

INSTITUTO FEDERAL GOIANO
CAMPUS URUTAÍ

ANA PAULA NERES KRAEMER

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE ISOLADOS
SELVAGENS E TRANSFORMADOS DE *Trichoderma* spp.**

URUTAÍ – GOIÁS
2019

ANA PAULA NERES KRAEMER

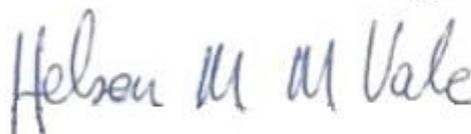
**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE ISOLADOS
SELVAGENS E TRANSFORMADOS DE *Trichoderma* spp.**

Monografia apresentada ao IF
Goiano-Campus Urutaí, como parte
das exigências do Curso de
Graduação em Agronomia para a
obtenção do título de Bacharel em
Agronomia.

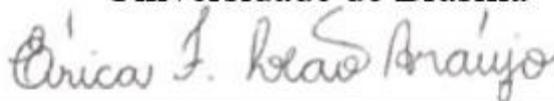
Aprovada em 18 de dezembro de 2019.



Dr. Milton Luiz da Paz Lima (Orientador)
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí



Dr. Helson Mario Martins do Vale
Universidade de Brasília



Prof. Dra. Erica Fernandes Leão Araújo
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí

URUTAÍ - GOIÁS
2019

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

KK89c Kraemer, Ana Paula Neres
Caracterização fisiológica de isolados selvagens e transformados de *Trichoderma* spp. / Ana Paula Neres Kraemer; orientador Milton Luiz da Paz Lima. -- Urutai, 2019.
57 p.

Monografia (em Agronomia) -- Instituto Federal Goiano, Campus Urutai, 2019.

1. antagonismo. 2. fisiologia do crescimento. 3. estresse. 4. transformação genética. 5. sensibilidade. I. Luiz da Paz Lima, Milton , orient. II. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL GOIANO – CAMPUS URUTAÍ
CURSO DE AGRONOMIA

ATA DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHO DE CURSO

Aos 18 dias do mês de dezembro de dois mil e dezenove reuniram-se: Prof. Dr. MILTON LUIZ DA PAZ LIMA, Prof. Dr. HELSON MARIO MARTINS DO VALE, Prof. Dra. ERICA FERNANDES LEÃO ARAÚJO nas dependências do Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí (GO), para avaliar o Trabalho de Curso do(a) acadêmico(a): ANA PAULA NERES KRAEMER, como requisito necessário para conclusão do Curso Superior de Bacharelado em Agronomia. O presente TC tem como título: CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE ISOLADOS SELVAGENS E TRANSFORMADOS DE *Trichoderma* spp.

Após análise, foram dadas as seguintes notas:

Avaliadores	Notas
1. Prof. Dr. MILTON LUIZ DA PAZ LIMA	9,4
2. Prof. Dr. HELSON MARIO MARTINS DO VALE	9,0
3. Prof. Dra. ERICA FERNANDES LEÃO ARAÚJO	9,3
Média final:	9,2

OBSERVAÇÕES:

Por ser verdade firmamos a presente:

Nome e Assinatura:

1. Milton Luiz da Paz Lima
2. Helson M. M. Vale
3. Erica F. Leão Araújo

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- Tese Artigo Científico
 Dissertação Capítulo de Livro
 Monografia – Especialização Livro
 TCC - Graduação Trabalho Apresentado em Evento
 Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____

Nome Completo do Autor: Ana Paula Neres Kraemer

Matrícula: 2015101200240457

Título do Trabalho: Caracterização fisiológica de isolados selvagens e transformados de *Trichoderma* spp.

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: será publicado como artigo

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 01/12/2020

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

4. o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
5. obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
6. cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Uruaia 07/10/2020
Local Data

Ana Paula Neres Kraemer

Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:

[Assinatura]

Assinatura do(a) orientador(a)

Dedico...
Em especial a minha mãe Maria
Neres, ao meu irmão Evandro, e ao
meu marido Rubens, familiares e
amigos, pelo apoio oferecido ao
longo desses anos.

AGRADECIMENTOS

Gratidão pelo amor incalculável do meu Criador a qual criou o céu e a terra, me proporcionando a vida.

Gratidão pelo meu marido Rubens Alceu Kraemer, pela paciência e sabedoria, não me deixando desanimar e nem desistir dessa jornada tornando as coisas mais simples, sendo um exemplo de coragem e determinação.

Gratidão aos meus pais pelo amor e apoio dedicação na minha formação de caráter, gratidão ao meu irmão Evandro, por todo amor e cuidado, amo todos vocês sendo minha motivação diária durante essa jornada.

Gratidão em especial aos meus sogros Maria Evenilda Kraemer e Alceu Kraemer, por todo cuidado amor e preocupação, me tratando como filha sempre, e me apoiando em tudo.

Ao meu querido e excelentíssimo orientador Dr Milton Luiz da Paz Lima, pelas orientações e oportunidades, no laboratório de Fitopatologia que me fizeram crescer como profissional, no tempo de convivência, a qual não me esquecerei, e claro por me dar a oportunidade de cuidar dos meus vinte e cinco isolados de *Trichoderma* meus “filhos”.

E a todos os outros professores do campo que me ajudaram direto ou indiretamente, através dos ensinamentos ofertados, e em especial ao Milton Sérgio Dornelles, que proporcionou a chave, para abrir a porta para o conhecimento da agroecologia. Ao IFGoiano campus Urutaí pelo apoio em ceder infraestrutura.

E aos meus colegas de sala Karoline, Thaís e Divino, por sempre estarem por perto dando apoio, e risadas nas horas tristes e alegres, e aos membros do laboratório de Fitopatologia que auxiliaram de alguma forma em especial, Paula pela história de vida e determinação, e aos meus irmãos de alma Roberth e Rafaela que foram conselhos para a vida.

"Os homens querem voar, mas temem o vazio. Não podem viver sem certezas. Por isso trocam o voo por gaiolas."
(Rubem Alves)

RESUMO

Caracterização fisiológica de isolados selvagens e transformados de *Trichoderma* spp.

Resumo - Uma variedade de cepas polivalentes de isolados de *Trichoderma* está disponível no mercado para controle biológico de pragas e doenças de plantas, além de estarem no campo nativo e antropizado representando a diversidade global. Tendo como objetivo analisar a fisiologia do crescimento, morfometria de isolados de *Trichoderma* spp. Os experimentos foram conduzidos em três etapas: i) Fisiologia do crescimento: em uma população de 25 isolados, em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, foram avaliados o: fator 1: efeito dos isolados (25), fator 2 - efeito dos tipos de estresse (três - sorbitol, NaCl e sem estresse), fator 3 - efeito da temperatura (10 °C, 20 °C e 27 °C). i) Diariamente durante sete dias o diâmetro da colônia (mm) foi medido. ii) Morfologia e Morfometria: a partir dos isolados cultivados anteriormente caracterizou-se as colônias morfologicamente, realizou-se a morfometria dos conídios e avaliou-se a produtividade de conídios em cada condição morfocultural imposta. Testes de hipóteses paramétricas e não paramétricas e análises multivariadas foram utilizadas para distinguir os tratamentos. A partir da fisiologia do crescimento observou-se o efeito individual dos isolados, identificando o isolado SLV1 por apresentar a maior média de crescimento em todos os dias avaliados; os estresse que mais inibiram o crescimento dos isolados foram NaCl seguido do sorbitol, havendo variações de insensibilidade aos estresses empregados, contudo refletindo em inaptidão reprodutiva. A partir da morfologia e morfometria os isolados que apresentaram maior comprimento do esporo foram SLV 5, SLV8 e SLV 10 e o estresse reduziu estatisticamente o tamanho do conídio do maior para o menor estatisticamente representado pelo meio batata-dextrose-ágar, sorbitol e NaCl. Conclui-se através desse trabalho para testes de campo que o isolado SLV1 é um candidato como agente de controle biológico de doenças de plantas.

Palavras-chave – antagonismo, fisiologia do crescimento, estresse, transformação genética, sensibilidade.

ABSTRACT

Physiological characterization of wild and transformed species of *Trichoderma* spp.

Abstract – A variety of multipurpose strains of *Trichoderma* isolates are commercially available for biological control of plant pests and diseases, as well as being in the native and anthropized field representing global diversity. The aim of this work is to analyze the growth physiology, morphometry of isolates of *Trichoderma* spp. The experiments were conducted in three stages: i) Growth physiology: in a population of 25 isolates, in a completely randomized design with three replications, the following factors were evaluated: factor 1: isolates effect (25), factor 2 - types effect stress (three - sorbitol, NaCl and no stress), factor 3 - temperature effect (10 °C, 20 °C and 27 °C). i) daily for seven days the diameter of the colony (mm) was measured; ii) morphology and morphometry: from the previously cultivated isolates the morphological colonies were characterized, the conidia morphometry was performed and the conidia productivity was evaluated in each imposed morphocultural condition. Parametric and nonparametric hypothesis tests and multivariate analyzes were used to distinguish the treatments. From the growth physiology we observed the individual effect of the isolates, identifying the SLV1 isolate by presenting the highest growth average in all evaluated days; The stresses that most inhibited the growth of isolates were NaCl followed by sorbitol, with variations in insensitivity to the stresses used, however reflecting in reproductive disability. From the morphology and morphometry the isolates that presented the largest spore length were SLV 5, SLV8 and SLV 10 and the stress reduced the conidia size from the largest to the smallest statistically represented by potato-dextrose-agar, sorbitol and NaCl. It is concluded from this work for field tests that the SLV1 isolate is a candidate as a biological control agent of plant diseases.

Key-words – antagonism, growth physiology, stress, genetic transformation, sensitivity.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTAGEM DE TABELAS	xii
LISTAGEM DE FIGURAS.....	xiii
INTRODUÇÃO	14
REVISÃO DE LITERATURA	17
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	54

LISTAGEM DE TABELAS

Tabela 1. Código dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. isolados e mutantes, e suas respectivas origens.	23
Tabela 2. Progresso temporal do diâmetro da colônia (cm), área abaixo da curva de progresso do crescimento micelial (AACPCM) e taxa de crescimento micelial (TCM) de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em diferentes dias de avaliação*.....	30
Tabela 3. Progresso temporal do diâmetro da colônia (D, cm), área abaixo da curva de progresso do crescimento micelial (AACPCM) e taxa de crescimento micelial (TCM, cm dia ⁻¹) de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em diferentes tipos de estresses*.....	33
Tabela 4. Progresso temporal do diâmetro da colônia (cm) de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em diferentes tipos de temperaturas de incubação*.....	36
Tabela 5. Médias do comprimento (C) dos conídios dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.*.....	38
Tabela 6. Médias do comprimento (C) dos conídios dos diferentes tipos de estresses*.....	39
Tabela 7. Médias do comprimento (C) dos conídios dos diferentes tipos de temperaturas*..	39
Tabela 8. Análise de variância das interações entre os fatores analisados.....	46
Tabela 9. Contrastes das medianas e médias das áreas abaixo da curva de progresso da crescimento micelial (AACPCM) e taxa de crescimento micelial (TCM) da interação dos isolados com a temperaturas de 10 °C* (Continuação).....	48
Tabela 10. Contrastes das medianas e médias das áreas abaixo da curva de progresso da crescimento micelial (AACPCM) e taxa de crescimento micelial (TCM) da interação dos isolados com a temperaturas de 20 °C*.....	49
Tabela 11. Contrastes das medianas e médias das áreas abaixo da curva de progresso da crescimento micelial (AACPCM) e taxa de crescimento micelial (TCM) da interação dos isolados com a temperaturas de 27 °C*.....	50
Tabela 12. Médias da abaixo da curva de progresso do crescimento micelial (AACPCM) e taxa de crescimento micelial (TCM) da interação das temperaturas e estresses aplicados no experimento*.....	52

LISTAGEM DE FIGURAS

- Figura 1.** Curvas de progresso temporal do crescimento micelial de isolados de *Trichoderma* spp. selecionados por apresentarem maiores, intermediários e menores AACPCM. 31
- Figura 2.** Curva de progresso temporal do diâmetro da colônia (cm) dos isolados de *Trichoderma* spp. submetidos a diferentes estresses..... 34
- Figura 3.** Curva de progresso temporal dos isolados de *Trichoderma* spp. submetidos a diferentes temperaturas de incubação. 36
- Figura 4.** Componentes principais do crescimento micelial temporal (7 dias de avaliação), área abaixo da curva de progresso do crescimento micelial (AACPCM) e taxa de crescimento micelial (TCM). A. efeito dos isolados de *Trichoderma* spp., B. efeito dos tipos de estresses (meios de cultivo), C. efeito das temperaturas de incubação. 41
- Figura 5.** Correlações canônicas do crescimento micelial temporal (cm, 7 dias de avaliação), área abaixo da curva de progresso do crescimento micelial (AACPCM) e taxa de crescimento micelial (TCM). A. efeito dos isolados de *Trichoderma* spp., B. efeito dos tipos de estresses (meios de cultivo), C. efeito das temperaturas de incubação. 43
- Figura 6.** Agrupamento utilizando medida de similaridade de Malahanobis utilizando as variáveis crescimento micelial temporal (cm, 7 dias de avaliação), área abaixo da curva de progresso do crescimento micelial (AACPCM) e taxa de crescimento micelial (TCM). A. efeito dos isolados de *Trichoderma* spp., B. efeito dos tipos de estresses (meios de cultivo), C. efeito das temperaturas de incubação. 45

INTRODUÇÃO

Diversos microrganismos são encontrados na rizosfera que podem proteger o sistema radicular da infecção por fitopatógenos além de promover o crescimento vegetal, estando incluído nesse grupo *Trichoderma* spp. Fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* sp. Pers. (1794) têm importância econômica significativa para a agricultura, estes antagonistas, além de apresentarem potenciais como biofungicidas, se colonizados nas raízes melhora a produtividade das culturas, a resistência a estresses abióticos e bióticos a captação e uso de nutrientes (ALMANÇA, 2005; MOHAMED e HAGGAG, 2006).

