



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA REGIÃO TOCANTINA DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS, NATURAIS E TECNOLÓGICAS - CCENT
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FRANCIELTON DO NASCIMENTO DOS SANTOS

**SELEÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp.
COM POTENCIAL PARA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO DO FEIJÃO CAUPI EM ENSAIOS DE CASA DE VEGETAÇÃO**

Imperatriz – MA

2022





FRANCIELTON DO NASCIMENTO DOS SANTOS

**SELEÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp.
COM POTENCIAL PARA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO DO FEIJÃO CAUPI EM ENSAIOS DE CASA DE VEGETAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Exatas Naturais e Tecnológicas da Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão – UEMASUL, como pré-requisito para obtenção do título de graduação em Ciências Biológicas Licenciatura.

Orientador (a): Profa. Dra. Ivaneide de Oliveira Nascimento

Imperatriz – MA

2022



S237s

Santos, Francielton do Nascimento dos

Seleção, identificação e avaliação de isolados de *Trichoderma* spp. com potencial para indução de resistência e promoção de crescimento do feijão-caupi em ensaios de casa de vegetação / Francielton do Nascimento dos Santos. – Imperatriz, MA, 2022.

49 f.; il.

Monografia (Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão – UEMASUL, Imperatriz, MA, 2022.

1. Fungos. 2. Cultura do feijão caupi. 3. Extração de DNA. I. Título.

CDU 582.28

Ficha elaborada pelo Bibliotecário: **Raniere Nunes da Silva CRB13/729**



FRANCIELTON DO NASCIMENTO DOS SANTOS

SELEÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DE *Trichoderma spp.* COM POTENCIAL PARA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DO FEIJÃO CAUPI EM ENSAIOS DE CASA DE VEGETAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Exatas Naturais e Tecnológicas da Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão – UEMASUL, como pré-requisito para obtenção do título de graduação em Ciências Biológicas Licenciatura.

Orientador (a): Profa. Dra. Ivaneide de Oliveira Nascimento

Aprovada em: 05 / 09 / 2022

Banca Examinadora:

Ivaneide de Oliveira Nascimento

Prof^a. Dra. Ivaneide de Oliveira Nascimento, Orientadora
Doutora em Agroecologia
Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão – UEMASUL

Documento assinado digitalmente
SILVIO CORTEZ E SILVA
Data: 14/09/2022 08:41:17-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Ms. Silvio Cortez e Silva, Membro da banca examinadora
Mestre em Agronomia
Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão – UEMASUL

Sheila Elke Araújo Nunes

Prof.^a Dr.^a Sheila Elke Araújo Nunes, Membro da banca examinadora
Doutora em Medicina Tropical e Saúde Pública
Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão – UEMASUL





AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e por toda força e coragem que Ele me deu durante todos esses anos.

À Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão, pelas oportunidades, experiências e apoio.

À minha família, que tanto amo, em especial, meu pai e minha mãe, Benedito dos Santos e Elizeth Moraes, a minha namorada, Natália Rocha, por todo apoio e ajuda.

À minha orientadora, Professora Doutora Ivaneide de Oliveira, por todas as oportunidades, ensinamentos, compreensão e confiança, realmente uma mãe para todos os seus orientados.

Aos meus colegas de laboratório, em especial os integrantes do grupo “*Trichoderma*”, Luis, Neidelane, Kele e Jorge por todos os momentos compartilhados, as conversas, as risadas, as pesquisas juntos, só tenho a agradecer vocês.

Ao Leonardo e a professora Antonia Alice, ambos da UEMA campus São Luís, pelos ensinamentos e por toda a ajuda.

Aos meus colegas de turma, em especial, Carla Raissa, Alana Laisa, Ludmylla Santos, Yasmin Rita, Laryssa Steffany, Dhállyth Zainny e Noryelleh, na ajuda em alguns momentos durante a elaboração do meu trabalho e por todos os momentos compartilhados, pelas risadas, conversas e momentos únicos, espero levá-los para a vida.





RESUMO

Entre as leguminosas, o Feijão-Caupi *Vigna unguiculata* (L.) Walp, tem ganhado grande destaque no cenário mundial e brasileiro, tendo em vista que o seu valor nutricional e rápido desenvolvimento são fatores importantes para esse consumo. No entanto, essa cultura sofre com a presença de agentes patógenos que acabam degradando e gerando perdas em larga escala para muitos agricultores, a procura por produtos que inibam o desenvolvimento desse patógeno cresce cada vez mais. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo, Selecionar e identificar isolados de *Trichoderma* spp. promotores de crescimento e indutores de resistência para o cultivo de feijão caupi no estado do Maranhão em relação ao *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *tracheiphilum* (Smith) Snyder, *in vitro*, e em casa de vegetação, avaliou-se o desenvolvimento da cultura em estudo. No teste *in vitro* em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, foram feitos pareamentos de culturas utilizando trinta e seis isolados de *Trichoderma* spp, avaliados em placas de Petri contendo meio BDA, nestas foram postos discos do patógeno e do antagonista incubados à temperatura de 25°C, durante sete dias. A testemunha consistiu na inserção do disco de patógeno na placa de Petri, sem antagonista. A avaliação foi realizada no quinto e sétimo dia e consistiu na medição do crescimento micelial do patógeno. A implantação do experimento em casa de vegetação, foi em delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos, (L1, I1, A1, 44, 52 e testemunha), com 4 repetições, a testemunha foi constituída de sementes tratadas com água destilada. Os isolados selecionados foram utilizados na produção de solução líquida e formulação em pó, e foram aplicados na microbiolização de sementes de feijão Caupi. Foram avaliados a porcentagem de germinação de sementes, promoção de crescimento, parâmetros fisiológicos e severidade da fusariose. Para os parâmetros de índice de clorofila, área foliar e altura de plantas, os tratamentos com os isolados de *Trichoderma* spp., (44, 52, L1, A1 e I1), não promoveram efeito significativo ao nível de 5% na promoção de crescimento do feijoeiro em casa de vegetação. Quanto a identificação molecular todos os isolados estavam dentro do gênero *Trichoderma*. Observando a árvore filogenética foi possível verificar que os isolados foram agrupados em 8 grupos evolutivos. Os isolados do grupo 1 foram *Trichoderma* (TV1 e U1) que estavam agrupados a espécie de *T. rugulosum*. Outros isolados divididos nos grupos 2, 3, 4, 5 e 6 formaram clados exclusivos, altamente suportados e não agruparam-se com nenhuma espécie conhecida. No grupo 7 o isolado Q1 foi evolutivamente próximo de *T. polysporum* e no grupo 8 o isolado GS1 compartilhava ancestral em comum com *T. humanense*. Dos 36 isolados analisados 32 não agruparam-se a nenhuma espécie conhecida e estes estavam em clados altamente suportados, isso levanta a teoria de serem possíveis novas espécies.

Palavras-chave: Fungos; Antagonismo. Biocontrole.





ABSTRACT

Between the vegetables, the Feijão-Caupi *Vigna unguiculata* (L.) Walp, has gain a big prominence in global scenario and brazilian, considering that its nutritional value and fast development are strong factors to his consume. However, this culture suffer with the presence of pathogens that end up degrading and generating losts in a large scale to many farmers, for that the search for products that inhibit the development of this pathogen grow increasingly. In this context, the present work select and identify *Trichoderma* spp. Growth promoters and resistance inducers for the cultivation of cowpea in the state of Maranhão. in relation to *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *tracheiphilum* (Smith) Snyder, *in vitro*, and in a greenhouse and also evaluated the development of the culture under study. In the test *in vitro*, in outline fully randomized with four repetitions, culture pairings were made using thirty-six isolates of *Trichoderma*, avaliated in plaques of Petri having half BDA, in these were putted disks of pathogens and of the antagonistic incubated at the temperature of 25°C, for seven days. The witness consisted in the insertion of the disk of the pathogen in the plaque of Petri, without antagonistic. The evaluation was made on fifth and seventh day and consisted on the mediation of mycelial growing of the pathogen. The implantation of the experiment in the greenhouse, was in completely randomized design with six treatments, (L1, I1, A1, 44,52 and witness), with 4 repetitions, the witness was constituted of sedes treated with distilled water. The selected isolates were used in the fabrication of liquid solution and powder formulation, and were implicated in the microbiolization of Caupi beans seeds. The percentage of seed germination, growth promotion, physiological parameters and fusariosis severity were evaluated. For the parameters of chlorophyll index, leaf area, plant height, the treatments with the isolates of *Trichoderma* spp., (44, 52, L1, A1 e I1), did not promote signidicant effect at the level of 5% at the promotion of the bean growth in a greenhouse. Regarding molecular identification, al isolates were within the genus *Trichoderma*. Observing the phylogenetic tree, it was possible to verify that the isolates were grouped into 8 evolutionary groups. The isolates of group 1 were *Trichoderma* (TV1 and U1) that grouped the kind of *T. rugulosum*. Other isolates divided into groups 2, 3, 4, 5 and 6 formed exclusive clades, highly supported and did not cluster with any known species. At group 7 the isolate Q1 was evolutionarily close to *T. polysporum* and at the group 8 the isolate GS1 shared a common ancestor with *T. humanense*. Of the 36 isolates analyzed, 32 did not group to any known species and these were in highly supported clades, which raises the theory that new species are possible.

Key words: *Fungi*. Antgonism. biological control.





LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Sementes de feijão-caupi nas formulações em pó (à direita) e nas formulações líquida (a esquerda) para que os fungos fossem inoculados homoganeamente nas sementes.....	21
Figura 2 – Erlemeyers na mesa agitadora para homogeneização dos fungos nas sementes de feijão-caupi.....	22
Figura 3 – Pareamento nos tratamentos: A) I; B) 47; C) TJ; D) F; E) O1; F) F1.....	30
Figura 4 – Pareamento nos tratamentos: A) M1; B) Z; C) V1; D) Z1; E) TS1-1; F) 50.....	30
Figura 5 – Pareamento nos tratamentos: A) TT1; B) X; C) TS4; D) TC; E) Q1; F) S.....	30
Figura 6 – Pareamento nos tratamentos: A) 48; B) 53; C) 44; D) 46; E) 135; F) Testemunha/controlle.....	31
Figura 7 – Plântulas de feijão-caupi, submetidas à microbiolização de sementes com suspensão líquida e formulação em pó a base de <i>Trichoderma</i> spp.....	33
Figura 8 - Árvore filogenética baseada na Análise de Inferência Bayesiana da combinação do conjunto de dados de sequências de genes ITS e TEF1 α . <i>Trichoderma ceramicum</i> CBS 114576 ET foi utilizado como outgroup.....	38





LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

- Tabela 1** – Diâmetro médio de crescimento do *F. oxysporum* em pareamento com *Trichoderma* spp. cinco dias após o pareamento *in vitro*.....25
- Tabela 2** – Diâmetro médio de crescimento do *F. oxysporum* em pareamento com *Trichoderma* spp. sete dias após o pareamento *in vitro*.....26
- Tabela 3** – Avaliação do Índice de clorofila das plantas de feijão-caupi em casa de vegetação, submetidas à microbiolização de sementes com suspensão líquida e formulação em pó a base de *Trichoderma* spp., aos 20 dia após a semeadura.....35
- Tabela 4** – Avaliação da área foliar e altura das plantas de feijão-caupi em casa de vegetação, submetidas à microbiolização de sementes com suspensão líquida e formulação em pó a base de *Trichoderma* spp., realizados no 25 dia após a semeadura.....35
- Tabela 5** – Avaliação da área foliar, altura de plantas, índice de clorofila e severidade de fusariose nas plantas de feijão-caupi em casa de vegetação, submetidas à microbiolização de sementes com suspensão líquida e formulação em pó a base de *Trichoderma* spp., aos 37 dias após a semeadura.....36
- Tabela 6** – Avaliação da área foliar, altura de plantas, índice de clorofila e incidência de fusariose nas plantas de feijão-caupi em casa de vegetação, submetidas à microbiolização de sementes com suspensão líquida e formulação em pó a base de *Trichoderma* spp., aos 44 dias após a semeadura.....36
- Tabela 7** – Avaliação da área foliar, altura das plantas e índice de clorofila, nas plantas de feijão-caupi em casa de vegetação, submetidas à microbiolização de sementes com suspensão líquida e formulação em pó a base de *Trichoderma* spp., aos 51 dias após a semeadura.....37
- Gráfico 1** – Avaliação da taxa de germinação das sementes de feijão-caupi em casa de vegetação, submetidas à microbiolização de sementes com suspensão líquida e formulação em pó a base de *Trichoderma* spp., em casa de vegetação aos 4 e 7 dias após a semead 32





SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. Feijão caupi (<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp)	12
2.2. Doenças presentes na cultura do feijão caupi	13
2.3. Biocontrole com utilização de <i>Trichodermas</i> spp	15
3. OBJETIVOS	17
3.1. Geral	17
3.2. Específicos	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 Pareamento <i>in vitro</i>	18
4.2 Seleção de isolados promotores de crescimento e indutores de resistência em casa de vegetação	19
4.2.1 Produção e aplicação de <i>Trichoderma</i> spp	19
4.2.2 Implantação do experimento em Casa de vegetação	21
4.2.3 Avaliação do experimento em Casa de vegetação	21
4.4 Análises Estatísticas	22
4.5 Identificação molecular dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp	22
4.5.1 Extração de DNA	23
4.5.2 Amplificação da região ITS do rDNA	23
4.5.3 Análises de distância genética e construção de Matriz de divergência genética dos fungos	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1. Avaliação do pareamento <i>in vitro</i> com os isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	25
5.2. Avaliação dos efeitos dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp., sobre o feijão caupi em casa de vegetação	31
5.3. Identificação molecular de isolados de <i>Trichoderma</i>	38
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
REFERÊNCIAS	45



1. INTRODUÇÃO

Dentre as leguminosas existentes no mundo, o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp) tornou-se uma das mais cultivadas e comercializadas. Além do nome já citado, esse feijão também é conhecido em outros lugares com diferentes nomenclaturas como feijão-fraude, em Portugal, feijão mancunde, em Angola e feijão-massar ou de-corda, no Brasil. Essa leguminosa tem diversas formas de comercialização como em grãos secos e imaturos, farinha para o acarajé e suas sementes. Um dos seus destaques por trás da sua grande comercialização é o seu elevado teor de proteína e sua riqueza nutricional, sobretudo em países em desenvolvimento como o próprio continente africano (SILVA, 2018).

