suaves, durante 10 min e centrifugadas a 14000 rpm pelo mesmo tempo a 4 °C. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para novos microtubos de 2,0 mL. Para precipitação do DNA, 14  $\mu$ L de 5M NaCl e 500  $\mu$ L de isopropanol gelado foram adicionados ao sobrenadante. Os tubos foram mantidos a -20 °C por 2 h e depois centrifugados novamente por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com etanol 70% resfriado, e seco à temperatura ambiente em câmara de fluxo por meia hora.

O pelete, que continha o DNA total de cada amostra foi ressuspensionado em 100  $\mu$ L de água contendo RNase na concentração de 40  $\mu$ g/mL e incubados em banho-maria por 30 min a 37 °C para ressuspensão completa (AUSUBEL et al., 1992). A quantificação e avaliação da integridade do material genético foi realizado através de corridas eletroforética em gel de agarose a 0,8%.

### **6.5. Análise da diversidade genética dos isolados de *Trichoderma* por meio de BOX-PCR**

A caracterização molecular dos isolados de *Trichoderma* foram avaliadas por meio da técnica de BOX-PCR, utilizando o primer BOXA1R (Srivastava et al., 2014). A reação de amplificação para genotipagem por BOX-PCR foi realizada em um volume de 25  $\mu$ L contendo: 60 ng/ $\mu$ L de DNA genômico, 2,5  $\mu$ L de tampão 1X, 0,75  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 2,0  $\mu$ L de primer BOX-A1R (5'- CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') (Versalovic *et al.*, 1994) 10 pmol/ $\mu$ L, 0,5  $\mu$ L de dNTPs (10 mM de cada) e 0,3  $\mu$ L de Taq DNA polimerase. As condições de PCR foram: uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 3 min, seguida por 35 ciclos a 95°C por 1 min, 55°C por 45 seg e 72°C por 1 min e 30 seg, com extensão final à 72°C por 5 min. Os produtos amplificados foram corados com GelRed® (Biotium, USA) e separados em gel de agarose a 2,0% com eletroforese conduzida à 70V durante 4 horas em tampão 1X Tris acetate-EDTA (TAE). Os amplicons foram visualizados e documentados sob um transiluminador. Os perfis eletroforéticos gerados foram utilizados para comparação direta utilizando um marcador molecular 1 Kb. Os perfis de cada isolado foram transformados em uma matriz de presença e ausência para construção de um dendograma utilizando o método de agrupamento hierárquico por UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic

Averages).

## 6.6. Sequenciamento dos isolados de *Trichoderma*

Após a análise da diversidade genética dos isolados de *Trichoderma* que compõem a coleção, foram selecionados os isolados que seriam sequenciados. A análise da diversidade por BOX-PCR possibilitou a seleção de grupos genéticos de acordo com perfis de bandas amplificadas., as estirpes foram selecionadas ao acaso com base nos grupos genéticos. Para a identificação por meio do sequenciamento foram utilizados os genes que codificam o fator de transcrição e alongação 1 alfa (*tef1*) utilizando os primers TEF1-728F (CATCGAGAAGTTCGAGAAGG) e TEF1-LLE (AACTTGCAGGCAATGTGG).

As amplificações por PCR das regiões alvo foram obtidas em um volume total de 50 µL, A amplificação seguiu a metodologia de Gezgin et. al, 2023, consistindo em desnaturação inicial a 94 °C 3 minutos, 94 °C por 30 segundos, 59 °C 1 minuto, 35 ciclos 74 °C 50 segundos, 74 °C 7 minutos 4 °C. O resultado da PCR foi quantificado em gel de agarose 0,8% com gel red em transluminador UV. Os produtos da amplificação foram utilizados para o sequenciamento genômico através do método Sanger. As amostras foram enviadas para uma empresa especializada nesse tipo de serviço onde também passaram pelo processo de purificação.

As sequências obtidas foram montadas com auxílio do software Sequencher v.2 (Gene Codes). As sequências montadas sofreram um alinhamento múltiplo juntamente com sequências de diferentes espécies tipo de *Trichoderma*. Esses alinhamentos foram feitos com auxílio do programa MEGA versão X (KUMAR et al., 2018). Além disso, o programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1999) também foi utilizado para comparar as sequências dos isolados obtidos com sequências disponíveis no NCBI (National Center for Biotechnology Information).

## 6.7 Patogenicidade e diferentes concentrações de inóculo de *R. Solani* em soja

Sementes de soja passaram por um processo de desinfestação consistindo em imersão em NaClO 5% (vol/vol) por 1 minuto, seguido por etanol a 70% (vol/vol) por 30 segundos, e três lavagens em água destilada autoclavada por 1 minuto. Posteriormente, as sementes desinfestadas foram armazenadas em sacos de papel autoclavado. Para a infestação do solo com o patógeno, foram utilizados três discos de meio de cultura BDA contendo micélio de *Rhizoctonia solani*. Esses discos foram transferidos para erlenmeyer asséptico contendo 100 g

de arroz pré-cozido e autoclavado (a 120°C por 30 minutos). Os Erlenmeyers foram incubados por 8 dias, em fotoperíodo de 12 horas a uma temperatura de 20°C. Em seguida, o material foi moído em um triturador e condicionado em tubos falcons autoclavados de 50 ml.

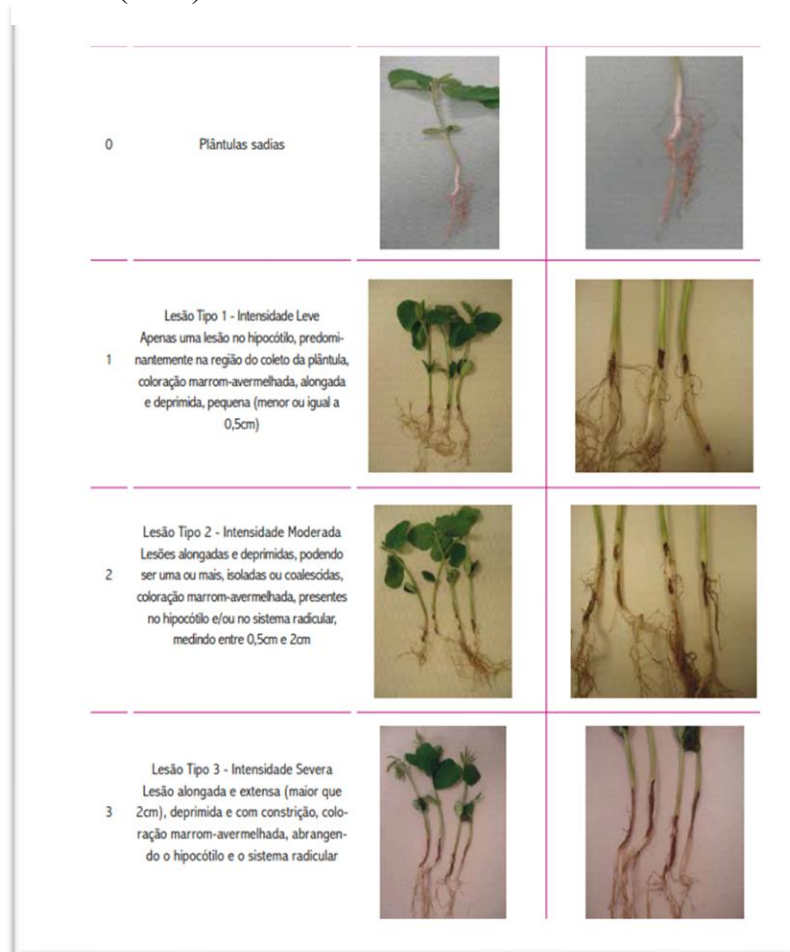
A avaliação da severidade consistiu na porcentagem de lesão em plântulas doentes com a escala proposta por Goulart (2022). Para a condução dos experimentos foi adotado o DBC. Estes experimentos foram conduzidos utilizando 6 tratamentos com diferentes métodos e dosagens do inóculo de *Rhizoctonia solani*, T1- 5 escleródios a 1 cm da superfície; T2- 3 escleródios homogeneizado no solo, T3- 5 grãos de arroz colonizados; T4- 1,4g de inóculo crescido no arroz triturado e homogeneizado ao solo; T5- 0,446g de inóculo crescido no arroz triturado e homogeneizado ao solo; T6- 0,144g de inóculo crescido no arroz triturado e homogeneizado ao solo e 1 controle não inoculado com o patógeno. Para os testes de concentrações e o método mais eficiente de *R. solani* na colonização do substrato, foi adotado a metodologia citada por Santos et al.

### 6.8 Biocontrole de *Trichoderma* spp. a *R. Solani*

Sementes de soja (*Glycine max (L.) Merr*) foram tratadas com suspensão de conídios ajustada para  $1 \times 10^7$  conídios/mL<sup>-1</sup> dos 10 isolados de *Trichoderma* spp. selecionados conforme o perfil genético com auxílio do BOX-PCR. No preparo do inóculo dos isolados de *Trichoderma* spp., dois discos de 9 mm de diâmetro de meio de cultura B.D.A. contendo estruturas propagativas dos isolados foram transferidos assepticamente para sacos plásticos de polipropileno transparentes, capacidade de 500 mL, contendo 100 g de arroz umedecidos em água, na proporção de 1:1 (50 g de arroz e 50 mL de água) e previamente autoclavados a 121 °C e 1 atm de pressão, por meia hora. As culturas foram incubadas em B.O.D. a  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo de doze horas de luz e escuro, durante sete dias (PAPAVIZAS, 1982). As sementes foram tratadas durante a semeadura com aplicação da suspensão no sulco do plantio na concentração de 1 ml por semente, semeadas em copos plásticos com capacidade de 700 mL, contendo solo infestados com *R. solani*. A infestação do solo foi realizada na concentração de 0.446g do patógeno colonizado no arroz, triturado e homogeneizado no solo, como mencionado para o teste de patogenicidade., O experimento foi conduzido em DBC, com três repetições por tratamento, contendo 10 copos por repetição, semeados com três sementes. O percentual de germinação foi avaliado diariamente até o 7 dia após a semeadura (DAS) deste período em diante também foram avaliados o índice de incidência, computando a porcentagem de plantas infectadas por *R. solani* e, o comprimento em cm da raiz e parte aérea das plantas. Para avaliar

o índice de severidade foi utilizado a escala de notas proposta por Goulart (2022): 0- Plântulas saudias; lesão tipo 1 - Intensidade leve; lesão tipo 2 - Intensidade Moderada; e Lesão Tipo 3 – Intensidade severa, como representado na **figura 1**: os dados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Scott-Knott, em 5% de probabilidade, utilizando o software R (R Core Team, 2022).