Existe grande versatilidade no uso desse biocontrole, além desses benefícios relatados como ação antibiose e competição, possuindo espectro de ação de metabólitos, em vários fungos fito patogênicos (MARQUES et al., 2018), estudos como o de Roberti et al. (2006) mostraram que *Trichoderma* podem ser usados também, como biorremediadores, pois degradam alguns grupos de substâncias químicas de alta persistência no ambiente, representando grande vantagem podendo ser utilizado em controle integrado.

Outra atividade importante presente é o microparasitismo em espécies de *Trichoderma*, muitas pesquisas relataram a elucidação desse mecanismo sendo um elemento-chave nas vias de sinalização e transdução, além das sequências reguladoras de regiões promotoras de genes relacionados ao micoparasitismo (LISBOA e FELIX, 2007; TSENG et al., 2008; SAVAZZINI et al., 2008; ROSA e HERRERA, 2009; MARCELLO et al., 2010; VIEIRA, 2014). A transformação genética é uma ferramenta indispensável para a análise funcional de genes de interesse biotecnológico, para criação de isolados transformantes de *Trichoderma*.

Em meio aos antagonistas de fungos fitopatogênicos usados no biocontrole, cerca de 90 % têm sido executados com diferentes isolados pertencentes a este gênero *Trichoderma*

(BENÍTEZ et al., 2004; VINALE et al., 2008). Existem em literatura 432 táxons válidos de *Trichoderma* spp., sendo destes apresentado 423 espécies, quatro *formae speciales* e sete variedades descritas em literatura. Este hifomiceto, apresenta como posicionamento taxonômico o reino Fungi, Divisão ascomicota, Subdivisão Pezizomycotina, Classe Sordaryomycetes, subclasse Hypocreomycetidae, Ordem Hypocreales, família Hypocreaceae (teleomorfo) (INDEX FUNGORUM, 2019).

Atualmente o tema sustentabilidade é pauta obrigatória em vários âmbitos econômicos, seja para incentivar a redução do uso de agrotóxicos nos sistemas de plantio, bem como para atender a demanda crescente de alimentos mais saudáveis e produtos livres de resíduos químicos, nesse sentido, existe uma tendência cada vez maior de estudar, incentivar e discutir o uso do controle biológico como opção sustentável viável no âmbito econômico e organizacional (HARMAN, 2012). Segundo AGROSMART (2019) os defensivos biológicos protagonizaram uma nova revolução agrícola, Agro 4.0 ou agricultura digital, tendo adoção tanto na agricultura orgânica quanto convencional promovendo o uso sustentável.

O controle biológico constitui-se uma alternativa indispensável no controle de pragas e doenças. Entre 2017 e 2018, a indústria brasileira registrou um aumento de 77 % no comércio de insumos biológicos. O volume de vendas passou de R\$ 262,4 milhões para R\$ 464,5 milhões, segundo a Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico (ABCBio, 2019), sendo um dos principais atuantes no controle biológico de fitopatógenos o *Trichoderma* spp.

Curiosamente, um fungo amplamente utilizado como agente de controle biológico e regulador de crescimento, Li Destri Nicosia et al. (2015) associaram porcentagens de mortalidade de 30-80 % plantas de *Pinus nigra* devido a *T. viridae*, em mudas inoculadas, sendo detectados dois isolados não virulentos como *T. viridarium* e *T. trixiae*.

Isolados de *Trichoderma* spp. são muito utilizados para controle biológico de doenças de plantas como para *Phytophthora cactorum* e *Phytophthora* spp. que causam podridões de árvores de pera (SANCHEZ et al., 2019), plantas de pepino visando controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* também foram validadas (SARAVANAKUMAR et al., 2016), em ensaios de campo procurando caracterizar isolados nativos de *Trichoderma* spp. contra o fitopatógeno de solo *Rhizoctonia solani* (ANEES et al., 2010), além da utilização em grandes culturas em feijão e soja no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* (CARVALHO et al., 2011; Görge et al., 2009). No Brasil existem cepas disponibilizadas para uso comercial no controle de fitopatógenos como *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. stromaticum*, quantificando o total de 22 produtos registrados aos quais 21 são fungicidas microbiológicos e 1 nematicida microbiológico (AGROFIT, 2019).

O presente trabalho teve como objetivo analisar a fisiologia do crescimento, morfometria e antagonismo de isolados de *Trichoderma* spp.

REVISÃO DE LITERATURA

Agricultura orgânica e controle biológico

Em 1920 o inglês Sir Albert Howard dá início ao movimento orgânico, sendo considerado o fundador da agricultura orgânica, baseado em mais de 40 anos de pesquisa na Índia, onde procurou demonstrar a relação da saúde e resistência humana às doenças correlacionando com a estrutura orgânica do solo. Onde os princípios básicos de produção é não utilização de adubos artificiais e defensivos sintéticos, priorizando a matéria orgânica do solo na melhoria da fertilidade natural do solo, além da utilização da compostagem como aporte para eliminação de pragas e doenças (PENTEADO, 2000).

Sistemas não convencionais de cultivo do solo, baseado em princípios ecológicos, designa o termo orgânico. A agricultura orgânica é um sistema de produção onde visa, pela saúde, ética e cidadania do ser humano, contribuindo para a preservação da vida e natureza, utilizando os recursos naturais de forma racional, aplicando métodos de cultivos de povos tradicionais e as recentes tecnologias ecológicas. Diversos movimentos ou processos baseados nos princípios agroecológicos se enquadram na agricultura orgânica a exemplo temos: as agriculturas alternativa, biológica, orgânica, natural, biodinâmica, yamaguishiana, permacultura, agroflorestais e outras (EHLERS, 1994; PENTEADO, 2001).

O mercado nacional de orgânicos cresceu 20 % em 2016, com faturamento estimado de R\$ 3 bilhões, segundo o Conselho Nacional da Produção Orgânica e Sustentável (Organis) (SNA, 2017). No DF o mercado de produtos orgânicos é crescente, é estimada uma produção de 8.200 ton por ano de hortaliças e frutas, o que representa um crescimento anual de 34 % (GOMEZ, 2017). Ainda segundo GOMES (2017) há 45 mil pessoas no DF que consomem somente produtos orgânicos, movimentando neste nicho de mercado R\$ 35 milhões por ano neste território.

E o que se observa no campo quando se fala de produção orgânica em larga escala, que ao contrário da produção convencional que se resume em pacotes tecnológicos de insumos, a agricultura orgânica baseia-se em tecnologias de processos, onde pesquisas e profissionais capacitados são escassos, sendo um fator limitante para adesão. Não se trata de dizer que agricultura orgânica é inviável para grandes produtores empresariais, mas sim que sistemas de produção com estas características possuem maior restrições aos desenhos de sistemas diversificados, respeitando-se as inter-relações e proporções, pois todos os fatores são interdependentes (DAROLT, 2001).

O controle biológico é uma ferramenta fundamental para fornecer o aporte necessário, no processo de produção orgânica, uma vez que, o controle emergencial curativo que se é permitido no convencional, não se aplica na agricultura orgânica, baseando-se assim no controle preventivo de proteção às plantas, na restauração da comunidade microbiana e na recuperação da estrutura do solo. Enfatiza-se o emprego de táticas e métodos, sejam culturais, biológicos e de resistência genética, visando a prevenção e a redução da intensidade das doenças (DAROLT, 2001; AMORIM, 2011).

No entanto, para serem utilizados dentro da agricultura orgânica os produtos biológicos de controle, além de serem registrados no MAPA (2019), precisam ser analisados pela Coordenação de Agroecologia e produção orgânica (Coagre). Os insumos usados no controle, não devem gerar resíduos nos produtos finais, que possam se acumular nos organismos vivos ou prejudicar a saúde humana e animal, ou ambiental (MAPA, 2016).

Agricultura convencional e controle biológico

O Sistema Convencional é o atual sistema de produção agrícola, fortemente incentivada na década de 70, baseado pelo uso maciço de insumos o qual originou-se dos pacotes tecnológicos daquele governo, sendo sinônimo de crescimento econômico e foi chamada de Revolução Verde. O processo de produção da Agricultura Convencional, se baseia

no emprego de insumos externos, como adubos químicos, agrotóxicos, uso de mecanização, monocultura, e outros, sendo conhecida como tecnologia de produtos, necessitando de aporte externo (CONTERATO e FILLIPE, 2009).

Segundo BRUM (1983), RÜCKERT (2003) e ALBUQUERQUE e SILVA (2008) a modernização da agricultura brasileira teve início no Planalto Médio gaúcho com o trigo, ainda na década de 1940. A tecnologia da revolução verde é inicialmente aplicada na região sul do Brasil, que era o lugar que reunia as condições climáticas, sociais e econômicas ideais para a implantação bem-sucedida da revolução verde nas décadas de 1960 e 1970, e segue concomitantemente a expansão para outras regiões do país (ALVES e TEDESCO, 2016).

Poucos são os trabalhos que abordam os problemas que circundam a agricultura convencional, o que gera perdas econômicas e ambientais. O pacote vendido onde se aborda o monocultivo, adubo químico, agrotóxicos, transgênicos, torna-se insustentável dando sinais de exaustão, mediante a resistência de agroquímicos; surgimento de mais pragas; perda gradual da capacidade nutritiva do solo, e, conseqüentemente, da produtividade, e poluição de mananciais são alguns dos problemas para os quais a pesquisa e os agricultores buscam alternativas no campo da agroecologia (GLIESSMAN, 2009; SOARES e PORTO, 2007).

A tendência é que os biológicos ganhem destaque, visto crescimento e adesão desses novos produtos, segundo a (ABCBio, 2019) o uso de biopesticidas agrícolas como estratégia para o controle biológico de pragas e doenças tem potencial para crescimento anual de 20 %. No Brasil, o total de produtos de controle biológico registrados são 651 biodefensivos, dos quais possuem ampla ação de controle, fungicidas, nematicidas, inseticidas, acaricidas todos microbiológicos.

Essa crescente adesão, de controle biológico na agricultura convencional surge como uma estratégia que entrega produtividade aliada a uma agricultura sustentável, em consonância

com as novas demandas de mercado, onde consumidores estão mais preocupados com alimentos saudáveis. A adição do controle biológico na agricultura complementa o manejo integrado de pragas e doenças, trazendo benefícios ao produtor, consumidor e meio ambiente, reduzindo a aplicação de defensivos químicos, o número de pragas resistentes, e menor concentração de resíduos químicos nos alimentos, maior especificidade contra pragas, além de restabelecimento de organismos benéficos na lavoura (GLIESSMAM, 2001; ROMEIRO, 2007).

***Trichoderma* spp. como agente de controle biológico**

Partindo do princípio de se buscar uma agricultura sustentável e reduzir o uso indiscriminado de produtos fitossanitários o controle biológico por um antagonismo é uma abordagem potencial, não química e ecológica para o gerenciamento de doenças de plantas. *Trichoderma* é um agente biológico de controle ABC amplamente encontrado sendo usado em todo o mundo para o gerenciamento adequado de vários fitopatógenos foliares e do solo (MACHADO et al., 2012).

Dentre os produtos de controle biológico disponíveis no mercado, espécies de *Trichoderma* mais utilizados no Brasil são *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis* e *T. stromaticum*, quantificando o total de 22 produtos registrados aos quais 21 são fungicidas microbiológicos e 1 nematicida microbiológico (AGROFIT, 2019).

O gênero *Trichoderma* spp. abrange hifomicetos de vida livre, encontrados facilmente em solos, colonizando madeira, raízes de plantas, e são associados a decomposição sendo um fungo sapróbio, para cada espécie, existe habitualmente uma forma anamórfica (ou clonal) e uma forma teleomórfica (ou sexuada) (HARMAN et al., 2004a; FIGUEIREDO et al., 2007). Possuem característica de crescimento rápido, observado em meio de cultura. Caracterizado por conidióforos hialinos bem definidos, muito ramificados, com ramos terminais, não verticiliados e fíalides isoladas ou em grupos. O formato e tamanho de conídios podem variar, apresentando

colorações verdes, amarelos ou verdes amarelados, tendenciados a se acumular em massas globulares (ESPOSITO, 1998; SAMUELS, 1996). Apresenta conidióforos hialinos, muito ramificados, não verticilados, fiálides simples ou agrupadas, conídios hialinos, unicelulares, ovoides, e surgem agrupados na região da célula conidiogênica (cabeças úmidas), facilmente reconhecidos e crescem rapidamente em meios de cultivo produzindo floculação de conídios; são muito comuns em condições de saprófitos em solo ou madeira, são relatados como espécies parasitas de outros fungos (BARNETT e HUNTER, 1998).

O biocontrole resulta da competição por nutrientes e espaço ou como resultado da capacidade dos agentes de controle biológico (ACB) de produzir e / ou resistir a metabólitos que impedem a germinação de esporos (fungistase), matam as células (antibiose) ou modificam a rizosfera, acidificando o solo, e dificultando o crescimento de fitopatógenos. Outro mecanismo de ação em interação direta com o patógeno, é o micoparasitismo, que envolve contato físico e síntese de enzimas hidrolíticas degradadoras da parede celular do patógeno como sendo um fator determinante na eficiência desse processo. Além de influenciar na promoção de crescimento e indução de resistência (BENÍTEZ et al., 2004; INFANTE et al., 2009).