O desenvolvimento maçante do agronegócio tem promovido um aumento exponencial em diversas culturas, sobretudo as que dependem do uso de materiais sintéticos para seu desenvolvimento como fertilizantes. Com o tempo, essa cultura tem tido um aumento cada vez maior em sua produção o que faz com que o valor para produzir aumente na mesma proporção, para isso, a busca por novas formas de desenvolver o crescimento tem se tornado cada vez mais evidente. O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp.), por exemplo, é uma dessas culturas (FREIRE FILHO, 2011).

Nos últimos anos, alguns países no continente africano ganharam destaque na produção do feijão-caupi, sobre tudo a Nigéria que conseguiu produzir aproximadamente 3,02 toneladas, seguida pelo Níger que produziu cerca de 1,98 milhões de toneladas, ambos em 2016. Logo após, em terceiro lugar, no ranking mundial, apareceu o Brasil com o uma produção média de 713,3 mil toneladas com maior destaque nas regiões Nordeste, Norte e Centro-Oeste (CONAB, 2018).

De acordo com o boletim divulgado pela Conab, o ciclo 2021/2022 da segunda safra do feijão-caupi, demonstrou números expressivos no nordeste brasileiro, sobretudo em Pernambuco. De acordo com o oitavo boletim da safra de grãos, divulgado em maio de 2022, notificou que a produção para esse ciclo deve chegar a 28 mil toneladas, expressando um aumento de quase 17% em detrimento do ciclo anterior 2020/2021. Essa safra, somada a primeira e a terceira, prevê um alcance total de quase 35 mil toneladas do feijão-caupi no país, o que configura sua terceira colocação no Brasil, como produtor dessa leguminosa (CONAB, 2022).



O cultivo dessa leguminosa tem tomado duas frentes importantes. A primeira é vista na região Centro-Oeste, o qual a sua produção é concentrada nas mãos de médios e grandes produtores, com o uso de altas tecnologias, já nas regiões Norte e Nordeste, a produção é predominante pelos pequenos agricultores, no qual, muitos preferem o uso de cultivares com ciclos mais prolongados e que podem permitir a esses agricultores mais de uma colheita durante o ano, que é o cultivo de prostrado (FREIRE FILHO et. al., 2011).

O feijão-caupi também sofre com os altos índices de doenças fúngicas que o atacam. Quando acometidos por essas doenças, diversas partes acabam sofrendo danos, como é o caso de suas partes aéreas e raízes o que faz com que seja comprometida sua produção de grãos, situação essa vista bastante nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Em alguns estados do Brasil, como o que acontece no Pará, os prejuízos provocados por esses fungos têm feito com que os produtores encontrem o quanto antes essas incidências para inibir o seu desenvolvimento. Entre os agentes patogênicos se encontram o (*Sclerotium rolfsii*) causador da murcha de esclerócio, (*Rhizoctonia solani*) causador da Mela, e (*Macrophomina phaseolina*) causador da podridão cinzenta do caule (BECHIMOL, 2021).

O uso de microrganismos que iniba o avanço dessa doença tornou-se uma alternativa sustentável para esse embate, com isso, os fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* spp. são os mais apontados para esse controle biológico (RAJENDIRAN et al., 2010). Porque esse fungo apresenta características importantes para esse controle, como sua distribuição geográfica, seu antagonismo, sua capacidade de reprodução e sua resistência a condições desgastantes e sua versatilidade em desenvolvimento em qualquer ambiente (SOUSA, 2021).

Bem como possui a capacidade de parasitar outros fungos. A espécie *T. virens*, por exemplo, podem enrolar, penetrar e até mesmo destruir todo o conteúdo citoplasmático de *Rhizoctonia solani*, causador da Mela. Com o avanço dos estudos de caráter ecofisiológicos, foi possível afirmar que todas as espécies de *Trichoderma* spp. são eficientes parasitas de fungos patogênicos, graças ao uso de uma nutrição biotrófica (MONTE et al., 2019).

O manejo de isolados de *Trichoderma* spp. no controle biológico já tem sido usado em outras ocasiões, como é o caso do combate ao mofo branco. Nesse processo, esse antagonista trabalha na prevenção inativando os escleródios que posteriormente adoecem o hospedeiro. Tendo isso em vista, o uso frequente desse fungo nas culturas provoca a diminuição de produtos nocivos ao solo e ao consumidor, eliminando o fungo patógeno e auxiliando em outras formas de manejo (POMELLA, 2009).



Pelo seu potencial de antagonismo, o *Trichoderma* spp. tem se destacado no processo de microbiolização de sementes, tendo em vista, seu poder de atuação sobre fitopatógenos e pela promoção de crescimento. Portanto, cada vez mais o controle biológico mostra-se uma ferramenta eficaz para reparar as perdas causadas por doenças fúngicas em sementes e plantas (DE MOURA, 2022).

Considerando a importância do feijão-caupi para a população Mundial, Brasileira, Nordestina e Maranhense, o presente trabalho buscou avaliar a influência e eficácia de isolados de *Trichoderma* spp. sobre o *Fusarium oxysporium* em plantas de feijão-caupi para inibir as doenças provocadas por esse fungo e a promoção de crescimento nesta cultura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) está bastante presente nas mesas dos brasileiros, uma vez que é uma fonte de proteína importante pra o desenvolvimento e alimentação do ser humano, tendo em vista também seu baixo custo na produção. Além de alimentar, a produção do feijão-caupi, principalmente para algumas regiões do Brasil como Norte e Nordeste, é uma importante fonte de renda, já que é responsável por gerar empregos para grandes, médios e pequenos agricultores (CHAVES, 2018).

Em algumas regiões do Brasil, sobretudo no Nordeste, é o alimento mais frequente nas mesas dos brasileiros, em função do ciclo curto de produção, seu desenvolvimento rápido ainda que em solos de baixos níveis de fertilidade e, sobretudo por possuírem características edafoclimáticas o que faz com que usem uma menor quantidade de água que as demais culturas para o seu correto desenvolvimento. O Brasil é o terceiro maior produtor do feijão-caupi, com isso, sua área de cultivo é aproximadamente de 412 mil hectares, com uma produção próxima de 160mil toneladas. (CHAVES, 2018; IBGE, 2015).

No Brasil, o estado de Pernambuco, sobretudo algumas microrregiões como é o caso de alguns municípios como São João, Lajeado e Calçado ganham destaque quando a produção dessa leguminosa, o que conseqüentemente gera empregos para os moradores dessas localidades. Ainda que a produção seja bastante significativa nessa localidade, sua produtividade ainda não é a ideal, tendo em vista a desenvoltura genética que essas culturas possuem uma explicação para isso é quanto a qualidade das sementes, uma vez que a



agricultura familiar é um dos principais meios de produção do feijão, e pelo pouco a acesso a tecnologias e técnicas efetivas para a produção dessa semente, acabam plantando sementes de pouca qualidade (DA SILVA, 2018).

Por outro lado, essa produção também é afetada pelas ocorrências de pragas, sobretudo o acometimento de doenças provocadas por fungos patogênico o que prejudica a produção e a qualidade do feijão. Não obstante, o clima também poder ser mais um agente desfavorável para o desenvolvimento da cultura, uma delas é o período de seca que prejudica o período de floração e frutificação (DA SILVA, 2018).

Quanto a sua irrigação por água com certo grau de salinidade, o feijão-caupi mostra-se tolerante. O processo de irrigação com água salina tem feito com que aumente a concentração de sal no solo, o que pode desencadear algumas complicações como a redução de alguns processos importantes para a planta como absorção, transporte, distribuição dos nutrientes, o que afeta também na fisiologia da planta, tendo em vista que os processos de fotossíntese e transpiração são afetados. Para que haja uma adaptação do feijão a essa salinidade, é necessário que aconteçam mudanças morfológicas e fisiológicas, uma delas é o nível foliar (DA SILVA, 2021).

Com a grande produção do feijão-caupi oriunda da agricultura familiar e com recursos finitos frente o seu potencial de produção, tem crescido de forma exponencial as pesquisas sobre essa cultura, o que tem influenciado para a melhora da sua produtividade, tornando-o mais rentável, e com isso, os grandes e médios produtores buscam também investir e produzir essa leguminosa o que conseqüentemente, promove a modernização nos cultivares para que o manejo do feijão-caupi seja cada vez mais evoluído atendendo as demandas mundial (BEZERRA, 2009).

2.2. Doenças presentes na cultura do feijão-caupi

Os danos causados pelos patógenos são variáveis em função do material cultivado, das condições climáticas, do estágio de desenvolvimento da planta e das práticas de cultivo utilizadas pelos produtores (EMBRAPA, 2018). Dentre as doenças causadas por fungos, destacam-se a murcha de fusário (*Fusarium oxysporum* f.sp. phaseoli), a podridão radicular seca (*Fusarium solani* f.sp. phaseoli), a podridão cinzenta da haste (*Macrophomina phaseolina*), a podridão radicular e mela (*Rhizoctonia solani*), o mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) e a murcha de esclerócio (*Sclerotium rolfsii*) (LEITE, 2019).



Dentre as inúmeras doenças encontradas nessa leguminosa, a que mais se destaca é a mela, causada pelo fungo *Rhizoctonia solani*. O feijão produzido na região Norte é o que mais sofre, tendo em vista que o clima dessa região é de caráter mais úmido. O alto índice de chuvas e clima quente corrobora para o desenvolvimento rápido desse patógeno. Um dos sintomas frequentes em plantas acometidas é o processo de desfolha até a morte da planta (BECHIMOL, 2021).

Outra doença encontrada na cultura do feijão caupi é a podridão cinzenta do caule, provocada pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. Esse patógeno se desenvolve em condições climáticas favoráveis como um clima seco e altas temperaturas, ademais sua patogenicidade causa danos graves as lavouras, podendo chegar a 100% de perda de tudo o que foi produzido (GOMES SILVA et al., 2017).

A podridão cinzenta do caule é outra doença recorrente na cultura do feijão, causada pelo fungo *M. phaseolina*, a ocorrência dessa doença é comumente encontrada nas produções do Nordeste brasileiro, já que essa região sofre com climas secos e estresses hídricos, por se tratar de um fungo de solo, esse agente consegue viver mesmo com condições de solos e climáticas adversas (DE OLIVEIRA, 2021). Quando atingem o feijão, a planta tem sua produtividade afetada e suas sementes perdem a qualidade, por sobrevivem em condições adversas, climas que varam de 28° a 35° aceleram o processo de infecção e sintomas da planta (DE OLIVEIRA, 2021).

Se destacam também quanto a patogenicidade ao feijão-caupi, os fungos *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causador da antracnose e o *Colletotrichum truncatum*, agente causador da mancha de café, esses fungos estão intimamente ligados as sementes do feijão que, uma vez atacadas por esses fungos, passam por um processo de necrose, ou lesões com uma coloração, geralmente amarronzada levando a perda de seu desenvolvimento e produtividade, ocasionado perdas nas culturas (GOMES, 2022).

No que tange as doenças causadas por bactérias, tem-se a mancha-bacteriana que, tem como agente causal *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*, que possui um alto potencial de dano, ainda que sua incidência seja restrita. O controle dessa doença ainda possui dificuldades, tendo em vista à falta de um método de controle eficiente, no entanto, o uso de resistentes variados, sementes que sejam sadias e o plantio em áreas sem indícios dessa doença mostram-se como práticas precisas e que auxiliam na redução da doença (HALFELD-VIEIRA; NECHET; SOUZA, 2011).



2.3. Biocontrole com utilização de *Trichodermas* spp.

De acordo com Agrios (2004), controle biológico pode ser definido como a redução em sua totalidade ou parcialidade de agentes patógenos sobre outros organismos e que ocorre frequentemente na natureza. A percepção de uma planta doente é confirmada quando há interação do hospedeiro e o patógeno, o que trará como resultado: a resistência do hospedeiro frente a doença ou o aumento do potencial do patógeno em limitar a atividade do organismo (BETTIOL, 1991).

A busca por um controle biológico efetivo passa pela seleção de organismos potenciais para o controle, seguidos de testes que podem ser *in vitro* ou *in vivo* com ambientes controlados ou naturais. Para os testes *in vitro* um dos métodos mais utilizados é o pareamento de culturas, quanto ao *in vivo* a aplicação do antagonista e do patógeno no hospedeiro em células, raízes ou ferimentos de plantas mostra-se com um dos mais utilizados (MELO; AZEVEDO, 1998).

