

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Bioprospecção de *Trichoderma* spp. envolvidas na solubilização de fosfato e
no controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja**

Laura Bononi

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2020

Laura Bononi
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

Bioprospecção de *Trichoderma* spp. envolvidas na solubilização de fosfato e no controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ITAMAR SOARES DE MELO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2020

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Bononi, Laura

Bioprospecção de *Trichoderma* spp. envolvidas na solubilização de fosfato e controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja / Laura Bononi. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2020.

135 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Bioestimulante 2. Biocontrole 3. Consócio microbiano 4. Solubilização . I.
Título

DEDICATÓRIA

*À minha mãe, Maria Leonor, pelo seu cuidado e dedicação.
A todos familiares e amigos que de alguma forma
estiveram próximos a mim, me auxiliando
no desenvolvimento desse trabalho.*

OBRIGADA

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e familiares, pelo apoio, carinho, amor e pelos esforços na minha educação.

Agradeço ao meu orientador, Itamar Soares de Melo, por todos os conselhos, orientações e dedicação nesses seis anos de convivência.

Agradeço a todos que me ajudaram no desenvolvimento desse trabalho, pois sem a ajuda de vocês não teria sido possível a realização desse sonho.

Agradeço as minhas amigas e companheiras de apartamento, Vanessa Abdo e Marta Moitinho, por me aguentarem firmes e fortes nesses quatro anos de doutorado.

Agradeço aos colegas de laboratório pelas risadas, conselhos, por agregar conhecimentos e pelos anos de convívio, obrigada pela força!.

Agradeço, em especial, Marta Alves Moitinho, Josiane Barros Chiamonte, João Paulo Ventura e Abilene Pego Goulart pela ajuda e desenvolvimento da tese.

Agradeço as técnicas do laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente, por todo o suporte.

Agradeço aos professores e as instituições que possibilitaram a realização desse trabalho, ESALQ e Embrapa.

Agradeço à CAPES pela bolsa de doutorado, sem a qual seria impossível dar continuidade. E a FAPESP por financiar a coleta dos isolados na Amazônia.

Muito obrigada a todos!

“Investir em conhecimento rende sempre os melhores juros”.

Benjamin Franklin

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
REFERÊNCIAS	23
4. SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO POR <i>TRICHODERMA</i> SPP. DOS SOLOS DA FLORESTA AMAZÔNICA MELHORAM O CRESCIMENTO DE PLANTAS DE SOJA	38
4.1. INTRODUÇÃO	39
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.2.1. LOCAL DE AMOSTRAGEM	42
4.2.2. MICRORGANISMOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS	43
4.2.2.1. <i>TRICHODERMA</i> SPP.	43
4.2.2.2. INÓCULO DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. PARA OS EXPERIMENTOS EM CASA DE VEGETAÇÃO	43
4.2.3. SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO.....	44
4.2.3.1. SELEÇÃO DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. SOLUBILIZADORES DE FOSFATO	44
4.2.4. MATERIAL VEGETAL E DESENHO EXPERIMENTAL	45
4.2.5. TESTE DE COLONIZAÇÃO RADICULAR	48
4.2.6. ANÁLISE DOS DADOS E ESTATÍSTICA	48
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.3.1. ISOLAMENTO SELETIVO E SELEÇÃO DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. COM CAPACIDADE NA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO	49
4.3.2. INFLUÊNCIA DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. E FERTILIZANTES FOSFATADOS NO DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE SOJA	53
4.3.3. ATIVIDADE ENZIMÁTICA NO SOLO.....	59
4.4. CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64
5. CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>S. SCLEROTIUM</i> POR <i>TRICHODERMA</i> SPP. DE SOLOS DA FLORESTA AMAZÔNICA EM PLANTAS DE SOJA	79
RESUMO	79
ABSTRACT	79
5.1. INTRODUÇÃO	80
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	81
5.2.1. <i>TRICHODERMA</i> SPP.	81
5.2.2. <i>SCLEROTINIA SCLEROTIUM</i>	82
5.2.3. INÓCULO DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. PARA OS EXPERIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	82
5.2.4. INÓCULO DE <i>SCLEROTINIA SCLEROTIUM</i>	82
5.2.5. TESTE DE PATOGENICIDADE DE <i>SCLEROTINIA SCLEROTIUM</i>	82
5.2.6. SELEÇÃO DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. QUANTO AO POTENCIAL ANTAGÔNICO A <i>SCLEROTINIA SCLEROTIUM</i> ..	83
5.2.7. TESTE DE COMPETITIVIDADE DE <i>TRICHODERMA</i> NO SOLO	84
5.2.8. AVALIAÇÃO DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. NO CONTROLE DO MOFO BRANCO EM CASA DE VEGETAÇÃO	84
5.2.9. TESTE DE COLONIZAÇÃO RADICULAR	86
5.2.10. ANÁLISE DOS DADOS E ESTATÍSTICA.....	86
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	86

5.3.1. POTENCIAL DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. NO CONTROLE DO MOFO BRANCO EM PLAN	91
5.4. CONCLUSÃO.....	95
REFERÊNCIAS.....	96
6. POTENCIAL DO CONSÓRCIO DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. NA DISPONIBILIDADE DE FÓSFORO E CONTROLE DO MOFO BRANCO EM PLANTAS DE SOJA.....	102
RESUMO.....	102
ABSTRACT	102
6.1. INTRODUÇÃO.....	103
6.2. MATERIAL E MÉTODOS	104
6.2.1. <i>TRICHODERMA</i> SPP.	104
6.2.2. INÓCULO DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. PARA OS EXPERIMENTOS EM CASA DE VEGETAÇÃO	104
6.2.3. ANTAGONISMO DAS ESTIRPES DE <i>TRICHODERMA</i> SPP.....	104
6.2.4. CONSÓRCIO DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. COMO SOLUBILIZADORES DE FOSFATO E CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</i>	105
6.2.5. ANÁLISE DOS DADOS E ESTATÍSTICA	106
6.2.6. ESTUDO DA COMUNIDADE DE BACTÉRIAS E FUNGOS	107
6.2.6.1. EXTRAÇÃO DE DNA METAGENÔMICO DO SOLO	107
6.2.6.2. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE <i>AMPLICONS</i> DOS GENES 16S rRNA E ITS rRNA	107
6.2.6.3. AVALIAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA	108
6.2.6.4. QUANTIFICAÇÃO DA COMUNIDADE SOLUBILIZADORA DE FÓSFORO PELO GENE <i>PHOD</i>	109
6.2.7. IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES	109
6.2.7.1. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ESTIRPES DE <i>TRICHODERMA</i> SELECIONADAS	109
6.2.7.2. AMPLIFICAÇÃO DO DNA DAS ESTIRPES DE <i>TRICHODERMA</i>	110
6.2.7.3. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR E REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO	110
6.2.7.4. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS.....	110
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	110
6.3.1. INFLUÊNCIA DO CONSÓRCIO DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. NA DISPONIBILIDADE DE FÓSFORO E CONTROLE DE <i>SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</i>	110
6.4. CONCLUSÃO.....	128
REFERÊNCIAS.....	128

RESUMO

Bioprospecção de *Trichoderma* spp. envolvidas na solubilização de fosfato e no controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja

Os efeitos nocivos resultantes do uso de fertilizantes e agrotóxicos ao meio ambiente e a saúde humana estimulam a busca por estratégias que contribuam para uma agricultura mais sustentável. No Brasil, aspectos envolvendo a disponibilidade de fósforo e a presença de uma gama de patógenos de solo estão entre os principais fatores limitantes para a produção agrícola. O uso de microrganismos específicos para auxiliar na absorção de fósforo pela planta e como agentes de biocontrole vêm sendo uma estratégia promissora. Fungos do gênero *Trichoderma* encontram-se entre os agentes de controle biológico e solubilizadores de fosfato conhecidos e empregados mundialmente. Além do controle de fitopatógenos, melhoram o desenvolvimento e a produção de diversas espécies de plantas de importância econômica. O presente trabalho busca selecionar *Trichoderma* spp. capazes de solubilizar fósforo e de suprimir a atividade do fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, agente etiológico do mofo branco. Além disso, avaliou-se um consórcio de *Trichoderma* spp. para uma possível formulação de um inoculante para soja. Dessa forma, foram avaliados 251 isolados de *Trichoderma*, providos de solos da floresta Amazônica, em condições de laboratório e casa de vegetação. Plantas de soja foram cultivadas em solo com um gradiente de fosfato de rocha Bayóvar e de superfosfato triplo. A presença dos dois isolados de *Trichoderma* spp. (AMS 34.39 e AMS 31.15) apresentaram respostas positivas na promoção de crescimento das plantas, de 2,1 a 41,1%, considerando as fontes e níveis de fósforo em relação ao tratamento sem a presença de *Trichoderma*. O experimento de controle biológico selecionou três estirpes com potencial em controlar *S. sclerotiorum* em condições de casa de vegetação, não apresentando plantas com sintomas do mofo branco. E por fim, a aplicação do consórcio de *Trichoderma* spp. mostrou resultados positivos, auxiliando na absorção de fósforo em 39,6 a 49%, com possibilidade de um novo inoculante para a cultura da soja. A aplicação do consórcio não alterou a comunidade bacteriana do solo, mas estimulou os grupos envolvidos na solubilização de fosfato.

Palavras-chave: 1. Bioestimulante 2. Biocontrole 3. Consórcio microbiano 4. Solubilização 5. Diversidade microbiana

ABSTRACT**Bioprospection of *Trichoderma* spp. involved in phosphate solubilization and biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean**

The harmful effects resulting from the use of fertilizers and pesticides to the environment and human health stimulate the search for strategies that contribute to a more sustainable agriculture. In Brazil, aspects involving the availability of phosphorus and the presence of soil pathogens are the main limiting factors for agricultural production. The use of specific microorganisms to aid in the phosphorus absorption by the plant and as well as biocontrol agents has been a promising strategy. Fungi of the genus *Trichoderma* are found among biological control agents and phosphate solubilizers known and used worldwide. In addition to the control of phytopathogens, they improve the development and production of several species of economic importance. The aim of this work is to select *Trichoderma* spp. capable of solubilizing phosphorus and suppressing the activity of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum*, a fungus that causes the white mold. In addition, it was evaluated a consortium of *Trichoderma* spp. for a possible formulation of a soybean inoculant. In this way, 251 isolates of *Trichoderma*, from the Amazon forest soils, were evaluated in experiments under laboratory and greenhouse conditions. Soybean plants were grown in soil with a gradient of Bayovar rock phosphate and triple superphosphate. The presence of the two isolates of *Trichoderma* spp. (AMS 34.39 and AMS 31.15) showed positive responses in promoting plant growth, from 2.1 to 41.1%, considering the sources and levels of phosphorus in relation to the treatment without the presence of *Trichoderma*. The biological control experiment selected three strains with the potential to control *S. sclerotiorum* under greenhouse conditions, with no plants showing symptoms of white mold. And finally, the application of the consortium of *Trichoderma* spp. showed positive results, helping in the absorption of phosphorus in 39.6 to 49%, with the possibility of a new inoculant for soybean culture. The application of the consortium did not alter the soil bacterial community, but stimulated the groups involved in phosphate solubilization.

Keywords: Biostimulant, biocontrol, microbial consortium, solubilization, rock phosphate, microbial diversity.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto em consumo de fertilizantes e o maior consumidor mundial de agrotóxicos. Uma das culturas agrícolas mais importante no país é a soja. O Brasil é o segundo maior produtor e exportador de grãos de soja. Porém, essa cultura necessita de uma larga aplicação de fertilizantes e agrotóxicos para uma boa produtividade. A demanda por produtos que contribuam para uma agricultura mais sustentável está cada vez maior. O método para suprir as necessidades nutricionais da planta mais utilizado na atualidade é o uso de fertilizantes. Dentre os nutrientes essenciais para o desenvolvimento e crescimento de espécies vegetais, o fósforo tem enorme importância como parte de diversos compostos estruturais da planta e na produção de energia. Porém é o nutriente que se encontra nas concentrações mais baixas na maioria dos solos agrícolas brasileiros. Nesse mesmo contexto, o controle mais utilizado pelos produtores para muitas das doenças que atacam as culturas agrícolas é, ainda, o controle químico. Porém, apresentam um efeito temporário e necessitam ser reaplicados durante o crescimento da cultura. Essa aplicação em larga escala é prejudicial à saúde humana, animal e ao meio ambiente. Uma das alternativas para diminuir o uso de fertilizantes e agrotóxicos nos campos agrícolas e atender a demanda de alimentos mais saudáveis e sem resíduos químicos são os biofertilizantes e o controle biológico. Os microrganismos apresentam um papel importante para o suprimento de fósforo e no antagonismo a fitopatógenos de solo.

Recentemente a utilização de comunidade sintética vêm sendo bastante requisitado. Microrganismos com funções diferentes trabalhando juntos para beneficiar o crescimento e produtividade de culturas agrícolas. Outro termo para essa prática é o probiótico agrícola que nada mais são que inoculantes microbianos eficazes que estimulam o crescimento da cultura, seja por disponibilidade de nutrientes ou por diminuir ou erradicar a incidência de algum patógeno no solo. Fungos do gênero *Trichoderma* têm sido estudados e empregados mundialmente no biocontrole de uma gama de patógenos de plantas e mais recentemente como biofertilizante. São fungos com grande potencial em solubilizar fosfato e que detêm de diferentes mecanismos de ação, tais como antibiose, competição, parasitismo e indução de resistência, contra patógenos do solo. Bioprodutos comerciais à base de *Trichoderma* têm sido utilizados para o controle de diversos fitopatógenos de solo, em diferentes culturas, inclusive do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofo branco.

A floresta Amazônica está entre as florestas com as maiores reservas de biodiversidade. A biodiversidade da floresta Amazônica é atribuída à alta variabilidade de nichos dentro dela, da floresta densa à savana, fazendo do Brasil um dos países com grande biodiversidade macro

e microbiológica. Um grande número de microecossistemas, tipos de solo e condições climáticas são favoráveis às comunidades fúngicas do solo, proporcionando uma constante degradação da biomassa florestal, o que torna a floresta Amazônica uma fonte substancial de bioprospecção a partir de produtos de origem fúngica.