Isolados selvagens e mutantes de *Trichoderma* spp.

Existe uma grande biodiversidade de espécies de *Trichoderma* em diferentes habitats ecológicos, demonstrando uma alta adaptabilidade a vários nichos ecológicos. Podendo apresentar características sobrepostas dentro de um mesmo grupo ou secção, o estudo de isolados selvagens é de grande importância, visto que preparações comerciais para uso como ACB, devem ser compostas de conídios produzidos em massa (esporos assexuais), com suficiente viabilidade para crescimento vegetativo e atividade antagônica quando aplicado nas atividades agrícolas. Uma vez que, ainda existe um interesse considerável em encontrar fungos

micoparasitários mais eficientes, especialmente em *Trichoderma* spp. que diferem consideravelmente em relação à sua eficácia no biocontrole (MASSART e JIJAKLI, 2007).

Outra tecnologia importante, que possui potencial para melhoramento de isolados do gênero *Trichoderma* sp., e a transformação genética para seleção de genes com interesse biotecnológico, a biologia molecular da interação entre os transformantes de *Trichoderma* e patógenos tem sido estudada em detalhe. Para tanto, a crescente disponibilização de genomas de espécies de *Trichoderma* tem permitido a análise funcional de genes envolvidos no controle biológico e elicitores de defesa em plantas em maior escala (ZEILINGER, 2004; SCHUSTER e SCHMOLL, 2010).

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de cepas de *Trichoderma* spp.

Vinte e cinco isolados purificados de *Trichoderma* sp. foram obtidos de diferentes formas (Tab. 1).

Tabela 1. Código dos isolados de *Trichoderma* spp. isolados e mutantes, e suas respectivas origens.

Isolados	Tipo de substrato	Origem
SLV1	Coletado em EM mata IF	Urutaí-GO
SLV2	<i>T. harzianum</i> selvagem	Laboratório de Enzimologia (UFG/ICB)
SLV3	Placa exposta ao ar livre	Urutaí-GO
SLV4	Feijão	Urutaí-GO
SLV5	Feijão	Urutaí-GO
SLV6	Algodão	Urutaí-GO
SLV7	Capim massambara	Urutaí-GO
SLV8	Corda de viola	Urutaí-GO
SLV9	Ipê- roxo (<i>Handroanthus impetiginosus</i>)	Urutaí-GO
SLV10	Ipê- roxo (<i>Handroanthus impetiginosus</i>)	Urutaí-GO
SLV20	Soja (<i>Glycine max</i>)	Urutaí-GO
SLV21	Soja (<i>Glycine max</i>)	Urutaí-GO
SLV22	Soja (<i>Glycine max</i>)	Urutaí-GO
SLV23	Soja (<i>Glycine max</i>)	Urutaí-GO
SLV24	Soja (<i>Glycine max</i>)	Urutaí-GO
SLV15	Milho (<i>Zea mays</i>)	Urutaí-GO
SLV208	Ficus	Urutaí-GO
SLV210	Algodãozinho do cerrado	Urutaí-GO
SLV564	Milho (<i>Zea mays</i>)	Urutaí-GO
SLVD1	Raspagem de pele de cachorro	Urutaí-GO
SLVARG	Sementes de soja	Argentina
COMHARZ	Produto comercial Ecotrich	Urutaí-GO
SYN8	Transformados	Laboratório de Enzimologia (UFG/ICB)
SYN9	Transformados	Laboratório de Enzimologia (UFG/ICB)
SYN10	Transformados	Laboratório de Enzimologia (UFG/ICB)

Fisiologia do crescimento, esporulação e morfometria

No experimento foram utilizados 25 isolados, analisados num delineamento inteiramente casualizado fator 1: isolados (25), fator 2: estresses abióticos (três tipos) em meio de cultivo batata-dextrose-ágar (três tipos - sem estresse, adição sorbitol e NaCl), fator 3: temperaturas (três tipos - 10 °C, 20 °C e 27 °C) sob duas repetições totalizando 450 unidades experimentais.

O meio de cultivo batata-dextrose-ágar (BDA) foi realizado de acordo com a concentração indicado pela bula. Para provocar o estresse salino utilizou-se a concentração [1%] de NaCl, sendo adicionado a 500 mL de meio de cultivo BDA a quantidade de 5 g de NaCl. O outro estresse provocado aos isolados foi a adição de sorbitol, o qual adicionou-se também a 500 mL de BDA 18,2 g de sorbitol. O controle negativo foi realizado utilizando apenas meio de cultivo BDA.

Produziu-se matrizes axênicas dos isolados de *Trichoderma* spp. que serviram para recorte de discos de micélio de 10 mm de diâmetro que foram transferidos para o centro das placas de Petri, com a parte do micélio voltado para baixo.

Avaliou-se diariamente por um período de 7 dias, o diâmetro da colônia, permitindo o cálculo da área abaixo da curva de progresso do crescimento micelial (AACPCM) e taxa de crescimento micelial (TCM) nas diferentes temperaturas de crescimento e tipos de estresses. A partir de sete medidas temporais do diâmetro da colônia (mm) calculou-se a AACPCM, integralizando a curva de progresso do crescimento micelial para cada tratamento/fator (diâmetro x sete dias de avaliação), por meio da fórmula:

$$AACPCM = \sum_i^{n-1} \frac{(X_i + X_{i+1})(t_{i+1} - t_i)}{2}$$

Onde, n é o número de avaliações do diâmetro da colônia, X_i é o diâmetro da colônia, e $(t_{i+1}-t_i)$ é o número em dias entre as avaliações consecutivas (SHANER e FINNEY, 1977). O valor da AACPCM sintetiza todas as avaliações do diâmetro da colônia em um único valor, representando o progresso do crescimento micelial.

A taxa de crescimento micelial (TCM) foi calculada através da regressão linear sendo os dias o valor de X e Y os valores de diâmetro da colônia calculando o coeficiente angular obtido no Excel[®], (procedimento = inclinação($y;x$)) correspondente a taxa de crescimento dada em % cm dia⁻¹.

Na avaliação da morfometria dos isolados, foram realizadas lâminas semipermanentes, utilizando corante fixador a base lactofenol, onde foram coletados os conídios ao 7º dia de crescimento da colônia, onde foram levados para o microscópio de captura digital e os conídios fotografados as medições do comprimento do conídio (μm) e suas medições realizadas utilizando o software ToupView[©], avaliando 100 unidades para os fatores isolados, tipos de estresses (meio) e tipos de temperaturas.

Foi realizado testes de hipótese para a normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade dos dados (Bartlett), para verificação e se atendem aos pressupostos dos testes paramétricos (Cowan, 1998). Os três fatores foram analisados através de testes de hipótese [testes paramétricos (teste F) à 5% de probabilidade; não paramétricos (LSD teste e Friedmann teste) à 5% de probabilidade] e testes de comparação de médias quando os mesmos apresentavam interação. Além disso, foi realizado interação (contrastes) dois a dois (fatores), e três fatores bem como, testes de comparação de médias utilizando os mesmos procedimentos citados anteriormente. O teste de médias de três fatores por recomendação estatística não foi apresentado devido o volume de resultados e interpretação biológica inconclusiva para o experimento.

Além dos testes inferenciais acima descritos, foi realizada análise multivariada (RENCHEER, 2004) de componentes principais (CP), correlações canônicas (CN) e agrupamento utilizando medidas de similaridade de Malahanobis, afim de verificar relacionamentos de forma individual e das interações, entre tratamentos com as variáveis dependentes utilizando o programa livre “R”(R Team 2008).(R Team, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito individual dos fatores

Considerando os isolados, os efeitos de estresses e temperaturas, as variáveis dependentes, diâmetro da colônia, analisadas no primeiro ao sétimo dia após a inoculação, da área abaixo da curva de progresso e taxa de crescimento micelial, não apresentaram distribuição normal, sendo analisados utilizando testes não paramétricos, utilizando coeficiente de Friedman aos quais estão marcados em negrito (Tabela 2).

Após o primeiro dia de inoculação os isolados que apresentaram maior crescimento micelial foram, SLV2 e SLVD1, em adverso os isolados que menos cresceram diferenciando estatisticamente dos demais foram, SLV20, SLV208, SLV 24, SLV8 (Tabela 2). No segundo dia os isolados que melhor apresentaram crescimento foram SLV2, SLV564, SLVD1, SYN9. Já os isolados que apresentaram menor atividade fisiológica, e menor crescimento foram, SLV20, SLV208, SLV22, SLV24, se diferenciando estatisticamente dos demais (Tabela 2).

Aos três dias após a inoculação os isolados que maior apresentaram crescimento micelial foram, SLV1 e SLVD1. Já os que tiveram menor crescimento, diferenciando estatisticamente dos demais foram os isolados SLV20 e SLV22 (Tabela 2). Ao quarto dia após a inoculação os isolados que apresentaram maior atividade fisiológica foram os isolados, SLV7 e SLVD1, nos diferentes tipos de estresses e temperaturas diferindo estatisticamente dos demais. Os isolados que apresentaram menor atividade fisiológica foram SLV20, SLV22, SLV24, SLV3 diferenciando estatisticamente dos demais (Tabela 2).

Os isolados que apresentaram maior atividade fisiológica, nos diferentes tipos de estresses e temperaturas no quinto dia, foram, SLV6 e SLVD1, diferindo estatisticamente dos demais. Já os isolados que na mesma condição apresentaram menor atividade fisiológica foram

isolados SLV20, SLV3, SYN10, SYN 8, diferindo estatisticamente dos demais (Tabela 2). Ao sexto dia os isolados que apresentaram maior atividade fisiológica foram os isolados SLV564, SLV6 e SLVD1. Já os isolados que apresentaram menor atividade fisiológica foram COMHARZ, SLV20, SLV210, SLV3, SLVARG, SYN10, SYN8 e SYN 9 (Tabela 2).

Aos sete dias após a inoculação os isolados que apresentaram maior atividade fisiológica nos diferentes tipos de estresses e temperatura foram SLVD1, SLV6, SLV2 e SLV1, diferindo estatisticamente dos demais, em adverso os isolados que apresentaram menor atividade fisiológica submetidos as mesmas condições de estresses e temperaturas, foram o isolado SLV10, SLV20, SLV21, SLV24, SLV3, SLV4, SLV5, SLV7, SLV8, SLVARG, SYN10 e SYN9, diferindo estatisticamente dos demais (Tabela 2).

Analisando o progresso e avaliando as médias dos diâmetros das colônias observou-se que, houve um destaque nos sete dias de avaliação para o isolado SLVD1 que apresentou a acréscimo de taxa de crescimento micelial (TCM) maior que os demais, demonstrando o maior diâmetro da colônia apresentando assim maior atividade fisiológica nas condições de estresses e temperaturas aplicadas e o isolado que denotou a menor atividade fisiológica nas condições submetidas de estresses e temperatura, foi o isolado SLV20 (Tabela 2). Isolados regionais são eficazes para reduzir podridões de *Phytophthora* sp. em pera causando inibição do crescimento micelial e micoparasitismo do fitopatógeno (SANCHEZ et al., 2019).

Nas curvas de progresso, os isolados foram posicionados em maior, intermediário e menor área abaixo da curva, foi observado que houve um grande avanço do isolado SLVD1 a partir do primeiro dia de crescimento onde se manteve liderando entre os outros dias até o ultimo dia de avaliação, considerando todas as combinações de estresses e temperaturas. O isolado SLV20 apresentou menor atividade fisiológica desde do primeiro dia reduzindo ao

longo dos dias devido aos estresses e temperaturas submetidos. Os demais isolados SLV7, SLV4 e SLV8 ao sexto dia apresentaram redução da atividade fisiológica, do seu crescimento quando comparado aos demais, havendo uma redução do seu progresso temporal (Figura 1).

A respeito do isolado SLVD1 que apresentou maior atividade fisiológica, corresponde aquele germoplasma microbiano de *Trichoderma* spp. que possui maior adaptabilidade podendo suportar em uma condição ambiental maiores condições de estresses promovidos por variações climáticas e condições químicas tanto na rizosfera quanto na filosfera da planta no momento que ele for utilizado como uma estratégia de controle biológico.

Os isolados selvagens apresentaram crescimento mais rápido se comparados com os isolados mutantes, muitos são os fatores que influenciam o crescimento e a sobrevivência de fungos do gênero *Trichoderma* e assim a sua eficiência no biocontrole.

Tabela 2. Progresso temporal do diâmetro da colônia (cm), área abaixo da curva de progresso do crescimento micelial (AACPCM) e taxa de crescimento micelial (TCM) de isolados de *Trichoderma* spp. em diferentes dias de avaliação*.