Com o acometimento de inúmeras doenças nas culturas de leguminosas, sobretudo no feijão-caupi, o uso de agroquímicos ainda é muito usado e disseminado para conter esses patógenos, no entanto, o uso frequente desses químicos, provocam riscos e acidentes ambientais, afetando também a saúde dos agricultores e consumidores (DA SILVA, 2021).

Portanto, optar por uma produção sustentável é o caminho mais correto a ser seguido, e o uso de organismos antagonísticos tem sido cada vez mais pesquisados e levados em consideração no biocontrole de doenças. O *Trichoderma* spp. se tornou um fungo cada vez mais estudado e utilizado para essa ação de biocontrole, tendo em vista alguns de seus mecanismos como competição por espaço, nutrientes, parasitismo e produção de antibióticos e por fim, não causam mal nenhum a animais e ao homem (DA SILVA, 2021).

Os *Trichodermas* spp. são fungos de vida livre e com reprodução assexuada. Algumas espécies desse gênero são encontradas colonizando madeiras, no entanto, são mais abundantes habitando em solos de regiões com clima temperado e tropical. Quanto a sua classificação, estão na subdivisão Deuteromycotina, grupo classificado por possuírem seus conídios formados a partir de células conidiógenas que podem estar ou não no talo micelial (MACHADO, 2012).

A eficácia desse antagonista tem sido encontrada em trabalhos desenvolvidos tanto em laboratórios como em casa de vegetação e quando levados a campo. Sua eficiência é vista,



sobretudo, em patógenos encontrados em solos como a *Rhizoctonia* sp. e *Fusarium* sp. Tendo em vista que, por ser um fungo de solo, sua atividade é mais bem expressa nesses ambientes, indicando o seu potencial como biocontrolador sobre diferentes fungos e situações adversas (SANTIN, 2008).

Também tem sido relatado que *Trichoderma* spp. são eficazes em aliviar os efeitos adversos que o estresse salino tem sobre as plantas. Nos resultados do seu experimento, Rubio et al., (2017) relataram que *Trichoderma harzianum*, na ausência de fertilização mineral, promoveu o crescimento de plantas de tomate, independentemente do estresse salino. Quando plantas de milho foram tratadas com *T. harzianum* foi observada uma redução na sobrevivência de *Fusarium graminearum* e o favorecimento de bactérias promotoras de crescimento de plantas (SARAVANAKUMAR et al., 2017).

O biocontrole com uso de *Trichodermas* spp. também pode ser visto no combate a insetos que vem acometendo inúmeras lavouras, como é o caso das formigas cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta*, que por possuírem uma alta taxa de adaptabilidade a diversos ambientes, tornam-se pragas provocando desfolhamento quando cortam partes importantes para o desenvolvimento das plantas. Apesar do uso de químicos para o controle dessas pragas, a busca por meios alternativos e sustentáveis tem sido bastante significativa, sobretudo o uso do *Trichoderma* spp., uma vez que podem parasitar as formigas trazendo prejuízos para a colônia (STEFANELI, 2022).

É importante ressaltar que alguns defensivos utilizados na agricultura, como fungicidas, inseticidas, herbicidas e algumas fontes de nutrientes podem atuar negativamente sobre espécies de *Trichoderma* spp., interferindo no crescimento micelial ou degradando metabólitos secundários. Em contrapartida, estudos demonstram que outros defensivos agrícolas podem atuar de forma compatível, sem afetar o crescimento, desenvolvimento, esporulação e a produção de metabólitos por espécies de *Trichoderma* spp. A compatibilidade de *Trichoderma* spp. com produtos químicos torna esse agente de controle biológico promissor no manejo integrado de doenças, além de ser um aliado no manejo da resistência a doenças de plantas (DIAS NETO, 2014).



3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Selecionar e identificar isolados de *Trichoderma* spp. promotores de crescimento e indutores de resistência para o cultivo de feijão-caupi no estado do Maranhão.

3.2. Específicos

- Selecionar isolados antagônicos à *F. oxysporum* Schl. f. sp. *tracheiphilum* (Smith) Snyder e Hansen;
- Realizar identificação molecular dos isolados de *Trichoderma* spp. pertencentes à coleção de microorganismos da Universidade Estadual do Maranhão;
- Identificar o método mais eficaz para indução de plantas de feijão com os isolados de *Trichoderma* spp. isolados;
- Avaliar a incidência da fusariose no feijão-caupi tratado com *Trichoderma* spp. em casa de vegetação e o crescimento das plantas;



4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Pareamento *in vitro*

O teste de pareamento *in vitro* em delineamento inteiramente casualizado com 36 tratamentos e quatro repetições foi conduzido no Laboratório de Microbiologia e Saúde da Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão – UEMASUL, Campus Imperatriz (5°32'07"S 47°28'59"W).

O antagonismo dos isolados de *Trichoderma* spp. contra o patógeno (*F. oxysporum*.) foi avaliado pelo método de culturas pareadas, conforme descrição de Mello et al., (2007). Utilizou-se 36 isolados diferentes de *Trichoderma* spp.: 44, 46, 47, 48, 49, 52,53, 135, I1, A1, L1, U1, TU1, TP1, I, Z, V1, TT1, TS5, Z1, TZ1, X, A, T51, J1, TC, 50, TS4, O1, M1, Q1, F1, F, TJ, S e TS1-1. A inoculação dos isolados de *Trichoderma* spp. e do *Fusarium oxysporum* foi realizada separadamente, em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio de cultura Batata- Dextrose-Ágar (BDA). Em seguida, as placas foram incubadas em câmara do tipo *Biochemical Oxygen Demand* (B.O.D.), sob luz fluorescente branca, a uma temperatura de 26°C, para favorecer o crescimento dos isolados, durante sete dias. Após esse período de incubação, cada isolado de *Trichoderma* spp. foram inoculados em novas placas de Petri contendo BDA, juntamente com *Fusarium oxysporum*.

Para cada tratamento e repetição, foi colocado um disco de 1cm de diâmetro auxiliado pela alça de platina, contendo micélio do fungo antagonista, logo em seguida, a alça era flambada e na mesma placa era inoculado micélio do patógeno. Os fungos foram colocados a 1cm da borda em cada placa. E como testemunha foram utilizadas placas de Petri nas mesmas condições, somente com o *Fusarium oxysporum* distante 1 cm da borda, após este procedimento, as placas com discos do patógeno e do antagonista foram incubadas durante sete dias.

As placas pareadas foram avaliadas no quinto e sétimo dia. O crescimento micelial foi avaliado através da medição nos sentidos horizontal e vertical (diametricamente opostos) com uma régua graduada (mm). Em seguida, determinou-se o diâmetro de crescimento do *Fusarium oxysporum*. através da média entre os valores obtidos da mensuração realizada.



4.2 Seleção de isolados promotores de crescimento e indutores de resistência em casa de vegetação

A partir do pareamento *in vitro*, foram selecionados os isolados para serem submetidos a ensaio em casa de vegetação para avaliações de promoção do crescimento e indução de resistência do feijão. O ensaio foi realizado em casa de vegetação da Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, utilizando os isolados de *Trichoderma* spp. (L1, 44, 52, A1 e I1), que foram selecionados no teste *in vitro* com o manuseio de dois tratamentos: o primeiro era a microbiolização de sementes com suspensão fresca e o segundo consistia no tratamento de sementes via formulação em pó.

4.2.1 Produção e aplicação de *Trichoderma* spp

Os isolados de *Trichoderma* spp. para inoculação foram elaborados de duas formas diferentes de acordo com Silva et al. (2012):

- 1) Para a formulação do inoculante em pó, realizou-se a repicagem dos isolados de *Trichoderma* spp. selecionados *in vitro*, em meio de cultura do tipo BDA, e decorrido sete dias incubados em B.O.D a uma temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, estes foram inoculados em 100 gramas de arroz, anteriormente preparado para receber os discos do fungo. Para que o arroz recebesse os discos de fungos, primeiramente foi colocado de molho em água destilada e autoclavada durante uma hora, em seguida retirou-se o excesso de água e pesou-se 100 gramas de arroz em balança analítica. Essa quantidade foi acondicionada em potes de vidro com tampa rosqueável e esterilizados em autoclave a 120°C por um período de 30 minutos. Posteriormente, cada pote recebeu 10 discos dos isolados, e foram incubados em B.O.D sob uma temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo por um período de sete dias. Após este período de crescimento, realizou-se a trituração de todo o conteúdo e a pesagem de 10 gramas de pó inoculado de cada tratamento. Os 10 gramas foram diluídos em 10 mL de água destilada e autoclavada e peneirada em três gases fechadas, com o intuito de separar apenas a parte líquida, e em seguida utilizou-se o a Câmara de Neubauer para contagem dos esporos. Após a contagem, fez-se a relação entre as 10 gramas de arroz inoculado (com quantidade de esporos conhecido) com o volume total do inoculante em pó, e ajustou-se para a concentração de 6×10^8 conídios g^{-1} de arroz inoculado, estabelecendo assim a quantidade de inoculante que cada tratamento receberia.



2) Para a formulação do inoculante líquido, a cultura do fungo selecionada no experimento *in vitro* foi cultivada em BDA a $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo por um período de sete dias. Após este período, adicionou-se 10 mL de água destilada e autoclavada em cada placa e realizou-se a raspagem com o auxílio de uma lâmina de vidro esterilizada, este conteúdo foi reservado em um Becker de forma que cada tratamento ficasse separado. Após esse processo, utilizou-se a câmara de Neubauer para a contagem dos esporos e por meio da fórmula matemática $VC=V'C'$, determinou-se a quantidade de água destilada e autoclavada a ser acrescentada nas soluções, e assim a concentração padrão da solução ficou em 6×10^8 conídios mL^{-1} de inoculante. Todo esse processo foi executado na capela de fluxo laminar (Laboratório de Microbiologia da UEMASUL), sendo a mesma, devidamente higienizada cumprindo os procedimentos para se evitar contaminação.

Para inocular os fungos uniformemente nas sementes de feijão-caupi, ambas as formulações (suspensão em pó e líquida) foram aplicadas nas sementes, utilizando-se 20 ml suspensão líquida e 20g da formulação em pó e acondicionados em erlenmeyers de 250 mL contendo as sementes de feijão-caupi (Figura 1).

Figura 1 – Sementes de feijão-caupi nas formulações em pó (à direita) e nas formulações líquida (a esquerda) para que os fungos fossem inoculados homogeneamente nas sementes.



Fonte: O autor.

Posteriormente, os erlenmeyers foram levados para mesa agitadora com rotação de 150 RPM (rotação por minuto) durante uma hora, conforme a Figura 2. A testemunha consistiu de sementes tratadas somente com água destilada.

Figura 2 – Erlemeyers na mesa agitadora contendo para homogeneização dos fungos nas sementes de feijão-caupi.



Fonte: O autor

4.2.2 Implantação do experimento em Casa de vegetação

O experimento em casa de vegetação foi realizado na Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão (UEMASUL), em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os tratamentos foram compostos pelos isolados de *Trichoderma* spp. (44, 52, I1, A1 e L1), em duas formulações: pó e líquida. As sementes de feijão caupi, variedade Manteguiinha foram microbiolizadas com essas formulações, e cultivadas em vasos de 3 litros, semeando-se cinco sementes por vaso, 15 dias após, a germinação realizou-se o desbaste, manteve-se uma planta por vaso. A irrigação dos vasos era diária e manualmente.

4.2.3 Avaliação do experimento em Casa de vegetação

Foram avaliados os seguintes parâmetros:

a) Porcentagem de germinação de sementes (G): a avaliação da porcentagem de sementes germinadas foi feita de acordo com Aragão et al. (2000), onde:

$$G = \frac{\text{sementes germinadas} \times 100}{\text{sementes semeadas}}$$

b) Promoção do crescimento: As plantas foram analisadas aos 25 dias após a semeadura, para determinação do comprimento da parte aérea (cm), número de folhas, área foliar.

c) Parâmetros fisiológicos: Aos 20 dias foi realizada a medição do índice de clorofila tomando cinco pontos distintos do limbo da folha sem que tocasse na nervura central, isso

para todos os tratamentos entre 07h30 às 09h30, com o auxílio do aparelho SPAD (Soil Plant Analysis Development)-502 Plus, adotando-se o valor médio das leituras.

d) Inoculação com *F. oxysporum*: a inoculação do patógeno aconteceu a partir da aplicação dos isolados de *F. oxysporum* oriundos da micoteca Prof. Gilson Soares, do laboratório de Fitopatologia da UEMA, estes obtidos de feijoeiro e preservados em solo autoclavado. O isolado foi multiplicado em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). Para preparo do inóculo, os isolados de *F. oxysporum* foram cultivados em placas de Petri, contendo meio BDA, durante sete dias. Passados os sete dias foram adicionados 20 mL de água destilada e esterilizada em cada placa, para que se fizesse as raspagens das colônias com lâmina de vidro, o inóculo foi ajustado para 1×10^6 conídios/mL, com auxílio de câmara de Neubauer. Após 30 dias da semeadura, foi feita a inoculação do *Fusarium oxysporum*, por meio do ferimento das raízes, em formato de meia lua, utilizando um bisturi, e aplicando-se 20 ml da suspensão de inóculo em cada planta. As plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 horas após a inoculação. As avaliações da incidência da fusariose foram realizadas aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação, utilizando a escala de nota do CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) e descrita por Schoonhoven e Pastor-Corrales (1987), com notas variando de 1 a 9, onde nota 1- nenhum sintoma vascular ou foliar; 3- de 1 a 10% de folhas sintomáticas, suave murchamento de plantas e descoloração vascular no hipocótilo; 5- com 11 a 25% de folhas sintomáticas, moderada murcha nas plantas e descoloração vascular extensa até o primeiro nó; 7- com 26 a 50% de folhas sintomáticas, severa murcha de plantas e descoloração vascular por toda a haste e pecíolo e 9- planta morta.