Dessa forma, nossa hipótese é de que estirpes de *Trichoderma* isolados de ambiente Amazônico possuam um grande potencial biotecnológico para formulação de inoculantes tanto para fins nutricionais como de controle biológico. Isso porque o ambiente da Floresta Amazônica apresenta grande dependência dos microrganismos para ciclagem de nutrientes. E que determinadas espécies de *Trichoderma* tem efeito supressor na atividade de fitopatógenos de solo, de forma a contribuir como alternativa ambientalmente correta no manejo de solos agrícolas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos principais

Bioprospectar estirpes de *Trichoderma* spp. de solos da floresta Amazônica capazes de disponibilizar fósforo para plantas de soja e assim promover o crescimento e a produtividade e avaliar o potencial dessas estirpes no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, fungo causador do mofo branco. Por fim, avaliar um consórcio de *Trichoderma* spp. e o impacto da inoculação nas comunidades microbianas com objetivo de encontrar um possível inoculante para a cultura da soja.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar *in vitro* *Trichoderma* spp. com potencial atividade na solubilização de fósforo;
- Avaliar *Trichoderma* spp. quanto à eficiência em promover crescimento em plantas de soja mediante a diferentes níveis de superfosfato triplo e fosfato de rocha, em casa de vegetação;
- Selecionar *in vitro* o potencial antagônico de *Trichoderma* spp. ao fungo *Sclerotinia sclerotiorum*;
- Avaliar o potencial de *Trichoderma* spp. em controlar o mofo branco na cultura da soja, em casa de vegetação.
- Construir uma comunidade sintética de *Trichoderma* spp. com alta eficiência no uso de fósforo e no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*.
- Avaliar as mudanças nas comunidades bacterianas e fúngicas do solo com a aplicação do consórcio.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Uso de insumos químicos e biológicos na agricultura

A demanda dos consumidores por produtos menos agressivos ao meio ambiente está cada vez maior, surgindo nichos no mercado nacional e internacional mais exigentes quanto à qualidade dos alimentos produzidos (GOMES et al., 2008). Dentre os fatores responsáveis por esse aumento na busca de insumos ambientalmente sustentáveis, a aplicação indiscriminada de fertilizantes inorgânicos e agrotóxicos tem grande relevância (JÚNIOR, 2013). No entanto, quando se pensa em alimentação global, tais insumos agrícolas ainda são de grande importância (PRASHAR; SHAH, 2016). As culturas agrícolas necessitam de nutrientes essenciais para seu desenvolvimento e rendimento (GRANT et al., 2005) para isso, é necessário que estejam em quantidades adequadas e disponibilizadas no solo, para serem assimiladas pelas plantas. Dessa forma, os fertilizantes são fontes rápidas e de fácil aplicabilidade para oferecer o padrão nutricional exigido para um bom rendimento das plantas (CAMARGO, 2012).

Da mesma forma que os fertilizantes, os agrotóxicos, que englobam os pesticidas, bactericidas, fungicidas e nematicidas, são os métodos mais rápidos e “eficazes” para erradicar as diferentes pragas e patógenos que atacam as diversas culturas agrícolas e dessa maneira auxiliar na produtividade (SOARES; PORTO, 2007). Porém, tais produtos sintéticos são frequentemente de baixa especificidade e difíceis de serem degradados no ambiente. Resulta no acúmulo em solos e águas e, portanto, causam poluição ambiental e trazem problemas à saúde humana e animal (RIMANDO; DUKE, 2006). Há relatos na literatura que apontam que a aplicação em áreas agrícolas de agrotóxicos e fertilizantes têm crescido de forma expressiva nos últimos 48 anos (GOMES et al., 2008). Como consequência das altas doses de químicos no solo, as preocupações com o equilíbrio ecológico e a conservação da biodiversidade do solo necessitam de atenção nos dias atuais (PRASHAR; SHAH, 2016). A contaminação do solo por metais pesados está diretamente relacionada, principalmente, a fertilizantes fosfatados. Dentre os principais metais pesados presentes nos solos agrícolas, o cádmio (Cd) e o chumbo (Pb) são os mais nocivos, resultando em toxidez nas plantas, água e microbiota do solo (FREITAS et al., 2009).

Assim, a preocupação com os danos à saúde humana, animal e ambiental vem crescendo, junto com a busca por componentes biológicos na formulação de novos insumos

(ADESEMOYE; KLOEPPER, 2009; LUCON, 2016). Nesse contexto, uma prática que vem sendo bastante estudada é a utilização de microrganismos do solo no controle biológico de doenças e como biofertilizantes (ALORI; GLICK; BABALOLA, 2017; DRUZHININA et al., 2011; HADDAD, et al., 2017; MIRANSARI, 2013; RAMESH et al., 2011; SHARMA et al., 2013). Tais estudos são uma alternativa ambientalmente correta para novas aplicações desses insumos nos solos agrícolas (KHAN; ZAIDI; WANI, 2007). A microbiota do solo é responsável por funções de grande importância para o sistema como um todo. A degradação de compostos orgânicos, consequente disponibilidade de nutrientes e, portanto, auxiliando no crescimento das plantas (KHAN; ZAIDI; MUSARRAT, 2014; MIRANSARI, 2013).

Fungos do gênero *Trichoderma* produzem um arsenal de metabólitos secundários que auxiliam a planta no seu crescimento, como as auxinas e enzimas extracelulares. Dentre os metabólitos já conhecido produzidos por estirpes do fungo, alguns se encontram entre os produtos naturais mais importantes utilizados para inibir o crescimento de fitopatógenos como: ácido harziânico, alameticinas, antraquinonas, azafilonas, daucanas, harzialactonas, bisorbicillinoides, butenolides, tricholina, glisopreninas, ácido heptelídico, gliovirina, pironas, tricotecenos, isocianatos, trichosetina, viridina, peptaiboles, entre outros (AMIN et al., 2010; MOHIDDIN et al., 2010; REINO et al., 2008; VINALE et al., 2009).

Uma gama de nutrientes é importante para o desenvolvimento da planta (TILMAN et al., 2002), porém os que mais limitam a produção agrícola são nitrogênio e o fósforo (ALORI; GLICK; BABALOLA, 2017; RICHARDSON et al., 2009). Dentre estes, o fósforo é o nutriente que geralmente está na concentração mais baixa no solo, 0,6% de fósforo, quando comparado a 0,14% de nitrogênio e 0,83 % de potássio. Em solos ácidos, o fósforo é rapidamente adsorvido nos coloides do solo ou precipitados em fosfato de magnésio (Mg), ferro (Fe) e alumínio (Al), tornando-se inviável para as plantas assimilarem (FINK et al., 2016; RICHARDSON et al., 2009). Os microrganismos mineralizam formas orgânicas de P por meio de enzimas fosfatases e fitases (NAHAS, 2002; NAIK et al., 2013; SARAVANAKUMAR; SHANMUGA ARASU; KATHIRESAN, 2013; ZHANG; LI; XIA, 2015; ZHAO et al., 2017). Também, por meio dos fungos micorrízicos arbusculares (MA) que atuam como uma extensão do sistema radicular, aumentando a área e a velocidade de absorção de fósforo (BOLAN, 1991; RICHARDSON et al., 2009).

3.2. Microrganismos do solo como solubilizadores de fosfato

A quantidade de P absorvido pelas culturas variam de 10 a 40% do total aplicado ao solo (ADESEMOYE; KLOEPPER, 2009). Um fator importante para disponibilizar P para as plantas é o pH do solo. A melhor faixa de pH esta entre 6,0 a 7,0, pois todos os nutrientes estão melhor disponíveis nessa faixa de pH. Além disso, permite maior ação dos microrganismos no solo, no entanto, os solos agrícolas brasileiros apresentam acidez elevada (VELOSO et al., 1992). Nesse contexto, o uso de calcário no solo é de grande importância, pois as plantas e microrganismos são capazes de absorver prontamente íons H_2PO_4 que são favorecidos no solo com o pH mais elevado (JIANG et al., 2017).

O papel do P na planta está associado com três processos bioquímicos essenciais, tais como produção de energia, respiração e fotossíntese. Assim como, processos enzimáticos e como componente dos ácidos nucleicos e membrana celular (ANAND; KUMARI; MALLICK, 2016; NAIK et al., 2013; RAMESH et al., 2011; TALBOYS et al., 2014). No solo o fósforo é encontrado em duas formas, o orgânico (Po) e o inorgânico (Pi). A forma orgânica desse elemento está presente em materiais em decomposição, como restos vegetais, e são os microrganismos responsáveis por decompor esse material e disponibilizar Pi no solo (BINI; LOPEZ, 2016). O Po da massa microbiana é a forma orgânica de mais rápido acesso para as plantas. O solo pobre em P tem mais dependência do Po, assim, os microrganismos absorvem e imobilizam P e liberam gradativamente ao solo (WITHERS et al., 2018).

As fosfatases ácida e alcalina são responsáveis pela disponibilização de fósforo para as plantas. São classificadas em ácidas ou alcalinas de acordo com a atividade ótima em pH ácido (6,5) e alcalino (11). A fosfatase alcalina é produzida basicamente por microrganismos e a ácida tanto por microrganismos quanto por plantas e outros organismos edáficos (RICHARDSON et al., 2009; RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999). A fitase é encontrada em grandes concentrações em grãos (nas paredes celulares de soja e milho) e por alguns grupos de microrganismos (LEE; CHOI; HWANG, 2005; SOUZA; REBELLO; ASCHERI, 2011). O fósforo orgânico representa cerca de 80% do total de fósforo presente no solo, sendo que aproximadamente 25% estão na forma de fitato. Para o P do fitato ser utilizado pela planta é necessário que seja hidrolisado pela enzima fitase (RICHARDSON; HADOBAS; HAYES, 2000).

Uma gama de microrganismos são conhecidos por mineralizar fósforo no solo, gêneros bacterianos como *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* e gêneros fúngicos como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* (MENDES; LUIZ; FREITAS, 2014; RICHARDSON et al., 2009; RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999; SHARMA et al., 2013). Os fungos micorrízicos arbusculares também fornecem muitos benefícios às plantas leguminosas, uma das principais funções desse

grupo de microrganismos é fornecer fósforo para a planta hospedeira e para os nódulos, dessa forma tem um papel importante na fixação biológica de nitrogênio (GRANT et al., 2005; JÚNIOR et al., 2017). Assim, inoculantes microbianos têm sido bastante utilizados em pesquisas como fonte na disponibilidade de fósforo nos solos (BIRHANU et al., 2017; JAOUANI et al., 2012; KAPRI; TEWARI, 2010; KHAN; ZAIDI; MUSARRAT, 2014; RICHARDSON et al., 2009).

Dentre os microrganismos benéficos, fungo do gênero *Trichoderma* tem sido um dos mais estudados para melhorar a produção e desenvolvimento de diversas culturas (CHAGAS et al., 2017; GARCÍA-LÓPEZ; AVILÉS; DELGADO, 2016; HOYOS-CARVAJAL; ORDUZ; BISSETT, 2009; THONAR et al., 2017) principalmente, pela sua capacidade de colonização radicular, formando associação simbiótica com as plantas (HARMAN, 2011). E ainda, podem suprir as necessidades nutricionais da planta, por exemplo, pela solubilização de fosfato (ASERI; JAIN; TARAFDAR, 2015; BORGES CHAGAS et al., 2015).

3.3. Gênero *Trichoderma*, aspectos gerais

O gênero *Trichoderma* pertence ao filo *Ascomycota*, subdivisão *Pezizomycotina*, classe *Sordariomycetes*, ordem *Hypocreales* e família *Hypocreaceae* (DRUZHININA; SHELEST; KUBICEK, 2012; WAGHUNDE; SHELAKE; SABALPARA, 2016). São fungos de crescimento rápido em meio de cultura, apresentando colônias, inicialmente, com a presença de micélio de cor branca que com o desenvolvimento torna-se cotonoso e compacto com tufo verdes. A coloração da colônia depende da cor e quantidade de conídios produzidos pelo fungo (DEVI et al., 2012). São cosmopolitas, encontrados na maioria dos solos e apresentam importante função ecológica, pois participam da decomposição e mineralização de resíduos vegetais, contribuindo na disponibilização de nutrientes para as plantas (BROTMAN et al., 2013; SHORESH; HARMAN; MASTOURI, 2010).

Como são de natureza saprofítica, espécies de *Trichoderma* são encontradas nas superfícies dos solos e serapilheiras, onde detêm de grande quantidade de micélio (MUKHERJEE et al., 2012; SINGH; MAURYA; SANMUKH, 2015). A capacidade de se associar às raízes das plantas é um destaque para esse gênero. A simbiose ocorre por mecanismos similares dos fungos micorrízicos (BENÍTEZ et al., 2004; BROTMAN et al., 2013; MASUNAKA; HYAKUMACHI; TAKENAKA, 2011; YEDIDIA; BENHAMOU, 1999), iniciando-se com a colonização da superfície externa das raízes que podem ficar restritas ou se estender por todo o rizoplano (NAHER et al., 2014) e da invasão da primeira ou da

segunda camada de células da epiderme, com a produção de hidrofobinas, que são proteínas que permitem a adesão às superfícies hidrofóbicas (KERSHAW; TALBOT, 1998).

Nos primeiros estudos sobre a diversidade de fungos do gênero *Trichoderma*, a identificação das espécies era baseada somente em caracteres morfológicos. Mais recentemente, esses levantamentos passaram a utilizar métodos moleculares, facilitando o trabalho e permitindo identificar cerca de 200 espécies (ALVARADO-MARCHENA; RIVERA-MÉNDEZ, 2016; DRUZHININA; KUBICEK, 2005; DRUZHININA; SHELEST; KUBICEK, 2012; LÓPEZ-QUINTERO et al., 2012).

Atualmente, fungos do gênero *Trichoderma* são de grande importância econômica para a agricultura, uma vez que são capazes de atuarem como agentes de controle de doenças de várias plantas cultivadas, promotores de crescimento e indutores de resistência de plantas a doenças (FORTES et al., 2007; HOLMES et al., 2004; SHORESH; HARMAN; MASTOURI, 2010; THONAR et al., 2017). Eles atuam através de diversos mecanismos, tais como antibiose, produção de enzimas degradadoras de parede celular, competição por nutrientes e micoparasitismo resultando em efeitos benéficos para as plantas (HARMAN, 2006; SHORESH; HARMAN; MASTOURI, 2010).