Isolados	D (cm)							AACPCM	TCM (mm dia ⁻¹)
	1 DAI	2 DAI	3 DAI	4 DAI	5 DAI	6 DAI	7 DAI		
COMHARZ	0,9 hi	1,9 gh	2,9 fg	3,2 ef	3,3 ij	4,3 gh	5,0 de	8,2 hi	0,4500 ij
SLV 1	0,8 ij	2,1 de	3,2 ab	3,6 bc	3,9 de	4,9 cd	5,4 a	11,2 bc	0,5200 de
SLV 10	0,7 lm	1,7 hi	2,4 k	3,0 hi	3,8 gh	4,6 ef	5,0 de	9,2 ef	0,5200 de
SLV 15	0,8 jk	2,0 fg	3,0 de	3,3 de	3,8 ef	4,9 bc	5,2 cd	9,9 de	0,5700 bc
SLV 2	1,5 ab	2,2 ab	3,1 bc	3,6 bc	3,8 gh	4,6 ef	5,3 ab	10,7 cd	0,4600 gh
SLV 20	0,6 no	1,4 lm	1,6 op	1,9 m	2,1 n	2,8 h	3,6 e	5,4 mn	0,2500 kl
SLV 208	0,3 o	1,2 m	2,4 k	3,1 gh	3,6 hi	4,6 ef	5,2 bc	1,8 mn	0,2100 l
SLV 21	0,9 gh	2,0 ef	2,9 gh	3,5 bc	4,0 bc	4,6 ef	5,0 de	11,3 ab	0,4400 jk
SLV 210	0,8 lm	2,0 cd	2,9 fg	3,1 hi	3,3 lm	4,4 gh	5,2 cd	1,1 n	0,1900 l
SLV 22	0,9 gh	1,4 lm	2,0 p	2,4 lm	3,5 jk	4,6 ef	5,0 de	9,8 ef	0,4700 fg
SLV 23	0,7 mn	1,5 kl	2,3 mn	2,9 jk	3,8 fg	4,7 de	5,2 cd	8,4 gh	0,5900 ab
SLV 24	0,4 no	1,3 lm	2,0 no	2,6 lm	3,4 kl	4,5 fg	5,0 de	6,9 jk	0,5400 cd
SLV 3	0,8 jk	1,6 kl	2,0 no	2,3 lm	2,7 mn	3,9 gh	5,0 de	6,5 lm	0,4900 fg
SLV 4	0,9 fg	1,8 gh	2,7 ij	3,2 ef	3,7 gh	4,6 ef	5,0 de	9,4 ef	0,4600 hi
SLV 5	0,8 kl	1,7 ij	2,5 jk	3,4 cd	3,9 ef	4,6 ef	5,0 de	9,6 ef	0,4700 fg
SLV 564	0,9 gh	2,2 ab	3,1 c	3,5 bc	4,0 bc	5,0 ab	5,2 cd	11,3 bc	0,5400 cd
SLV 6	0,9 ef	1,9 gh	2,8 gh	3,6 bc	4,3 ab	5,0 ab	5,6 ab	11,6 ab	0,6000 a
SLV 7	1,1 cd	2,1 ab	3,0 c	3,7 ab	4,0 cd	4,7 de	5,0 de	11,4 ab	0,4100 kl
SLV 8	0,6 no	1,6 jk	2,3 lm	3,0 kl	3,7 hi	4,6 ef	5,0 de	8,3 hi	0,5200 ef
SLV 9	0,7 lm	1,6 jk	2,4 kl	3,0 ij	3,6 ij	4,7 ef	5,3 ab	8,3 hi	0,5800 ab
SLVARG	0,9 hi	2,0 de	2,9 ef	3,0 ij	3,3 lm	4,3 gh	5,1 de	7,0 jk	0,5300 de
SLVD 1	2,3 a	4,6 a	5,1 a	5,4 a	5,4 a	5,4 a	5,5 a	22,4 a	0,3400 kl
SYN 10	1,2 bc	2,1 bc	3,0 cd	3,1 fg	3,3 mn	4,3 gh	5,0 de	7,7 ij	0,4600 gh
SYN 8	1,0 de	2,0 fg	2,8 hi	3,0 jk	3,1 mn	4,3 gh	5,2 bc	6,7 kl	0,5400 cd
SYN 9	1,2 bc	2,2 ab	3,1 bc	3,4 cd	3,4 kl	4,3 gh	5,0 de	8,8 fg	0,4000 kl
Shapiro-Wilk (Normalidade)	0,9807 ^{ns}	0,9531 ^{ns}	0,8952 ^{ns}	0,8437 ^{ns}	0,8772 ^{ns}	0,8354 ^{ns}	0,7179 ^{ns}	0,6713 ^{ns}	0,8580 ^{ns}
Bartlett (Homogeneidade)	91,71 ^{ns}	52,85 ^{ns}	37,36 ^{ns}	8,55 ^{ns}	4,45 ^{ns}	4,17 ^{ns}	2,52 ^{ns}	36,53 ^{ns}	64,658 ^{ns}
Valor F _{16,32} Coeficiente de Variação (%)	72,25 ^{**}	100,44 ^{**}	152,21 ^{**}	54,42 ^{**}	118,39 ^{**}	19,10 ^{**}	9,86 ^{**}	250,12 ^{**}	29,1566 ^{ns}
Valor de Friedman	46,7015^{**}	46,3355^{**}	47,4689^{**}	45,4826^{**}	46,3371^{**}	38,6237^{**}	35,4265^{**}	47,1459^{**}	44,8649^{ns}

*Médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem entre si ao teste de hipótese não paramétrico e teste de comparação de médias Tukey à 5 % de probabilidade.

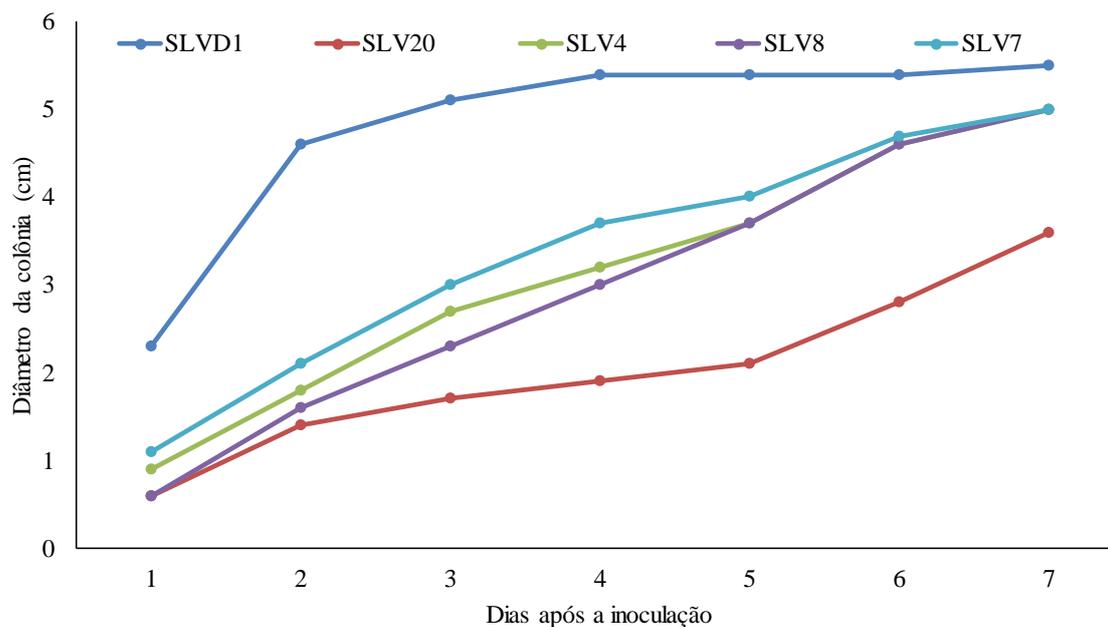


Figura 1. Curvas de progresso temporal do crescimento micelial de isolados de *Trichoderma* spp. selecionados por apresentarem maiores, intermediários e menores AACPCM.

Analisando os meios de cultivo, com os diferentes efeitos de estresses e temperaturas, as variáveis dependentes, diâmetro da colônia, analisadas no primeiro ao sétimo dia após a inoculação, da área abaixo da curva de progresso e taxa de crescimento micelial, não apresentaram distribuição normal, sendo analisados utilizando testes não paramétricos, utilizando coeficiente de Fridman aos quais estão marcados em negrito (Tabela 3).

Após o primeiro dia de inoculação o meio que apresentou melhor crescimento micelial foi o BDA (controle), se diferenciando estatisticamente dos demais, o segundo meio que apresentou melhor crescimento micelial submetido a variações de temperaturas, foi o meio BDA com sorbitol, e o meio que mais inibiu o crescimento micelial foi o meio BDA com NaCl se diferenciando estatisticamente (Tabela 3). No segundo, terceiro e quarto dia de avaliação foram observados os mesmos resultados se comparado ao primeiro dia (Tabela 3).

No quinto dia de avaliação após a inoculação o meio BDA (controle), BDA com sorbitol e BDA com NaCl, não se diferenciaram estatisticamente apresentando mesmo padrão de crescimento micelial (Tabela 3). Ao sexto dia de avaliação o meio que melhor apresentou crescimento micelial foi o BDA com sorbitol, submetido a variações de temperaturas, o segundo meio que apresentou melhor atividade fisiológica foi o meio BDA com NaCl seguido do meio BDA controle, se diferenciando estatisticamente entre si (Tabela 3).

Ao sétimo e último dia de avaliação após a inoculação o meio BDA (controle), BDA com sorbitol e BDA com NaCl, não se diferenciaram estatisticamente apresentando mesmo padrão de atividade fisiológica (Tabela 3). Analisando o progresso e avaliando as médias dos diâmetros das colônias observou-se que, houve um destaque nos sete dias de avaliação para os meios de estresses submetidos a diferentes temperaturas onde BDA com sorbitol e BDA com NaCl que apresentaram melhor atividade fisiológica se comparada com BDA (controle). No primeiro dia de avaliação ao quarto dia o meio BDA (controle) se manteve com maior atividade fisiológica (Tabela 3).

Nas curvas de progresso, os meios foram posicionados em maior, intermediário e menor área abaixo da curva, foi observado que houve pouca diferenciação entre os diferentes meios submetidos. O meio BDA controle mostrou maior atividade fisiológica até o quarto dia de avaliação se diferenciando dos demais. O meio BDA com sorbitol ficou segundo classificação de melhor atividade fisiológica até o quarto dia e no sexto dia apresentou melhor atividade fisiológica. Já o meio BDA com NaCl apresentou menor atividade fisiológica até o quarto dia. No quinto e sexto dia de avaliação os meios não se diferenciaram entre si (Figura 2).

Atualmente 33% dos solos agricultáveis já sofrem degradação, segundo relatório da FAO e ITPS (2015) uma das principais causas é a salinização, tornando-se um problema significativo em todo mundo, o mesmo relatório expõe a grave situação de degradação dos solos agricultáveis do mundo, fazendo um alerta a comunidade mundial, altos níveis de sal eventualmente tornam os solos inadequados para o crescimento das plantas, limitando a produção.

As estirpes de *Trichoderma* são capazes de aumentar a tolerância das plantas a estresses bióticos e abióticos, como seca e salinidade trabalhos como o de (AHMAD et al., 2015; MASTOURI et al., 2012; SHORESH et al., 2010) elucidam esse processo, mostrando que a maior resistência das plantas com aplicação de *Trichoderma* havendo aumento do crescimento radicular, da absorção nutricional e da proteção contra danos oxidativos. O poliálcool sorbitol é uma molécula mais simples com metade dos carbonos e sem os radicais hidroxila, no trabalho de Goes (2017), meio conteúdo sorbitol impactou positivamente a fisiologia e esporulação de isolados de *Colletotrichum* spp.

Tabela 3. Progresso temporal do diâmetro da colônia (D, cm), área abaixo da curva de progresso do crescimento micelial (AACPCM) e taxa de crescimento micelial (TCM, cm dia⁻¹) de isolados de *Trichoderma* spp. em diferentes tipos de estresses*.

Tipos de estresses	D (cm)							AACPCM	TCM (mm dia ⁻¹)
	1 DAI	2 DAI	3 DAI	4 DAI	5 DAI	6 DAI	7 DAI		
BDA (controle)	1,0 a	2,1 a	2,9 a	3,3 a	3,6 a	4,5 c	5,1 a	19,45 a	0,6352 c
BDA com Sorbitol	1,0 b	2,0 b	2,8 b	3,3 b	3,7 a	4,7 a	5,1 a	19,45 a	0,6583 b
BDA com NaCl	0,7 c	1,7 c	2,5 c	3,1 c	3,6 a	4,6 b	5,1 a	18,40 a	0,7161 a
Shapiro-Wilk (Normalidade)	0,9109 ^{ns}	0,9026 ^{ns}	0,8362 ^{ns}	0,7845 ^{ns}	0,8087 ^{ns}	0,7984 ^{ns}	0,6991 ^{ns}	0,8109 ^{ns}	0,8115 ^{ns}
Bartlett (Homogeneidade)	9,95 ^{ns}	8,43 ^{ns}	3,69 ^{ns}	1,11 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,16 ^{ns}	1,5963 ^{**}	1,8482 ^{ns}
Valor F _{16,32} Coeficiente de Variação (%)	24,89 ^{**}	382,52 ^{**}	52,15 ^{**}	142,75 ^{**}	1,53 ^{**}	1,73 ^{**}	0,14 ^{**}	1,9322 ^{**}	24,1765 [*]
Valor de Friedman	4,0000^{**}	4,0000^{**}	4,0000^{**}	4,0000^{**}	3,0000^{ns}	4,0000^{**}	1,0000^{ns}	4,0000^{ns}	4,0000^{**}

*Médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem entre si ao teste de hipótese não paramétrico e teste de comparação de médias Tukey à 5 % de probabilidade.