4.4 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente com auxílio do programa SISVAR e submetidos à análise de variância, com comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.5 Identificação molecular dos isolados de *Trichoderma* spp.

Os isolados de *Trichoderma* spp. selecionados como potenciais antagonistas foram identificados em nível de espécie. Para a identificação foi realizado o sequenciamento, a partir da extração do DNA, amplificação da região ITS e do gene codificador do fator de alongação 1-. As sequências obtidas serão comparadas com as depositadas no GenBank,



utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4. Essa etapa foi realizada no Laboratório de Fitopatologia e de Genética da Universidade estadual do Maranhão.

4.5.1 Extração de DNA

Após a identificação morfológica e incorporação dos isolados na Micoteca. A extração foi realizada através da utilização de KIT Quick-DNA Fungal/Bacterial miniprep. Zymo para extração de DNA genômico de fungos sp. O preparo das amostras para extração consistiu no cultivo dos isolados em meio sólido, e posteriormente raspado. Após a obtenção das amostras, cerca de 100 mg de tecido fúngico foram macerados na presença de nitrogênio líquido até formar um pó fino e o DNA extraído de acordo com o protocolo de extração fornecido junto com o Kit.

Das amostras de DNA extraídas foi retirada uma alíquota para verificação da qualidade e concentração do DNA, através de análise comparativa em gel de agarose a 0,9 % contendo brometo de etídeo a 0,01 % (v/v). Após este processo as amostras foram armazenadas a -80 °C até o momento do uso.

4.5.2 Amplificação da região ITS do rDNA

A amplificação das regiões ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal (rDNA) foi realizada conforme metodologia descrita por White et al. (1990), utilizando-se os primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') em termociclador programado para as seguintes condições: 94 °C por 12 minutos (desnaturação e ativação enzimática), 35 ciclos – 94 °C por 30 segundos (desnaturação), 55 °C por 30 segundos (anelamento) e 72 °C por 30 segundos (extensão) - 72 °C por 10 minutos (extensão final). Para a reação de PCR foram utilizados 20 ng de DNA molde, 10 mM de cada primer, 1,5 mM de MgCl₂, 0,08 mM de cada dNTP, 0,2 U/μL de Taq DNA polimerase, 50 mM de Tris-HCl (pH 8,4) e 20 mM de KCl em 50 μL de volume final.

Uma alíquota do produto da reação de amplificação (10 μL) foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1,5 % (p/v) em tampão TBE 1X contendo brometo de etídeo a uma concentração de 0,01 % (v/v), a uma voltagem de 90 V por 1 hora. O Scada 100bp DNA Ladder (Sinapse inc.) foi utilizado como marcador de peso molecular. Decorrido o tempo de eletroforese, o gel foi retirado da cuba e visualizado sob luz UV e posteriormente fotografado.



Os produtos da reação de PCR foram purificados com auxílio de Kits de purificação comercial por coluna (Purelink® – Thermo Fisher Scientific, Inc.), e em seguida encaminhados para sequenciamento em Laboratório qualificado para tal. As sequências de DNA obtidas foram avaliadas quanto à qualidade de sequenciamento, com base nos respectivos eletroferogramas, alinhadas par-a-par e editadas manualmente, para obtenção de uma sequência consenso para cada um dos isolados. As sequências consenso geradas foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information website - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), por meio da ferramenta do BLAST search, para confirmação do gênero de cada um dos isolados.

A verificação da identidade das espécies causadoras de doenças em plantas e entomopatógenos foi realizada a partir de análises filogenéticas de Máxima verossimilhança, e por meio de 1000 repetições de bootstrap, em comparação às demais sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), e/ou de espécies-tipo presentes.

4.5.3 Análises de distância genética e construção de Matriz de divergência genética dos fungos

As análises de distância genética foram realizadas utilizando o programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2013). As sequências foram alinhadas usando o CLUSTALW implementado no MEGA 6 e ajustadas ao melhor modelo de substituição de nucleotídeos. As árvores filogenéticas de Máxima Verossimilhança e a Matriz de divergência genética foram construídas para cada um dos 16 gêneros e a significância dos agrupamentos das árvores filogenéticas foi estimada pela análise de bootstrap.



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação do pareamento *in vitro* com os isolados de *Trichoderma* spp.

No experimento baseado no pareamento *in vitro* do antagonismo dos 36 isolados de *Trichoderma* spp. (Tabela 1) aos cinco dias, observou-se que 16 isolados (52, 44, II, 135, L1, A1, U1, I, TP1, 47, TT1, 48, V1, TC, Z1 e TU1) mostraram efeito inibidor ao patógeno avaliado (*F. oxysporum* Schl. f. sp. *tracheiphilum*), os quais diferiram estatisticamente da testemunha em relação ao crescimento micelial do *F. oxysporum*.

Tabela 1 – Diâmetro médio de crescimento do *F. oxysporum* em pareamento com *Trichoderma* spp. cinco dias após o pareamento *in vitro*.

Tratamentos	Diâmetro Médio (cm)*	Área ocupada (cm ²)	% da área ocupada
52	0,95 a	0,71	1%
44	1,21ab	1,15	2%
II	1,50abc	1,77	3%
135	1,71abc	2,30	4%
L1	1,73abc	2,34	4%
A1	1,80abc	2,54	4%
U1	1,85abc	2,69	4%
I	1,90abc	2,83	4%
TP1	1,96abc	3,02	5%
47	1,98abc	3,06	5%
TT1	2,04abc	3,26	5%
48	2,06abc	3,34	5%
V1	2,06abc	3,34	5%
TC	2,08abc	3,38	5%
Z1	2,08abc	3,38	5%
TU1	2,09abc	3,42	5%
Z	2,19abcd	3,76	6%
TS4	2,20abcd	3,80	6%
TS5	2,24abcd	3,93	6%
O1	2,24abcd	3,93	6%
M1	2,28abcd	4,06	6%
F1	2,48abcd	4,81	8%
T51	2,51abcd	4,96	8%
46	2,51abcd	4,96	8%
X	2,54abcd	5,05	8%

TZ1	2,55abcd	5,10	8%
A	2,59abcd	5,26	8%
53	2,66abcd	5,56	9%
J1	2,69abcd	5,67	9%
50	2,74abcd	5,88	9%
49	2,85abcd	6,38	10%
Q1	2,99abcd	7,01	11%
F	3,03bcd	7,18	11%
TJ	3,34cd	8,74	14%
S	3,48cd	9,48	15%
TS1-1	3,51cd	9,66	15%
Testemunha	4,15d	13,52	21%
C.V (%)	31,30		

* Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% ($p \leq 0,05$) de significância.

Os vários mecanismos de proliferação e sobrevivência do *Trichoderma* spp, contribuem para que este gênero seja bem sucedido ao colonizar um habitat, pois possuem uma capacidade de secreção de metabólitos e fazem uso eficiente do substrato. Mello et al., (2007) enfatizam que o método de cultura pareada é essencial para selecionar e verificar a potencialidade de isolados que possuem atividade antagônica e de micoparasitismo. E assim, para a avaliação da capacidade do antagonista suprimir o patógeno é necessário à realização de testes *in vitro* e *in vivo*, para que assim, possa ser determinado os efeitos ecológicos que interferem no controle da doença.

Referente à avaliação realizada aos sete dias de pareamento, constatou-se que todos os tratamentos diferiram estatisticamente da testemunha, mostrando a eficiência das espécies de *Trichoderma* no controle deste patógeno (Tabela 2). E que os isolados com maior eficiência quanto à inibição do crescimento micelial de *F. oxysporum* foram: 52, I1, A1, L1 e 44 (Figuras 3, 4 e 5). Logo, estes foram os isolados selecionados para o plantio em casa de vegetação.

Tabela 2 – Diâmetro médio de crescimento do *F. oxysporum* em pareamento com *Trichoderma* spp. sete dias após o pareamento *in vitro*.

Tratamentos	Diâmetro médio (cm)*	Área ocupada (cm²)	% da área ocupada
52	0,80 ^a	0,50	1%
I1	1,28ab	1,28	2%
A1	1,40abc	1,54	2%

L1	1,55abc	1,89	3%
44	1,63abcd	2,07	3%
U1	1,90abcd	2,83	4%
TU1	1,93abcd	2,91	5%
TP1	1,98abcd	3,06	5%
135	2,03abcd	3,22	5%
I	2,18abcd	3,71	6%
Z	2,21abcd	3,84	6%
47	2,26abcd	4,02	6%
V1	2,31abcd	4,20	7%
TT1	2,31abcd	4,20	7%
TS5	2,39abcd	4,47	7%
Z1	2,53abcd	5,00	8%
TZ1	2,54abcd	5,05	8%
X	2,54abcd	5,05	8%
A	2,58abcd	5,21	8%
49	2,58abcd	5,21	8%
53	2,59abcd	5,26	8%
T51	2,59abcd	5,26	8%
J1	2,61abcd	5,36	8%
TC	2,68abcd	5,62	9%
50	2,69abcd	5,67	9%
TS4	2,70abcd	5,72	9%
O1	2,74abcd	5,88	9%
M1	2,89bcd	6,55	10%
48	2,93bcd	6,72	11%
Q1	3,13bcd	7,67	12%
F1	3,13bcd	7,67	12%
F	3,20bcd	8,04	13%
TJ	3,24bcd	8,23	13%
46	3,36cd	8,88	14%
S	3,56cd	9,96	16%
TS1-1	3,56d	9,96	16%
Testemunha	5,63e	24,90	39%

* Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% ($p \leq 0,05$) de significância.



Resultados semelhantes foram obtidos por Isaias et al., (2014), ao estudarem 20 isolados de *Trichoderma* spp. contra a inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos *Sclerotium rolfii* e *Verticillium dahliae*, onde a maioria dos 20 isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram antagonismo sobre os patógenos, inibindo totalmente o crescimento dos dois fitopatógenos *in vitro*. Ainda, segundo os autores, os 19 isolados de *Trichoderma* spp. estudados apresentaram grau máximo de inibição crescimento micelial contra o *V. dahliae*, e apenas o *Trichoderma harzianum* apresentou máximo antagonismo sobre o de inibição do *S. rolfii* no pareamento *in vitro*.

Os resultados de Bonfim et al., (2010), também ratificam o bom desempenho do uso do método de pareamento *in vitro*, os mesmos observaram a rápida atividade antagônica de *Trichoderma* spp. sobre o patógeno *Rhizopus stolonifer*, causador da podridão floral do maracujazeiro, estes apresentaram uma inibição do crescimento micelial em apenas 72 horas de pareamento. Essa ação de inibição do crescimento da colônia do fitopatógeno, pode ser explicada pela liberação de metabólicos, aos estar na presença de *Trichoderma* spp.

O trabalho desenvolvido por De Oliveira (2021,) trouxe resultados significativos. Foram utilizados sete isolados de *Trichodermas* spp. no controle de *Macrophomina phaseolina*, fungo causador do podridão cinzenta do caule, ao final, todos os isolados tiveram o potencial antagônico, tendo em vista que o fungo antagonista cresceu 2/3 da placa. A utilização de testes *in vitro* é importante para selecionar os organismos para o biocontrole, já que proporcionam informações em condições controladas quanto a sua variabilidade e eficiência no momento de colonizar o patógeno, parasitismo e competir por espaço e nutrientes (NASCIMENTO et al., 2016).

No presente estudo, os isolados 52, 44 e II foram os que induziram as menores médias de diâmetro da colônia do patógeno. Os isolados F, TJ, S e TS1-1 diferiram da testemunha, no entanto as médias de crescimento micelial de *F. oxysporum* Schl. f. sp. *tracheiphilum* foram maiores (Tabela 2). Com base nos resultados, pode-se afirmar que os isolados agem de forma diferente, referente ao mecanismo de antagonismo ao patógeno. Ramírez-Olier et al. (2019), ressaltam que a capacidade antagonista do isolado de *Trichoderma* dependerá do fitopatógeno que pretende controlar. Como exemplo, o *Trichoderma asperellum* inibiu totalmente o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Curvularia lunata* e foi eficaz no controle de *Fusarium Oxysporum* em ensaios *in vitro* (SARAVANAKUMAR et al., 2020). O *Trichoderma virens* se demonstrou um

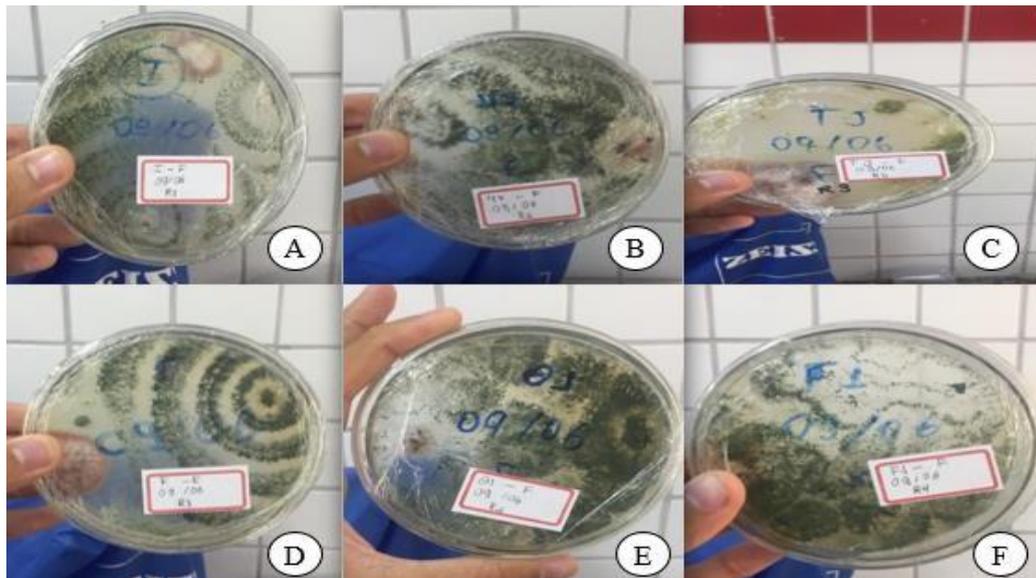


potente antagonista contra inibição do crescimento micelial de *Fusarium solani*, fitopatógeno da doença da murcha na plantação de Shisham, onde inibiu 80% do crescimento micelial do patógeno (BANERJEE et al., 2020).