**Figura 1:** Escala de notas para a avaliação de severidade de lesões de *Rhizoctonia solani* em plântulas de soja. Retirado de Goulart (2022).



## 6.8 Análises estatísticas

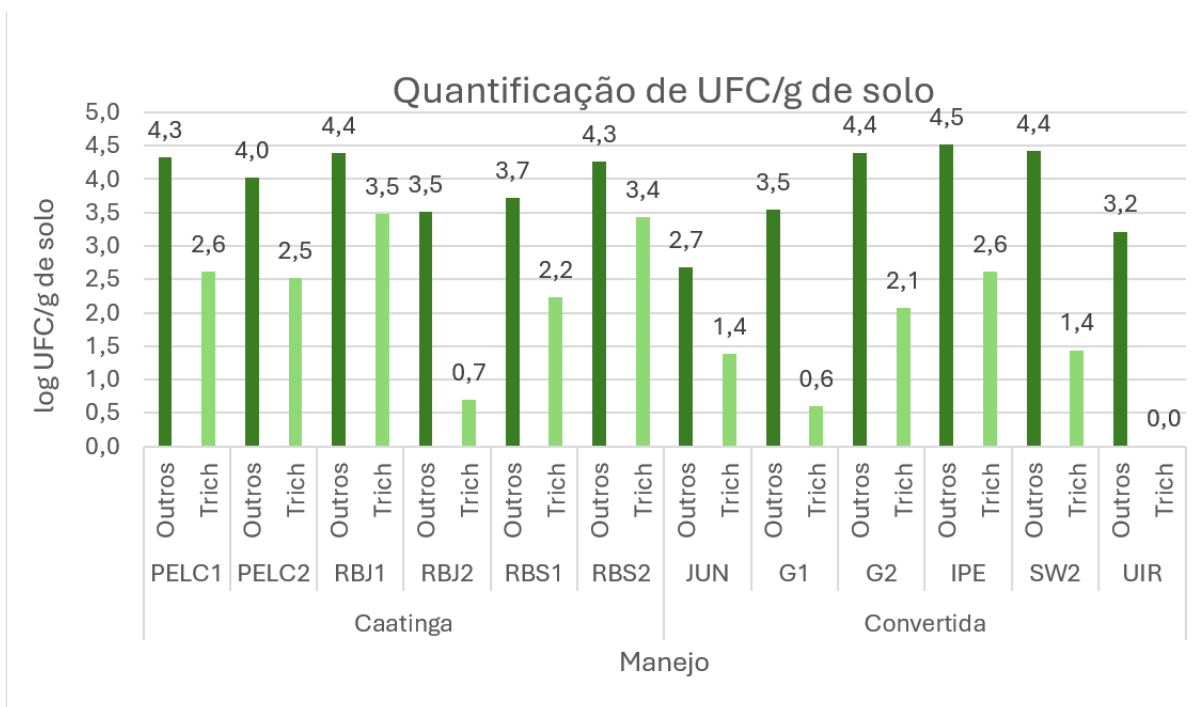
As análises estatísticas foram realizadas com o software R (R Core Team, 2022) e os resultados submetidos aos testes de normalidade dos resíduos por Shapiro-Wilk e homogeneidade das variâncias por Bartlett's. Os dados que apresentaram distribuição normal e homocedasticidade foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F ( $p \leq 0.05$ ) com as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott para os experimentos *in vivo*.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Coleta de solo e quantificação de UFC'S

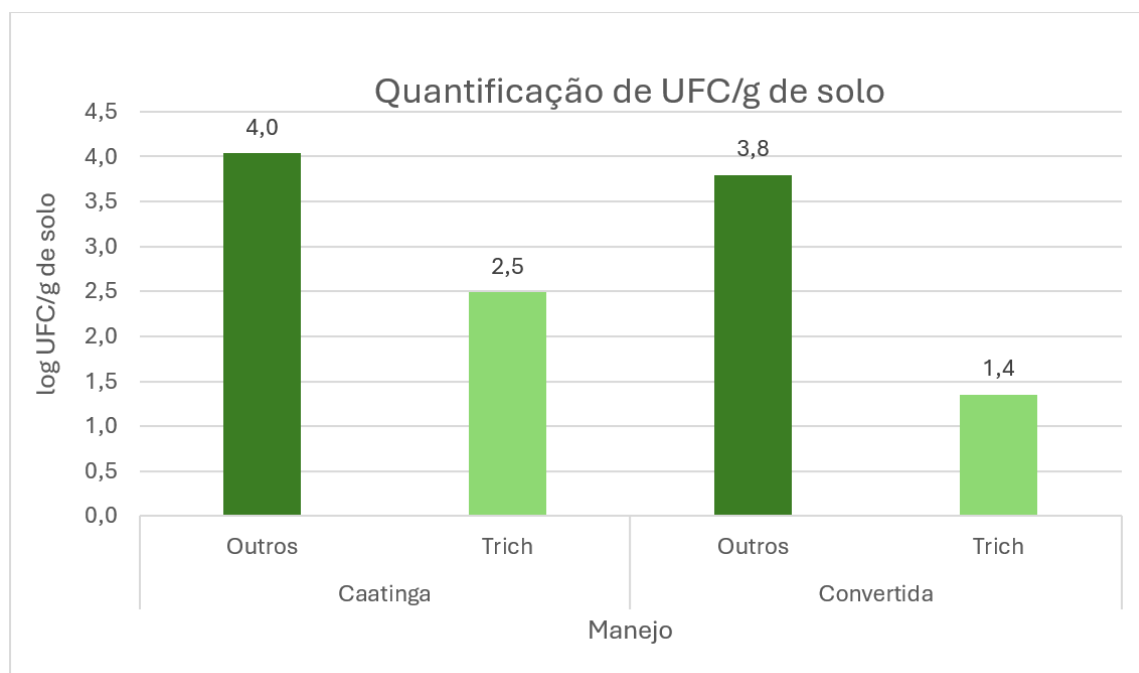
Para a contagem das colônias, representando a avaliação quantitativa, após 7 dias, foi realizada a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de fungos que cresceram nas placas preparadas da diluição, com auxílio de um contador de colônias manual para obtenção do número de esporo inicial. Os dados da análise dos resultados da contagem das colônias identificando a quantidade de esporos por diluição, estão representados na **figura 2**.

**Figura 2:** Contagem de colônias no fator de diluição (10-3) após 7 dias de crescimento em BOD a 25°C.



Observou-se na figura 2, que em talhões de áreas convertidas para o plantio de banana, o gênero *Trichoderma* representou o seu menor percentual, como é visto na área UIR; enquanto outros gêneros atingem 4,5 log UFC/g de solo em áreas de conversão para banana. Os resultados apresentados mostram que em áreas naturais de Caatinga, o gênero *Trichoderma* é mais presente que em quando comparados com áreas de plantio de banana.

**Figura 3:** Contagem de colônias no fator log UFC/g de solo por manejo.



A densidade populacional média de *Trichoderma* estimada foi de 2,5 log UFC/g de solo em áreas de Caatinga, enquanto a densidade de outros fungos foi de 4,0 log UFC/g, já em áreas convertidas para o plantio de bananeira, a densidade média de *Trichoderma* foi de 1,4 log UFC/g, enquanto que a de outros fungos foi de 3,8 log UFC/g.

## 7.2 Obtenção dos isolados de *Trichoderma* spp.

Foram obtidas oitenta cepas de *Trichoderma* spp. nativas da região da Caatinga localizada no município de Jaíba. Dos quais 26 dos isolados foram coletados de solo convertido para o plantio de Banana (*Musae* spp.) de propriedades privadas, dos quais catorze (14) foram isoladas da Fazenda Geraldo e doze (12) fazenda SWZ-AGRO. Foram obtidos também cinquenta e quatro (54) isolados de mata natural; onde; vinte e quatro (24) são oriundos da Reserva Serra Azul; quatro (4) Parque Estadual Lagoa do Cajueiro, e vinte e seis (26) da Reserva Biológica do Jaíba; estirpes isoladas foram identificadas e registradas com códigos de letras das iniciais dos locais que foram coletadas.