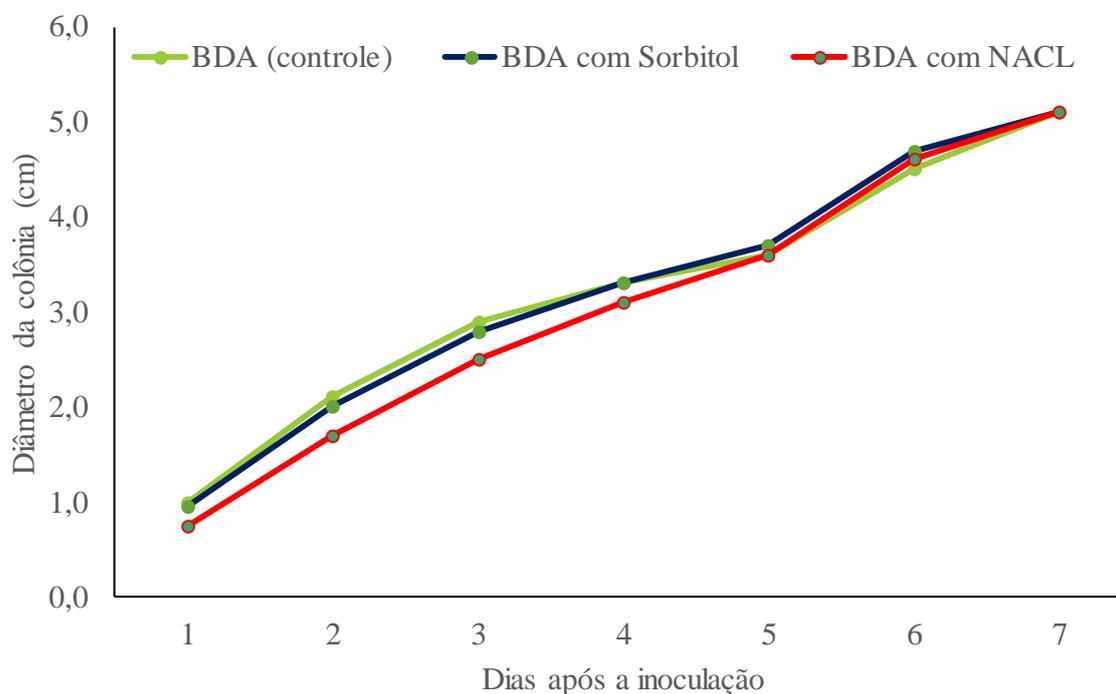


Figura 2. Curva de progresso temporal do diâmetro da colônia (cm) dos isolados de *Trichoderma* spp. submetidos a diferentes estresses.

Considerando as diferentes temperaturas, os isolados e efeitos de, as variáveis dependentes, diâmetro da colônia, analisadas no primeiro ao sétimo dia após a inoculação, da área abaixo da curva de progresso e taxa de crescimento micelial, apresentaram distribuição normal, sendo analisados utilizando testes não paramétricos, utilizando coeficiente de Friedman aos quais estão marcados em negrito (Tabela 4).

Após o primeiro dia de inoculação os isolados que apresentaram maior crescimento micelial foram, SLV2 e SLVD1, em adverso os isolados que menos cresceram diferenciando estatisticamente dos demais foram, SLV20, SLV208, SLV 24, SLV8 (Tabela 4). No segundo dia os isolados que melhor apresentaram crescimento foram SLV2, SLV564, SLVD1, SYN9.

Já os isolados que apresentaram menor atividade fisiológica, e menor crescimento foram, SLV20, SLV208, SLV22, SLV24, se diferenciando estatisticamente dos demais (Tabela 4).

A melhor temperatura de crescimento foi a de 20° C, isolados nessa temperatura já demonstravam em 72 hs crescimento completo no meio. A temperatura de 27°C demonstrou estatisticamente a segunda melhor temperatura para crescimento micelial dos isolados, já a temperatura de 10° C apresentou inaptidão para crescimento, mesmo alguns isolados apresentando emissão de hifas, não foram suficientes para o crescimento completo no meio (Figura 3).

Efeitos contrários foram observados no trabalho de Bomfim et al. (2010), onde a temperatura de 20°C fez com que os isolados não completassem o crescimento na placa. No trabalho de Jaill et al. (2006) constata que temperaturas ideais de crescimento de *Trichoderma* spp. consideradas temperaturas ótimas foram 25 a 28°C, e verificaram que nas temperaturas de 10 a 17°C os isolados não apresentaram um crescimento micelial satisfatório.

No presente estudo, verificou-se também uma inibição no crescimento micelial de todos os isolados nas temperaturas de 10 °C. Segundo esses pesquisadores, a temperatura pode ser considerada como um ponto crítico no biocontrole de fitopatógenos, já que eles observaram, em ensaios in vitro, que em temperaturas ideais de crescimento do patógeno houve um efeito inverso onde o patógeno cresceu sobre o antagonista.

Tabela 4. Progresso temporal do diâmetro da colônia (cm) de isolados de *Trichoderma* spp. em diferentes tipos de temperaturas de incubação*.

Temperaturas	D (cm)							AACPCM	TCM (mm dia ⁻¹)
	1 DAI	2 DAI	3 DAI	4 DAI	5 DAI	6 DAI	7 DAI		
20 °C	1,5 a	4,0 a	6,2 a	7,5 a	7,8 a	7,9 a	8,0 a	38,4 a	1,0270 a
27 °C	1,1 b	1,7 b	1,9 b	2,0 b	3,0 b	5,6 b	7,1 b	18,5 b	0,9639 b
10 °C	0,0 c	0,1 c	0,1 c	0,4 c	0,0185 c				
Shapiro-Wilk (Normalidade)	0,8741 ^{ns}	0,8159 ^{ns}	0,8093 ^{ns}	0,7073 ^{ns}	0,7406 ^{ns}	0,8125 ^{ns}	0,7314 ^{ns}	0,8189 ^{ns}	0,9390 ^{ns}
Bartlett (Homogeneidade)	599,37 ^{ns}	603,17 ^{ns}	617,53 ^{ns}	567,21 ^{ns}	427,34 ^{ns}	381,52 ^{ns}	294,12 ^{ns}	451,78 ^{ns}	313,94 ^{ns}
Valor F _{16,32}	6,45**	0,0007**	7,88**	3,44**	7,83**	5,07**	0,0001**	1,0120 ^{ns}	8,6555**
Coefficiente de Variação (%)	67,38	53,13	43,50	33,62	27,47	19,65	13,72	72,00	40,61
Valor de Friedman	4,0000**								

*Médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem entre si ao teste de hipótese não paramétrico e teste de comparação de médias Tukey à 5 % de probabilidade

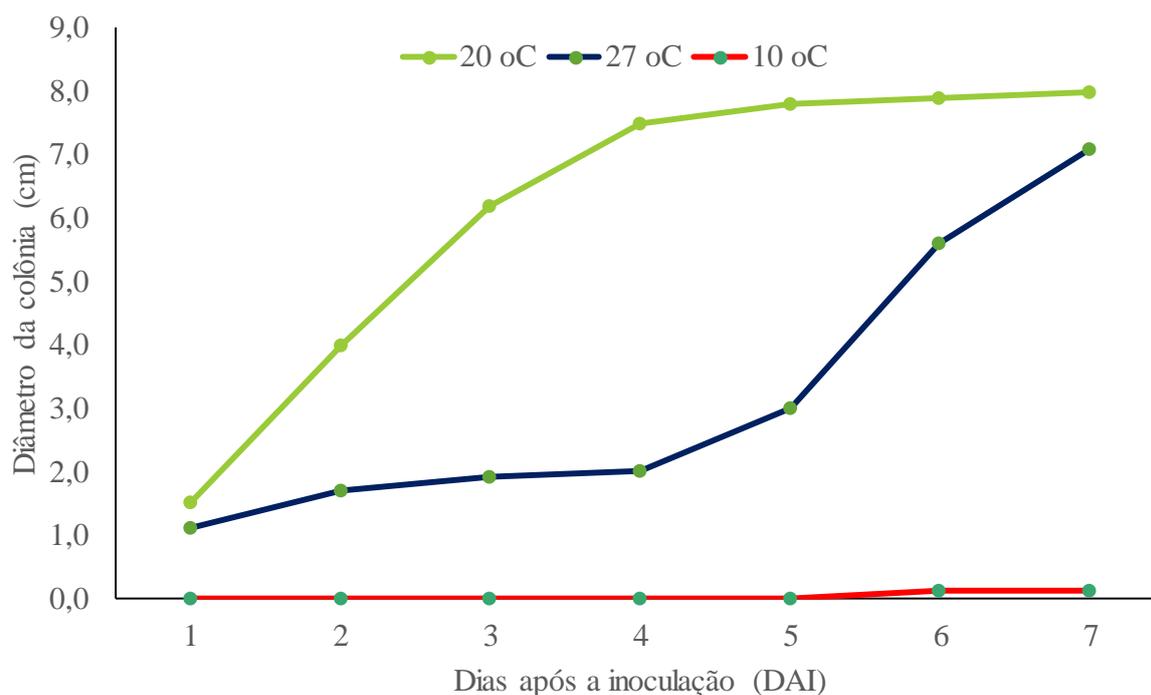


Figura 3. Curva de progresso temporal dos isolados de *Trichoderma* spp. submetidos a diferentes temperaturas de incubação.

Efeito da morfometria (μm) do fator isolado, tipos de estresses e tipos de temperaturas de incubação.

Considerando os efeitos dos isolados, estresses e temperaturas, a variável dependente, diâmetro do conídio (μm), analisadas no sétimo dia após a inoculação, rejeitou-se hipótese de nulidade havendo diferença significativa ao teste Skott-Knott a 5% de probabilidade (Tabela 5, 6 e 7).

Após a análise das dimensões dos conídios submetidos a estresses e temperaturas diferentes, avaliados depois de sete dias de inoculação, os isolados que apresentaram maiores dimensões de conídios foram, SLV8, SLV10 e SLV5, em adverso os isolados que apresentaram menor medias de dimensões de conídios foi os isolados SLVARG e SLV3 se diferenciando estatisticamente entre si (Tabela 5).

Tabela 5. Médias do comprimento (C) dos conídios dos isolados de *Trichoderma* spp.*.

Isolados	C do conídio (µm)
SLV8	2,93 a
SLV10	2,9 a
SLV5	2,9 a
SLV6	2,83 b
SLV1	2,8 b
SLV4	2,8 b
SLV9	2,71 c
SLV23	2,7 c
SLV24	2,7 c
SLV7	2,7 c
COMHARZ	2,63 d
SLV2	2,58 e
SLV21	2,56 e
SLV22	2,5 f
SLV15	2,47 f
SLVD1	2,46 f
SYN10	2,39 g
SLV208	2,25 h
SLV564	2,12 i
SYN9	2,09 i
SYN8	1,74 j
SLV20	1,38 k
SLV210	1,11 l
SLVARG	0,66 m
SLV3	0 n
Skott-Knott (Paramétrico)	2376 ^{ns}
Valor F _{16,32}	1540,29**

*Médias seguidas de mesma letra na vertical diferem entre si ao teste de médias Skott-Knott à 5 % de probabilidade.

Após a análise das dimensões dos conídios submetidos a estresses e temperaturas diferentes, avaliados depois de sete dias de inoculação, o meio que apresentou maiores dimensões de conídios foi o BDA (controle), o segundo meio que apresentou maior dimensões de conídios foi o meio BDA com sorbitol, e o meio que apresentou menor tamanho dos isolados foi o BDA com NaCl diferenciando estatisticamente dos demais (Tabela 6).

Tabela 6. Médias do comprimento (C) dos conídios dos diferentes tipos de estresses*.

Meios	C do conídio (μm)
BDA (controle)	2,45 a
BDA com sorbitol	2,41 b
BDA com NaCl	2,14 c
Skott-Knott (Paramétrico)	198 ^{ns}
Valor $F_{16,32}$	538,74**

*Médias seguidas de mesma letra na vertical diferem entre si ao teste de médias Skott-Knott à 5 % de probabilidade.

Após a análise das dimensões dos conídios submetidos a estresses e temperaturas diferentes, avaliados depois de sete dias de inoculação, a temperatura que apresentou maiores dimensões de conídios foi a de 27°C, se diferenciando estatisticamente, da temperatura de 20°C que apresentou menores dimensões de conídios (Tabela 7). Já na temperatura de 10°C não houve crescimento de conídios impossibilitando assim, a mensuração das dimensões de conídios submetidos nessa temperatura.

Tabela 7. Médias do comprimento (C) dos conídios dos diferentes tipos de temperaturas*.

Temperaturas	C do conídio (μm)
27	2,39 a
20	2,15 b
Skott-Knott (Paramétrico)	99 ^{ns}
Valor $F_{16,32}$	1060,53**

*Médias seguidas de mesma letra na vertical diferem entre si ao teste de médias Skott-Knott à 5 % de probabilidade.

As variáveis que mais explicaram as diferenças entre os isolados foram AACPCM, diâmetros das colônias aos 1, 2, 4, 5, 7 e 6 dias após a inoculação. O isolado 22 apresentou maior atividade fisiológica nas condições empregadas de estresse e temperatura no experimento, ao contrário dos isolados 13, 6, 12 e 10, que mais sofreram com os estresses (Figura 4A). Quando um isolado apresenta adaptação as condições de estresses submetidas, isso tem um significado in vitro com desdobramento para o campo, pois as variações químicas

e ambientais do campo, sobre o isolado terão baixa relevância nas interações de controle biológico e/ou antagonismo promovido pelos isolados de *Trichoderma* spp. avaliados.

Ao analisarmos o ensaio e os três fatores simultaneamente, o meio batata-dextrose-ágar contendo sorbitol favoreceu o crescimento dos isolados de *Trichoderma* spp, ao contrário, do estresse promovido por NaCl que inibiu o crescimento de todos os isolados (Figura 4B). Através da mesma estratégia de análise de componentes principais Sanchez et al. (2019) os microrganismos produzem respostas as condições do ambiente representado pela temperatura e pH, nos substratos, e pela diversidade apresentar indivíduos de uma população sensível ou insensível, cumprindo assim sua função antagonística.