3.4. *Trichoderma* na disponibilidade de fósforo para a planta plantas

O gênero *Trichoderma* também é estudado por estar envolvido no crescimento e desenvolvimento de plantas (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2009; HARMAN et al., 2004; HOYOS-CARVAJAL; ORDUZ; BISSETT, 2009; SARAVANAKUMAR; SHANMUGA ARASU; KATHIRESAN, 2013; THONAR et al., 2017). *Trichoderma* têm sido um dos fungos mais estudados por serem capazes de colonizar as raízes das plantas, assim formar associação simbiótica (HARMAN, 2011). Dessa forma, produzem metabólitos que atuam na defesa ao ataque de fitopatógenos e na decomposição de material vegetal, disponibilizando nutrientes para a planta, interferindo de forma direta e indireta no seu crescimento (HOYOS-CARVAJAL; ORDUZ; BISSETT, 2009; PACHAURI, 2014; SHANMUGAIAH et al., 2009). Um dos mecanismos de ação biofertilizante de *Trichoderma* spp. é o suprimento das necessidades nutricionais das plantas por meio da solubilização de fosfato (BORGES CHAGAS et al., 2015; GAIND; NAIN, 2015; SARAVANAKUMAR; SHANMUGA ARASU; KATHIRESAN, 2013). Produzem uma gama de ácidos orgânicos responsáveis por liberar o fósforo retido nos óxidos de Fe e Al presentes no solo.

A aplicação de isolados de *Trichoderma* spp. em solos já foi demonstrada em muitas pesquisas, para aumentar o tamanho das raízes e como solubilizadores de fosfato (BORGES CHAGAS et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2012; SARAVANAKUMAR; SHANMUGA ARASU; KATHIRESAN, 2013). São fungos com potencial na produção de enzimas fitases e fosfatases (KAPRI; TEWARI, 2010; SOUZA et al., 2016) liberando assim o fósforo de forma assimilável para as plantas.

3.5. *Trichoderma* como agente de controle biológico

Trichoderma spp. merecem destaque no controle biológico de doenças, por deter de características importantes para tal finalidade. Crescimento em diferentes meios de cultura, são oportunistas, produtores de grandes quantidades de esporos, competitivos por espaço, nutrientes e luz (BUTT, 2000; HERRERA-ESTRELLA, 2004; MONTERO-BARRIENTOS et al., 2008; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010). Ainda, no estágio assexuado do seu desenvolvimento, as populações crescem e evoluem separadamente (WAGHUNDE; SHELAKE; SABALPARA, 2016). Esse gênero fúngico atua sobre os patógenos presentes no solo por meio de diferentes mecanismos de ação, tais como antibiose, competição, parasitismo e indução de resistência (HARMAN, 2006; LO, 1998). O micoparasitismo envolve a antibiose, pois ocorre por meio da ação de enzimas hidrolíticas, como glucanases, quitinases, proteases e lipases, responsáveis pela morte de um dos microrganismos, de modo a servir como alimento ao outro (KUMAR; KUMAR; ANUPAMA, 2012; MARCO; FELIX, 2007; MARCO; VALADARES-INGLIS; FELIX, 2003; SANDHYA et al., 2004; ÜLKER et al., 2011; ZHANG; LI; XIA, 2015). Esse fungo dispõe de alta capacidade na produção de enzimas hidrolíticas, produzem metabólitos secundários e antibióticos capazes de inibir o crescimento micelial de patógenos. Outro ponto bastante relevante sobre o gênero é em relação aos locais de aplicação do mesmo que podem ser em solos, substratos, sementes, parte aérea das plantas, em frutos e resíduos culturais (HARMAN, 2008; LUCON, 2016; MELO, 1996).

Novas moléculas bioativas com potencial fungicida vêm sendo estudadas a partir de extração líquida de meio de cultura com crescimento de *Trichoderma*. Dentre os metabólitos já conhecido produzidos por estirpes do fungo, alguns se encontram entre os produtos naturais mais importantes utilizados para inibir o crescimento de fitopatógenos como: ácido harziânico, alameticinas, antraquinonas, azafilonas, daucanas, harzialactonas, bisorbicillinoides, butenolides, tricholina, glistopreninas, ácido heptelídico, gliovirina, pironas, tricotecenos, isocianatos, trichosetina, viridina, peptaiboles, entre outros (AMIN et al., 2010; MOHIDDIN et

al., 2010; REINO et al., 2008; VINALE et al., 2009). *Trichoderma* atua de forma preventiva no solo, assim é necessário estar presente ou ser aplicado antes da ocorrência da doença (LUCON, 2016).

3.6. *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofo-branco em soja

A soja é uma planta pertencente ao reino *Plantae*, divisão *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida*, ordem *Fabales*, família *Fabaceae* (*Leguminosae*), subfamília *Faboideae* (*Papilionoideae*), gênero *Glycine*, espécie *Glycine max* (L.) Merrill (SEDIYAMA, 2009). É uma cultura anual e de clima tropical. A produção é concentrada nos Estados Unidos e no Brasil, devido as condições ambientais. No Brasil, a soja é a cultura com maior área plantada e encontra-se em expansão, produzindo cerca de 122,2 milhões de toneladas de grãos na safra 2019/2020, aumento de 2,6% da safra anterior. Está previsto um aumento de 1,5% na área plantada, diferença de 967,2 mil hectares de novas áreas plantadas (CONAB, 2020).

Dentre os principais fatores limitantes na produção da cultura da soja, estão as doenças causadas por fungos de solo, tal como *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, causador do mofo branco ou podridão branca (ZHANG et al., 2016). É considerado um fungo polífago por ter como hospedeiros cerca de 75 famílias de plantas e 408 espécies, destacando-se como principais culturas a soja, feijão, ervilha, alface, tomate e batata. Geralmente apresentam sintomas como lesões em diferentes órgãos da planta, caracterizada por necrose no caule ou haste da planta, seguida de murchamento e folhas secas (LEITE, 2005) de acordo com o tipo de hospedeiro, região da planta afetada e as condições ambientais.

As condições no qual o patógeno se desenvolve bem são temperaturas amenas, entre 15 e 25 °C, e em ambientes com alta umidade. Quando exposto a temperaturas abaixo de 0 °C e acima de 32 °C, o fungo apresenta baixa atividade (LEITE, 2005; PURDY, 1979). Responde por aproximadamente 30% na perda da produção agrícola (ANDRADE et al., 2016), mas dependendo das condições ambientais chega a causar perdas de até 100% em soja (HENNEBERG et al., 2012). Está distribuído em todas as regiões produtoras do mundo, temperadas, tropicais ou subtropicais, sendo considerado um dos patógenos fúngicos mais importantes mundialmente (LEITE, 2005). Para se estabelecer no solo, *Sclerotinia sclerotiorum* produz estruturas de resistência conhecidas como escleródios. Essas estruturas são compostas por hifas de parede espessa e podem permanecer no solo por cerca de 10 anos. Quando as condições no ambiente são favoráveis, os escleródios germinam e originam hifas infecciosas

(ORDÓÑEZ-VALENCIA et al., 2015). A ocorrência da doença na hora da semeadura está entre as formas de disseminação da doença, principalmente pela invasão da semente pelo patógeno (HENNEBERG et al., 2012), dificultando o seu controle.

Devido à agressividade, dispersão e produção de estruturas de resistência, torna-se difícil o controle desse fungo nas áreas agrícolas. Dentre as principais práticas para o controle da doença estão o uso de sementes saudáveis, preparo do solo, rotação de culturas, irrigação correta, controle químico, controle biológico, maior espaçamento entre as plantas e linhas e menor densidade de plantas (ABDULLAH; ALI; SULEMAN, 2008; BAE; KNUDSEN, 2007; C. JULIATTI et al., 2019). Os fungicidas agem por tempo limitado e são necessárias várias aplicações durante o desenvolvimento da soja, por exemplo. Em contrapartida, os microrganismos antagonistas têm ação direta nos escleródios, dificultando sua germinação e propagação, sendo esses agentes de biocontrole capazes de se estabelecer rapidamente no solo (ÁVILA et al., 2005; KNUDSEN; DANDURAND, 2014; ZHANG et al., 2016).

A espécie *Sclerotinia sclerotiorum* foi descrita pela primeira vez por Anton de Bary em 1884 (PURDY, 1979). Atualmente, o fungo *S. sclerotiorum* está difundido por todo o país, e as áreas mais afetadas são os estados do Sul, Sudeste e Centro-Oeste, locais com condições climáticas favoráveis ao patógeno, ou seja, alta umidade relativa e temperatura amena, característico de regiões acima de 800 m de altitude (ALMEIDA et al., 1997). O mofo branco tem se tornado uma doença de grande importância para a cultura de soja em muitas regiões do Centro-Sul do Brasil. Além do clima propício a doença (LEITE, 2005), o uso de sementes contaminadas e a rotação de culturas com espécies suscetíveis, colaboram para o alto índice do mofo branco nos cultivos. A fase mais vulnerável ao ataque do patógeno estende-se da floração plena ao início da formação de vagens e enchimento dos grãos (DANIELSON; NELSON; HELMS, 2004).

Dessa forma, nossa hipótese é de que um consórcio de estirpes de *Trichoderma* spp. presentes na Coleção de Culturas de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA) da Empresa Brasileira para Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), providos de ambiente Amazônico, possuam um potencial biotecnológico para formulação de inoculante para fins nutricionais e controle de fitopatógenos. Essas cepas coletados de solos amazônicos apresentam crescimento rápido, característica importante para um fungo com ação biofungicida, portanto, sendo avaliados para o controle biológico do mofo branco em soja. Dessa forma, esse estudo buscará construir uma comunidade sintética visando a elaboração de inoculantes que ajudem a minimizar o uso de fertilizantes fosforados e agrotóxicos.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, M. T.; ALI, N. Y.; SULEMAN, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, v. 27, n. 10, p. 1354–1359, 2008.
- ADESEMOYE, A. O.; KLOEPPER, J. W. Plant – microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. **Applied Microbiol Biotechnol**, v. 85, p. 1–12, 2009.
- ALMEIDA, A. M. R. et al. Doenças da soja. In: **Manual de Fitopatologia**. 1997. p. 597–618.
- ALORI, E. T.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–8, 2017.
- ALTOMARE, C. et al. Solubilization of Phosphates and Micronutrients by the Plant-Growth-Promoting and Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2926–2933, 1999.
- ALVARADO-MARCHENA, L.; RIVERA-MÉNDEZ, W. Molecular Identification of *Trichoderma* spp . in Garlic and Onion Fields and In Vitro Antagonism Trials on *Sclerotium cepivorum*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 40, p. 1–9, 2016.
- AMES, B. Assays of phosphate and phosphatases 115. In: **Methods in enzymology**. 1996. 235p.
- AMIN, F. et al. E Ffect of Volatile Metabolites of *Trichoderma* Species Against Seven Fungal Plant. **Mycological Research**, v. 2, n. 10, p. 34–37, 2010.
- ANAND, K.; KUMARI, B.; MALLICK, M. A. Phosphate solubilizing microbes: An effective and alternative approach as biofertilizers. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 2, p. 37–40, 2016.
- ANDRADE, C. M. et al. Host-induced gene silencing in the necrotrophic fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, v. 65, n. 4, p. 626–632, 2016.
- ASERI, G. K.; JAIN, N.; TARAFDAR, J. C. Hydrolysis of Organic Phosphate Forms by

Phosphatases and Phytase Producing Fungi of Arid and Semi Arid Soils of India. **American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci**, v. 5, n. 4, p. 564–570, 2015.

ÁVILA, Z. R. DE et al. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagônicos a *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, p. 30, 2005.

BAE, Y. S.; KNUDSEN, G. R. Effect of sclerotial distribution pattern of *Sclerotinia sclerotiorum* on biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. **Applied Soil Ecology**, v. 35, n. 1, p. 21–24, 2007.

BENÍTEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249–260, 2004.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012.

BINI, D.; LOPEZ, M. V. Transformação microbiana do P. In: **Microbiologia do solo**. Piracicaba: 2016. p. 149–163.

BIRHANU, G. et al. Phosphate solubilizing fungi isolated and characterized from Teff rhizosphere soil collected from North Showa zone, Ethiopia. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 17, p. 687–696, 2017.

BOLAN, N. S. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. **Plant and Soil**, v. 134, p. 189–207, 1991.

BORGES CHAGAS, L. F. et al. Evaluation of the phosphate solubilization potential of *Trichoderma* strains (Trichoplus JCO) and effects on rice biomass. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 15, n. 3, p. 794–804, 2015.

BROTMAN, Y. et al. *Trichoderma*-Plant Root Colonization: Escaping Early Plant Defense Responses and Activation of the Antioxidant Machinery for Saline Stress Tolerance. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 3, 2013.

BUTT, T. M. Fungal biological control agents. **The Royal Society of Chemistry**, p. 186–191, 2000.

C. JULIATTI, F. et al. *Trichoderma* as a Biocontrol Agent against *Sclerotinia* Stem Rot or White Mold on Soybeans in Brazil: Usage and Technology . ***Trichoderma - The Most Widely Used Fungicide***, p. 1–23, 2019.

CAMARGO, M. S. A importância do uso de fertilizantes para o meio ambiente. ***Pesquisa & Tecnologia***, v. 9, n. 2, p. 1–4, 2012.

CASEY, A.; WALSH, G. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. ***Bioresource Technology***, v. 86, n. 2, p. 183–188, 2003.

CENCIANI, K. et al. Bacteria diversity and microbial biomass in forest, pasture and fallow soils in the southwestern Amazon basin. ***Revista Brasileira de Ciência do Solo***, v. 33, n. 4, p. 907–916, 2009.

CHAGAS, L. F. B. et al. *Trichoderma asperellum* efficiency in soybean yield components. ***Comunicata Scientiae***, v. 8, n. 1, p. 165–169, 2017.