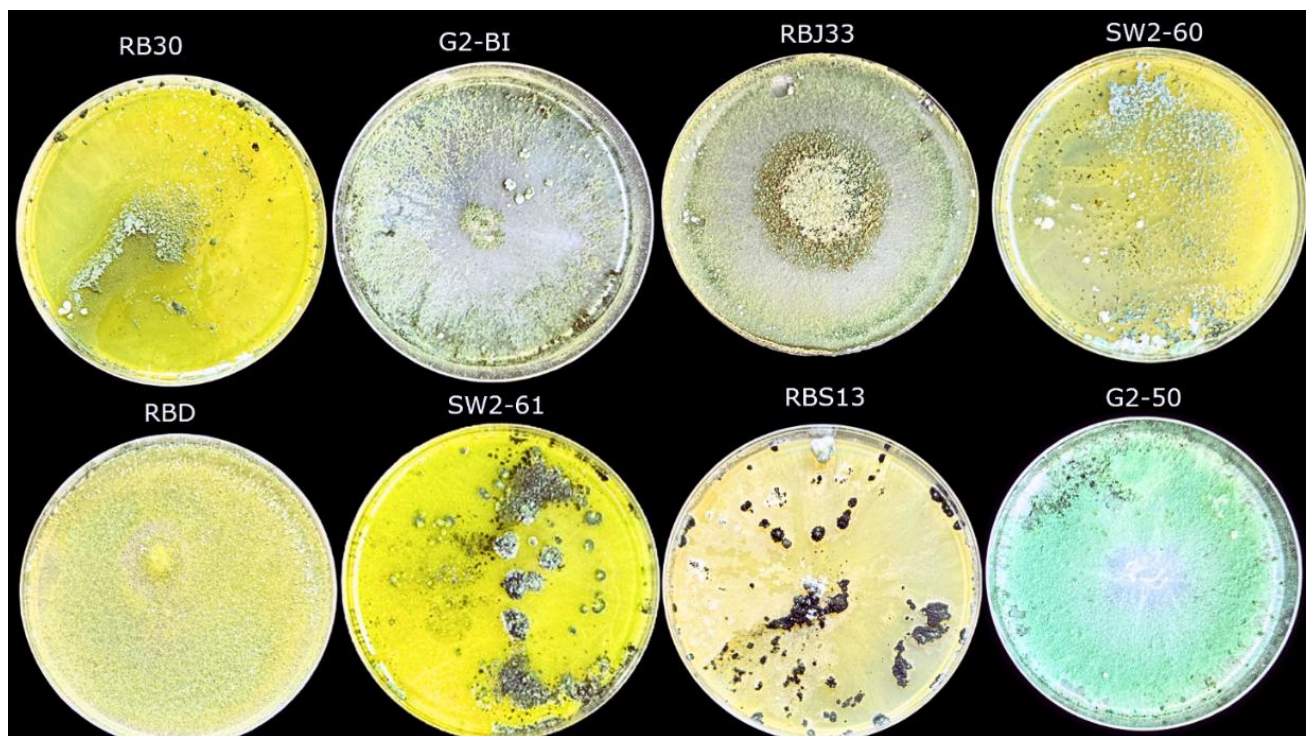
**Tabela 1:** Origem dos isolados de *Trichoderma* obtidos a partir de amostras de solo do município de Jaíba-MG.

|    | ISOLADOS | MATERIAL     | REGIÃO                                       |
|----|----------|--------------|----------------------------------------------|
| 1  | G2-51    | Solo Banana  | Fazenda Geraldo (Jaíba-MG)                   |
| 2  | G2-49    | Solo Banana  | Fazenda Geraldo (Jaíba-MG)                   |
| 3  | G2-P17   | Solo Banana  | Fazenda Geraldo (Jaíba-MG)                   |
| 4  | G2-47    | Solo Banana  | Fazenda Geraldo (Jaíba-MG)                   |
| 5  | G2-48    | Solo Banana  | Fazenda Geraldo (Jaíba-MG)                   |
| 6  | G2-52    | Solo Banana  | Fazenda Geraldo (Jaíba-MG)                   |
| 7  | G2-55    | Solo Banana  | Fazenda Geraldo (Jaíba-MG)                   |
| 8  | G2-50    | Solo Banana  | Fazenda Geraldo (Jaíba-MG)                   |
| 9  | G2-54    | Solo Banana  | Fazenda Geraldo (Jaíba-MG)                   |
| 10 | G2-53    | Solo Banana  | Fazenda Geraldo (Jaíba-MG)                   |
| 11 | G2-BI    | Solo Banana  | Fazenda Geraldo (Jaíba-MG)                   |
| 12 | G2-45    | Solo Banana  | Fazenda Geraldo (Jaíba-MG)                   |
| 13 | G2-PIP1  | Solo Banana  | Fazenda Geraldo (Jaíba-MG)                   |
| 14 | G1-P1    | Solo Banana  | Fazenda Geraldo (Jaíba-MG)                   |
| 15 | RBJF     | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 16 | RBJ31    | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 17 | RBJ34    | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 18 | RBJ33    | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 19 | RBJ133   | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 20 | RBJA     | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 21 | RBJE     | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 22 | RBJ36    | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 23 | RBJ-P1   | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 24 | RBJ3     | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 25 | RBJ35    | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 26 | RBJC     | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 27 | RBJG     | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 28 | RBJB     | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 29 | RBJ1     | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 30 | RBJ21    | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 31 | RB27     | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 32 | RB19     | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 33 | RB38     | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 34 | RB26     | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 35 | RB24     | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 36 | RBE      | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 37 | RBC      | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 38 | RBA      | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 39 | RBD      | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 40 | RB28     | Solo Natural | Reserva Biológica do Jaíba (Jaíba-MG)        |
| 41 | PE-42    | Solo Natural | Parque Estadual Lagoa do Cajueiro (Jaíba-MG) |
| 42 | PE-43    | Solo Natural | Parque Estadual Lagoa do Cajueiro (Jaíba-MG) |
| 43 | PEL-40   | Solo Natural | Parque Estadual Lagoa do Cajueiro (Jaíba-MG) |
| 44 | PEL-35   | Solo Natural | Parque Estadual Lagoa do Cajueiro (Jaíba-MG) |
| 45 | RBS1     | Solo Natural | Reserva Biológica Serra Azul (Jaíba-MG)      |
| 46 | RBS10    | Solo Natural | Reserva Biológica Serra Azul (Jaíba-MG)      |
| 47 | RBS5     | Solo Natural | Reserva Biológica Serra Azul (Jaíba-MG)      |

|    |         |              |                                         |
|----|---------|--------------|-----------------------------------------|
| 48 | RBS22   | Solo Natural | Reserva Biológica Serra Azul (Jaíba-MG) |
| 49 | RBS15   | Solo Natural | Reserva Biológica Serra Azul (Jaíba-MG) |
| 50 | RBS18   | Solo Natural | Reserva Biológica Serra Azul (Jaíba-MG) |
| 51 | RBS14   | Solo Natural | Reserva Biológica Serra Azul (Jaíba-MG) |
| 52 | RBS16   | Solo Natural | Reserva Biológica Serra Azul (Jaíba-MG) |
| 53 | RBS7    | Solo Natural | Reserva Biológica Serra Azul (Jaíba-MG) |
| 54 | RBS20   | Solo Natural | Reserva Biológica Serra Azul (Jaíba-MG) |
| 55 | RBS17   | Solo Natural | Reserva Biológica Serra Azul (Jaíba-MG) |
| 56 | RBS3    | Solo Natural | Reserva Biológica Serra Azul (Jaíba-MG) |
| 57 | RBS-LEI | Solo Natural | Reserva Biológica Serra Azul (Jaíba-MG) |
| 58 | RBS9    | Solo Natural | Reserva Biológica Serra Azul (Jaíba-MG) |
| 59 | RBS     | Solo Natural | Reserva Biológica Serra Azul (Jaíba-MG) |
| 60 | RBS2    | Solo Natural | Reserva Biológica Serra Azul (Jaíba-MG) |
| 61 | RBS8    | Solo Natural | Reserva Biológica Serra Azul (Jaíba-MG) |
| 62 | RBS6    | Solo Natural | Reserva Biológica Serra Azul (Jaíba-MG) |
| 63 | RBS4    | Solo Natural | Reserva Biológica Serra Azul (Jaíba-MG) |
| 64 | RBS11   | Solo Natural | Reserva Biológica Serra Azul (Jaíba-MG) |
| 65 | RBSF    | Solo Natural | Reserva Biológica Serra Azul (Jaíba-MG) |
| 66 | RB30    | Solo Natural | Reserva Biológica Serra Azul (Jaíba-MG) |
| 67 | RBS21   | Solo Natural | Reserva Biológica Serra Azul (Jaíba-MG) |
| 68 | RBS133  | Solo Natural | Reserva Biológica Serra Azul (Jaíba-MG) |
| 69 | SW2-59  | Solo Banana  | SWZ-AGRO (Jaíba-MG)                     |
| 70 | SW2-P4  | Solo Banana  | SWZ-AGRO (Jaíba-MG)                     |
| 71 | SW2-56  | Solo Banana  | SWZ-AGRO (Jaíba-MG)                     |
| 72 | SW2-YU  | Solo Banana  | SWZ-AGRO (Jaíba-MG)                     |
| 73 | SW2-57  | Solo Banana  | SWZ-AGRO (Jaíba-MG)                     |
| 74 | SW2-622 | Solo Banana  | SWZ-AGRO (Jaíba-MG)                     |
| 75 | SW2-60  | Solo Banana  | SWZ-AGRO (Jaíba-MG)                     |
| 76 | SW2-666 | Solo Banana  | SWZ-AGRO (Jaíba-MG)                     |
| 77 | SW2-58  | Solo Banana  | SWZ-AGRO (Jaíba-MG)                     |
| 78 | SW2-62  | Solo Banana  | SWZ-AGRO (Jaíba-MG)                     |
| 79 | SW2-600 | Solo Banana  | SWZ-AGRO (Jaíba-MG)                     |
| 80 | SW2-662 | Solo Banana  | SWZ-AGRO (Jaíba-MG)                     |

Foi possível observar uma grande diversidade morfológica entre os 80 isolados de *Trichoderma* (figura 4). As colônias são formadas por massa de micélio de aparência flocosa e crescimento rápido, cerca de 3 centímetros por dia em meio BDA, ocupando a placa de Petri em aproximadamente 3 a 4 dias. Nos primeiros dias de cultivo, as colônias apresentavam cor branca, sendo posteriormente substituída por diversos tons de verde e alguns entretons de amarelo. Na maioria das placas o micélio se desenvolve apresentando anéis formados por zonas concêntricas. Além destas características determinantes, alguns isolados exibiram a capacidade de difusão de pigmentos no meio de cultura, foi observado ainda alta taxa de esporulação quando estes fungos eram expostos a diferentes luminosidades.