As temperaturas que nas faixas de 25-35 °C favorecem o metabolismo de muitos organismos incluindo macro e microrganismos independente da relação com o hospedeiro (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Nesse experimento, todos os isolados de *Trichoderma* spp. submetidos a diferentes condições de estresses apresentaram maior atividade fisiológica nas temperatura de 20 e 27 °C, sendo que a temperatura baixa inibe o crescimento e desenvolvimento micelial de todos os isolados (Figura 4C). Algumas condições antropogênicas da agricultura podem influenciar a indução de estresse oxidativo e resposta antioxidante sobre *Trichoderma* spp. potencializado por variações de temperaturas, que pode ser utilizado como degradador de cloroacetanilidas (herbicida), e essa exposição ao alacloro e ao metolacloro, provocou alteração na integridade da membrana de *Trichoderma* spp. (Nykiel-Szymańska et al., 2019).

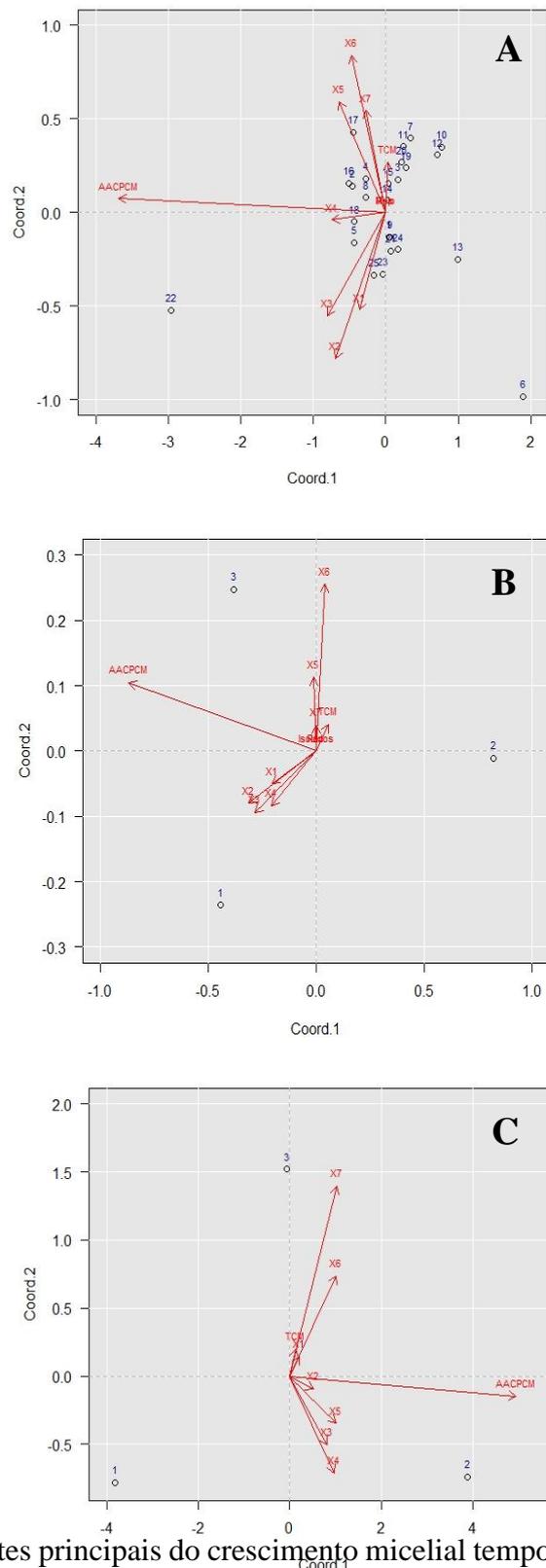


Figura 4. Componentes principais do crescimento micelial temporal (7 dias de avaliação), área abaixo da curva de progresso do crescimento micelial (AACPCM) e taxa de crescimento micelial (TCM). A. efeito dos isolados de *Trichoderma* spp., B. efeito dos tipos de estresses (meios de cultivo), C. efeito das temperaturas de incubação.

Através da análise de correlações canônicas as variáveis que mais explicaram as diferenças entre os isolados foram taxa de crescimento micelial (TCM), área abaixo da curva de progresso do crescimento micelial (AACPCM), o diâmetro da colônia aos 3^o, 4^o. e 5^o dias de incubação, permitindo o agrupamento dos isolados próximo ao eixo (comportamentos fisiológicos similares) havendo divergência para os isolados SLV22 e SLVD1, sendo o último isolado aquele que apresentou maior atividade fisiológica nas variações de temperatura e tipos de estresses submetidos no meio de cultivo (Fig. 5A).

As variáveis que mais influenciaram o comportamento do tipo de estresse foram taxa de crescimento micelial (TCM), área abaixo da curva de progresso do crescimento micelial (AACPCM), o diâmetro da colônia aos 3^o e 6^o dias de incubação, apresentando comportamento similares o meio sem agente causador de estresse e o meio contendo sorbitol, divergindo do meio contendo NaCl, que apresentou maior TCL (Figura 5B). A tolerância salina já foi detectada para *Trichoderma asperellum*, com características de promoção de crescimento de plantas, aumentando o teor de clorofila e reduziu o estresse oxidativo da planta hospedeira (capim Sudão) (ANAM et al., 2019).

Todas as variáveis estudadas influenciaram na diferenciação dos tipos de temperaturas, sendo a temperatura de 20 oC a temperatura que mais influenciou na atividade de crescimento micelial dos isolados de *Trichoderma*, seguido da temperatura de 27 oC, e por fim a temperatura de 10 oC que atuou de maneira a dificultar o metabolismo de crescimento (Figura 5C).

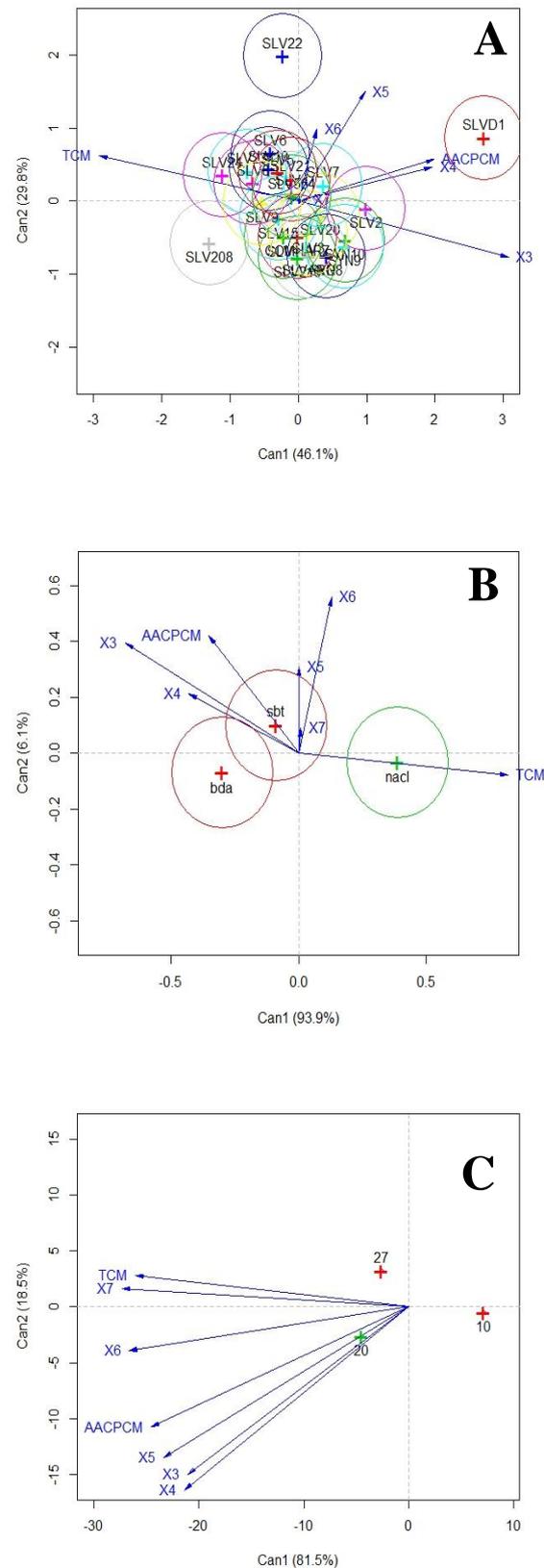


Figura 5. Correlações canônicas do crescimento micelial temporal (cm, 7 dias de avaliação), área abaixo da curva de progresso do crescimento micelial (AACPCM) e taxa de crescimento micelial (TCM). A. efeito dos isolados de *Trichoderma* spp., B. efeito dos tipos de estresses (meios de cultivo), C. efeito das temperaturas de incubação.

A fenotipagem de caracterização dos isolados utilizando marcadores fisiológicos permitiu a separação pelo método de agrupamento em três grandes grupos representados pelo primeiro formado pelo isolado SLVD1 (isolado oriundo de derme de cão). Segundo grupo formado por 14 isolados representados por SLV 6, SLV 23, SLV 9, SLV 208, SLV 4, SLV 10, SLV 15, SLV 2, SLV 22, SLV 1, SLV 564, SLV 7, SLV 21 e SLV 5, todos isolados selvagem. No terceiro grupo composto de 10 isolados incluindo isolados transformados, isolado comercial, oriundo da Argentina e alguns selvagens representados por SYN 9, COMHARZ, SLVARG, SYN 10, SLV24, SLV24, SLV 28, SLV 20, SLV 3 e SYN 8 (Figura 6A).

O comportamento do crescimento dos isolados foi similar nos estresses contendo NaCl e sorbitol, diferenciando como esperado do crescimento em meio de cultivo batata-dextrose-ágar sem adição de estresse salino ou carboidrato (Figura 6B).

As temperaturas que menos influenciara o crescimento dos isolados de *Trichoderma* foram 10 e 27 °C, pela análise de agrupamento, assim como foi observado na Figura 5C, sendo a temperatura que melhor favoreceu o crescimento micelial foi a temperatura de 20 °C (Figura 6C).

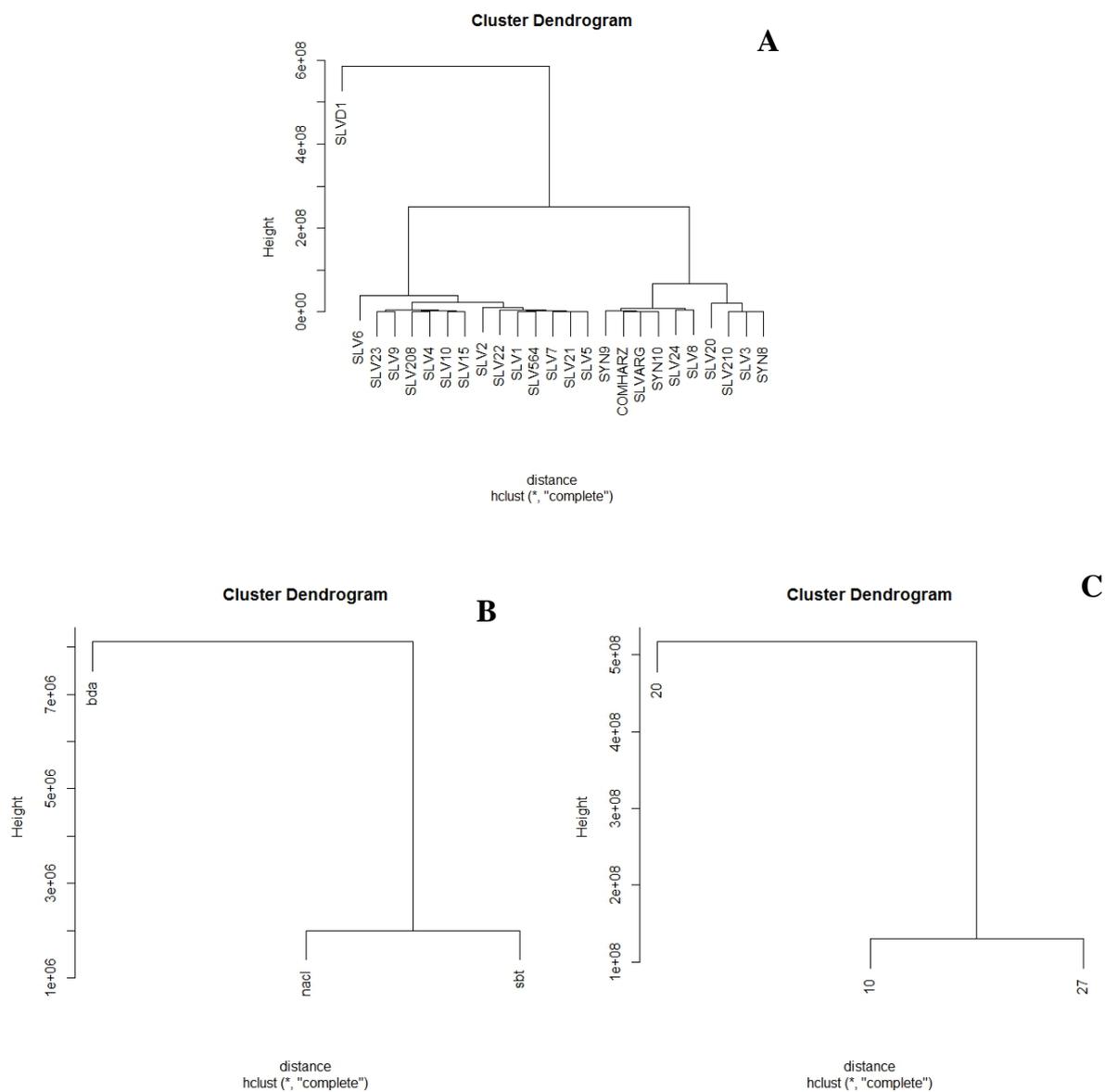


Figura 6. Agrupamento utilizando medida de similaridade de Malahanobis utilizando as variáveis crescimento micelial temporal (cm, 7 dias de avaliação), área abaixo da curva de progresso do crescimento micelial (AACPCM) e taxa de crescimento micelial (TCM). A. efeito dos isolados de *Trichoderma* spp., B. efeito dos tipos de estresses (meios de cultivo), C. efeito das temperaturas de incubação.