CHUAN-QING, Z. et al. Dissolving mechanism of strain P17 on insoluble phosphorus of yellow-brown soil. ***Brazilian Journal of Microbiology***, v. 45, n. 3, p. 937–943, 2014.

COLLA, G. et al. Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops. v. 95, n. 8, p. 1706–15, 2015.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A. et al. *Trichoderma virens* , a Plant Beneficial Fungus , Enhances Biomass Production and Promotes Lateral Root Growth through an Auxin-Dependent. ***Plant Physiology***, v. 149, n. March, p. 1579–1592, 2009.

COUTINHO, F. P.; FELIX, W. P.; YANO-MELO, A. M. Solubilization of phosphates in vitro by *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. ***Ecological Engineering***, v. 42, p. 85–89, 2012.

DA COSTA SIMÕES, D.; CAIXETA-FILHO, J. V.; PALEKAR, U. S. Fertilizer distribution flows and logistic costs in Brazil: Changes and benefits arising from investments in port terminals. ***International Food and Agribusiness Management Review***, v. 21, n. 3, p. 407–422, 2018.

DANIELSON, G. A.; NELSON, B. D.; HELMS, T. C. Effect of *Sclerotinia* stem rot on yield

of soybean inoculated at different growth stages. **Plant Disease**, v. 88, p. 297–300, 2004.

DE FRANÇA, S. K. S. et al. Biocontrol of sheath blight by *Trichoderma asperellum* in tropical lowland rice. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, n. 1, p. 317–324, 2015.

DE SANTIAGO, A. et al. Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 and glucose addition on iron nutrition in cucumber grown on calcareous soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 57, p. 598–605, 2013.

DELABONA, P. DA S. et al. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 517–521, 2012.

DEVI, P. et al. Characterization of Indian native isolates of *Trichoderma* spp. and assessment of their bio-control efficiency against plant pathogens. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 85, p. 15150–15160, 2012.

DRUZHININA, I.; KUBICEK, C. P. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? **Journal of Zhejiang University Science**, v. 6, n. 2, p. 100–112, 2005.

DRUZHININA, I. S. et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 749–59, 2011.

DRUZHININA, I. S.; SHELEST, E.; KUBICEK, C. P. Novel traits of *Trichoderma* predicted through the analysis of its secretome. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 337, p. 1–9, 2012.

FAO. Fertilizer use by crop in Brazil. **Development Division. Food and Agriculture Organization of the United Nations**, p. 64, 2004.

FAO; OECD. **OECD-FAO Agricultural**. 2015, 145p.

FINK, J. R. et al. Iron oxides and organic matter on soil phosphorus availability. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 4, p. 369–379, 2016.

FORTES, F. DE O. et al. Root induction from microcutting of an *Eucalyptus* sp. clone by *Trichoderma* spp. **Revista Árvore**, v. 31, n. 2, p. 221–228, 2007.

FREITAS, V. D. S. et al. Disponibilidade de cádmio e chumbo para milho em solo adubado

com fertilizantes fosfatados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 6, p. 1899–1907, 2009.

GAIND, S.; NAIN, L. Soil–Phosphorus Mobilization Potential of Phytate Mineralizing Fungi. **Journal of Plant Nutrition**, v. 38, n. 14, p. 2159–2175, 2015.

GARCÍA-LÓPEZ, A. M. et al. Effect of *Bacillus subtilis* QST713 and *Trichoderma asperellum* T34 on P uptake by wheat and how it is modulated by soil properties. **Journal of Soils and Sediments**, v. 18, n. 3, p. 727–738, 2018.

GARCÍA-LÓPEZ, A. M.; AVILÉS, M.; DELGADO, A. Plant uptake of phosphorus from sparingly available P- sources as affected by *Trichoderma asperellum* T34. **Agricultural and Food Science**, v. 24, n. 3, p. 249–260, 2015.

GARCÍA-LÓPEZ, A. M.; AVILÉS, M.; DELGADO, A. Effect of various microorganisms on phosphorus uptake from insoluble Ca-phosphates by cucumber plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 179, n. 4, p. 454–465, 2016.

GARNICA-VERGARA, A. et al. The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ethylene insensitive functioning. **New Phytologist**, v. 209, n. 4, p. 1496–1512, 2016.

GOMES, M. A. F. et al. Nutrientes vegetais no meio ambiente: ciclos bioquímicos, fertilizantes e corretivos. **Embrapa Meio Ambiente: Documentos 66**, p. 62, 2008.

GRANT, C. et al. Soil and fertilizer phosphorus : Effects on plant P supply and mycorrhizal development. **J.Plant Sci.**, p. 3–14, 2005.

HADDAD, P. E. et al. Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *S. sclerotiorum* in soybean. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 52, n. 12, p. 1140–1148, 2017.

HARMAN, G. E. Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v. 84, n. 4, p. 377–393, 2000.

HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species--opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43–56, 2004.

HARMAN, G. E. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp . **Phytopathology**,

v. 96, n. 2, p. 190–194, 2006.

HARMAN, G. E. What are *Trichoderma*?. **Phytopathology**, p. 1–14, 2008.

HARMAN, G. E. Multifunctional fungal plant symbionts: New tools to enhance plant growth and productivity. **New Phytologist**, v. 189, n. 3, p. 647–649, 2011.

HENNEBERG, L. et al. Incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja e sensibilidade dos testes de detecção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 6, p. 763–768, 2012.

HERRERA-ESTRELLA, A. The Biological Control Agent *Trichoderma* From Fundamentals To Applications. In: **Handbook of Fungal Biotechnology**. Irapuato: 2004. p. 147–156.

HINSINGER, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as effected by root-induced chemical changes A review. **Plant and Soil**, v. 237, p. 173–195, 2001.

HOLANDA SENA, H. et al. Erratum to “Production of Biosurfactants by Soil Fungi Isolated from the Amazon Forest”. **International Journal of Microbiology**, v. 2018, p. 1–8, 2018.

HOLMES, K. A. et al. Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin of South America. **Mycological Progress**, v. 3, n. 3, p. 199–210, 2004.

HOORN, C. et al. Amazonia Through Time : Andean Uplift, Climate Change, Landscape Evolution, and Biodiversity. **Science**, v. 330, n. November, p. 927–931, 2010.

HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological Control**, v. 51, n. 3, p. 409–416, 2009.

JAIN, R.; SAXENA, J.; SHARMA, V. Effect of phosphate-solubilizing fungi *Aspergillus awamori* S29 on mungbean (*Vigna radiata* cv. RMG 492) growth. **Folia Microbiologica**, v. 57, n. 6, p. 533–541, 2012.

JAOUANI, A. et al. Purification and characterization of a highly thermostable esterase from the actinobacterium *Geodermatophilus obscurus* strain G20. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, p. 653–660, 2012.

JESUS, E. P. DE et al. Avaliação do potencial de *Trichoderma asperellum* como condicionador de substrato para a produção de mudas de café. **Cerrado Agrociências**, v. 7, n. 2, p. 7–19,

2011.

JIANG, H. et al. Revealing new insights into different phosphorus-starving responses between two maize (*Zea mays*) inbred lines by transcriptomic and proteomic studies. **Scientific Reports**, v. 7, n. December 2016, p. 1–9, 2017.

JIN, J.; TANG, C.; SALE, P. The impact of elevated carbon dioxide on the phosphorus nutrition of plants: A review. **Annals of Botany**, v. 116, n. 6, p. 987–999, 2015.

JUNGK, A. Root hairs and the acquisition of plant nutrients from soil. **Journal Plant Nutr. Soil Sci.**, v. 164, p. 121–129, 2001.

JÚNIOR, A. C. G. Descontaminação e monitoramento de águas e solos na região amazônica utilizando materiais adsorventes alternativos, visando a remoção de metais pesados tóxicos e pesticidas. **Inc. Soc., Brasília, D.F.**, v. 6, p. 105–113, 2013.

JÚNIOR, J. Q. DE O. et al. Nitrogen-fixing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 95–100, 2017.

KAPRI, A.; TEWARI, L. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 787–795, 2010.

KERSHAW, M. J.; TALBOT, N. J. Hydrophobins and Repellents: Proteins with Fundamental Roles in Fungal Morphogenesis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 23, n. 1, p. 18–33, 1998.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; WANI, P. A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – A review. **Agron. Sustain.**, v. 27, p. 29–43, 2007.

KNUDSEN, G. R.; DANDURAND, L. C. Ecological Complexity and the Success of Fungal Biological Control Agents. **Advances in agriculture**, v. 2014, p. 2–11, 2014.

KUMAR, D. P.; KUMAR, R.; ANUPAMA, S. P. D. Studies on Exo-Chitinase Production from *Trichoderma asperellum* UTP-16 and Its Characterization. **Indian J. Microbiol**, v. 52, n. 3, p. 388–395, 2012.

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism

in relation to water deficits in higher plants. **Plant, cell & environment**, v. 25, n. 2, p. 275–294, 2002.

LEE, D.-H.; CHOI, S.-U.; HWANG, Y.-I. Culture conditions and characterizations of a new phytase-producing fungal isolate, *Aspergillus* sp. L117. **Mycobiology**, v. 33, n. 4, p. 223–229, 2005.

LEITE, R. M. V. B. D. C. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. **Comunicado Técnico**, p. 1–3, 2005.

LI, R. et al. Solubilisation of Phosphate and Micronutrients by *Trichoderma harzianum* and ITS Relationship with the Promotion of Tomato Plant Growth. **PLoS ONE**, p. 1–16, 2015.

LO, C.-T. General mechanisms of action of microbial biocontrol agents. **Plant Pathology Bulletin**, v. 7, p. 155–166, 1998.

LOPES, C. A.; REIS, A. Doenças do tomateiro cultivado em ambiente protegido. **Embrapa Hortalizas, Circular técnica**, p. 1–26, 2011.

LÓPEZ-QUINTERO, C. et al. Macrofungal diversity in Colombian Amazon forests varies with regions and regimes of disturbance. **Biodiversity and Conservation**, v. 21, n. 9, p. 2221–2243, 2012.

LUCON, C. M. M. *Trichoderma*: uso do bioagente na produção agrícola brasileira. **Tecnologia Sustentável: Trichoderma**, 2016.

MACRAE, A. et al. Tropical Soil Microbial Communities. In: ROSENBERG E., DELONG E.F., LORY S., STACKEBRANDT E., T. F. (Ed.). **The Prokaryotes**. Springer International Publishing, 2013. p. 85–95.

MARCO, J. L. DE; FELIX, C. R. Purification and Characterization of a β -Glucanase Produced by *Trichoderma harzianum* Showing Biocontrol Potential. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 21–29, 2007.

MARCO, J. L. DE; VALADARES-INGLIS, M. C.; FELIX, C. R. Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *crinipellis perniciososa*, the causal agent of witches' broom of cocoa. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 33–38, 2003.

MARTINS, J. C. R. et al. Nitrogen symbiotically fixed by cowpea and gliricidia in traditional and agroforestry systems under semiarid conditions. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 50, n. 2, p. 178–184, 2015.

MASUNAKA, A.; HYAKUMACHI, M.; TAKENAKA, S. Plant Growth – Promoting Fungus *Trichoderma koningi* Suppresses Isoflavonoid Phytoalexin Vestitol Production for Colonization on / in the Roots of Lotus japonicus. **Microbes Environment**, v. 26, n. 2, p. 128–134, 2011.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 4, p. 261–295, 1996.

MENDES, G. D. O.; LUIZ, A.; FREITAS, M. DE. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. **Ann Microbiol**, v. 64, p. 239–249, 2014.

METCALFE, D. B. et al. Impacts of fire on sources of soil CO₂ efflux in a dry Amazon rain forest. **Global Change Biology**, v. 24, n. 8, p. 3629–3641, 2018.

MIRANSARI, M. Soil microbes and the availability of soil nutrients. **Acta Physiol Plant**, p. 10 p., 2013.

MOHIDDIN, F. A. et al. Why *Trichoderma* is considered super hero (super fungus) against the evil parasites?. **Plant Pathology**, 2010.

MONTERO-BARRIENTOS, M. et al. Overexpression of a *Trichoderma* HSP70 gene increases fungal resistance to heat and other abiotic stresses. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 11, p. 1506–1513, 2008.

MUKHERJEE, M. et al. *Trichoderma* – Plant – Pathogen Interactions : Advances in Genetics of Biological Control. **Indian J. Microbiol**, v. 52, n. 4, p. 522–529, 2012.

MURPHY, J.; RIPELY, J. P. Determination Single Solution Method For The In Natural Waters. **Analytica Chimica Act**, v. 27, p. 31–36, 1962.

NAHAS, E. Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. **Bragantia**, v. 61, n. 3, p. 267–275, 2002.

NAHER, L. et al. *Trichoderma* spp .: a biocontrol agent for sustainable management of plant

diseases. **Pak J Bot**, v. 46, n. 4, p. 1489–1493, 2014.

NAIK, S. K. et al. Inorganic phosphate solubilization by phosphate solubilizing fungi isolated from acidic soils. **African journal of microbiology research**, v. 7, n. 34, p. 4310–4316, 2013.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 170, n. 436, p. 265–270, 1999.

OLIVEIRA, A. G.; DANTOS, G. R.; ETAL. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 3, p. 149–155, 2012.

ORDÓÑEZ-VALENCIA, C. et al. Morphological development of sclerotia by *Sclerotinia sclerotiorum*: a view from light and scanning electron microscopy. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 765–770, 2015.

PACHAURI, R. K. **Climate Change 2014 Synthesis Report**. 2014.

PAPAVIZAS, G. C. Survival of *Trichoderma harzianum* in Soil and in Pea and Bean Rhizospheres. **Phytopathology**, 1982.

PELAGIO-FLORES, R. et al. *Trichoderma*-induced acidification is an early trigger for changes in *Arabidopsis* root growth and determines fungal phytostimulation. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. May, p. 1–13, 2017.

PELEG, Y. et al. Translocation of *Neurospora crassa* transcription factor NUC-1 into the nucleus is induced by phosphorus limitation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 20, n. 3, p. 185–191, 1996.

PEREIRA, J. O. et al. Overview on Biodiversity, Chemistry, and Biotechnological Potential of Microorganisms from the Brazilian Amazon. **Springer International Publishing**, p. 71–103, 2017.