**Figura 4:** Diversidade morfológica dos isolados de *Trichoderma* oriundos de amostras de solo coletada no bioma Caatinga cultivados em meio BDA em placas de Petri.



### 7.3 Análise de BOX-PCR



RBS12; RB19; G2-49. As sequências de nucleotídeos dos genes *tef1* dos isolados de *Trichoderma* foram comparadas com as sequências depositadas nas bases de dados do NCBI utilizando o programa BLASTN. Conforme os resultados dessa análise os isolados SW1-662; SW2-62; SW2-P4; SW2-59 são relacionados com *T. huanense*, os isolados PE43; SW2-YU; RBJ33; RB26; são relacionados com *T. longibrachiatum*. o isolado PEL39 é relacionado com *T. neokoningii* e os isolado RBS17; TRICH; RBS4; RBS12; RB19; G2-49 foram relacionados com *T. pseudoasperelloides* (**Tabela 2**).

**Tabela 2:** Identidade de isolados de *Trichoderma* spp. obtidos de amostras de solo coletadas no município de Jaíba-MG. A identificação molecular foi realizada por meio do sequenciamento de um fragmento do gene *tef1* e comparadas com sequencias deste gene de

| <b>Isolados</b>              | <b>Espécie tipo mais próxima em banco de dados</b> | <b>Fragmento <i>tef1-α</i> (bp)</b> |
|------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------|
| SW1662, SW262, SW2P4 e SW259 | <i>T. huanense</i>                                 | 725                                 |
| PE43, SW2YU, RBJ33 e RB26    | <i>T. longibrachiatum</i>                          | 725                                 |
| PEL39                        | <i>T. neokoningii</i>                              | 725                                 |
| RBS17 e TRICH                | <i>T. pseudoasperelloides</i>                      | 816                                 |
| RBS4 e REBS12                | <i>T. pseudoasperelloides</i>                      | 714                                 |
| RB19 e G2-49                 | <i>T. pseudoasperelloides</i>                      | 714                                 |

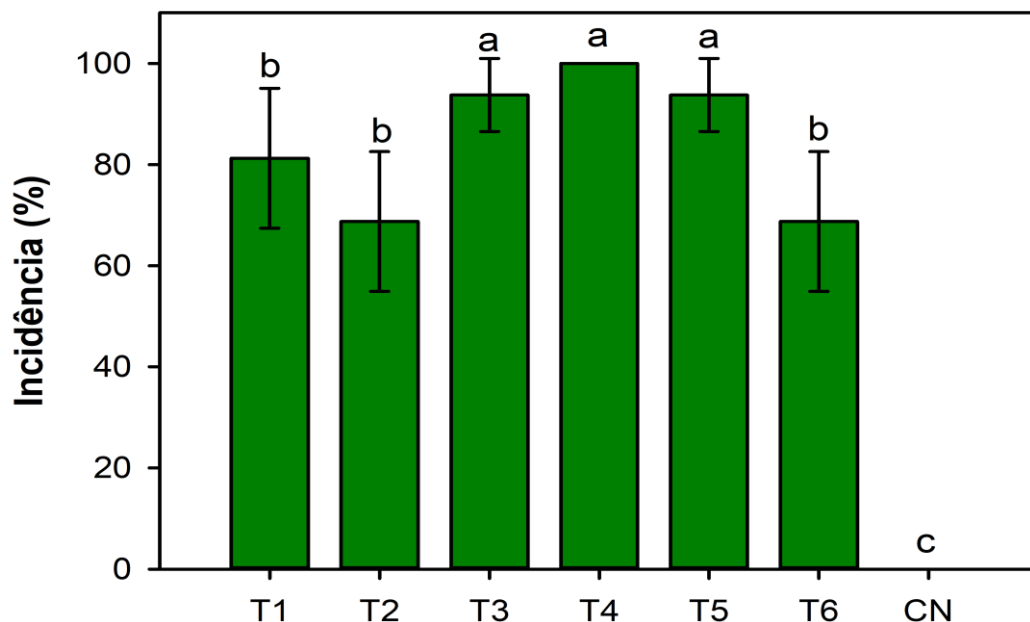
### 7.5 Teste de patogenicidade

Os sintomas exibidos pelas plantas inoculadas foram observados em casa de vegetação, apenas nos tratamentos em que se inoculou *R. solani*. No sétimo dia após a inoculação, observaram-se, nas estipulas e base dos pecíolos, que as lesões que atingiram, em média, a extensão de 1,5 cm, eram deprimidas e marrom-avermelhadas, detectaram-se sintomas de necrose da gema apical, avermelhamento dos pecíolos e posição horizontal da base de pecíolos. Ao sétimo dia após a semeadura da soja, as concentrações de 1,4 g, 0,446 g, 0,144g ,5 grãos de arroz cultivado com *R. solani* e as quantidades de 5 escleródios, 3 escleródios (**tabela 3**), foram os suficientes para causar o processo de infecção de doença nas plântulas de soja.

**Tabela 3:** Concentrações de inóculo de *R. solani*

|               |                  |
|---------------|------------------|
| <b>TRAT 1</b> | 5 Escleródios    |
| <b>TRAT 2</b> | 3 Escleródios    |
| <b>TRAT 3</b> | 5 grãos de arroz |
| <b>TRAT 4</b> | 1,4g             |
| <b>TRAT 5</b> | 0,446 g          |
| <b>TRAT 6</b> | 0,144g           |
| <b>CN</b>     | Não inoculado    |

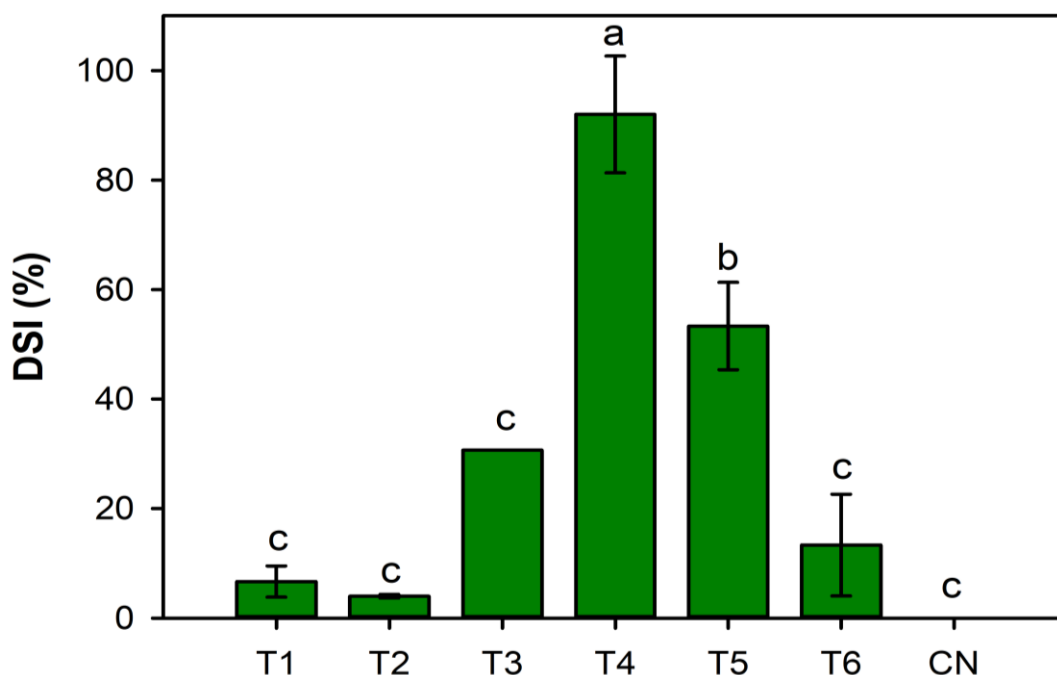
**Figura 6:** Incidência de *Rhizoctonia solani* em plantas de soja, submetidas aos seguintes tratamentos; T1- 5 escleródios a 1 cm da superfície; T2- 3 escleródios homogeneizado no solo, T3- 5 grãos de arroz colonizados; T4- 1,4g de inóculo crescido no arroz triturado e homogeneizado no solo; T5- 0,446g de inóculo crescido no arroz triturado e homogeneizado no solo; T6- 0,144 g de inóculo crescido no arroz triturado e homogeneizado no solo.



Incidência de *R. solani* em soja submetidos a diferentes métodos de inoculação. Médias seguidas por letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade.