Efeito da interação entre dois fatores: isolados e estresse

Na análise dois a dois entre os fatores foi observada diferenças significativas entre ambos, tal como, houve diferença significativa entre os contrastes dos três fatores analisados no experimento (Tabela 8).

Tabela 8. Análise de variância das interações entre os fatores analisados.

Ord.	Interação entre fatores	Valor F
1	Efeito do Isolados * efeito da temperatura	$F_{48,225} = 116,6915^{**}$
2	Efeito dos isolados * efeito do estresse	$F_{48,225} = 15,7662^{**}$
3	Efeito da temperatura * efeito do estresse	$F_{96,225} = 11,6940^{**}$
4	Efeito dos Isolados * efeito da temperatura * efeito do estresse	$F_{4,225} = 157,4119^{**}$
	Coeficiente de variação (%)	7,41

Ao analisar as médias da área abaixo da curva de progresso do crescimento micelial (AACPCM) pelo teste F a interação dos isolados com o meio não apresentou diferença significativa, ou seja, não rejeitou a hipótese de nulidade ($F_{48,449} = 0,0424^{ns}$).

Ao analisar as médias da taxa de crescimento micelial (TCM) pelo teste F a interação dos isolados com o meio não apresentou diferença significativa, ou seja, não rejeitou a hipótese de nulidade ($F_{48,449} = 0,0575^{ns}$).

Efeito da interação entre dois fatores: isolados e temperatura

Na interação dos isolados com a temperatura de 10 °C não houve diferença significativa, entre a área abaixo da curva de progresso do crescimento micelial (AACPCM) e a taxa de crescimento micelial (TCM) a partir da análise não paramétrica (Tabela 9).

Ao analisar a interação dos tipos de isolados com a temperatura de 20 °C, foi observado que os isolados que mais cresceram, foram a combinação SLVD1, SLVARG e SLV210, já o isolado que menos proporcionou o crescimento diante da área abaixo da curva de progresso do crescimento micelial (AACPCM) foi o SLV9 e analisando a taxa de crescimento micelial (TCM), os isolados que tiveram maiores taxas temporal de crescimento foram SLV 208 e SLV22 e o isolado que apresentou menor crescimento temporal durante os sete dias de avaliação foi o isolado SLVD1 (Tabela 10).

Na interação dos isolados com a temperatura de 27 °C, foi observado que SLVD 1 mais apresentou crescimento micelial, já os isolados que proporcionou menor crescimento diante da área abaixo da curva de progresso do crescimento micelial (AACPCM) foram o SLV 20 e SLV 3 e analisando a taxa de crescimento micelial (TCM), os isolados que tiveram maior taxa temporal de crescimento foi SLV23 e SLV6 e o isolado que apresentou menor crescimento temporal durante os sete dias de avaliação foram os isolados SLVD 1 e SLV 20 (Tabela 11).

Considerando que a melhor temperatura de crescimento micelial para os isolados de *Trichoderma* sp. foi de 20 °C (Figura 5C), a análise de contraste dois a dois permite a identificação de efeitos diferenciais de isolados que nas temperaturas de 10 e 27 °C possam expressar potencial de atividade antagonismo, parasitismo, competição, indução de resistência (MEDEIROS et al., 2018) e promoção de crescimento (Tabelas 9, 10 e 11).

Tabela 9. Contrastes das medianas e médias das áreas abaixo da curva de progresso da crescimento micelial (AACPCM) e taxa de crescimento micelial (TCM) da interação dos isolados com a temperaturas de 10 °C* (Continuação)

Isolados	Temperatura	AACPCM	TCM (cm dia ⁻¹)
COMHARZ	10 °C	0,0 (0,0) a	0,0000 (0,0000) a
SLV1	10 °C	0,0 (0,2) a	0,0000 (0,0018) a
SLV10	10 °C	0,1 (0,3) a	0,0100 (0,0089) a
SLV15	10 °C	0,0 (0,0) a	0,0000 (0,0000) a
SLV2	10 °C	0,6 (2,0) a	0,0390 (0,0363) a
SLV20	10 °C	0,0 (0,0) a	0,0000 (0,0000) a
SLV208	10 °C	0,9 (2,2) a	0,1620 (0,1649) a
SLV21	10 °C	0,2 (0,1) a	0,0140 (0,0149) a
SLV210	10 °C	0,3 (0,1) a	0,0530 (0,0583) a
SLV22	10 °C	0,0 (0,0) a	0,0000 (0,0000) a
SLV23	10 °C	0,0 (0,0) a	0,0000 (0,0048) a
SLV24	10 °C	0,0 (0,0) a	0,0000 (0,0000) a
SLV3	10 °C	0,0 (0,0) a	0,0000 (0,0000) a
SLV4	10 °C	0,0 (0,0) a	0,0000 (0,0000) a
SLV5	10 °C	0,0 (0,0) a	0,0000 (0,0000) a
SLV564	10 °C	0,0 (0,1) a	0,0000 (0,0060) a
SLV6	10 °C	0,0 (0,0) a	0,0000 (0,0000) a
SLV7	10 °C	0,0 (0,0) a	0,0000 (0,0000) a
SLV8	10 °C	0,0 (0,0) a	0,0000 (0,0000) a
SLV9	10 °C	0,0 (0,0) a	0,0000 (0,0000) a
SLVARG	10 °C	0,0 (0,0) a	0,0000 (0,0000) a
SLVD1	10 °C	0,4 (1,0) a	0,0710 (0,0595) a
SYN10	10 °C	0,3 (0,0) a	0,0500 (0,0351) a
SYN8	10 °C	0,0 (1,0) a	0,0250 (0,0238) a
SYN9	10 °C	0,4 (1,0) a	0,0250 (0,0488) a
F _{48,449}		15,2222 ^{ns}	7,1000 ^{ns}
CV		13,14	16,87

*Medianas seguidas de mesma letra na vertical diferem entre si ao teste não paramétrico LSD à 5 % de probabilidade.

Tabela 10. Contrastes das medianas e médias das áreas abaixo da curva de progresso da crescimento micelial (AACPCM) e taxa de crescimento micelial (TCM) da interação dos isolados com a temperaturas de 20 °C*.

Isolados	Temperatura	AACPCM	TCM (cm dia ⁻¹)
COMHARZ	20 °C	40,3 (40,3) ef	1,0260 (1,0298) gh
SLV1	20 °C	39,3 (40,0) ef	1,0350 (1,0857) ef
SLV10	20 °C	39,3 (37,0) gh	1,0580 (1,1041) de
SLV15	20 °C	40,3 (40,4) de	1,0120 (1,0142) gh
SLV2	20 °C	41,3 (40,8) de	0,9140 (0,9053) ij
SLV20	20 °C	22,0 (25,2) gh	0,8640 (0,8208) j
SLV208	20 °C	37,0 (36,1) h	1,2830 (1,2857) a
SLV21	20 °C	38,0 (37,6) gh	1,1260 (1,1446) cd
SLV210	20 °C	43,5 (42,2) ab	0,7980 (0,8780) ij
SLV22	20 °C	29,2 (29,2) j	1,2960 (1,2982) a
SLV23	20 °C	38,6 (37,9) gh	1,1000 (1,1160) de
SLV24	20 °C	34,4 (35,7) hi	1,2960 (1,2404) ab
SLV3	20 °C	33,6 (33,1) i	0,9620 (0,9684) hi
SLV4	20 °C	38,3 (38,2) gh	1,1250 (1,1101) de
SLV5	20 °C	38,7 (37,6) gh	1,1300 (1,1565) cd
SLV564	20 °C	40,4 (40,2) ef	1,0280 (1,0130) gh
SLV6	20 °C	39,0 (31,0) fg	1,078 (1,0220) fg
SLV7	20 °C	39,5 (39,2) fg	1,0910 (1,0702) gh
SLV8	20 °C	38,5 (37,2) gh	1,1420 (1,1791) cd
SLV9	20 °C	38,9 (38,2) k	1,0870 (1,1119) de
SLVARG	20 °C	43,0 (42,4) ab	0,8260 (0,8506) ij
SLVD1	20 °C	45,2 (45,1) a	0,5800 (0,5880) k
SYN10	20 °C	42,5 (42,2) b	0,8230 (0,8351) j
SYN8	20 °C	41,8 (41,9) bc	0,8120 (0,8500) ij
SYN9	20 °C	40,8 (41,2) cd	0,9780 (0,9476) ij
F _{48,449}		15,2222**	7,1000**
CV		13,14	16,87

* Medianas seguidas de mesma letra na vertical diferem entre si ao teste não paramétrico LSD à 5 % de probabilidade.

Tabela 11. Contrastes das medianas e médias das áreas abaixo da curva de progresso da crescimento micelial (AACPCM) e taxa de crescimento micelial (TCM) da interação dos isolados com a temperaturas de 27 °C*.

Isolados	Temperatura	AACPCM	TCM (cm dia ⁻¹)
COMHARZ	27 °C	15,7 (16,5) ij	0,9607 (0,8988) ij
SLV1	27 °C	21,8 (22,2) cd	1,0017 (1,0482) gh
SLV10	27 °C	19,0 (18,1) gh	1,0375 (1,0291) gh
SLV15	27 °C	18,7 (19,9) ef	1,1160 (1,1392) cd
SLV2	27 °C	19,3 (19,3) gh	0,9250 (0,8738) ij
SLV20	27 °C	<u>11,6 (10,8) l</u>	<u>0,5125 (0,4982) m</u>
SLV208	27 °C	15,1 (15,2) jk	0,9696 (0,9798) hi
SLV21	27 °C	20,2 (21,9) de	0,9321 (0,8714) jk
SLV210	27 °C	13,1 (13,8) jk	1,0607 (0,0619) fg
SLV22	27 °C	20,0 (19,6) fg	1,0285 (0,9363) ij
SLV23	27 °C	16,5 (16,7) hi	1,2089 (1,1851) ab
SLV24	27 °C	13,4 (13,8) jk	1,1339 (1,0773) de
SLV3	27 °C	<u>13,2 (13,1) kl</u>	0,9464 (0,9726) hi
SLV4	27 °C	18,7 (18,9) gh	0,9178 (0,9250) ij
SLV5	27 °C	20,8 (19,30) gh	0,9553 (0,9482) hi
SLV564	27 °C	23,0 (22,6) bc	1,1750 (1,0738) ef
SLV6	27 °C	23,3 (22,3) b	1,1964 (1,2053) a
SLV7	27 °C	22,7 (22,8) b	0,8517 (0,8167) jk
SLV8	27 °C	16,8 (16,5) ij	0,9589 (1,0392) gh
SLV9	27 °C	17,2 (16,7) hi	1,2142 (1,1625) bc
SLVARG	27 °C	13,2 (14,1) jk	1,0464 (1,0601) fg
SLVD1	27 °C	44,0 (44,3) a	<u>0,5821 (0,6226) lm</u>
SYN10	27 °C	16,4 (15,0) jk	0,9178 (0,8840) ij
SYN8	27 °C	<u>13,6 (12,4) kl</u>	1,0678 (1,0452) gh
SYN9	27 °C	17,3 (16,8) hi	0,7553 (0,7440) kl
F _{48,449}		15,2222**	7,1000**
CV		13,14	16,87

* Medianas seguidas de mesma letra na vertical diferem entre si ao teste não paramétrico LSD à 5 % de probabilidade.

Efeito da interação entre dois fatores: temperaturas e estresses

Ao analisar as médias da área abaixo da curva de progresso do crescimento micelial (AACPCM) pelo teste F a interação das temperaturas com os estresses foi observado diferença significativa entre as médias, ou seja, rejeitou-se a hipótese de nulidade ($F_{4,449} = 5,5600^{**}$).

Ao analisar as médias da taxa de crescimento micelial (TCM) pelo teste F a interação das temperaturas com os estresses foi observado diferença significativa entre as médias, ou seja, rejeitou-se a hipótese de nulidade ($F_{4,449} = 4,0900^{**}$)(Tabela 12).

A interação na temperatura de 10 °C com os diferentes estresses empregados, não houve diferença significativa entre a AACPCM e TCM.

A interação na temperatura de 20 °C com os diferentes estresses empregados, foi observado maior média de AACPCM na interação BDA controle (sem estresse), diferenciando estatisticamente da interação BDA contendo sorbitol que mais inibiu o crescimento dos isolados de *Trichoderma* (Tabela 14). Ao contrário dos resultados apresentados de AACPCM, foi observado maior média de TCM na interação BDA contendo NaCl, diferenciando estatisticamente dos demais que apresentaram TCL temporal dos isolados de *Trichoderma* (Tabela 12).

Ao analisar a interação na temperatura de 27 °C com os diferentes estresses empregados, não houve diferença significativa entre a AACPCM. Ao contrário dos resultados apresentados de AACPCM, foi observado maior média de TCM na interação BDA contendo NaCl, diferenciando estatisticamente dos demais tratamentos que apresentaram estatisticamente as menores TCL temporais dos isolados de *Trichoderma* (Tabela 12).

Tabela 12. Médias da abaixo da curva de progresso do crescimento micelial (AACPCM) e taxa de crescimento micelial (TCM) da interação das temperaturas e estresses aplicados no experimento*.