PRASHAR, P.; SHAH, S. Impact of Fertilizers and Pesticides on Soil Microflora in Agriculture. In: **Sustainable Agriculture Reviews**, p. 331–361, 2016.

PTÁČEK, P. Phosphate Rocks. **Intech**, p. 13, 2016.

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, Diseases and Symptomatology, Host Range,

Geographic Distribution, and Impact. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 875–880, 1979.

QUALHATO, T. F. et al. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: Evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 9, p. 1461–1468, 2013.

RAJESH, R. W.; RAHUL, M. S.; AMBALAL, N. S. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 22, p. 1952–1965, 2016.

RAMESH, A. et al. Phytase, Phosphatase Activity and P-Nutrition of Soybean as Influenced by Inoculation of *Bacillus*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 94–99, 2011.

REINO, J. L. et al. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 1, p. 89–123, 2008.

RIBAS, P. P.; RECH, R.; TEREZINHA, A. Potencial in vitro para solubilização de fosfato por *Trichoderma* spp . **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 14, n. 2, p. 70–75, 2016.

RICHARDSON, A. E. et al. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant Soil**, v. 321, p. 305–339, 2009.

RICHARDSON, A. E.; HADOBAS, P. A.; HAYES, J. E. Acid phosphomonoesterase and phytase activities of wheat (*Triticum aestivum* L.) roots and utilization of organic phosphorus substrates by seedlings grown in sterile culture. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, n. 4, p. 397–405, 2000.

RICHARDSON, A. E.; SIMPSON, R. J. Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability Update on Microbial Phosphorus. **Plant Physiology**, v. 156, n. 3, p. 989–996, 2011.

RIMANDO, A. M.; DUKE, S. O. Natural Products for Pest Management. In: **ACS Symposium Series**. 2006. v. 927, p. 2–21.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 319–339, 1999.

ROPER, M. M.; GUPTA, V. V. S. R. Enhancing Non-symbiotic N₂ Fixation in Agriculture.

The Open Agriculture Journal, v. 10, n. 1, p. 7–27, 2016.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 195–206, 2006.

SANDHYA, C. et al. Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation. **J. Basic Microbiol**, v. 44, n. 1, p. 49–58, 2004.

SARAVANAKUMAR, K.; SHANMUGA ARASU, V.; KATHIRESAN, K. Effect of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of *Avicennia marina*. **Aquatic Botany**, v. 104, p. 101–105, 2013.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiol Biotechnol**, v. 87, p. 787–799, 2010.

SHANMUGAIAH, V. et al. Effect of single application of *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorescens* on growth promotion in cotton plants. **African Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 11, p. 1220–1225, 2009.

SHARMA, S. B. et al. Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 1–14, 2013.

SHORESH, M.; HARMAN, G. E.; MASTOURI, F. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 48, p. 21–43, 2010.

SINGH, R.; MAURYA, S.; SANMUKH, R. The improvement of competitive saprophytic capabilities of *Trichoderma* species through the use of chemical mutagens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 10–17, 2015.

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**, v. 12, n. 1, p. 131–143, 2007.

SOUZA, A. A. et al. *Trichoderma harzianum* produces a new thermally stable acid phosphatase, with potential for biotechnological application. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–18, 2016.

SOUZA, V. F. DE; REBELLO, F. D. F. P.; ASCHERI, J. L. R. Fitase: Aspectos gerais e suas

principais aplicações. **Revista Acta Tecnológica**, v. 6, n. 2, p. 69–76, 2011.

STEFFEN, G. P. K.; STEFFEN, R. B.; ANTONIOLLI, Z. I. Contaminação do solo e da água pelo uso de agrotóxicos. **Revista Tecno-lógica**, v. 15, n. 1, p. 15–21, 2011.

STEWART, A.; HILL, R. Applications of *Trichoderma* in Plant Growth Promotion. In: **Biotechnology and Biology of Trichoderma**. 2014. p. 415–425.

STÜRMER, S. L.; SIQUEIRA, J. O. Species richness and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi across distinct land uses in Western Brazilian Amazon. **Mycorrhiza**, v. 21, n. 4, p. 255–267, 2011.

TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Bd. Biochem.**, v. 1, p. 301–307, 1969.

TALBOYS, P. J. et al. Phosphate depletion modulates auxin transport in *Triticum aestivum* leading to altered root branching. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 17, p. 5023–5032, 2014.

TANDON, A. et al. Phosphate solubilization by *Trichoderma koningiopsis* (NBRI-PR5) under abiotic stress conditions. **Journal of King Saud University - Science**, n. xxxx, p. 1–8, 2019.

THONAR, C. et al. Potential of three microbial bio-effectors to promote maize growth and nutrient acquisition from alternative phosphorous fertilizers in contrasting soils. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 4, n. 1, p. 1–16, 2017.

TILMAN, D. et al. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, v. 418, n. August, p. 671–677, 2002.

TRANNIN, I. C.; SIQUEIRA, J. O.; DE SOUZA MOREIRA, F. M. Características biológicas do solo indicadoras de qualidade após dois anos de aplicação de biossólido industrial e cultivo de milho. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 31, n. 5, p. 1173–1184, 2007.

ÜLKER, S. et al. Isolation , production , and characterization of an extracellular lipase from *Trichoderma harzianum* isolated from soil. **Turk J Biol**, v. 35, p. 543–550, 2011.

VAZ, A. B. M. et al. A multiscale study of fungal endophyte communities of the foliar endosphere of native rubber trees in Eastern Amazon. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11,

2018.

VELOSO, C. A. C. et al. Efeito de diferentes materiais no ph do solo. **Scientia Agricola**, v. 49, n. 1, p. 123–128, 1992.

VINALE, F. et al. Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. January, p. 705–711, 2009.

VITTI, G. C.; TREVISAN, W. Manejo de macro e micronutrientes para alta produtividade da soja. **PotaFos - Informações Agronômicas**, n. 90, p. 1–16, 2000.

WAGHUNDE, R. R.; SHELAKE, R. M.; SABALPARA, A. N. *Trichoderma* : A significant fungus for agriculture and environment. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 22, p. 1952–1965, 2016.

WANG, X.; PAN, Q.; CHEN, F. Effects of co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on soybean growth as related to root architecture and availability of N and P. **Mycorrhiza**, v. 21, p. 173–181, 2011.

WITHERS, P. J. A. et al. Transitions to sustainable management of phosphorus in Brazilian agriculture. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

XIAO, C. et al. Evaluation for rock phosphate solubilization in fermentation and soil-plant system using a stress-tolerant phosphate-solubilizing *Aspergillus niger* WHAK1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 1, p. 123–133, 2013.

YEDIDIA, I. et al. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant and Soil**, v. 235, p. 235–242, 2001.

YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N. Induction of Defense Responses in Cucumber Plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 65, n. 3, p. 1061–1070, 1999.

ZANDONÁ, R. R. et al. Chemical and biological seed treatment and their effect on soybean development and yield. **Revista Caatinga**, v. 32, n. 2, p. 559–565, 2019.

ZHANG, F. et al. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against

Sclerotinia sclerotiorum in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 100, p. 64–74, 2016.

ZHANG, F. et al. *Trichoderma*-inoculation and mowing synergistically altered soil available nutrients, rhizosphere chemical compounds and soil microbial community, potentially driving alfalfa growth. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JAN, 2019.

ZHANG, S.; GAN, Y.; XU, B. Application of Plant-Growth-Promoting Fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 Enhances Tolerance of Wheat to Salt Stress through Improvement of Antioxidative Defense System and Gene Expression. **Frontiers in plant science**, v. 7, n. September, 2016.

ZHANG, X.; LI, X.; XIA, L. Heterologous Expression of an Alkali and Thermotolerant Lipase from *Talaromyces thermophilus* in *Trichoderma reesei*. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 176, p. 1722–1735, 2015.

ZHAO, L. et al. Effect of acid phosphatase produced by *Trichoderma asperellum* Q1 on growth of *Arabidopsis* under salt stress. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 16, n. 6, p. 1341–1346, 2017.

ZHAO, L.; ZHANG, Y. Q. Effects of phosphate solubilization and phytohormone production of *Trichoderma asperellum* Q1 on promoting cucumber growth under salt stress. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 8, p. 1588–1597, 2015.

ZHOU, D. et al. *Trichoderma gamsii* affected herbivore feeding behaviour on *Arabidopsis thaliana* by modifying the leaf metabolome and phytohormones. **Microbial Biotechnology**, v. 11, n. 6, p. 1195–1206, 2018.

4. SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO POR *TRICHODERMA* SPP. DOS SOLOS DA FLORESTA AMAZÔNICA MELHORAM O CRESCIMENTO DE PLANTAS DE SOJA

Resumo

Os solos ácidos retêm rapidamente os fertilizantes fosfatados aplicados e, conseqüentemente apresentam baixa disponibilidade deste nutriente para a absorção pelas plantas. O uso de microrganismos solubilizantes de fosfato para ajudar na absorção de fósforo (P) pelas plantas é uma estratégia sustentável e promissora para o manejo de deficiências de P em solos agrícolas. As estirpes de *Trichoderma* spp. têm sido um dos fungos filamentosos mais estudados para melhorar a produção e o desenvolvimento de várias culturas, principalmente devido a sua capacidade de associações simbióticas e a sua capacidade em controlar as doenças das plantas presentes no solo. Assim, este trabalho buscou bioprospectar estirpes de *Trichoderma* spp. da floresta Amazônica capazes de solubilizar/mineralizar o fosfato do solo e promover o crescimento de plantas de soja. As plantas inoculadas com estirpes selecionadas de *Trichoderma* foram cultivadas em solo sob condições de estufa e sob um gradiente de fosfato rochoso e superfosfato triplo. Como resultado, 19,5% de *Trichoderma* spp. foram capazes de solubilizar o fosfato. Além disso, essas cepas produziram diferentes ácidos orgânicos durante o processo de solubilização. As estirpes mostraram respostas positivas na promoção do crescimento da soja - de 2,1% a 41,1% - assim como na eficiência da absorção de P até 156,1%. Estes resultados revelam o potencial de *Trichoderma* spp. do bioma Amazônia como agentes biofertilizantes promissores.

Palavras-chave: Solubilização de fosfato; Absorção de fósforo, *Trichoderma*, Biofertilizantes

Abstract

Acidic soils rapidly retain applied phosphorus fertilizers and consequently present low availability of this nutrient to plants. The use of phosphate-solubilizing microorganisms to help plant phosphorus (P) absorption is a promising sustainable strategy for managing P deficiencies in agricultural soils. *Trichoderma* strains have been one of the most studied filamentous fungi for improving the production and development of several crop species mainly due to their capability for symbiotic associations and their ability to control soil-borne plant diseases. Thus, this work sought to bioprospect *Trichoderma* strains from the Amazon rainforest capable of solubilizing/mineralizing soil phosphate and promoting soybean growth. Soybean plants inoculated with selected *Trichoderma* strains were cultivated in soil under greenhouse conditions and under a gradient of rock phosphate and triple superphosphate. As a result, 19.5% of the isolated *Trichoderma* strains were able to solubilize phosphate. In addition, those strains produced different organic acids during the solubilization process. *Trichoderma* spp. strains showed positive responses in the promotion of soybean growth—from 2.1% to 41.1%—as well as in the efficiency of P uptake-up to 141%. These results reveal the potential of *Trichoderma* spp. from the Amazon biome as promising biofertilizer agents.

Keywords: Phosphate-solubilizing, Phosphorus uptake, *Trichoderma*, Biofertilizer

4.1. INTRODUÇÃO

A alta demanda pelo uso de fertilizantes na agricultura brasileira é resultado do crescimento da população, o que exige um aumento na produção de alimentos (ALORI; GLICK; BABALOLA, 2017). O Brasil é o segundo maior fornecedor de alimentos e produtos agrícolas e deverá ser o principal produtor de alimentos para atender a demanda global no futuro (FAO; OECD, 2015). Assim, as aplicações de fertilizantes são uma atividade rotineira na produção agrícola como uma tentativa de promover o crescimento das culturas para aumentar a produtividade. A necessidade no uso de fertilizantes no campo resulta no acúmulo desses insumos nos solos e na água e, portanto, na poluição ambiental, causando problemas para a saúde humana e animal (ALORI; GLICK; BABALOLA, 2017; RIMANDO; DUKE, 2006). Em pouco tempo, a agricultura terá que ter alternativas para reduzir sua dependência de fertilizantes químicos e, ao mesmo tempo, funcionar de forma lucrativa e mais sustentável (WITHERS et al., 2018).

Uma gama de nutrientes é importante para o crescimento das plantas (TILMAN et al., 2002), mas os que mais limitam a produção agrícola são o nitrogênio e o fósforo, que são importantes no desenvolvimento inicial da planta (MIRANSARI, 2013; RICHARDSON et al., 2009). A fertilização nitrogenada no Brasil diminuiu significativamente com o uso de associações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio (MARTINS et al., 2015; ROPER; GUPTA, 2016). Entretanto, a agricultura brasileira continua a depender da fertilização química com fosfato (WITHERS et al., 2018). O papel do P na planta está associado a três processos bioquímicos essenciais: produção de energia, respiração e fotossíntese. O fósforo também está envolvido em processos enzimáticos e é um componente dos ácidos nucleicos e membranas celulares (ANAND; KUMARI; MALLICK, 2016a; KHAN; ZAIDI; WANI, 2007; NAIK et al., 2013; RAMESH et al., 2011). Esse elemento é geralmente encontrado em menor concentração no solo, 0,01%, comparado a 0,14% de nitrogênio, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (FINK et al., 2016; WANG; PAN; CHEN, 2011). Embora exista uma alta quantidade de fósforo total no solo, sua baixa disponibilidade às plantas é um dos principais obstáculos à produtividade agrícola (ALORI; GLICK; BABALOLA, 2017). A quantidade de P absorvido pelas culturas varia de 10 a 40% do fertilizante fosfatado total aplicado no solo (ADESEMOYE; KLOPPER, 2009). Este fenômeno se deve a um alto grau de reatividade que ocorre entre o fósforo e os constituintes do solo, provocando a fixação do fósforo ou sua precipitação com partículas do solo, tornando-o indisponível para absorção pelas plantas (THONAR et al., 2017).