Nessa mesma direção, Saravanakumar et al., (2020) estudaram a atividade antagonista de nove espécies *Trichoderma*, como *T. atroviride*, *T. virens*, *T. velutinum*, *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. koning iopsis*, *T. aureoviride*, *H. lixii* e *T. koningii* oriundos de solo de áreas úmidas contra três patógenos *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium graminearum* e *Botrytis cinérea*, os mesmos constataram que todos as espécies possuíam altas propriedades de biocontrole. E que a espécie *Trichoderma aureovirida* se apresentou como um excelente agente biológico, ao inibir o crescimento micelial dos três patógenos, sendo 92,5% do *M. phaseolina*, 94,5%) do *F. graminearum*, e 89,32% do *B. cinerea*.

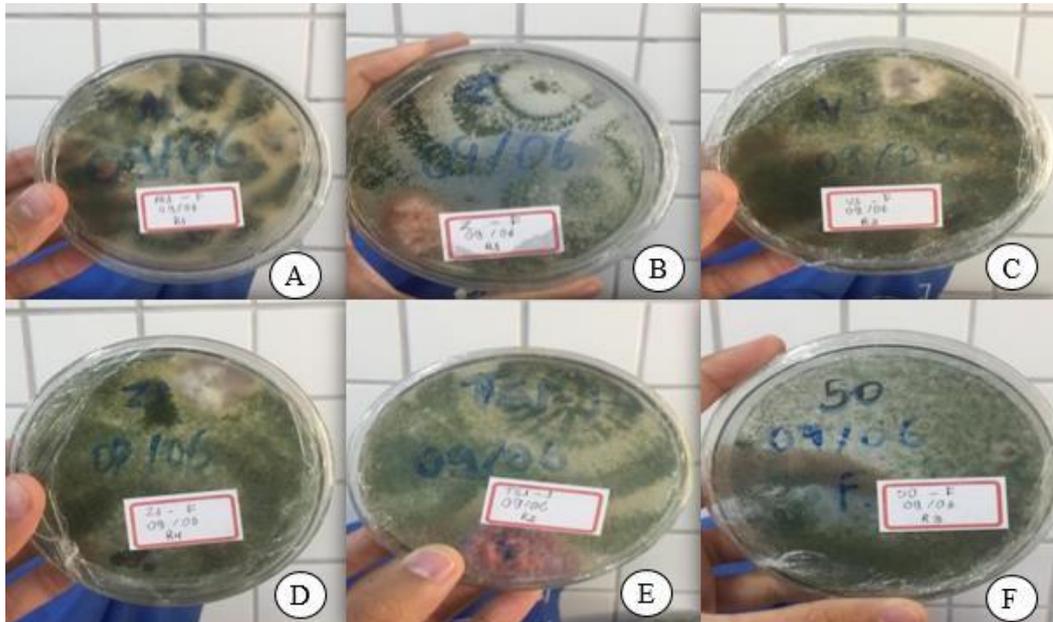
As Figuras 3, 4, 5 e 6 ilustram o resultado final do crescimento do *Trichoderma* spp. se comparado ao crescimento do *Fusarium oxysporum*. Diante dessas figuras e da análise estatística descrita, é possível considerar o potencial antagônico dos isolados de *Trichoderma* spp. em relação ao *Fusarium oxysporum*.

Figura 3 – Pareamento nos tratamentos: A) I; B) 47; C) TJ; D) F; E) O1; F) F1.



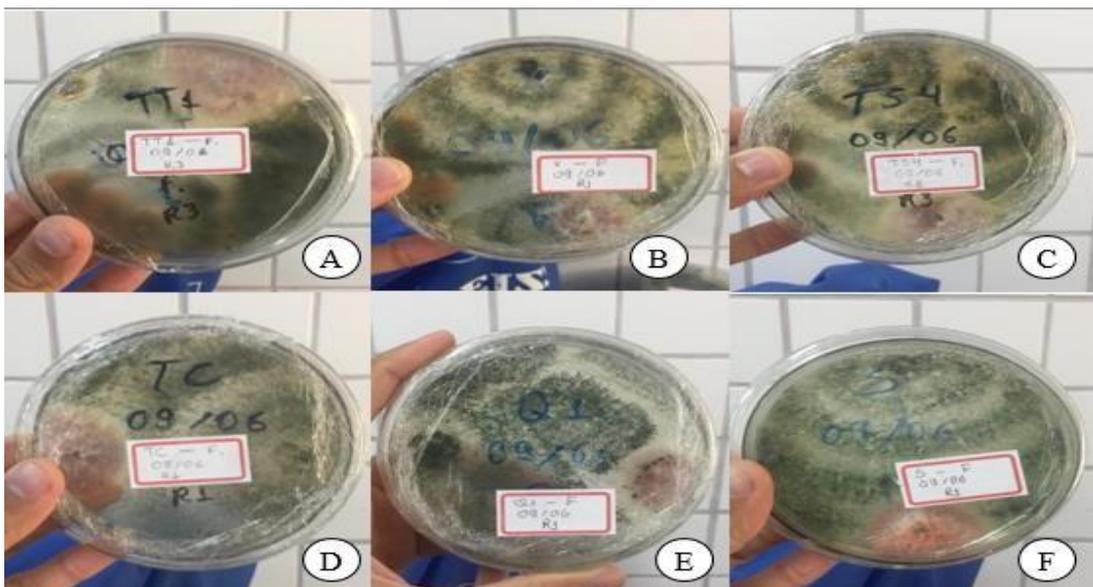
Fonte: O autor.

Figura 4 – Pareamento nos tratamentos: A) M1; B) Z; C) V1; D) Z1; E) TS1-1; F) 50



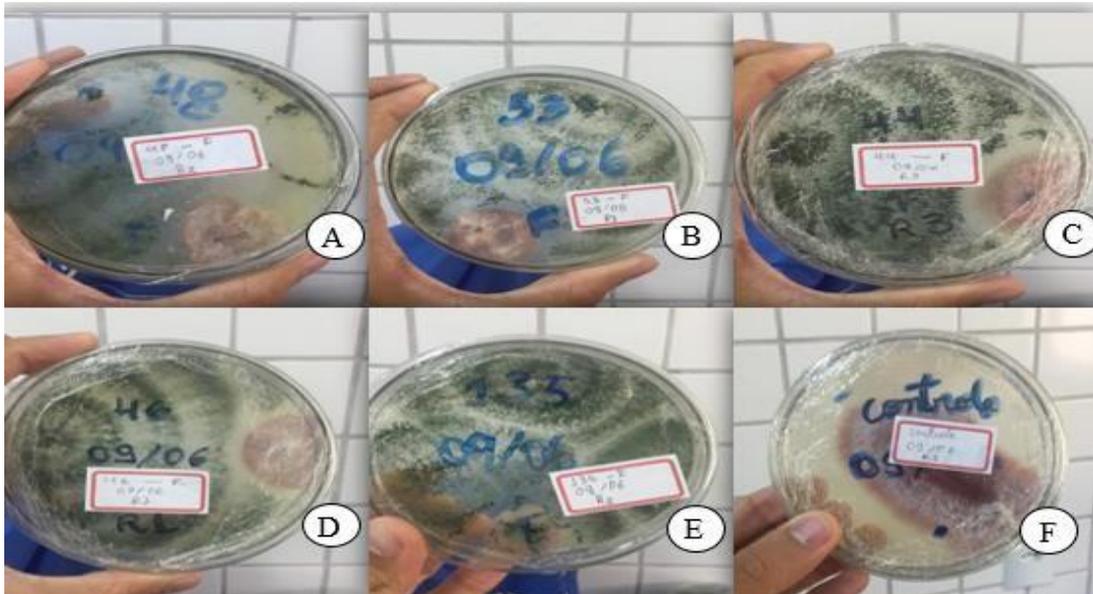
Fonte: O autor.

Figura 5 – Pareamento nos tratamentos: A) TT1; B) X; C) TS4; D) TC; E) Q1; F) S.



Fonte: O autor.

Figura 6 – Pareamento nos tratamentos: A) 48; B) 53; C) 44; D) 46; E) 135; F) Testemunha/controlado.



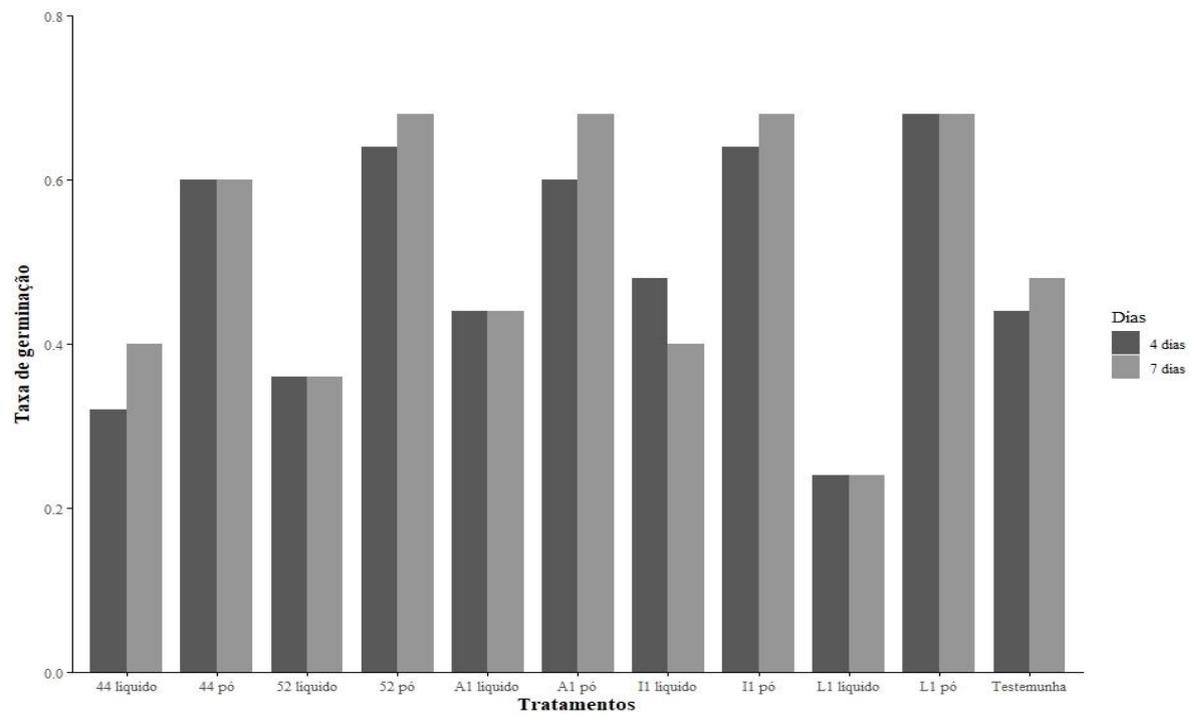
Fonte: O autor.

Diversos autores têm estudado o potencial antagônico de isolados de *Trichoderma* spp sobre *Fusarium oxysporum* e obtido bons resultados de inibição ao crescimento dos fungos fitopatogênicos (HARMAN et al. 2004; BOMFIM et al., 2010; MARQUES et al., 2018). Cucu et al. (2020), avaliaram em campo a eficiência do *Trichoderma* spp. sobre a murcha do fusário causada pelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* sobre a plantação de tomate, e obtiveram um nível de 70% de redução eficiente do fitopatógeno, o que foi constatado diminuição da ocorrência do *F. oxysporum*.

5.2. Avaliação dos efeitos dos isolados de *Trichoderma* spp., sobre o feijão caupi em casa de vegetação

Referente à taxa de germinação das sementes microbiolizadas com *Trichoderma* spp. em suspensão líquida e pó no 4º dia após a semeadura, proporcionou maior taxa de germinação o tratamento L1 em pó, correspondente a 68%, seguido do tratamento I1 pó e 52 pó, ambos com 64% de taxa de germinação. O tratamento com menor taxa de germinação foi o L1 líquido com 24% (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Avaliação da taxa de germinação das sementes de feijão-caupi em casa de vegetação, submetidas à microbiolização de sementes com suspensão líquida e formulação em pó a base de *Trichoderma* spp., em casa de vegetação aos 4 e 7 dias após a semeadura.



Fonte: O autor.