De acordo com a figura 8, observou-se que apenas o tratamento testemunha não apresenta o fungo *R. solani* e todos os métodos de inoculação empregados proporcionaram o desenvolvimento da doença nas plantas de soja. Verificou-se também que os primeiros sintomas na soja foram observados em plantas inoculadas pelo método do T4, onde a incidência atingiu 100%. O aumento da concentração do inóculo a 1,4g, macerado e homogeneizado no solo comprovou a maior e mais rápida ação do patógeno, quando comparado 68 % de incidência de T6 -tratamento com o mesmo inóculo, nas mesmas condições, porém em concentração de 0,144g; Segundo Medeiros et al. (18), metodologias de infestação de solo são menos severas, e exigem maior tempo, e uma concentração de doença ímpar para aparecimento dos sintomas, uma vez que o patógeno precisa primeiramente se estabelecer no solo para então efetuar a infecção; diante disso maiores concentrações podem interferir na incidência do patógeno; Tratamentos como T1 e T2, incidência 81% e 68% , respectivamente, mostram que incidência da doença pode também ser influenciada na disposição do inóculo no solo, visto que o tratamento T1; 5 escleródios depositados a 1cm da superfície, houve maior incidência da doença, quando comparado a T2, onde os escleródios estão misturados aleatoriamente no solo. Ainda acerca dos resultados de patogenicidade é possível inferir que a inoculação com 5 grãos de arroz colonizados sem ser triturados, é capaz de causar incidência de 93%, o que mostra que embora A trituração do arroz colonizado seja um método de uniformizar o inóculo no solo, isso não interferiu nesse teste no desenvolvimento da doença. Em outro trabalho realizado por Oliveira et al. (2008), com diferentes métodos de inoculação de *Rhizoctonia solani* na cultura da cenoura, também foi possível observar diferenças entre o método de contato e outros métodos de inoculação, obtendo desempenho inferior ou superior, isso deve-se ao contato direto da semente com o patógeno, já que o contato das sementes com o patógeno é fundamental para que se obtenham sementes com diferentes níveis de inóculo.

**Figura 7:** Severidade de *Rhizoctonia solani* em plantas de soja submetidas aos seguintes tratamentos; T1- 5 escleródios a 1 cm da superfície; T2- 3 escleródios homogeneizado no solo, T3- 5 grãos de arroz colonizados; T4- 1,4g de inóculo crescido no arroz triturado e homogeneizado no solo; T5- 0,446g de inóculo crescido no arroz triturado e homogeneizado no solo; T6- 0,144 g de inóculo crescido no arroz triturado e homogeneizado no solo.



Severidade de *R. solani* em soja submetidos a diferentes métodos de inoculação, médias seguidas por letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade

Para a variável severidade da doença em folhas (Figura 8), verificou-se que os diferentes métodos de inoculação não foram semelhantes entre si, diferindo de tratamento para tratamento. Todos os métodos apresentaram percentual de severidade da doença variando de 4% (T2) a 92% (T4). As plântulas apresentaram sintomas de murcha e amarelecimento nas folhas, com necrose nas bordas foliares e posteriormente senescência. O maior índice de severidade foi constatado em plântulas oriundas de sementes inoculadas pelo T4-92%, com concentrações 1,4g de inoculo macerado, quando comparadas com menor severidade de 4% do T2, inoculado com 3 escleródios. O mesmo ocorre com tratamentos que diferem somente em concentrações de inóculos; T5- 0,446g e T6- 0,144g, com severidade de 53% e 13%, respectivamente, podendo inferir que as concentrações, o inoculo e a disponibilidade espacial do inoculo no solo podem interferir diretamente na severidade da doença. Mediante ao teste de patogenicidade de *Rhizoctonia solani*, com diferentes concentrações em casa de vegetação, os sintomas observados foram; lesão na região do colo nas plântulas, com aparecimentos de lesões profundas, progredindo para o encolhimento do caule lesão nos cotilédones e deterioração da semente (figura 10) evidenciando a capacidade do patógeno causar doença em diferentes formas de inoculação. Doenças como *R. solani* que incide em plântulas jovens ou nas sementes que apodrecem quando recém semeadas se classificam no grupo de doenças de “damping-off”, mais conhecido como tombamento de plântulas, e podem reduzir o stand inicial de plantas no campo

e conseqüentemente causar danos econômicos.

**Figura 8:** Sintomas de *Rhizoctonia solani* em plântulas de soja.



(A) Semente de soja com sintomas de deterioração; (b) plântula de soja com lesão no colo; (C) plântula de soja com lesão nos cotilédones – imagens oriundas do teste de patogenicidade

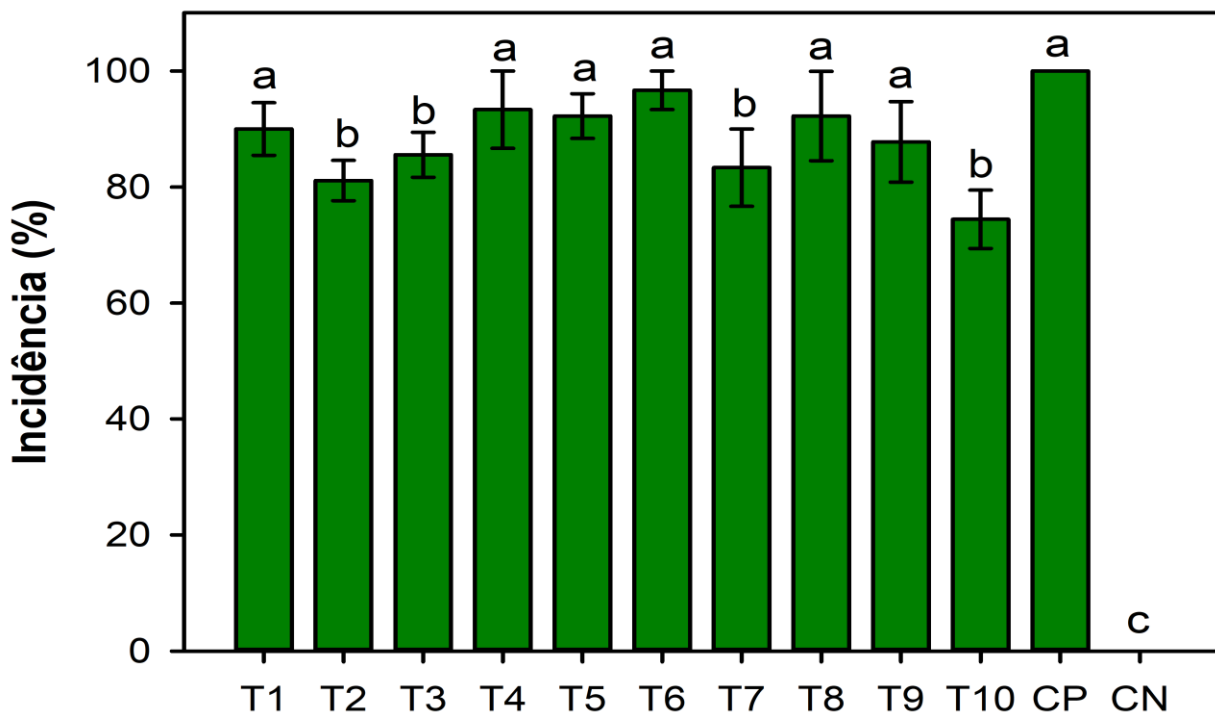
#### 7.6 Avaliação do controle de *Rhizoctonia solani* por *Trichoderma* spp. *in vivo*

Foram selecionados dez tratamentos de *Trichoderma* spp, para o experimento *in vivo*, no controle de *Rhizoctonia solani*. Para a seleção desses isolados, foram considerados os resultados do BOX-PCR. As plantas foram avaliadas quanto a incidência da doença (figura 11). severidade, emergência, altura e comprimento da parte aérea (figura 12) e raiz. Foram inoculados simultaneamente *Rhizoctonia solani* no substrato de crescimento de plantas e cada um dos dez isolados de *Trichoderma* spp. no sulco do plantio. As menores incidências de lesões em plântulas de soja e as maiores porcentagens de controle foram observadas nas parcelas tratadas com os isolados PEL39 (*T. neokoningii*) e RBS17 (*T. pseudoasperelloides*), com incidência de 76% e 73%, respectivamente (figura 12) e diferença significativa em relação à testemunha, cujo substrato foi infestado apenas com o patógeno. Por outro lado, os isolados, PE-43 (*T. longibrachiatum*) e TRICH (*T. pseudoasperelloides*) não diferiram significativamente em relação à testemunha, apresentando porcentagens de incidência de 91%, 90%%, respectivamente. A avaliação da incidência de *R. solani* foi efetuada uma única vez, no decimo sétimo dia após a semeadura sendo obtida pela contagem de plantas que apresentaram sintomas típicos da doença, como lesão na região do colo nas plântulas, lesões profundas, e lesão nos cotilédones. A avaliação dos sintomas foi feita através de análise visual, planta por planta e os valores foram expressos em porcentagem que foram usados para gerar as análises estatísticas.