Em geral, os solos brasileiros apresentam baixo teor de fósforo (0,03 mg disponíveis $P.kg^{-1}$ de solo), exigindo altas aplicações de fertilizantes fosfatados para atender as demandas culturais (COUTINHO; FELIX; YANO-MELO, 2012). O fósforo acessível a microrganismos e plantas fornecido por esses fertilizantes é muito baixo (RICHARDSON; SIMPSON, 2011). O Brasil é o quarto maior país em termos de consumo de fertilizantes. Segundo a Associação Nacional de Difusão de Fertilizantes, as importações de fertilizantes fosfatados e a produção interna de insumos fosfatados em 2017 aumentaram em 56,2% e 33,7%, respectivamente, os maiores aumentos em relação aos fertilizantes nitrogenados e potássicos. A alta taxa de importação desses fertilizantes contribuiu fortemente para um déficit negativo na balança comercial brasileira (DA COSTA SIMÕES; CAIXETA-FILHO; PALEKAR, 2018). Nos últimos vinte anos, a aplicação de fertilizantes fosfatados superou a expansão das terras aráveis devido à rápida fixação do fósforo no solo. Milho, soja e cana-de-açúcar são as culturas que recebem a maior parte desses fertilizantes fosfatados (WITHERS et al., 2018). A fertilidade dos solos tropicais é geralmente dependente de uma fina camada de matéria orgânica associada a serrapilheira. Assim, os solos são altamente intemperizados e tipicamente ácidos, e a disponibilidade de nutrientes depende principalmente do ciclo dos nutrientes (CENCIANI et al., 2009; MACRAE et al., 2013). A floresta Amazônica está entre as florestas com as maiores reservas de biodiversidade (HOORN et al., 2010). A biodiversidade da floresta Amazônica é atribuída à alta variabilidade de nichos dentro dela, da floresta densa à savana, fazendo do Brasil um dos países com grande biodiversidade macro e microbiológica (PEREIRA et al., 2017). Um grande número de microecossistemas, tipos de solo e condições climáticas são favoráveis às comunidades fúngicas do solo, proporcionando uma constante degradação da biomassa florestal (METCALFE et al., 2018; STÜRMER; SIQUEIRA, 2011), o que torna a floresta Amazônica uma fonte substancial de bioprospecção a partir de produtos de origem fúngica.

A aplicação de microrganismos como biofertilizantes é uma abordagem promissora para auxiliar na produção agrícola. Essas aplicações têm contribuído para o crescimento de várias espécies de plantas (ALORI; GLICK; BABALOLA, 2017; SHARMA et al., 2013; XIAO et al., 2013), aumentam a biomassa vegetal e o teor total de P (JAIN; SAXENA; SHARMA, 2012) e participam da ciclagem de P sem afetar o meio ambiente. Os solos agrícolas e de pastagem são compostos por comunidades com uma diversidade maior destes microrganismos envolvidos na disponibilidade do P (ANAND; KUMARI; MALLICK, 2016a; LI et al., 2015). Eles são fundamentais para fornecer fósforo que é retido no solo às plantas (ALORI; GLICK; BABALOLA, 2017) através dos processos de mineralização e solubilização (BHATTACHARYYA; JHA, 2012). Sharma et al. (2013) relataram a capacidade dos fungos

de ocupar espaços e faixas maiores dentro do solo do que as bactérias e de produzir uma gama de ácidos orgânicos que desempenham um papel trivial na solubilização do fosfato inorgânico (SHARMA et al., 2013). Dentro deste contexto, acredita-se que a floresta Amazônica pode ser um excelente bioma para a bioprospecção de cepas fúngicas capazes de solubilizar/mineralizar o fósforo insolúvel e disponibilizar uma porção deste nutrientes para as plantas. Desta forma, a floresta Amazônica pode melhorar o crescimento e a produtividade de uma grande variedade de espécies de culturas.

Os fungos do gênero *Trichoderma* pertencem ao Filo Ascomycota, Subdivisão Pezizomycotina, Classe Sordariomycetes, Ordem Hypocreales e Família Hipocreaceae (DRUZHININA; SHELEST; KUBICEK, 2012; RAJESH; RAHUL; AMBALAL, 2016). São fungos de crescimento rápido no meio de cultura, apresentando inicialmente colônias com a presença de micélio branco, que com o desenvolvimento se torna cotonoso e compacto com tufo verde. São cosmopolitas, encontrados na maioria das vezes nos solos e têm uma importante função ecológica, pois participam da decomposição e mineralização dos resíduos vegetais, contribuindo para a disponibilidade de nutrientes para as plantas, interferindo direta e indiretamente no seu crescimento (BROTMAN et al., 2013; SHORESH; HARMAN; MASTOURI, 2010). *Trichoderma* é comumente estudado para o controle dos fitopatógenos do solo e como biofertilizante. *Trichoderma* têm grande destaque nos estudos, (SHARMA et al., 2013; VINALE et al., 2009) devido à sua predominância na rizosfera de diferentes espécies vegetais, papel no controle de diferentes fitopatógenos, auxilia na promoção do crescimento das plantas através de diferentes mecanismos. Além disso, isolamento fácil, crescimento rápido e capacidade de crescimento em diferentes substratos, bem como sua capacidade de produzir uma alta quantidade de metabólitos, como antibióticos e auxinas (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2009). Estudos recentes relataram a ocorrência de *Trichoderma* em solos da floresta amazônica com capacidade celulolítica (DELABONA et al., 2012; HOLANDA SENA et al., 2018), como endófitos de espécies nativas (VAZ et al., 2018), como produtores de biosurfactantes (HOLANDA SENA et al., 2018) e como agentes de controle biológico (DE FRANÇA et al., 2015; HOLMES et al., 2004). Assim, nosso trabalho buscou bioprospectar estirpes de *Trichoderma* dos solos da floresta Amazônica com a capacidade de solubilizar/mineralizar fosfato e como potencial em promover o crescimento de plantas de soja, pois o ambiente da floresta Amazônica é altamente dependente de microrganismos para ciclagem rápida de nutrientes. Com a aplicação de estirpes de *Trichoderma* spp. no solo, procuramos otimizar o uso de diferentes fontes de fosfatos, assim como os níveis destas fontes.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Local de amostragem

As coletas das amostras de solo foram realizadas no Estado do Amazonas. A partir da cidade de Manaus, três transectos foram determinados e que estenderam até as cidades de Itacoatiara, Novo Airão e Presidente Figueiredo. Para cada um dos transectos, foram feitas coletas de 3 a 5 pontos (Figura 1), em que cada ponto era composto por 3 sub-amostras. Os dados de temperatura do solo e do ar foram registrados para cada ponto de coleta, e as coordenadas geográficas dos 12 pontos georreferenciadas com auxílio de um GPS (Tabela 1).



Figura 1. Mapa da coleta realizada no Estado do Amazonas com a localização dos 12 pontos de coletas.

Para o isolamento de *Trichoderma* foram utilizados 10g de solo de cada amostra, homogeneizadas em 90mL de solução salina (NaCl 0,85%) por 2 horas a 120 rpm. Nas diluições 10^{-2} e 10^{-3} aliquotas de 100ul foram semeadas no meio TSM seletivo para *Trichoderma* (ELAD et al., 1981) em triplicata para cada ponto. Após o crescimento, fragmentos com características morfológicas de *Trichoderma* foram transferidas para meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e purificadas. As culturas não puras foram submetidas a cultura monospórica. Esse procedimento foi realizado até a obtenção de uma cultura pura.

Tabela 1. Pontos de coleta das estirpes de *Trichoderma* spp. dos solos da região de Manaus, na loresta Amazônica.

Pontos de coleta	Número de isolados	Coordenadas		Elevação (m)	Temperatura do solo (°C)	Temperatura do ar (°C)
		S	W			
AMS 1	39	02°50'58.6"	59°24'52.2"	84	24.8	25
AMS 2	7	02°54'41.6"	59°02'25.3"	16	28.2	31.4
AMS 3	10	03°00'45.3"	58°51'13.0"	43	25.5	25
AMS 4	18	03°07'33.2"	60°00'22.9"	41	24.1	25
AMS 5	17	03°12'35.3"	60°40'43.3"	53	25.7	26
AMS 6	29	02°59'21.6"	60°53'36.1"	50	20	25
AMS 7	18	02°51'36.8"	60°58'10.1"	48	26.2	27
AMS 8	20	02°17'49.7"	60°02'38.5"	118	24.1	23
AMS 9	24	01°49'46.1"	60°07'45.3"	107	25.1	25
AMS 10	20	01°28'40.0"	60°15'10.6"	57	28.7	38
AMS 11	26	01°28'52.8"	60°15'19.1"	85	25.2	26
AMS 12	23	01°56'52.4"	60°02'32.1"	146	26.1	27

AM- Estado do Amazonas; S+ número – ponto de coleta.

4.2.2. Microrganismos utilizados nos ensaios

4.2.2.1. *Trichoderma* spp.

Foram avaliados 251 estirpes de *Trichoderma* spp. que estão depositados na Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA), localizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental na Embrapa Meio Ambiente em Jaguariúna/SP. As estirpes foram mantidos pelos métodos de Castellani e em papel de filtro, mantidos a -20 °C.

4.2.2.2. Inóculo de *Trichoderma* spp. para os experimentos em casa de vegetação

As estirpes foram crescidas em placas de Petri contendo meio BDA por sete dias. Dois discos de 8 mm de diâmetro contendo estruturas propagativas de *Trichoderma* spp. foram transferidas assepticamente para sacos de plástico de polipropileno transparentes, capacidade de 500 mL, contendo 100 g de arroz umedecido em água, proporção de 1:1, previamente autoclavado a 121°C e 1 atm de pressão, por 30 minutos. As culturas foram incubadas em B.O.D a 27°C com fotoperíodo de doze horas, por 15 dias (PAPAVIZAS, 1982).

4.2.3. Solubilização de fosfato

4.2.3.1. Seleção de *Trichoderma* spp. solubilizadores de fosfato

Para selecionar as estirpes de *Trichoderma* spp. com potencial na solubilização de fosfato, foram avaliadas as 251 estirpes em meio sólido e líquido junto a uma fonte de fosfato. Dessa forma, *Trichoderma* spp. foram crescidas em meio BDA por um período de sete dias a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Um disco de 5 mm (milímetros) contendo estruturas do fungo foi depositado no centro da placa de Petri de 90 mm contendo o meio NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate) sólido (NAUTIYAL, 1999) com 1 % de Triton 100 como redutor de colônia: 10 g de glicose; 5g de $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)^3$; 5g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g de KCl; 0,1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,5% de ágar e pH 7,0 para volume total igual a 1000 mL. As placas foram incubadas a $27 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a formação de um halo de hidrólise claro ao redor das colônias, confirmando a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio dos fungos.

Para a avaliação em meio NBRIP líquido, três discos de 8mm das estirpes, crescidas em meio BDA, foram transferidas para Erlenmeyer de 50 mL contendo o meio NBRIP (glicose, 10 gramas (g); $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g; KCl, 0,2 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 g). Ao meio foi adicionado, 50 mL de K_2HPO_4 (10%) e 100 mL de CaCl_2 (10%), para formação de precipitado insolúvel de fosfato de cálcio (CaHPO_4). A estimativa da solubilização de fosfato foi realizada em triplicata, incubados a $27 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ em um agitador a 150 rpm no decorrer de 10 dias. Foram realizadas leituras em espectrofotômetro aos 0, 2, 4, 6, 8 e 10 dias. A determinação da concentração de fósforo solúvel foi por meio do método colorimétrico de Murphy & Riley (1962) (MURPHY; RIPELY, 1962). Além disso, foi avaliado o potencial de mineralização das *Trichoderma* spp. em meio PSM contendo fitato (15 g de $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$; 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 g de NaCl; 0,5 g de KCl; 0,01 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g de MnSO_4 ; 5 g de fitato de cálcio e 15 g de agar) (Singh et al, 2014).

Os ácidos orgânicos produzidos no processo de solubilização em meio líquido foi avaliado em cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Aliquotas das amostras com dez dias de incubação foram coletadas e centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos e filtradas em membrana Millipore® 0,2 μm . O extrato foi aplicado em uma coluna Bio-Rad aminex HPX-87H, com fase móvel de acetonitrila de 10,8 % a 0,0035 M de H_2SO_4 e vazão constante de 0,5 mL min^{-1} , $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, U.V. (210 nm) por 35 minutos.

Para selecionar as estirpes para o experimento em casa de vegetação, foi realizada um teste de germinação com as sementes de soja *Glycine max* (L.) Merrill. Suspensões de 1×10^7 conídios/mL dos *Trichoderma* avaliados foram preparadas em tubos de 50 mL. As sementes de

soja, variedade NA 5909 foram desinfestadas e em seguida, colocadas sob agitação nas suspensões, por 30 minutos. O tratamento controle foi composto por uma suspensão de água destilada, sem a presença de *Trichoderma*. Após esse período, foram transferidas 10 sementes para uma placa de Petri de 120 mm contendo papel de filtro úmido, previamente autoclavado. Para cada estirpe foi feita três repetições com dez sementes, totalizando 30 sementes. As placas foram incubadas no escuro, por sete dias. A avaliação foi por meio da porcentagem de sementes germinadas.