Tipos de estresses	Temperaturas	AACPCM	TCM (mm dia⁻¹)
BDA (controle)	10 °C	0,1 a	0,0261 a
BDA com Sorbitol	10 °C	0,1 a	0,0072 a
BDA com NaCl	10 °C	0,5 a	0,0222 a
BDA (controle)	20 °C	40,6 a	0,9537 b
BDA com Sorbitol	20 °C	36,2 c	1,0181 b
BDA com NaCl	20 °C	38,4 b	1,1092 a
BDA (controle)	27 °C	17,2 a	0,9256 b
BDA com Sorbitol	27 °C	18,9 a	0,9345 b
BDA com NaCl	27 °C	19,5 a	1,0318 a
CV		25,26	24,65

*Médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem entre si ao teste Skott Knott à 5% de probabilidade.

CONCLUSÕES

O isolado SLVD1 apresentou maior atividade fisiológica, corresponde aquele germoplasma microbiano de *Trichoderma* spp, enquanto o isolado SLV20 apresentou menor atividade fisiológica. A temperatura que teve melhor atividade fisiológica foi a de 20°C e a temperatura que inibiu crescimento foi a de 10°C. Isolados submetidos a estresses e temperaturas infere na mudança de tamanho dos conídios, não sendo um fator limitante para isolados que melhor apresentaram atividade fisiológica.

REFERÊNCIAS

ABC BIO Associação Brasileira de empresas de controle biológico. Acessado em: <<https://www.abcbio.org.br/>>, acessado em 15 de dezembro de 2019

AGROFIT Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons, acessado em 14 de dezembro de 2019.

AGROSMART. Para alimentar o mundo, é preciso trazer inovação para a agricultura. 2016. Disponível em: < <https://agrosmart.com.br/blog/alimentar-o-mundo-trazer-inovacao-para-agricultura/> >, Acesso em: 15 dezembro 2019.

AHMAD, P., HASHEN, A., ABD-ALAH-ABD, E.F., ALQARAWI, A.A., JOHN, R., EGAMBERDIEVA, D., GUCEL, S. Role of *Trichoderma harzianum* in mitigating NaCl stress in Indian mustard (*Brassica juncea* L.) through antioxidative defense system. *Frontiers in Plant Science*, 6:1-15, 2015.

ALBUQUERQUE, A.C.S., SILVA, A.G. Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas. Brasília: Embrapa, 2008.

ALMANÇA, M.A.K. *Trichoderma* sp. no controle de doenças e na promoção do crescimento de plantas de arroz. Dissertação de mestrado. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005, 81 p.

ALVES, C.T.; TEDESCO, J.C. A revolução verde e a modernização agrícola na mesorregião noroeste do Rio Grande do Sul – 1960/1970. *Revista Teoria e Evidência Econômica*, Passo Fundo: UPF, 2016.

AMORIM, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A. Manual de Fitopatologia - princípio e conceitos, 4a. Ed., vol. I, Editora Agronômica Ceres, São Paulo, SP, 2011.

ANAM, G.B., SUDHAKARA REDDY, M., AHN, Y.H. Characterization of *Trichoderma asperellum* RM-28 for its sodic/saline-alkali tolerance and plant growth promoting activities to alleviate toxicity of red mud. *Sci. if Environ.* 662:462–469. 2019.

ANEES, M., TRONSMO, A., EDEL-HERMANN, V., HJELJORD, L. G., HÉRAUD, C., E STEINBERG, C. Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biol.* 114:691–701. 2010.

BARNETT, H.L., HUNTER, B. B. Illustrated genera of imperfect fungi. St. Paul, Minnessota, USA: American Phytopathological Society. 4a. Ed. org. B.B. 1998.

BENÍTEZ, T., RINCÓN, A.M., LIMÓN, M.C., CONDÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7, 4: 249-260. 2004

BOMFIM, M.P.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; ALMEIDA, S.S.; 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*, v.36, n.1, p.61-67, 2010.

BRUM, A.J. Modernização da agricultura no Planalto Gaúcho. Ijuí: Fidene, 1983.

CARVALHO, D.D.C., MELLO, S.C.M., LOBO JUNIOR, M., SILVA, M.C. Control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in vitro and on seeds and growth promotion of common bean in early stages by *Trichoderma harzianum*. Tropical Plant Pathology, v.36, n.1, p.28-34, 2011.

CONTERATO, M.A., FILIPI, E.E. Teorias do Desenvolvimento. SEAD. Editora UFRGS. 2009.

COWAN, G. Statistical data analysis. 1a. Ed. org. G. Cowan. Oxford, UK: Clarendon Press. 1998.

DAROLT, M.R. As dimensões da sustentabilidade: um estudo da agricultura orgânica na região metropolitana de Curitiba, Paraná. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2001.

EHLERS, E. Uma visão histórica. Estudos Econômicos, 24:231-262, 1994.

ESPOSITO, E., SILVA, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. Critic Rev Microbiol, v. 24, p. 89-98, 1998.

FAO and ITPS Status of the World's Soil Resources (SWRS): Main Report. Food and Agriculture Organization of the United Nations and Intergovernmental Technical Panel on Soils, Rome, Italy, 2015.

FIGUEIREDO, B.M., ANDRADE, M.C.N., FILHO, J.K., MINHONI, J.T.A., COUTINHO, L.N. Productivity, biological efficiency, and number of *Agaricus blazei* mushrooms grown in compost in the presence of *Trichoderma* sp. and *Chaetomium olivacearum* contaminants. Brazilian Journal Microbiology, 38(2):243-247, 2007.

GLIESSMAN, S. Agroecologia: Processos ecológicos em agricultura sustentável. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 2001. 653p.

GLIESSMAN, S.R. Agroecologia - Processos ecológicos em agricultura sustentável. 4. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2009.

GOMEZ, M. Consumo de orgânicos cresce 34% no DF e movimenta R\$ 35 milhões. Correio Braziliense. Brasília, Disponível em: <http://www.correiobraziliense.com.br/app/noticia/economia/2017/06/05/internas_economia,600126/crece-o-consumo-de-organicos.shtml>, Acesso em: 12 de dezembro de 2019.

GÖRGEN, C.A., SILVEIRA NETO, A.N., CARNEIRO, L.C., RAGAGNIN, V., LOBO JUNIOR, M. Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. Pesq. Agropec. Bras., v.44, n.12, p.1583-1590, 2009.

HARMAM, G.E., HOWELL, C.R., VITERBO, A., CHET, I., LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology, 2: 43–56. 2004a.

HARMAN, G. E., HERRERA-ESTRELLA, A. H., HORWITZ, B.A., LORITO, M. Special issue: *Trichoderma* - from Basic Biology to Biotechnology. Microbiology-SGM, 158:1-2, 2012.

HARMAN, G.E., HOWELL, C.R., VITERBO, A., CHET, I., LORITO, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Review Microbiology, 2(1):43-56, 2004b.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease, v. 87, p. 4-10, 2003.

INDEX FUNGORUM. Disponível em:<<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp?pg=304/10>>, acessado em dezembro de 2019.

INFANTE, D., MARTINEZ, B., GONZÁLEZ, N., REYES, Y. *Trichoderma* mechanisms of action against phytopathogen fungi. Rev. Protección Veg. 24(1):14-21 2009.

KREDICS, L., HATVANI, L., NAEIMI, S., KORMOCZI, P., MONCZINGER, L., VÁGVOLGYI, DRUZHININA, I.S. Biodiversidade do gênero *Hipocrea* / *Trichoderma* em diferentes habitats. IN: GUPTA, V.K., SCHMOLL M., HERRERA-ESTRELLA A., UPADHYAY R.S., DRUZHININA I., TUOHY M. Biotecnologia e Biologia de *Trichoderma*, p. 3-24, 2014.

LI DESTRI NICOSIA, M. G., MOSCA, S., MERCURIO, R., SCHENA, L. Dieback of *Pinus nigra* seedlings caused by a strain of *Trichoderma viride*. Plant Disease, 99:44–49. 2015.

LISBOA, J., FELIX, C.R. Purification and characterization of a β -glucanase produced by *Trichoderma harzianum* showing biocontrol potential. Brazilian Archives of Biology and Technology, 50:21–29, 2007.

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

MAPA Registro de produtos fitossanitários. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/produtos-fitossanitarios/registro>>, acessado em 15 de dezembro de 2019.

MARCELLO, C.M., STEINDORFFB, A.S., NASCIMENTO, R.S., BATAUSB, L.A.M., SILAVA, S.P., ULHOAB, I.S. Expression analysis of the exo-b-1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. Microbiological Research, v. 165, p. 75–81, 2010.

MARQUES, E., MARTINS, I., MELLO, S.C.M. Potencial antifúngico de extratos brutos de *Trichoderma* spp. Biota Neotropica, 2018, vol. 18, n.1, 2018.

MASSART, S., JIJAKLI, H.M. Use of molecular techniques to elucidate the mechanisms of action of fungal biocontrol agents: a review, J. Microbiol Methods. v 69 p.229–241, 2007.

MASTOURI, F., BJORKMAN, T., HARMAN, G.E. *Trichoderma harzianum* aumenta a defesa antioxidante das mudas de tomate e a resistência ao déficit hídrico. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25 1264-1271. 2012.

MEDEIROS, F.H.V., SILVA, J.C.P., PASCHOLATI, S.F. 2018. Controle biológico de doenças de plantas. In Manual de fitopatologia, princípios e conceitos, org. A AMORIM, L; REZENDE, JAM; BERGAMIN FILHO. Ouro Fino, MG: Editora Agronômica Ceres, p. 261–272.

MOHAMED, H.A.L.A., HAGGAG, W.M. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. *Braz. J. Microbiol.* 37(2):181-191. 2006.

MOREIRA, F.M.S., SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2a. ed. org. Lavras, MG: Editora UFLA. 2006.

NYKIEL-SZYMAŃSKA, J., RÓŻALSKA, S., BERNAT, P., E SŁABA, M. Assessment of oxidative stress and phospholipids alterations in chloroacetanilides-degrading *Trichoderma* spp. *Ecotoxicology and Environment*, 184: 1-11, 2019.

OROS, G., NAÁR, Z. Mycofungicide: *Trichoderma* based preparation for foliar applications. *American Journal of Plant Sciences*, 8 (2):113-125, 2017.

PENTEADO, S.R. Agricultura orgânica. Piracicaba : ESALQ - Divisão de Biblioteca e Documentação, 2001. 41 p. - - (Série Produtor Rural, Edição Especial).

PENTEADO, S.R. Introdução à agricultura orgânica. Campinas: Ed. Grafimagem, 2000. 114 p.

R Team, R.D.C. 2008. R: a language and environment for statistical computing.

RENCHER, A. C. 2004. Methods of Multivariate Analysis. 2a. Ed. org. A.C. Rencher. New York, USA: Willey-Interscience.

ROBERTI, R., BADIALI, F., PISI, A., VERONESI, A., PANCALDI, D., CESARI, A. Sensitivity of *Clonostachys rosea* and *Trichoderma* spp. as potential biocontrol agents to pesticides. *Journal of Phytopathology*, v. 154, p. 100–109, 2006.

ROMEIRO, A.R. Perspectivas para políticas Agroambientais. In: RAMOS, P. (Org.). Dimensões do agronegócio brasileiro: políticas, instituições e perspectivas. Brasília: MDA, 2007. p. 283-312.

ROSA, D.R., HERRERA, C.J.L. Evaluation of *Trichoderma* spp. as biocontrol agents against avocado white root. *Biological Control*, v. 51, p. 66–71, 2009.

RÜCKERT, A. A. Metamorfoses do território. A agricultura de trigo/soja no planalto médio rio grandense, 1930-1990. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. 223p

SAMUELS, G.J. *Trichoderma*, a review of biology and systematics of the genus. *Mycological Resources*, 100:923-35, 1996.

SANCHEZ, A. D., OUSSET, M. J., SOSA, M. C. Biological control of *Phytophthora collar rot*

of pear using regional *Trichoderma* strains with multiple mechanisms. *Biol. Control*. 135:124–134. 2019.

SARAVANAKUMAR, K., YU, C., DOU, K., WANG, M., LI, Y., CHEN, J. Synergistic effect of *Trichoderma* derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Biol. Control*. 94:37–46. 2016.

SAVAZZINI, F., LONGA, C. M. O., PERTOT, I., GESSLE, C. Real-time PCR for detection and quantification of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* strain SC1 in soil. *Journal of Microbiological Methods*, 73:185–194, 2008.

SCHUSTER, A., SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 87, n. 3, p. 787–99, 2010.

SHANER, G., FINNEY, R.E. The Effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. *Phytopathology*. 67:1051–1056. 1977.

SHORESH, M., MASTOURI, F., HARMAN G. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Rev. Phytopathol.* 48 21–43, 2010.

SOARES, W.L., PORTO, M.F. Agricultural activity and environmental externality: an analysis of the use of pesticides in the Brazilian savannah. *Ciência & Saúde Coletiva*, 12 (1): 131-143. 2007.

STEYAERT, J. M., WELD, R. J. & STEWART, A. Ambient pH intrinsically influences *Trichoderma* conidiation and colony morphology. *Fungal Biological* 114, 198–208, 2010b.

TSENG, S. C.; LIU, S. Y.; YANG, H.; CHAUR-TSUEN, L. Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ETS 323 in response to *Rhizoctonia solani*. *Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 6914–6922, 2008.

VERMA, M.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y.; VALÉRO, J. R. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 37, n. 1, p. 1-20, 2007.

VIEIRA, P.M. Identificação, expressão e análise de genes de *Trichoderma harzianum* com potencial biotecnológico. Tese de doutorado, Universidade de Brasília, 2014

VINALE, F., SIVASITHAMPARAM, K., GHISALBERTI, E.L., MARRA, R., WOO, S.L., LORITO, M. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1): 1–10, 2008.

ZEILINGER, S. Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Current Genetics*, v. 45, n. 1, p. 54–60, 2004.