**Tabela 4:** Isolados e os tratamentos condizentes ao teste *in vivo*.

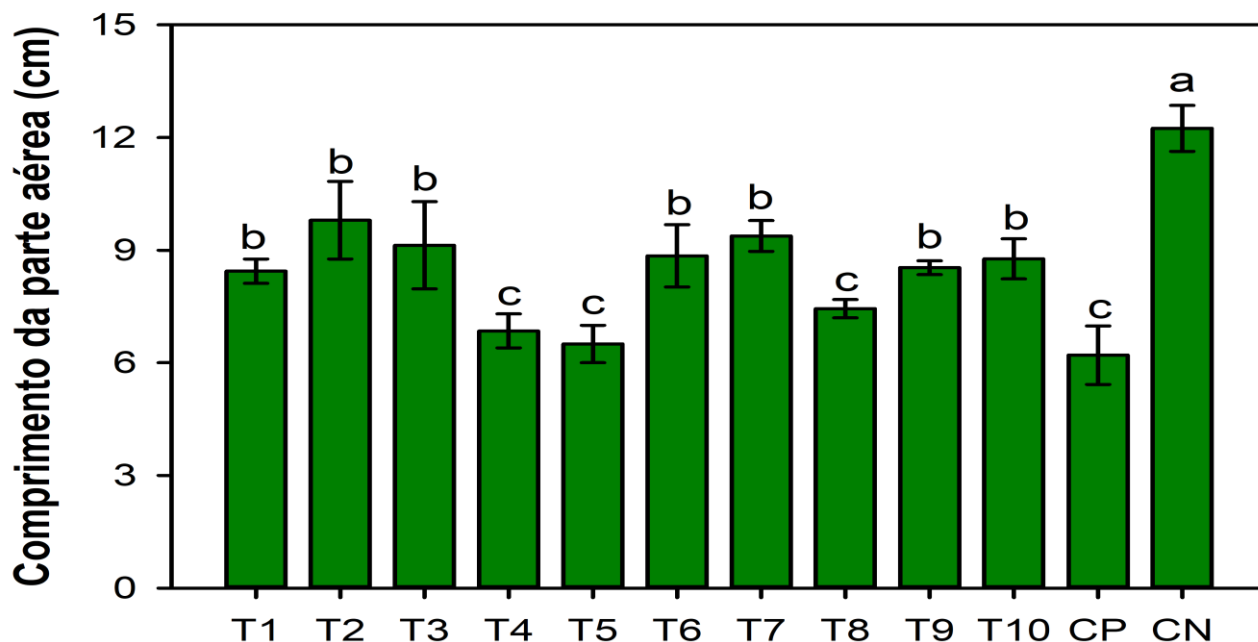
| Tratamentos | Isolados |
|-------------|----------|
| T1          | RBS12    |
| T2          | RBS17    |
| T3          | RBS4     |
| T4          | RB26     |
| T5          | SW2-YU   |
| T6          | PE-43    |
| T7          | G2-49    |
| T8          | TRICH    |
| T9          | SW2-59   |
| T10         | PEL-39   |
| CN          |          |
| CP          |          |

**Figura 9:** Incidência de *R. solani* em soja submetidos aos seguintes tratamentos de *Trichoderma* spp: T1-RBS12; T2-RBS17; T3-RBS4; RB26; SW2-YU; T6- PE43; T7-G2-49; T8-TRICH; T9-SW2-59; T10-PEL39. Com CP, como controle positivo, com inoculo do patógeno e sem tratamento e CN sem tratamento e sem inoculo de *R. solani*



Na avaliação de 10 isolados de *Trichoderma* spp. à *Rhizoctonia solani*, somente quatro tratamentos; T10 (PEL39); T2 (RBS17); T9 (SW2-59); e T3 (RBS4); com incidência de 76%, 73%, 77% e 78%, respectivamente, obtiveram incidência inferior a 79% reduzindo significativamente a incidência de lesões em plântulas de soja. Enquanto, 6 isolados T6 (PE-43); T8 (TRICH); T1 (RBS12); T4 (RB26); T5 (SW2-59) E T7 (G2-49) tiveram efeito semelhante à testemunha com patógeno, ou seja, não houve controle da doença. Para o volume de raiz não houve diferença significativa entre as médias de nenhum tratamento pelo teste de Scott Knott ao nível de 5%, o mesmo ocorreu para o teste de severidade. Ou seja, não houve influência da ação de *Trichoderma* spp no controle de lesões em plântulas de soja inoculadas com *Rhizoctonia solani* e nem no comprimento radicular das plantas.

**Figura 10-** Comprimento da parte aérea de plantas de soja submetidos aos seguintes tratamentos de *Trichoderma* spp: T1-RBS12; T2-RBS17; T3-RBS4; T4- RB26; T5-SW2-YU; T6- PE43; T7-G2-49; T8-TRICH; T9-SW2-59; T10-PEL39 com substrato inoculado com *R. solani*. CP- Controle positivo, com inóculo do patógeno e sem

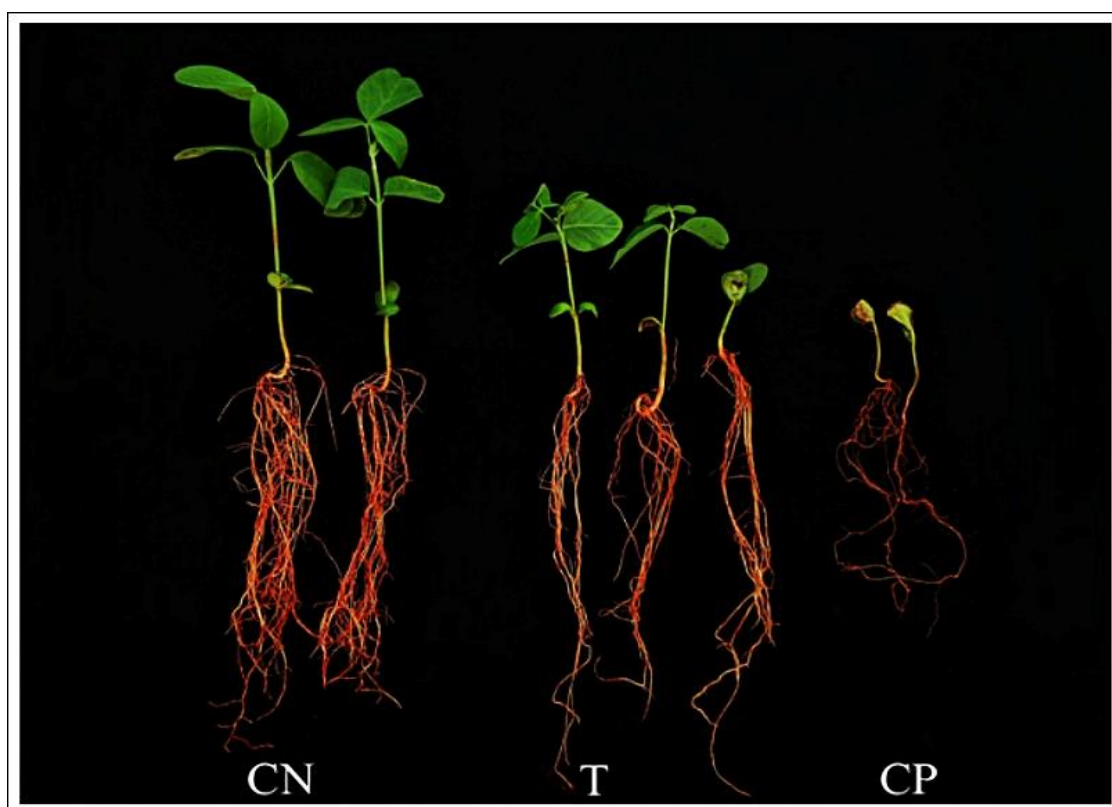


Comprimento da parte aérea de plantas de soja submetidas a tratamentos com isolados de *Trichoderma* spp. Médias seguidas por letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade.

Observa-se que para o comprimento da parte aérea o tratamento T2 - RBS17 (isolado de *Trichoderma*) apresentou o maior valor; seguido dos tratamentos T7 (G2-49), T6, T10, e T9,

respectivamente, demonstrando que o fungo pode estar associado ao aumento do comprimento da parte aérea. O tratamento T5 (SW2-YU) identificado com *T. longibrachiatum* apresentou o valor mais baixo dentre os tratamentos, com decréscimo de 2,7 cm quando comparado ao tratamento T6 (PEL 43) também identificado como *T. longibrachiatum* com média de comprimento 8.9 cm. O tratamento T1(RBS12) (*T. pseudoasperelloides*) apresentou um acréscimo de 2,7 cm no comprimento aéreo quando comparado com o T4 (RB26- *T. longibrachiatum*). Os menores comprimentos da parte aérea foram os dos tratamentos T4 (6,2cm), T5 (6,1 cm) podendo ser associados a presença do patógeno, e a redução de mecanismos ação do *Trichoderma* spp. como promoção de crescimento o que implica no crescimento radicular e parte aérea da planta.

**Figura 11:** Comparação de parte aérea e raiz de plantas de soja T= planta tratada com o isolado PEL39 com substrato inoculado com *R. solani*. CP- Controle positivo, com inoculo do patógeno e sem tratamento e CN sem tratamento com *Trichoderma* spp e sem inoculo de *R. solani*.



Comprimento da parte aérea de plantas de soja, teste de biocontrole, CN= planta não tratada e sem inoculação do patógeno, T= planta tratada com a estirpe; e CP= planta não tratada e com a presença do patógeno.

## 8. DISCUSSÃO

O primeiro trabalho que descreveu um isolado de *Trichoderma* como agente de biocontrole foi publicado por Weindling (1932). Desde então, várias espécies do gênero têm sido coletadas, isoladas pesquisadas e desenvolvidas como agentes de biocontrole para diversos patógenos (MELLO et al. 2007). Com este estudo, foram obtidos dados de quantificação de unidades formadoras de colônias por grama de solo, em dois diferentes tipos de manejo dentro do bioma Caatinga, dessa forma foi possível comparar a distribuição e presença do gênero de *Trichoderma* em amostras de solo de mata natural de Caatinga e amostras provenientes de solo convertido para o plantio de banana, portanto, parte dos isolados foram submetidos ao contato com patógenos e distúrbios como preparo do solo e aplicação de insumos na aérea convertida.

A avaliação dos resultados de UFC'S/g de solo mostraram a densidade populacional do gênero *Trichoderma* em solo convertido de 1,4 log de UFC/g quando comparado a 3,8 log de UFC/g da densidade de outros fungos, entretanto o mesmo não ocorre em solo de mata natural onde gênero *Trichoderma* é mais presente nas amostras naturais obtendo 2,5 log de UFC'g, isso pode estar atrelado, de acordo com GRANADA et al., 2019, ao processo de uma seleção de espécies resistentes à ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes e reduzidos a aeração do solo, constituindo áreas arenosas que acabam por possuir uma biomassa microbiana reduzida, o que é complementado em MEYER et al 2019 que infere que o gênero *Trichoderma* é um fungo oportunista que apresenta capacidade de colonizar substratos variados sob condições ambientais muito diversas, possuindo o maior número de enzimas hidrolíticas encontradas no Reino Fungi e também um sistema singular de reparação celular que lhe permite crescer em condições adversas.