4.2.4. Material vegetal e desenho experimental

Um experimento foi realizado em casa de vegetação, a fim de avaliar e verificar o uso de duas diferentes fontes de fósforo na promoção de crescimento de plantas por *Trichoderma* spp. Plantas de soja, variedade NA 5909, foram crescidas em vasos de três litros contendo solo natural da área experimental da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP. O experimento foi realizado em um esquema fatorial (2x2x4) no Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com cinco repetições, totalizando 120 vasos. No bioensaio foram avaliados os seguintes fatores: Duas estirpes de *Trichoderma* spp. (AMS 34.39 e AMS 31.15), quatro níveis de fósforo (0, 50, 70 e 90 kg/ha⁻¹) e duas fontes de fósforo (Superfosfato triplo - 46% de P₂O₅ e Fosfato de rocha Bayóvar – 31% de P₂O₅) (Tabela 2). Para isso, foram utilizados quatro níveis de cada fonte de fósforo estabelecidas de acordo com a análise do solo (Tabela 3). Esse solo é deficiente em P (P_{resina} 5 mg.dm⁻¹) e como apresentava pH ácido (pH 4,4), foi necessário a calagem do solo. Os níveis de fosfato, nível 2, 3 e 4, aplicados ao solo, correspondem a quantidade necessária para se obter uma baixa, média e alta produtividade da cultura da soja, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 2. Tratamentos aplicados ao experimento para promoção de crescimento

Tratamentos	<i>Trichoderma</i>	Fonte de Fosfato	Nível aplicado
T1	Sem <i>Trichoderma</i> (Controle)	Fosfato de Rocha Bayóvar	N1
T2	Sem <i>Trichoderma</i> (Controle)	Fosfato de Rocha Bayóvar	N2
T3	Sem <i>Trichoderma</i> (Controle)	Fosfato de Rocha Bayóvar	N3
T4	Sem <i>Trichoderma</i> (Controle)	Fosfato de Rocha Bayóvar	N4
T5	Sem <i>Trichoderma</i> (Controle)	Fosfato Super Triplo	N1
T6	Sem <i>Trichoderma</i> (Controle)	Fosfato Super Triplo	N2
T7	Sem <i>Trichoderma</i> (Controle)	Fosfato Super Triplo	N3
T8	Sem <i>Trichoderma</i> (Controle)	Fosfato Super Triplo	N4
T9	AMS 34.39	Fosfato de Rocha Bayóvar	N1
T10	AMS 34.39	Fosfato de Rocha Bayóvar	N2
T11	AMS 34.39	Fosfato de Rocha Bayóvar	N3
T12	AMS 34.39	Fosfato de Rocha Bayóvar	N4
T13	AMS 34.39	Fosfato Super Triplo	N1
T14	AMS 34.39	Fosfato Super Triplo	N2
T15	AMS 34.39	Fosfato Super Triplo	N3
T16	AMS 34.39	Fosfato Super Triplo	N4
T17	AMS 31.15	Fosfato de Rocha Bayóvar	N1
T18	AMS 31.15	Fosfato de Rocha Bayóvar	N2
T19	AMS 31.15	Fosfato de Rocha Bayóvar	N3
T20	AMS 31.15	Fosfato de Rocha Bayóvar	N4
T21	AMS 31.15	Fosfato Super Triplo	N1
T22	AMS 31.15	Fosfato Super Triplo	N2
T23	AMS 31.15	Fosfato Super Triplo	N3
T24	AMS 31.15	Fosfato Super Triplo	N4

Níveis de aplicação: (N1) 0 kg/ha; (N2) 50 kg/ha; (N3) 70 kg/ha; (N4) 90 kg/ha

Tabela 3. Propriedades químicas do solo

pH	M.O	P _{resina}	K	Ca	Mg	H+Al	SB	CTC	V
(CaCl ₂)	(g.dm ⁻³)	(mg.dm ⁻³)	-----	-----	mmolc.dm ⁻³	-----	-----	-----	%
6.0	32	6	< 0.9	44	12	< 2	56.5	71.5	79

Os níveis de fósforo foram corrigidos de acordo com o Boletim 100 (Instituto Agrônomo, 1996) por meio da análise química do solo, de acordo com a cultura usada no experimento. Dos níveis avaliados, o primeiro foi o fósforo já presente no solo (N1), sem adição de fosfato (Tabela 3). Adicionalmente, foi realizada adubação de nitrogênio e potássio conforme requisitos da cultura.

Tabela 4. Fonte e níveis de fósforo aplicadas ao solo agrícola.

Fosfato Super Triplo				Fosfato de Rocha Bayóvar				
Níveis								
N1	N2	N3	N4		N1	N2	N3	N4
Sem adição de fosfato	55	75	95	mg/kg ⁻¹	Sem adição de fosfato	80	112	145

O experimento foi conduzido por 45 dias, sob as mesmas condições de temperatura e umidade em casa de vegetação, contendo três plantas por vaso. Nos tratamentos controle não foram adicionados *Trichoderma* sp. ao solo, para cada fonte e nível de fósforo. A avaliação do experimento foi por meio da medida de massa de matéria seca (MMS) da parte aérea e raiz das plantas de soja, além da clorofila avaliada após 21 dias do plantio utilizando medidor portátil (SPAD-502Plus – Konica Minolta) e altura das plantas. Para verificar o teor de fósforo absorvido pelas plantas, as folhas foram coletadas, e lavadas em água corrente. Após secas a 60°C em estufa atingindo peso constante, o material foi triturado e encaminhado para o Laboratório de Tecido Vegetal da ESALQ/USP em Piracicaba-São Paulo. As análises enzimáticas do solo rizosférico foram por meio da avaliação das seguintes enzimas: fosfatase ácida e fosfatase alcalina (TABATABAI; BREMNER, 1969); hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA); e fitase (AMES, 1966).

Para determinar a atividade das fosfatases foi utilizado o substrato p-nitrofenil fosfato (PNP 0.05M). Pesou-se 1 grama (g) de solo em frascos de vidro de 50 mL e foram adicionado 4 mL de MUB pH 6.5 (para fosfatase ácida); pH 11 (fosfatase alcalina) e 1 mL da solução PNP em seguida, incubando em banho-maria a 37°C por uma hora. Após uma hora, para interromper a atividade da enzima, adicionou-se 1 mL de cloreto de cálcio (CaCl₂ - 0.5M) e 4 mL de hidróxido de sódio (NaOH – 0.5M). Em seguida, filtrou-se a suspensão de solo em papel filtro Whatman nº 2. Para o controle foi realizado os passos anteriores, porém a adição do PNP foi após a incubação. A leitura foi feita em espectrofotômetro NanoQuant (Infinite M200PRO, Tecan) a 420 nm (nanômetro) e a quantidade de p-nitrofenol foi determinada através da curva padrão de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 µg de p-nitrofenol. A curva foi obtida diluindo 1 mL da solução padrão de p-nitrofenol em 100 mL de água destilada. Em seguida, foram pipetados alíquotas de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 mL e ajustado para 5 mL com água. A atividade da enzima é produzida por hora por grama de solo (µg p-nitrofenol g⁻¹ de solo seco h⁻¹).

A atividade da fitase foi determinada utilizando-se 0,1 g de solo em frascos de 50 mL e foram adicionados 5 mL da solução de acetato de sódio (0.2M) contendo fitato de sódio (1M). As amostras foram incubadas por uma hora a 37°C. Após esse período, 0,5 mL de ácido tricloroacético (10%) foram adicionados para parar a reação. As amostras ficaram em repouso

por cinco minutos, transferiu-se 1,5 mL da suspensão e centrifugou a 10000 rpm, por cinco minutos. Transferiu-se 100 µL do sobrenadante para um novo tubo e acrescentou 1 mL de água destilada e 0,4 do reagente de molibdato. As amostras ficaram em repouso em temperatura ambiente por 10 minutos, para a leitura em espectrofotômetro a 420 nm. Para o controle foi adicionado fitato de sódio após a adição de ácido tricloroacético. A curva padrão foi calculada a partir de 0, 0,4, 0,5, 0,6, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0 e 2,0 mg/mL de fosfato de potássio. Os resultados foram expressos em µg fitato g⁻¹ de solo seco h⁻¹.

Para a atividade da FDA, pesou-se cinco gramas de solo em recipientes de vidro de 250 mL e foram adicionados 20 mL de tampão fosfato de potássio e 200 µl da solução estoque de FDA (2 mg.mL⁻¹ em acetona). As amostras foram colocadas em agitador orbital a 160 rpm por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 20 mL de acetona para parar a reação. Filtrou-se a suspensão de solo em papel filtro Whatman nº 1. A atividade foi determinada em espectrofotômetro a 490 nm. A curva padrão foi calculada a partir de 0, 100, 200, 300 e 400 µg de FDA. Os resultados foram expressos em µg de FDA hidrolisado g⁻¹ de solo seco h⁻¹.

4.2.5. Teste de colonização radicular

Ao final do experimento, foram coletadas três raízes, aleatoriamente, para cada estirpe de *Trichoderma* spp. avaliado, lavadas em água corrente, cortadas em fragmentos e depositadas sobre meio de cultura BDA, contendo pentabiótico (0,05 g por litro de meio) e redutor de colônia Triton X-100. As placas foram incubadas a 27°C por sete dias. A avaliação foi feita por meio do crescimento ou não das estirpes ao redor das raízes.

4.2.6. Análise dos dados e estatística

Todos os testes e experimentos foram realizados com repetições e os valores foram expressos pela média entre eles. Para os testes em laboratório, foi feita uma análise de variância (ANOVA) para avaliar se havia diferença significativa entre as estirpes de *Trichoderma* spp. no processo de solubilização de fosfato, após considerar os pressupostos de normalidade testados pelo teste de Shapiro-Wilk e igualdade de variância pelo teste de Bartlett. Os dados significativos foram comparados utilizando o teste de Tukey ou Scott Knott ($p < 0,05$).

No experimento em casa de vegetação foi aplicado aos dados uma two-way ANOVA para avaliar a significância dos fatores (níveis de fósforo e *Trichoderma* spp.) e sua interação. Foi aplicado o teste de comparação de médias Scott Knott ($p < 0,05$) aos tratamentos. A avaliação

da eficácia da aplicação de *Trichoderma* spp. para cada nível de fósforo nas duas fontes de P foi por meio dos valores absolutos de peso seco (g/planta^{-1}) na melhoria da biomassa das plantas (em %) para cada uma das estirpes calculado em relação ao tratamento sem a presença de *Trichoderma*. Para isso, aplicou-se a seguinte equação:

$$\text{Eficácia (\%)} = \frac{(\text{Trichoderma } x; \text{Nível } y * 100)}{\text{Controle; Nível } y}$$

Onde cada uma das estirpes de *Trichoderma* spp. (x), AMS 34.39 ou AMS 31.15, em cada nível de fósforo (y), 0, 50, 70 ou 90 kg/ha, é comparado aos controles no mesmo nível de P aplicado (y).

A quantidade de fósforo na parte aérea das plantas foi avaliada comparando *Trichoderma* com o tratamento controle, também considerando cada nível de fósforo separadamente. Esse valor foi obtido por meio da multiplicação do teor de fósforo da parte aérea da planta pela a massa seca da mesma. Assim, a eficiência da absorção de P (em %) entre os tratamentos foi calculada pela equação:

$$\text{Eficiência (\%)} = \frac{(\text{Trichoderma } x; \text{Nível } y - \text{Controle; Nível } 1)}{(\text{Control; Nível } y - \text{Controle; Nível } 1)}$$

Onde cada uma das estirpes, AMS 34.39 ou AMS 31.15, em cada nível de fósforo (y), 50, 70 ou 90 kg/há e os controles nos mesmos níveis foram comparados ao controle sem a adição de fósforo, Nível 1.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Isolamento seletivo e seleção de *Trichoderma* spp. com capacidade na solubilização de fosfato

Os fungos solubilizadores de fosfato desempenham um papel importante no aumento da disponibilidade de fósforo para as plantas (MENDES; LUIZ; FREITAS, 2014). Dessa forma, fomos buscar em solos da floresta Amazônica fungos do gênero *Trichoderma* que têm um papel importante na ciclagem de nutrientes. E como existe uma alta camada de serrapilheira nesses ambientes, acreditamos que esses fungos tenham um grande potencial na solubilização de fosfato e na disponibilidade do P. Foram isolados 251 estirpes de *Trichoderma* spp. dos solos amazônicos por meio do meio seletivo TSM, específico para esse gênero fúngico. O número de estirpes referentes a cada um dos doze pontos de coleta estão demonstrados na Tabela 1. Todos

os isolados estão depositados na Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental, na Embrapa Meio Ambiente.

Para a seleção dos fungos solubilizadores de fosfato em meio NBRIP sólido, foi observada uma zona clara ao redor das colônias de *Trichoderma*, que indica que o fosfato presente no meio de cultura foi utilizado pelo microrganismo. Dos duzentos e cinquenta e uma estirpes, quarenta e nove apresentaram-se como promissores no papel de solubilização do fosfato, com halos maiores que 10 milímetros (Tabela 5). Como ainda houve um número grande de isolados para avaliar em meio líquido, selecionamos os que apresentaram halos com valores maiores que 50 milímetros. Foram um total de oito isolados testados em NBRIP líquido.

Tabela 5. Solubilização e Mineralização de fosfato em meio de cultura NBRIP e PSM sólidos e produção de ácidos orgânicos por *Trichoderma* spp.

Tratamentos	Solubilização Mineralização			Média	Erro padrão	Ácidos Orgânicos
	Tamanho do halo (mm)					
	1	2	3			
AMS 34.39	53	53	54	53.3	0.58	Ácido Lático, Ácido Fumárico
	10	10	12	10.7	1.15	
AMS 29.10	57	54	50	53.7	3.51	Ácido Ascórbico, Ácido Glucônico
	11	9	10	10	1.0	
AMS 1.43	56	50	58	54.7	4.16	Ácido Lático
	6	5	5	5.3	0.58	
AMS 2.18b	65	57	49	57	8.0	Ácido Málico
	7	15	9	10.3	4.2	
AMS 31.15	53	60	60	57.7	4.0	Ácido D-Isocítrico, Ácido Fítico, Ácido Cítrico
	12	9	10	10.3	1.5	
AMS 26.10	53	60	60	57.7	4.0	Ácido Málico
	11	10	9	10	1	
MAS 29.6	46	53	55	51.3	4,7	Ácido Lático, Ácido Glucônico
	12	9	10	10,3	1,5	
AMS 2.18a	55	62	64	60.3	4.7	Ácido Ascórbico, Ácido Glucônico
	8	6	6	6.7	1.1	

Os resultados foram promissores, uma vez que o processo de solubilização do fosfato de calcio iniciou-se nas primeiras horas de incubação. De modo geral, a partir do quinto dia de incubação a concentração de fosfato solubilizado aumento gradualmente, não havendo decréscimo após o décimo dia de incubação (Figura 2). A avaliação final em meio NBRIP líquido foi ao décimo dia, no qual cinco estirpes de *Trichoderma* spp. foram selecionadas, com uma taxa de solubilização acima de 80%. São elas: AMS 31.15 (90.3%), AMS 1.43 (85.7%), AMS 2.18a (83.0%), AMS 34.39 (82.6%) e AMS 26.10 (81.4%). O padrão de aumento no processo de solubilização a partir do quinto dia, corrobora com os resultados observados por Ribas et al. (2016). Todavia, os resultados obtidos mostraram-se bem promissores, pois mesmo

após dez dias de incubação, o processo de solubilização do fosfato presente no meio não havia cessado. Alguns autores relataram uma diminuição no processo no sexto e oitavo dia (OLIVEIRA; DANTOS; ETAL., 2012), quarto (ALTOMARE et al., 1999) e quinto dia (KAPRI; TEWARI, 2010) de inculção.