Quanto à germinação das sementes no 7º dia após a semeadura, os tratamentos com a maior taxa (L1 pó, I1 pó, 52 pó e A1 pó) obtiveram 68% de suas sementes germinadas, e o tratamento L1 líquido, com 24% de taxa de germinação, continuou com a menor taxa de germinação dentre todos os tratamentos (Gráfico 1) (Figura 7).

Figura 7 – Plântulas de feijão-caupi, submetidas à microbiolização de sementes com suspensão líquida e formulação em pó a base de *Trichoderma* spp.



Fonte: O autor

Ferreira de Sá et al. (2019) em estudo com sementes de feijão-caupi microbiolizadas com *Trichoderma* sp. também obtiveram um aumento na germinação das sementes quando comparada a testemunha. Estudos desenvolvidos por Rocha et al. (2017) também mostraram resultados semelhantes onde isolados de *Trichoderma asperellum* e *B. subtilis* demonstraram o seu potencial na elevação da germinação e velocidade de emergência de sementes de *V. unguiculata* Sempre Verde e BRS Verde. O mesmo foi reportado por Marques et al. (2014), para sementes de *Vigna unguiculata* cv. BRS Estilo, quando submetidas ao tratamento com isolados de *Trichoderma* spp., onde apresentaram maior percentagem e precocidade germinativa em relação à testemunha.

Referente aos índices de clorofila não houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade entre os tratamentos (Tabela 3). Aguiar et al. (2014), que utilizaram duas formulações comerciais com *T. asperellum* e *T. harzianum*, também não observaram alteração na quantidade de clorofila das plantas.

Tabela 3 – Avaliação do Índice de clorofila das plantas de feijão-caupi em casa de vegetação, submetidas à microbiolização de sementes com suspensão líquida e formulação em pó a base de *Trichoderma* spp., aos 20 dias após a semeadura.

Tratamentos	Índice de clorofila
Testemunha	48,95 a ¹
44 líquido	50,60 a
L1 pó	51,60 a
A1 pó	52,25 a
L1 líquido	52,58 a
A1 líquido	53,88 a
52 líquido	54,58 a
52 pó	55,70 a
I1 líquido	55,88 a
44 pó	55,98 a
I1 pó	57,78 a
C.V (%) ²	8,82

¹ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si segundo Tukey a 5% de probabilidade. ² Coeficiente de variação.

A área foliar do feijão-caupi foi medida no 25º dia após a semeadura. A testemunha obteve a maior média e se diferenciou significativamente de todos os tratamentos, exceto do tratamento 44 Líquido, e quanto à altura das plantas avaliadas aos 25 dias após a semeadura, nenhum dos tratamentos divergiram da testemunha ou dos demais tratamentos (Tabela 4).



Tabela 4 – Avaliação da área foliar e altura das plantas de feijão-caupi em casa de vegetação, submetidas à microbiolização de sementes com suspensão líquida e formulação em pó a base de *Trichoderma* spp., realizados no 25 dia após a semeadura.

Tratamentos	Área foliar (cm ²)	Altura da planta (cm)
L1 líquido	28,10 a	20,38 a
L1 pó	31,60 a	23,75 a
44 pó	32,20 ^a	21,10 a
52 líquido	32,63 a	20,55 a
A1 pó	33,00 a	22,33 a
I1 líquido	33,83 a	22,20 a
52 pó	34,15 a	23,50 a
I1 pó	35,40 a	24,25 a
A1 líquido	36,20 a	24,45 a
44 líquido	40,98 ab	23,95 a
Testemunha	55,35 b	27,88 a
C.V (%) ²	20,2	14,01

¹ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si segundo Tukey a 5% de probabilidade. ² Coeficiente de variação.

Aos 37 dias após a semeadura, referente à área foliar, a altura das plantas e o índice de clorofila, não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos. Na avaliação da doença fusariose foi observado a menor severidade da doença nos tratamentos com isolados de *Trichoderma* spp. 52 e L1 líquida, no entanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos, conforme a Tabela 5.

Tabela 5 – Avaliação da área foliar, altura de plantas, índice de clorofila e severidade de fusariose nas plantas de feijão-caupi em casa de vegetação, submetidas à microbiolização de sementes com suspensão líquida e formulação em pó a base de *Trichoderma* spp., aos 37 dias após a semeadura.

Tratamentos	Área Foliar (cm ²)	Altura das Plantas (cm)	Índice de clorofila	Severidade fusariose (nota)
44 pó	22,73 a	21,80 a	44,33 a	1,5 a
A1 pó	24,48 a	24,25 a	46,40 a	1,2 a
52 líquido	25,13 a	25,25 a	42,48 a	1,0 a
L1 líquido	25,23 a	22,13 a	45,33 a	1,0 a
L1 pó	26,53 a	24,85 a	41,10 a	1,4 a
I1 líquido	27,15 a	24,48 a	42,45 a	1,2 a
44 líquido	29,50 a	24,60 a	44,85 a	1,2 a
52 pó	32,35 a	26,63 a	50,83 a	1,4 a
Testemunha	35,43 a	28,80 a	39,25 a	1,5 a

A1 líquido	35,95 a	25,18 a	41,18 a	1,4 a
I1 pó	36,35 a	28,28 a	50,65 a	1,2 a
C.V (%)	38,19	18,92	12,52	26,34

¹ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si segundo Tukey a 5% de probabilidade. CV= Coeficiente de variação.

No 44º dia após a semeadura, a área foliar, a altura da planta e o índice de clorofila entre os tratamentos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Ao avaliar a doença da fusariose, a menor severidade da doença foi observada nos tratamentos 52 líquido, L1 líquido, 44 líquido e I1 pó, mas não houve diferença estatística entre os tratamentos, conforme consta na Tabela 6.

Tabela 6 – Avaliação da área foliar, altura de plantas, índice de clorofila e incidência de fusariose nas plantas de feijão-caupi em casa de vegetação, submetidas à microbiolização de sementes com suspensão líquida e formulação em pó a base de *Trichoderma* spp., aos 44 dias após a semeadura.

Tratamentos	Área foliar (cm ²)	Altura das Plantas (cm)	Índice de clorofila	Severidade fusariose (nota)
44 pó	22,73 a	21,80 a	44,33 a	1,4 a
52 líquido	25,13 a	25,25 a	42,48 a	1,0 a
L1 líquido	25,23 a	22,13 a	42,45 a	1,0 a
A1 pó	26,33 a	28,00 a	43,90 a	1,2 a
I1 líquido	27,15 a	24,48 a	45,33 a	1,4 a
L1 pó	28,25 a	25,03 a	42,45 a	1,2 a
44 líquido	29,65 a	24,60 a	44,98 a	1,0 a
52 pó	32,35 a	25,38 a	50,83 a	1,2 a
Testemunha	35,43 a	28,80 a	39,25 a	1,2 a
A1 líquido	35,95 a	25,18 a	41,05 a	1,2 a
I1 pó	36,35 a	28,28 a	50,65 a	1,0 a
C.V (%)	37,53	20,38	13,52	-

¹ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si segundo Tukey a 5% de probabilidade. ² Coeficiente de variação.

No 51º dia após a semeadura, houve diferença significativa entre a Testemunha e o tratamento 44 pó referente à área foliar, sendo que o tratamento 44 pó apresentou o menor valor médio. Quanto à altura da planta e índice de clorofila, não houve diferenças significativas entre os tratamentos e a testemunha, e todos os tratamentos tiveram a mesma nota em termos de intensidade da doença fusariose, logo não houve diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 7). Aguiar *et al.* (2014), não obteve resultados significativos quanto a promoção na altura de plantas com a utilização de *Trichoderma harzianum* e *T.*

asperellum, assim como os resultados obtidos com os isolados utilizados no presente trabalho.



Tabela 7 – Avaliação da área foliar, altura das plantas e índice de clorofila, nas plantas de feijão-caupi em casa de vegetação, submetidas à microbiolização de sementes com suspensão líquida e formulação em pó a base de *Trichoderma* spp., aos 51 dias após a semeadura.

Tratamentos	Área Foliar (cm ²)	Altura das Plantas	Índice de Clorofila	Severidade fusariose (nota)
44 pó	19,60 a	23,55 a	50,45 a	1 a
L1 pó	25,50 ab	25,88 a	48,88 a	1 a
A1 pó	28,65ab	27,23 a	55,13 a	1 a
44 líquido	29,28 ab	26,00 a	48,43 a	1 a
I1 líquido	30,18 ab	26,30 a	51,60 a	1 a
52 líquido	30,23 ab	27,43 a	52,75 a	1 a
L1 líquido	31,40 ab	24,10 a	47,20 a	1 a
I1 pó	32,40 ab	28,83 a	55,43 a	1 a
A1 líquido	35,13 ab	26,98 a	49,68 a	1 a
52 pó	36,65 ab	30,33 a	52,75 a	1 a
Testemunha	48,68 b	31,60 a	52,75 a	1 a
C.V (%)	33,98	17,5	7,03	0,00

¹ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si segundo Tukey a 5% de probabilidade. ² Coeficiente de variação.

Gava et al. (2012) obtiveram resultados semelhantes a estes, onde as plantas de meloeiros inoculadas com *Trichoderma viridae* LCB48, *T. koningii* LCB49 e *T. harzianum* LCB47 não tiveram efeito no desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular das plantas, bem como, não diferiram significativamente os tratamentos da testemunhas. Ferreira de Sá et al. (2019) em seu estudo na microbiolização com *Trichoderma* spp. em sementes de feijão-caupi obtiveram um aumento significativo na massa seca da raiz das plantas.

Aguiar et al. (2014), não obtiveram resultados significativos quanto a promoção na altura de plantas com a utilização de *T. harzianum* e *T. asperellum*, assim como os resultados obtidos com os isolados utilizados no presente trabalho, em casa de vegetação. Já Gravel et al. (2007), obtiveram resultados promissores na promoção de crescimento com a utilização de *Trichoderma* spp. no tomateiro, isso devido a produção de ácido indolacético (IAI) proporcionado pelo fungo. Vitti et al. (2016) que estudaram a indução de resistência sistêmica promovida por *T. harzianum* (T-22) em tomateiros inoculados com *Cucumber mosaic virus*, verificou que o tratamento com T-22 promoveu aumento na quantidade de clorofila, atuou positivamente no crescimento da planta e na melhoria da fotossíntese, além de ter reduzido a severidade da doença.

5.3. Identificação molecular de isolados de *Trichoderma* spp.

Foram realizados a análise filogenética de 36 isolados obtidos da Micoteca Prof. Gilson Soares da Silva – MGSS através da análise concatenada dos genes TEF 1 α e ITS e todos isolados estavam dentro do gênero *Trichoderma*. Observando a árvore filogenética foi possível verificar que os isolados foram agrupados em 8 grupos evolutivos (Figura 8).

Os isolados do grupo 1 foram *Trichoderma* (TV1 e U1) que estavam agrupados a espécie de *T. rugulosum*. Outros isolados divididos nos grupos 2, 3, 4, 5 e 6 formaram clados exclusivos, altamente suportados e não agruparam-se com nenhuma espécie conhecida. No grupo 7 o isolado Q1 foi evolutivamente próximo de *T. polysporum* e no grupo 8 o isolado GS1 compartilhava ancestral em comum com *T. humanense*.

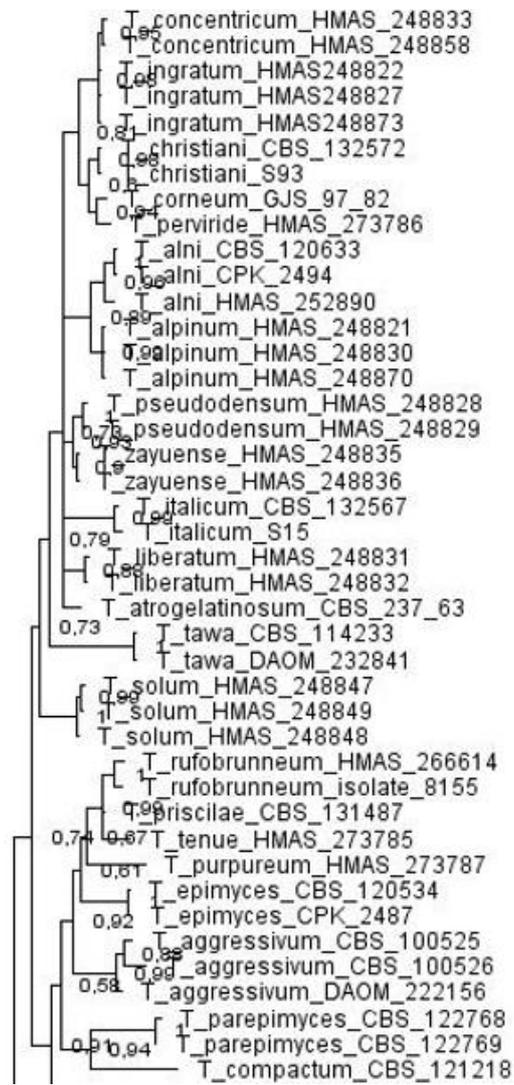
Dos 36 isolados analisados 32 não agruparam-se a nenhuma espécie conhecida e estes estavam em clados altamente suportados, isso levanta a teoria de serem possíveis novas espécies. Diversas pesquisas vem identificando novas espécies de *Trichoderma* spp. nos últimos anos, como as realizadas por Tomah et al., (2020) que relataram a espécie nova *T. dorothesis*, Gu et al., (2020) descobriram quatro novas espécies: *T. lentinulae*, *T. vermifimicola*, *T. xixiacum* e *T. zelobreve* e Rodríguez et al., (2021) descreveram também quatro novas espécies desse gênero: *T. botryosum*, *T. caeruloviride*, *T. lentissimum* e *T. pseudopyramidale*.