Ao todo se obteve oitenta (80) isolados, dos quais vinte e seis (26) foram isolados de solo convertido para o plantio de Banana (*Musae* spp.) e cinquenta e quatro (54) isolados de mata natural; após as metodologias de extração de DNA, e amplificação para O BOX-PCR, construção do dendograma em 67 perfis, quinze (15) estirpes foram selecionadas para a identificação molecular, três das espécies identificadas; (*T. neokoningii*; *T. Pseudoasperelloides* e *T. Longibrachiatum* de acordo com estudos publicados em literatura são espécies conhecidas e utilizadas no controle biológico de fitopatógenos.

Em um estudo de HARMAN et al. (2004) sobre as ações de *T. Longibrachiatum* antagonicas a *R.solani*, a escolha dessa espécie para atividades de biocontrole e produção da bioformulação é devido algumas das boas propriedades que possui, como alta velocidade de crescimento, produção de elevado número de esporos no substrato e alta atividade antagonica

contra *R. solani*. A promoção de crescimento relatada condiziu com os resultados da avaliação de comprimento de parte aérea de plantas de soja tratadas com as cepas PE43 e RB26, ambas oriundas de coleta de mata natural, identificadas como *T. longibrachiatum*, que obtiveram dados de crescimento médio de parte aérea de 1,0 cm e 2,9 cm, respectivamente, em comparação ao controle positivo infestado.

Em outro estudo semelhante de FAYYADH; 2019 os resultados do efeito biológico no controle da doença de mudas de tomateiro causada por *R. solani* mostraram que *T. longibrachiatum* melhorou a germinação de sementes de tomate e aumentou o crescimento da planta em 2,2 cm, ambos resultados evidenciam a promoção de crescimento, um dos principais mecanismos de ação do clado *longibrachiatum*. Esse grupo abriga também algumas espécies de *Trichoderma* que podem ser patógenos oportunistas de humanos imunocomprometidos: (KUHLIS et al., 1999). Contudo, também abriga *T. reesei*, utilizado na produção industrial de celulase (RECZEY et al., 1996). A seção *Longibrachiatum* foi umas das primeiras a serem avaliadas utilizando métodos moleculares SAMUELS et al., 1998 Espécies dessa seção são termotolerantes podendo sobreviver e se desenvolver em temperaturas de 37 a 40 °C, o que possibilita espécies desse clado se adaptem a condições de temperaturas mais altas.

Acerca do estudo da biodiversidade presentes nas amostras identificadas, observou-se que de dez (10) antagonistas selecionados no experimento contra *R. solani in vivo*, 3 isolados (RBS17; TRICH; RBS4) foram classificados como (*T. Pseudoaspereloides* ); 1 isolado (PEL39) identificado como *T. neokoningii*; 2 isolados (RB26; SW2-YU; PE43) identificados como *T. longibrachiatum* e 1 isolado (SW2-59) identificado como- *T. huanense*, sendo esse isolado parte de um clado novo do gênero *Trichoderma* spp, denominado *Hunanense*. O reposicionamento taxonômico ocorreu no estudo de L.S. SALES et al 2025 onde 93 sequências *tefl* de 90 cepas relacionadas ao clado *Spirale* foram recuperados de bancos de dados públicos. onde houve a transferência da espécie de *T. huanense* previamente descrito no clado *Spirale* para um novo clado, outra característica da cepa SW2-59 é ter sido isolada de amostras de solo convertido para plantio de banana . Dentre os isolados identificados, PEL39 identificado como *T. neokoningii*, pertencente ao clado *Viride* faz parte do grupo de espécies isoladas de mata natural da Caatinga.

Em um estudo semelhante sobre a biodiversidade de isolados de *Trichoderma* spp., no Sudeste da Ásia, entre 78 isolados identificados, 37 pertenciam à espécie *T. harzianum*, 16 a *T. virens*, oito a *T. spirale*, três a *T. koningii*, três a *T. aureoviride*, quatro a *T. asperellum*, dois a *Hypocrea jecorina*, dois a *T. viride*, um a *T. hamatum* e um a *T. ghanense* (Kubicek et al., 2003). Na presente investigação foram identificados molecularmente 15 isolados de

*Trichoderma* spp., provenientes de solo do bioma Caatinga, e constatou que a espécie mais frequentemente isolada foi, *T. Pseudoasperelloides* com 6 isolados, em que 4 (TRICH; RBS4; RBS12; RB17 e RB19) dos isolados são de mata natural da Caatinga e apenas um (G2-49) é oriundo de amostras de solo convertido.

Neste trabalho, apenas quatro estirpes (PEL39 ;RBS17; SW2-59; e RBS4); com incidência de 76%, 73%, 77% e 78%, respectivamente, obtiveram incidência inferior a 79% reduzindo significativamente a incidência de lesões em plântulas de soja. se revelando serem efetivas *in vivo* contra *Rhizoctonia solani*, patógeno que ataca culturas economicamente importantes. De fato, a literatura refere-se a espécies de *Trichoderma* como parasitas de uma ampla gama de fitopatógenos, que a despeito da maioria dos agentes empregados no biocontrole de doenças de plantas apresentaram certo grau de especialização. Entretanto, como mencionado por Dennis & Webster 1971 o nível de controle pode variar, a depender do isolado e de sua adaptação às condições bióticas e abióticas específicas, dentro e entre espécies de *Trichoderma*, isso poderia explicar as diferenças de controle encontrada entre as estirpes testadas no experimento *in vivo* em plantas de soja.

No presente estudo, entre as 60 amostras de solo utilizadas, 30 eram provenientes de áreas convertidas para o plantio de banana e 30 eram de mata natural da Caatinga, Corabi-Adell (2004) que também trabalhou com isolados de *Trichoderma* provenientes de áreas nativas ou com reduzido efeito antrópico, avaliou a redução do potencial antagonista de alguns isolados de *Trichoderma*, o que atribuiu a redução ou ausência de dois mecanismos de ação pertencente ao gênero *Trichoderma*, o micoparasitismo e a competição, já que espécies de *Trichoderma* podem ser diferencialmente seletivas contra diferentes fungos.

A ação do micoparasitismo acontece pelo fato do *Trichoderma* conseguir localizar e detectar as hifas de fungos hospedeiros, crescendo em sua direção. Possivelmente, isto se dá devido a estímulos químicos produzidos pela hifa hospedeira, desta forma o *Trichoderma* produz estruturas análogas à apressórios e enrolar-se envolvem fortemente em toda a sua extensão para, então, penetrar e digerir a hifa (MELO, 1998). Já o mecanismo de competição é um processo referente à interação entre dois ou mais organismos, empenhados na mesma ação. (MELO, 1996). A competição por nutrientes é um mecanismo importante, pois muitos fungos fitopatogênicos são sensíveis à falta de alguns nutrientes (BENÍTEZ et al.,2004). Esse é considerado um dos mais clássicos mecanismos de biocontrole (HARMAN, 2000).

O menor potencial antagonista apresentado pelos isolados; PE-43; TRICH ; RBS12; RB26; SW2-59 e G2-49 pode ser resultado de uma maior competição pelos nutrientes, ou uma menor produção de protease e cisteína, enzimas produzidas pelas espécies de *Trichoderma*

que inativam a capacidade enzimática do fitopatógenos (Bomfim et al., 2010). A habilidade de fungos do gênero *Trichoderma* obter nutrientes do solo é superior à da maioria dos micro-organismos, seus mecanismos baseiam-se na capacidade de metabolizar diferentes tipos de açúcares tais como: celulosas, glucanas e quitinas, sendo estes processos mediados pela assimilação de enzimas e permeases (CHETT; INBAR, 1994; DELGADO-JARANA et al., 2003 Segundo HJELJORD & TRONSMO (2003).

Outra variável que pode ter interferido nos resultados foi aplicação de altas concentrações de propágulos de *Trichoderma* spp. embora altas concentrações sejam necessárias para o controle satisfatório de fitopatógenos, estudos afirmam que pode ocorrer considerável inibição da germinação dos próprios conídios do antagonista (autoinibição), quando esse gênero é aplicado em doses muito elevadas, o mesmo foi observado nos estudos de Fravel & Lewis (2004) que examinaram a redução da sobrevivência e da atividade saprofítica de *R. solani*, quando isolados de *T. hamatum* e *T. virens* foram incorporados em doses superiores a 1,5% (v:v).

Ainda acerca de variáveis que podem ter interferido nos resultados do experimento *in vivo*; Segundo HYAKUMACHI (1996), o declínio na viabilidade de *R. solani* pode se encontrar-se associado às mudanças quantitativas e qualitativas nos propágulos do patógeno. Qualitativamente, pela perda da patogenicidade ou da habilidade de produzir propágulos viáveis e, quantitativamente, pela redução direta dos níveis da população do patógeno, causado por mecanismos de antibiose e parasitismo. Outros fatores, além da concentração do antagonista, podem ter interferido no desempenho dos isolados, principalmente os ambientais. Segundo Schmidt et al. (2004), esses fatores são importantes para se determinar a quantidade do agente de controle biológico a ser aplicada para o controle da doença.