A distribuição dos isolados em clados diferentes mostram que existe uma alta variabilidade genética entre os isolados e o uso de análise multilocus tem sido proposto para delimitar espécies dentro deste gênero. Segundo Gu et al., (2020) o uso apenas do gene ITS não consegue distinguir espécies de *Trichoderma* spp. dentro do clado *Harzianum*.

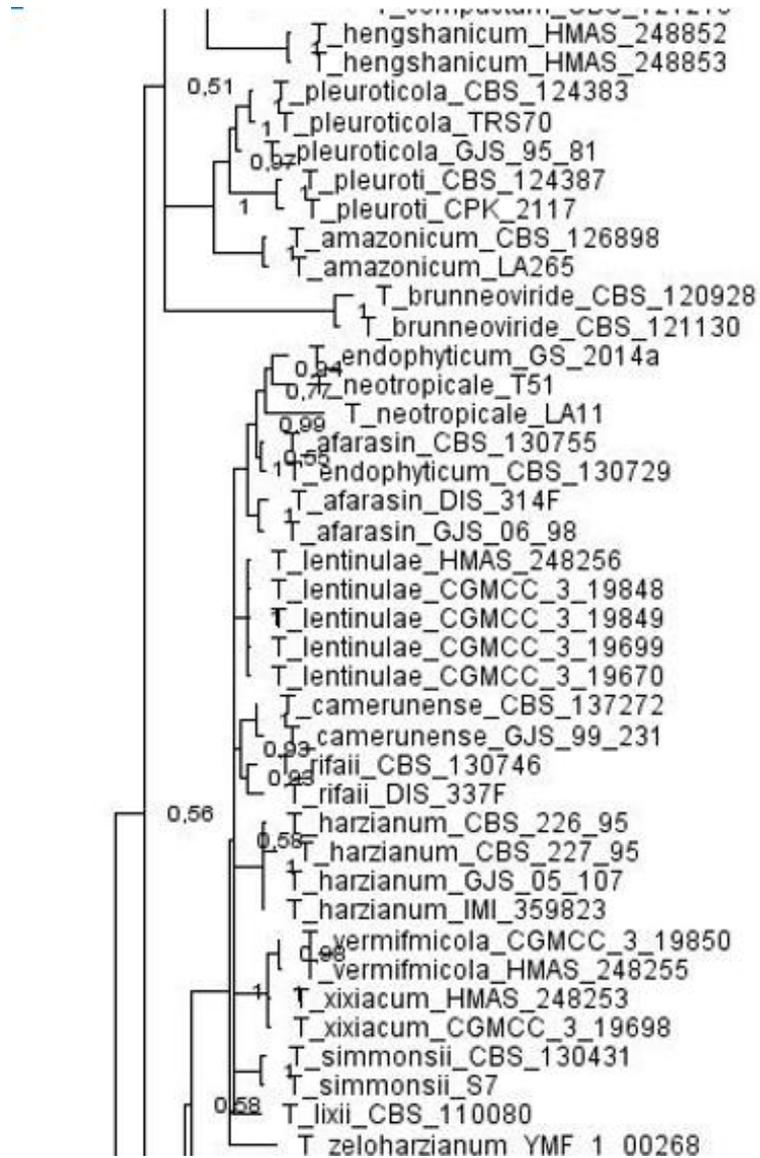
Pesquisadores vêm utilizando diversos genes para delimitar adequadamente as espécies sendo eles: ITS, TEF 1 α , Calmodulina, RPB2, ACT confirmando que a análise filogenética do gênero deve ser através de mais de um gene (RODRÍGUEZ et al., 2021; GU et al., 2020; TOMAH et al., 2020; HAOUHACH et al., 2020).



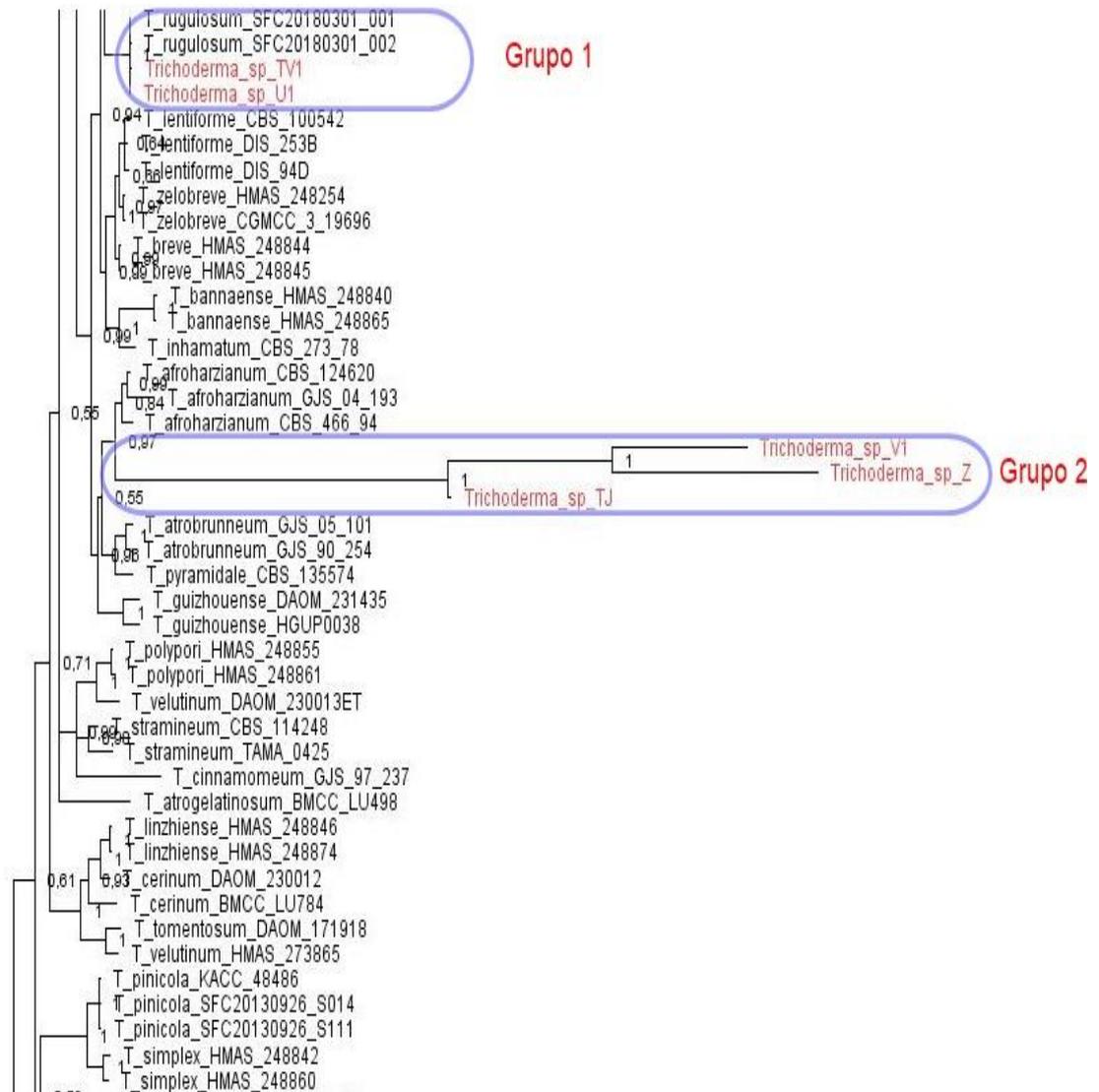
Figura 8 – Árvore filogenética baseada na Análise de Inferência Bayesiana da combinação do conjunto de dados de seqüências de genes ITS e TEF1 α . *Trichoderma ceramicum* CBS 114576 ET foi utilizado como outgroup. Os isolados obtidos neste grupo estão em vermelho.



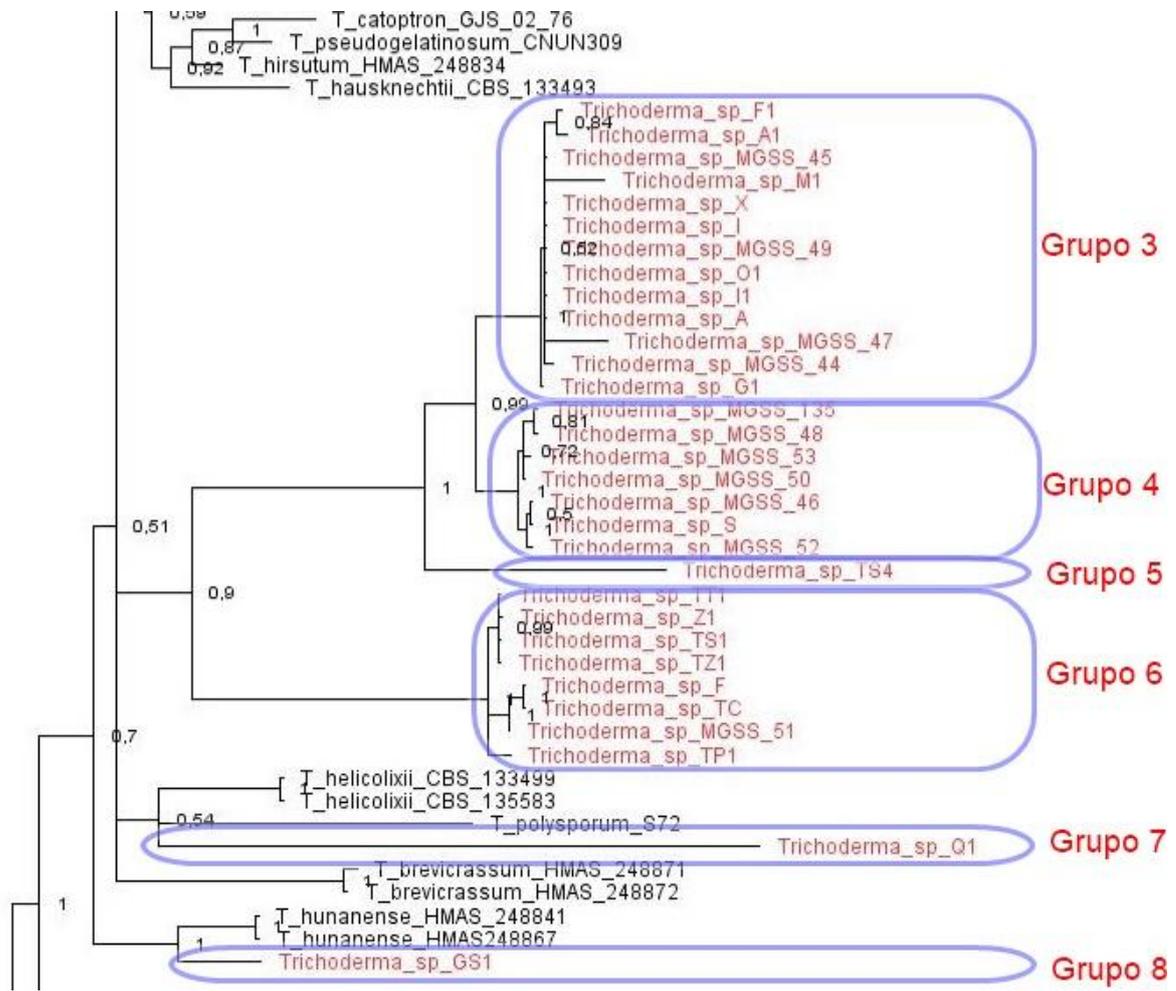
Continuação . Árvore filogenética baseada na Análise de Inferência Bayesiana da combinação do conjunto de dados de sequências de genes ITS e TEF1 α . *Trichoderma ceramicum* CBS 114576 ET foi utilizado como outgroup. Os isolados obtidos neste grupo estão em vermelho.



Continuação. Árvore filogenética baseada na Análise de Inferência Bayesiana da combinação do conjunto de dados de sequências de genes ITS e TEF1 α . *Trichoderma ceramicum* CBS 114576 ET foi utilizado como outgroup. Os isolados obtidos neste grupo estão em vermelho.



Continuação. Árvore filogenética baseada na Análise de Inferência Bayesiana da combinação do conjunto de dados de seqüências de genes ITS e TEF1 α . *Trichoderma ceramicum* CBS 114576 ET foi utilizado como outgroup. Os isolados obtidos neste grupo estão em vermelho.



0.01



6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No ensaio *in vitro* em que foi avaliado o antagonismo de isolados de *Trichoderma* spp., os isolados 52, 44, II, 135, L1, A1 e U1 apresentaram as menores médias de crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *tracheiphilum*, sendo que o isolado 52 foi o mais eficiente. No experimento em casa de vegetação, os isolados de *Trichoderma* spp. 52 e L1 na forma líquida foram os que apresentaram menor incidência de fusariose.

Para os parâmetros de índice de clorofila, área foliar e altura de plantas, os tratamentos com os isolados (44, 52, L1, A1 e II) de *Trichoderma* spp., não promoveram efeito no crescimento do feijoeiro em casa de vegetação.

Os métodos de microbiolização de sementes, suspensão líquida ou formulação em pó não diferiram significativamente nos parâmetros de crescimento avaliados no feijão-caupi.