## 9. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou a importância de se estabelecer coleções de culturas de *Trichoderma* spp., que sejam representativas de áreas geográficas pouco estudadas, pois bons antagonistas estão dispersos por diferentes regiões do país. Embora a grande maioria dos isolados de *Trichoderma* obtido da Caatinga tenham sido considerados ineficientes no controle de *R. solani*, o presente trabalho gerou um número considerável de novas culturas fúngicas. Além de acessar a diversidade de isolados e dados de distribuição e densidade populacional de *Trichoderma* spp. na Caatinga, A partir da incorporação dessas 80 culturas às coleções de microrganismos da Universidade Federal de Lavras, esses novos isolados passam a fazer parte

do patrimônio de recursos genéticos microbianos, preservado na universidade. Vale salientar que a formação de coleções de culturas é de real importância pela possibilidade de se disponibilizar esses organismos para estudos e testes pela comunidade científica, o que poderá originar uma infinidade de produtos e processos de interesse biológicos.

## REFERÊNCIAS

AB'SABER, A. N. BABU, A. N.; JOGAIAH, S.; ITO, S. I.; NAGARAJ, A. K.; TRAN, L. S. P. Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenol oxidase. *\*Plant Science\**, v. 231, p. 62-73, 2015.

BARRIE, F. R. et al. *\*International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants (Melbourne Code) \**. Königstein: Koeltz Scientific Books, 2012.

BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.). *\*Controle biológico de doenças de plantas\**. Jaguariúna: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de defesa da Agricultura, 1991a. p. 1-3.

BISSETT, J. et al. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *\*IMA fungus\**, v. 6, n. 2, p. 263-295, 2015.

CAI, Feng; DRUZHININA, Irina S. Em homenagem a John Bissett: Diretrizes oficiais sobre identificação molecular de *Trichoderma*. **Diversidade Fúngica**, v. 107, p. 1-69, 2021.

CASTELLETTI, C.H.M.; SILVA, J.M.C.; TABARELLI, M.; SANTOS, A.M.M. Quanto ainda resta da Caatinga? Uma estimativa preliminar. In: SILVA, J.M.C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M.T.; LINS, L.V. (Orgs.). *Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2004. p. 91-100.

CATTELAN, A. J.; DALL'AGNOI, A. The rapid soybean growth in Brazil. *\*Ocl\**, v. 25, n. 1, p. 1-12, fev. 2024. EDP Sciences. <<http://dx.doi.org/10.1051/ocl/2017058>>.

CHAVERRI, P. et al. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *\*Mycologia\**, v. 107, n. 3, p. 558- 590, 2015.

CHAVERRI, P.; GAZIS, R. O.; SAMUELS, G. J. *Trichoderma amazonicum*, a new endophytic species on *Hevea brasiliensis* and *H. guianensis* from the Amazon basin. *\*Mycologia\**, v. 103, n. 1, p. 139-151, 2011.

CHEN, K.; ZHUANG, W. Y. Discovery from a large-scaled survey of *Trichoderma* in soil of China. *\*Scientific reports\**, v. 7, n. 1, p. 1-37, 2017.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A., MACÍAS-RODRÍGUEZ, L., DEL-VAL, E. LARSEN, J. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *\*FEMS Microbiology Ecology\**, n. 92,

2016.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. \*The nature and practice of biological control of plant pathogens\*. 1. ed. SaintPaul: APS Press. 1983. 593p.

CRUZ-MAGALHÃES, Valter et al. As NADPH oxidases Nox1 e Nox2 regulam diferencialmente os compostos orgânicos voláteis, a atividade fungistática, a promoção do crescimento das plantas e a assimilação de nutrientes no *Trichoderma atroviride*. *Fronteiras em Microbiologia*, v. 9, p. 3271, 2019.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. \*Compendium of soil fungi\*. 2nd ed. Eching: IHW-Verlag, 2007. 672 p.

DRUZHININA, I. S. et al. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. \*Fungal Genetics and Biology\*, v. 42, n. 10, p. 813-828, 2005.

DRUZHININA, I. S. et al. The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. \*BMC Evolutionary Biology\*, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2010.

DRUZHININA, I. S.; KOPCHINSKIY, A. G.; KUBICEK, C. P. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. \*Mycoscience\*, v. 47, n. 2, p. 55, 2006.

DRUZHININA, I. S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M.; MONTE, E.; KUBICEK, C. P. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. \*Nature Reviews Microbiology\*, v. 9, n. 10, p. 749, 2011.

DURMANS, MENÉNDEZ A, GODEAS A. Evaluación de *Trichoderma* spp. como antagonista de *Rhizoctonia solani* “in vitro” y como biocontrolador del damping off de plantas de tomate en invernadero. \*Revista Argentina de Microbiología\*. v.31, n.1. 2003.

FENILLE, R. C. Caracterização citomorfologica, cultural, molecular e patogênica de *Rhizoctonia solani* Kuhn associado à soja no Brasil. 2001. 138f. Tese (Doutorado em Concentração em Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0100-54052007000200005&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0100-54052007000200005&script=sci_arttext)>. Acesso em: 11. fev. 2024.

FU, Z.Q.; DONG, X. 2013. Systemic acquired resistance: Turning local infection into global defense. \*Annual Review of Plant Biology\*, 64: 839-863.

FUJIMORI, F.; OKUDA, T. Application of the random amplified polymorphic DNA using the polymerase chain reaction for efficient elimination of duplicate strains in microbial screening. \*The Journal of antibiotics\*, v. 47, n. 2, 173-182, 1994.

HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. \*Phytopathology\*, v. 96, n. 2, p. 190-194, 2006.

HARMAN, G. E., HOWELL, C. R., VITERBO, A., CHET, I.; LORITO, M.

Trichoderma species opportunistic, avirulent plant symbionts. \*Nature Reviews Microbiology\*, v. 2, p. 43-56. 2004.

HOWELL, C. R. Effect of *Gliocladium virens* on *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, and damping-off of cotton seedlings. *Phytopathology*, v. 72, p. 496-498, 1982.

HU, J. et al. Large-scale *Trichoderma* diversity was associated with ecosystem, climate and geographic location. *Environmental Microbiology*, 2020.

ISLAM, S.; AKANDA, A. M.; SULTANA, F.; HOSSAIN, M. M. Chilli rhizosphere fungus *Aspergillus* spp. PPA1 promotes vegetative growth of cucumber (*Cucumis sativus*) plants upon root colonisation. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, v.47, n.10, p.1231-1238, 2014.

JAKLITSCH, W. M. European species of *Hypocrea* part II: species with hyaline ascospores. *Fungal diversity*, v. 48, n. 1, p. 1-250, 2011.

JAKLITSCH, W. M.; VOGLMAYR, H. Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in mycology*, v. 80, p. 1-87, 2015.

KASHYAP, P. L., RAI, P., SRIVASTAVA, A. K., KUMAR, S. *Trichoderma* for climate resilient agriculture. *World J Microbiol Biotechnol*, v. 33, n. 155, 2017. DOI: 10.1007/s11274-017-2319-1.

KINDERMANN, J.; EL-AYOUTI, Y.; SAMUELS, G. J.; KUBICEK, C. P. Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the Internal Transcribed Spacer region 1 of the rDNA Cluster. *Fungal Genetics and Biology*, v. 24, n. 3, p. 298-309, 1998.

KUBICEK, C. P.; KOMON-ZELAZOWSKA, M.; DRUZHININA, I. S. Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *Journal of Zhejiang University Science B*, v. 9, n. 10, p. 753, 2008.

KUHLS, K. et al. Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia*, v. 89, n. 3, p. 442-460, 1997.

*L.S. Sales et al. Fungal Biology (2025) -Redefining the clade Spirale of the genus Trichoderma by re-analyses of marker sequences and the description of new species* 10 de janeiro. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2024.101529>

LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. *Ecologia e conservação da Caatinga*. Recife, Brasil: Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

LEAL, I. R.; VICENTE, A.; TABARELLI, M. Herbivoria por caprinos na caatinga: uma estimativa preliminar. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (eds.). *Ecologia e conservação da Caatinga*. pp. 695-715. Recife, Brasil: Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

LEAL, I.R; TABARELLI. M; SILVA.J.M.C. *Ecologia e Conservação da Caatinga*. 2. ed. Brasil: Universidade Federal de Pernambuco, 2018.

Mahde, BY, Fayyadh, MA e Al-Luaibi, SS 2019. Avaliação da formulação

biofungicida de *Trichoderma longibrachiatum* no controle do amortecimento de mudas de tomate causado por *Rhizoctonia solani*. *Jornal Basrah de Ciências Agrícolas*. 32, 2 (dezembro de 2019), 135–149. DOI: <https://doi.org/10.37077/25200860.2019.204>

MEYER, Maurício Conrado et al. *Trichoderma: uso na agricultura*, v.1, p 169-239, 2019.

NIMER, E. Climatologia da região Nordeste do Brasil. Introdução à climatologia dinâmica. *Revista Brasileira de Geografia*, v. 34, p. 3-51, 1972.

PRADO, D. As caatingas da América do Sul. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (eds.). *Ecologia e conservação da Caatinga*. Recife, Brasil: Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, 2003. pp. 3-73.

SHORESH, Michal; HARMAN, Gary E. As bases moleculares das respostas da parte aérea de mudas de milho à inoculação da raiz com *Trichoderma harzianum* T22: uma abordagem proteômica. *Fisiologia vegetal*, v. 147, n. 4, pág. 2147-2163, 2008.

SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M. T.; LINS, L. V. (orgs.). *Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2004.

Sul, por ocasião dos períodos glaciais quaternários. *Paleoclimas* (Instituto de Geografia, Universidade de São Paulo), v. 3, p. 1-19, 1977.

TABARELLI, M.; VICENTE, A. Conhecimento sobre plantas lenhosas da Caatinga: lacunas geográficas e ecológicas. In: SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M. T.; LINS, L. V. (orgs.). *Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2004. pp. 101-111.

The Nature Conservancy do Brasil; Associação Caatinga. As unidades de conservação do bioma Caatinga. In: SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M. T.; LINS, L. V. (Orgs.). *Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2004. pp. 295-300.