Quanto a identificação molecular todos isolados estavam dentro do gênero *Trichoderma*. Observando a árvore filogenética foi possível verificar que os isolados foram agrupados em 8 grupos evolutivos. Os isolados do grupo 1 foram *Trichoderma* (TV1 e U1) que estavam agrupados a espécie de *T. rugulosum*. Outros isolados divididos nos grupos 2, 3, 4, 5 e 6 formaram clados exclusivos, altamente suportados e não agruparam-se com nenhuma espécie conhecida. No grupo 7 o isolado Q1 foi evolutivamente próximo de *T. polysporum* e no grupo 8 o isolado GS1 compartilhava ancestral em comum com *T. humanense*. Dos 36 isolados analisados 32 não agruparam-se a nenhuma espécie conhecida e estes estavam em clados altamente suportados, isso levanta a teoria de serem possíveis novas espécies.

Os estudos *in vitro* e *in vivo* para o controle biológico com isolados de *Trichoderma* spp. é viável, estes fungos do gênero *Trichoderma* spp. possuem grande potencial antifúngico. O que enfatiza a continuidade de investimentos em projetos que visem pesquisar o potencial de controle biológico desses fungos para cultura regional, como o feijão-caupi. O uso de *Trichoderma* spp., se configura como uma estratégia importante para o aumento da produtividade e indução de resistência do feijão caupi. Essa prática de inoculação do feijoeiro com *Trichoderma* spp. é recente, necessita ser estudada, avaliada e difundida, sobretudo a agricultores com baixa incorporação tecnológica. O trabalho contribui para reforçar a eficiência da utilização do controle biológico no manejo de fitopatógenos do solo.

É válido ressaltar também que algumas situações dificultaram o prosseguimento do trabalho, como a própria pandemia da COVID-19, o que impossibilitou algumas visitas ao laboratório e a casa de vegetação com a continuidade de mais algumas visitas para mais algumas avaliações quanto à promoção de crescimento do feijão-caupi o que seria importante



para mais resultados que poderiam se encontrados. Tendo isso em vista, a continuidade de mais pesquisas mostra-se muito importante, já que foi possível perceber o antagonismo dos isolados utilizados nesse trabalho o que demonstra resultados satisfatórios para a busca de mais estudos a cerca do controle biológico feito com *Trichoderma* spp.



REFERÊNCIAS

- AGUIAR, P. E. V. *et al.* Avaliação de *Trichoderma* spp. na Cultura de Feijão, em Antracnose, Mela e Nematóide das Galhas. **Scientific Electronic Archives**, v. 7, p. 17-25, 2014.
- AGRIOS, G.N. Plant Pathology, 5th ed., London, 2004.
- BANERJEE, S.; SINGH, S.; PANDEY, S.; BHANDARI, M. S.; PANDEY A.; GIRI, K. Biocontrol potential of *Pseudomonas azotoformans*, *Serratia marcescens* and *Trichoderma virens* against Fusarium wilt of *Dalbergia sissoo*. **Forest Pathology**, p.1-5, 2020.
- BENCHIMOL, R. L. *et al.* **Doenças fúngicas do feijão--caupi no estado do Pará**. 2021.
- BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, p.3-5, 1991.
- BEZERRA, A. A. C. *et al.* Características de dossel e de rendimento em feijão-caupi ereto em diferentes densidades populacionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1239-1245, 2009.
- BONFIM, M.P. SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; ALMEIDA, S.S.A.; SOUZA, I.V.B.; DIAS, N.O. Avaliação antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.36, n.1, p.61-67, 2010.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: Monitoramento da safra agrícola 2018/19**. Primeiro levantamento, Brasília: Conab, v.6, n.1, p.69-71, 2018.
- CONAB. Conab: campanha nacional de abastecimento, c2022. Pagina inicial. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra>>. Acesso em: 24 de ago. de. 2022.
- CHAVES, J. D. S., Oliveira, G. A., Rodrigues, T. G., Maia, S. S., Teixeira Junior, D. L., Sousa, F. G., & Rodriguez, C. A. (2018). Produtividade do feijão-caupi sob inoculação em área alterada no estado de Roraima-Brasil. *Nucleus*, 15(2), 319-324.
- CUCU, M. A.; GILARDI, G.; PUGLIESE, M.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. An assessment of the modulation of the population dynamics of pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in the tomato rhizosphere by means of the application of *Bacillus subtilis* QST 713, *Trichoderma* sp. TW2 and two composts. **Biological Control**, v.142, n. 1, p.1-10, 2020.
- DA SILVA, Abraão Cícero *et al.* Diagnóstico da produção de feijão-caupi no nordeste brasileiro. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 16, n. 2, 2018.
- DA SILVA JÚNIOR, J. V.; DE CARVALHO BEZERRA, A. A.; DA SILVA, E. M. Crescimento e desenvolvimento de cultivares de feijão-caupi em função da salinidade da água de irrigação. **Irriga**, v. 26, n. 2, p. 346-366, 2021.



DA SILVA, A. C. et al. Diagnóstico da produção de feijão-caupi no nordeste brasileiro. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 16, n. 2, 2018.

DE MOURA, I. N B. M. et al. Controle biológico com *Trichoderma* SP. sobre a qualidade de sementes de *Astronium urundeuva* (M. ALLEMÃO) ENGL. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 15, n. 1, p. 1-13, 2022.

DE OLIVEIRA, L. G. et al. Potencial de biocontrole *Trichoderma* spp contra *Macrophomina phaseolina* de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 26, n. 2, 2021.

DIAS NETO, J. A. Associação e compatibilidade de produtos químicos e os fungos *Trichoderma harzianum* e *Paecilomyces lilacinus* no manejo de fitonematoides na cultura da soja. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Chapadão do Sul, 2014.

EMBRAPA-AGÊNCIA EMBRAPA DE INFORMAÇÃO E TECNOLÓGICA-AGEITEC. **Importância dos Patógenos de Solo na Cultura do Feijoeiro**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/feijao/arvore/CONT000gvwk5em102wx7ha0g934vg016m2>. Acesso em: 25 fev.2018.

FERREIRA DE SÁ, M. N.; LIMA, J. S.; JESUS, F. N.; PEREZ, J. O. Microbiolização na qualidade de sementes e crescimento inicial de plantas de *Vigna unguiculata* L. Walp. **Acta Brasiliensis**, v. 3, n. 3, p. 111-115, 2019.

FREIRE FILHO, F. R. et al. **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. 2011.

GAVA, C. A. T.; MENEZES, M. E. L. Eficiência de isolados de *Trichoderma* spp no controle de patógenos de solo em meloeiro amarelo. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, Ceará, V. 43, n. 4, p. 644-640, out-dez, 2012.

GOMES, D. P. et al. Tratamento Alternativo de Sementes de Feijão caupi Produzido no Maranhão. **Cadernos de Agroecologia**, v. 17, n. 2, 2022.

GOMES-SILVA, F. et al. Genetic diversity of isolates of *Macrophomina phaseolina* associated with cowpea from Brazil semi-arid region. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, n. 11, p. 112-116, 2017.

GU X, WANG R, SUN Q, WU B, SUN J-Z Four new species of *Trichoderma* in the *Harzianum* clade from northern China. **MycoKeys**, v.73, p.109–132, 2020.

GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R. J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, p. 1968–1977, 2007.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L.; SOUZA, G. R. Ocorrência de mancha bacteriana do feijão-caupi em Roraima e reação de cultivares. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 37, n. 3, p. 127-130, 2011.



HAOUHACH, S.; KARKACHI, N.; OGUIBA, B.; SIDAOU, A.; CHAMORRO, I.; KIHAL, M.; MONTE, E. Three New Reports of *Trichoderma* in Algeria: *T. atrobrunneum*, (South) *T. longibrachiatum* (South), and *T. afroharzianum* (Northwest). **Microorganisms**, v.8, p. 1-14, 2020.

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

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – 2015. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Janeiro, 2015.

ISAIAS, C.O.; MARTINS, I.; SILVA, J.B.T.; SILVA, J.P.; MELLO, S.C.M. Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, v.40, n.1, p.34-41, 2014.

LEITE, J. J. M. Conhecimento dos produtores, percepção e uso de práticas de manejo de doenças da cultura do feijoeiro no agreste de Pernambuco. **TCC (Curso de Agronomia)**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns-PE, 2019.

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

MARQUES, E., SANTOS, D. B., SILVA, J. B. T., MARTINS, I., & MELLO, S. C. M. Avaliação do tratamento biológico com isolados de *Trichoderma* spp. na germinabilidade de sementes de feijão. **Cadernos de Agroecologia**, v. 9, n. 3, 2014.

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

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

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-DNPMA, p. 393-419, 1998.

MONTE, E.; BETTIOL, W.; HERMOSA, R. *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. **Trichoderma: Uso na Agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, p. 181-199, 2019.

NASCIMENTO, S. R. C. et al. Sobrevivência de estrutura de resistência de *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotium rolfsii* em solo tratado biologicamente. **Revista Agro@ambiente online**, Boa Vista, v. 10, n. 1, p. 50-56, 2016.

NECHET, K.L.; HALFELD-VIEIRA, B.A. **Doenças do feijão-caupi em Roraima**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2006. 16p. (Embrapa Roraima. Circular Técnica, 2).



POMELLA, A. W. V.; RIBEIRO, R. T. S. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas—uma visão empresarial. **Biocontrole de Doenças de Plantas**, p. 239, 2009.

RAJENDIRAN, R.; JEGADEESHKUMAR, D.; SURESHKUMAR, B.T.; NISHA, T. *In vitro* assessment of antagonistic activity of *Trichoderma viride* against post harvest pathogens. **Journal of Agricultural Technology**, Bangkok , v. 6, n. 1, p. 31-35, 2010.

RAMÍREZ-OLIER, J.; TRUJILLO-SALAZA, J.; Osorio-Echeverri, V.; Jaramillo-Ciro, M.; Botero-Botero, L. *In vitro* antagonism of *Trichoderma asperellum* against *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia lunata*, and *Fusarium oxysporum*. **Revista UIS Ingenierías**, v. 18, n. 2, p. 159-166, 2019.

RIBEIRO, V. Q. **Cultivo do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)**. Embrapa Meio-Norte-Sistema de Produção (INFOTECA-E), 2002.

ROCHA, W. S.; SAKAI, T. R.; SOUZA, D. L. A.; JUNIOR, A. F. C.; SANTOS, M. M. Efeito da microbiolização na germinação e crescimento inicial de feijão-caupi no Estado do Tocantins. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 11, n. 6, p. 41-47, 2017.

RODRÍGUEZ, M. DEL C. H. et al. New species and records of *Trichoderma* isolated as mycoparasites and endophytes from cultivated and wild coffee in Africa. **Scientific Reports**, v. 11, p. 1-30, 2021.

RUBIO, M. B.; HERMOSA, R.; VICENTE, R.; GÓMEZ-ACOSTA, F. A.; MORCUENDE, R.; MONTE, E.; BETTIOL, W. The Combination of *Trichoderma harzianum* and Chemical Fertilization Leads to the Dereglulation of Phytohormone Networking, Preventing the Adaptive Responses of Tomato Plants to Salt Stress. **Frontiers In Plant Science**, v. 8, p. 294, 2017.

SANTIN, R. C. M. Potencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* em *Phaseolus vulgaris*. v. 1, n.1, p. 5-7, 2008.

SARAVANAKUMAR, K., LI, Y.; YU, C.; WANG, Q. Q.; WANG, M.; SUN, J.; CHEN, J. Effect of *Trichoderma harzianum* on maize rhizosphere microbiome and biocontrol of *Fusarium* Stalk rot. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, article 1771, 2017.

SARAVANAKUMAR, K.; WANG, Myeong-Hyeon. Isolation and molecular identification of *Trichoderma* species from wetland soil and their antagonistic activity against phytopathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.109, n.1 p. 1-8, 2020.

SILVA, A. C.; VASCONCELOS, P. L. R. ; MELO, L. D. F. A. ; SILVA, V. S. G.; MELO JUNIOR, J. L. A. ; SANTANA, M. B. Diagnóstico da produção de feijão-caupi no nordeste brasileiro. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 16, n. 2, p.1-5, 2018.

SILVA, J. C.; TORRES, D. B.; LUSTOSA, D. C.; FILIPPI, M. C. C.; SILVA, G. B. Rice sheath blight biocontrol and growth promotion by *Trichoderma* isolates from the Amazon. **Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, Belém-PA, v. 55, n. 4, p. 243-250, 2012.



SOUSA, J. A. T.; BRITO, G. S.; REGO, S. S. Controle biológico de Fusariose em mudas de *Pinus taeda* e *Pinus elliottii* com produto comercial a base de *Trichoderma* sp. **Agrarian**, v. 14, n. 53, p. 304-313, 2021.

STEFANELLI, L. E. P. Controle biológico microbiano: *Beauveria bassiana* e *Trichoderma harzianum* em *Atta sexdens rubropilosa*, e *Metarhizium rileyi* em *Spodoptera litura*. 2022.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA6. Molecular evolutionary genetics analyses version 6.0. **Mol. Bio Evol.**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TOMAH, A. A.; ALAMER, I. S. A. et al. A new species of *Trichoderma* and gliotoxin role: A new observation in enhancing biocontrol potential of *T. virens* against *Phytophthora capsici* on chili pepper. **Biological Control**, v.145, p. 1-11, 2020.

VITTI, A.; PELLEGRINI, E.; NALI, C.; LOVELLI, S.; SOFO, A.; VALERIO, M.; SCOPA, M.; NUZZACICCI, M. *Trichoderma harzianum* T-22 induces systemic resistance in tomato infected by *Cucumber mosaic virus*. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1-11, 2016.