Também foi estudada a produção de ácidos orgânicos das oito estirpes avaliadas. Todas produziram durante o processo de solubilização, dentre os ácidos orgânicos estão o ácido láctico, ácido fumárico, ácido ascórbico, ácido glucônico, ácido d-málico, ácido d-isocítrico, ácido cítrico e ácido fítico (Tabela 5). Adicionalmente, foi verificado o potencial das estirpes em mineralizar fitato de calcio. Os oito isolados apresentaram halos ao redor das colônias em meio PSM (halos de 5,3 a 10,7 milímetros de diâmetro), indicando a capacidade de mineralizar fosfato orgânico na forma de fitato (Tabela 4). O processo de solubilização de fosfato é consequência da liberação de ácidos orgânicos e de diversas enzimas produzidas pelos microrganismos (RAMESH et al., 2011). Todos esses ácidos orgânicos já foram descritos como produzidos por cepas de *Trichoderma* (STEWART; HILL, 2014) (Tabela 4). Os ácidos orgânicos têm grande importância na disponibilidade de fósforo para a planta, pois são capazes de converter o fosfato presente no ambiente em fosfatos di ou monobásicos, que estão prontamente disponíveis para a absorção. O potencial de solubilização de fosfato por espécies de *Trichoderma* vêm sendo reportado em muitos estudos, presentes na rizosfera de plantas de café (JESUS et al., 2011), pepino (YEDIDIA et al., 2001), feijão (RIBAS; RECH; TEREZINHA, 2016) e plantas de manguezal (SARAVANAKUMAR; SHANMUGA ARASU; KATHIRESAN, 2013).

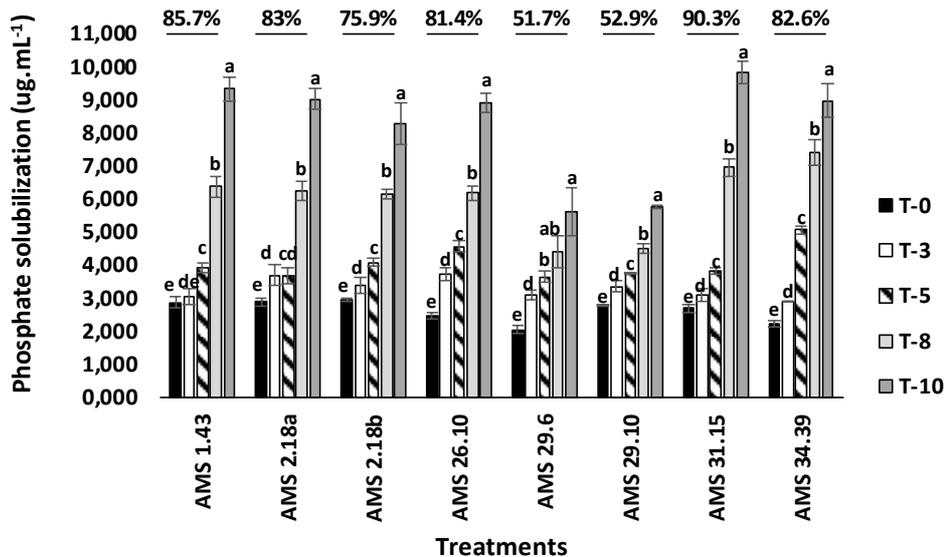


Figura 2. Valores em porcentagem de solubilização do fosfato de cálcio ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) após dez dias de incubação em meio NBRIP líquido por *Trichoderma* spp. T-0, primeiro dia de incubação; T-3, terceiro dia de incubação; T-5, quinto dia de incubação, T-8, oitavo dia de incubação, T-10, décimo dia de incubação. Letras distintas diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Antes de avaliar as cinco *Trichoderma* spp., selecionados acima, em casa de vegetação, foi realizado um teste de germinação de sementes com essas estirpes a fim de saber se elas inibiriam a germinação das sementes de soja. Dois não inibiram a germinação das sementes de soja, AMS 34.39 e AMS 31.15 (Figura 3). Por esse motivo, estes dois isolados foram selecionados para o bioensaio em estufa com plantas de soja.

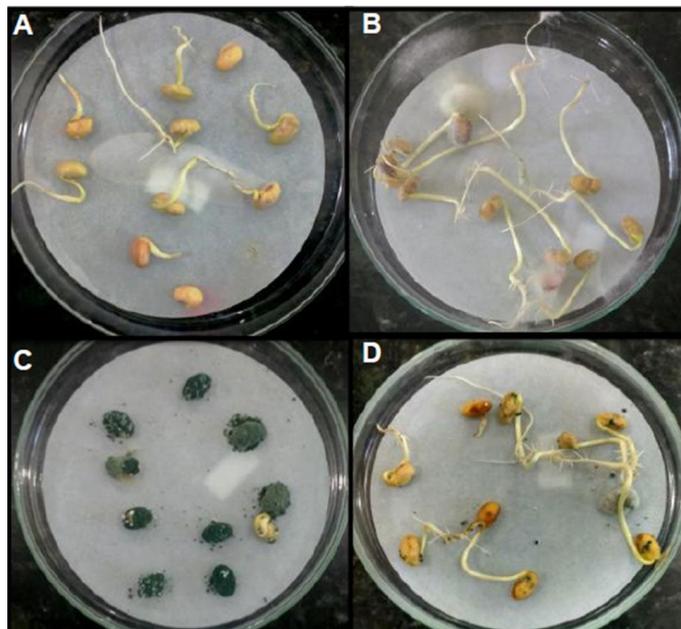


Figura 3. Teste de germinação de sementes de soja imersas em suspensão de conídios de *Trichoderma* spp. (A) Controle; (B) AMS 34.39; (C) AMS 1.43; (D) AMS 31.15.

4.3.2. Influência de *Trichoderma* spp. e fertilizantes fosfatados no desenvolvimento de plantas de soja

A deficiência de fósforo no solo está correlacionado com a diminuição do rendimento de plantas de soja nos estádios reprodutivos iniciais, como menor número de flores e vagens, assim, contribuí para uma queda na produtividade da cultura (VITTI; TREVISAN, 2000). Na ausência de uma fonte de fósforo aplicada ao solo (N1), ou seja, sem a adição das fontes de fosfato de rocha Bayóvar e superfosfato triplo, as plantas de soja, neste estudo, apresentaram um desenvolvimento menor, quando comparadas aos tratamentos que receberam alguma fonte de fósforo (nos níveis 2, 3 e 4) para o controle (sem *Trichoderma*) e as duas estirpes de *Trichoderma* spp. (Figura 4). Entretanto, a combinação de *Trichoderma* sp. e uma fonte de fósforo aumentou significativamente ($p < 0,05$) a biomassa da área foliar das plantas de soja, principalmente nos níveis 3 e 4 (Figura 4A e 4B). Em ambas as fontes de P, a estirpe AMS 34.39 se destacou, na maioria dos tratamentos, quando comparado ao controle no mesmo nível de fosfato aplicado. Essa diferença na melhoria da biomassa foi de 10,7 a 40,7% para o isolado AMS 34.39 na aplicação do fosfato de rocha Bayóvar, quando comparados ao controle. Já a estirpe AMS 31.15, para as mesmas condições, apresentou diferença de 3,6 a 34,8% quando comparada ao controle. Para o superfosfato triplo, o aumento da biomassa variou de 10,5 a 39,6% para AMS 34.39 e de 2,1 a 41,1% para o AMS 31.15. As duas fontes de fósforo mostraram maiores efeitos positivos quando combinadas com as estirpes de *Trichoderma* spp. do que quando aplicadas isoladamente. Esses efeitos também foram dependentes do nível de fosfato aplicado. O potencial de cepas de *Trichoderma* na presença de uma fonte de fósforo também tem sido relatado por outros autores (GARCÍA-LÓPEZ; AVILÉS; DELGADO, 2015; LI et al., 2015; SARAVANAKUMAR; SHANMUGA ARASU; KATHIRESAN, 2013).

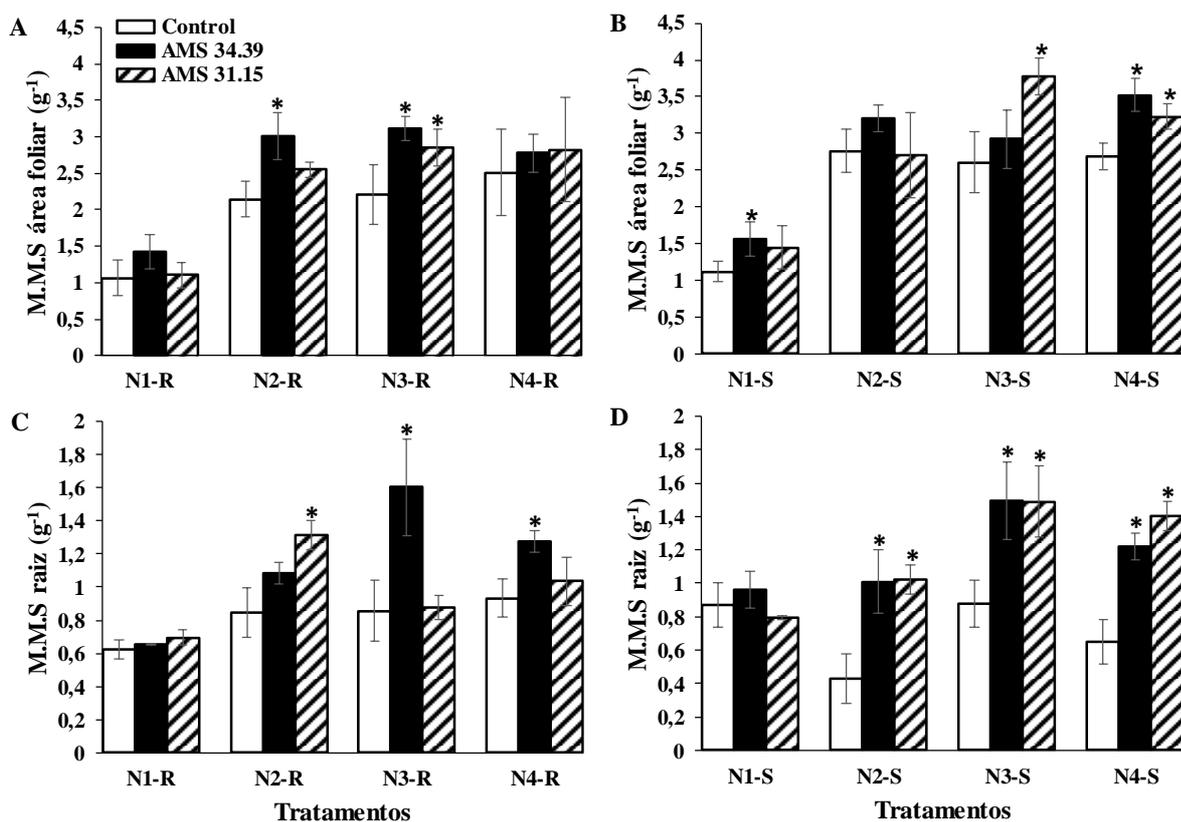


Figura 4. Média da massa de matéria seca da área foliar e raiz de plantas de soja cultivadas em solos com diferentes níveis de P (N1, N2, N3 e N4) e fontes de fósforo (R – Fosfato de rocha Bayóvar, S- Superfosfato triplo) na presença de *Trichoderma* (preto e listrado) e controle (branco). (A) Área foliar - fosfato de rocha Bayóvar; (B) área foliar - superfosfato triplo; (C) raiz - fosfato de rocha Bayóvar; (D) raiz - superfosfato triplo. Letras distintas diferem significativamente de acordo com o teste de Scott Knott ($p < 0,05$).

A melhoria na biomassa das raízes das plantas de soja foi observada, principalmente, quando foi aplicado *Trichoderma* sp. junto a uma fonte de fosfato (Figura 4C e 4D). Esses dados apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) quando se aplicou uma das fontes de P. Assim como para a biomassa foliar, a estirpe AMS 34.39 se destacou quando comparado ao controle e ao AMS 31.15. Para o fosfato de rocha Bayóvar houve um aumento de 4,9 a 87,5%, para o AMS 34.39, e de 3,5 a 53,3% para o isolado AMS 31.15. A melhoria observada para a fonte de superfosfato triplo foi de 10,7 a 134,9% (AMS 34.39) e de 0,9 a 137,2% (AMS 31.15). Todos os resultados de aumento da biomassa da área foliar e radicular estão presentes na tabela 5.

O fósforo que está facilmente disponível para a planta é um ânion fosfato, um elemento pouco móvel no solo e nas plantas, em comparação com outros macronutrientes. Assim, além de transformar o fosfato orgânico em fosfato inorgânico, *Trichoderma* ajuda a aumentar o sistema radicular, contribuindo para uma maior região de absorção de nutrientes pela planta (ZHAO et al., 2017). Há poucos relatos sobre os mecanismos de interação planta-*Trichoderma*

na promoção do crescimento. Possivelmente um dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento radicular é devido à acidificação do local onde há a presença de *Trichoderma*. Este processo resulta no desenvolvimento precoce das raízes, que após os primeiros dias de desenvolvimento ocorre uma inibição da raiz primária e conseqüentemente o desenvolvimento das raízes secundárias (36,49), como mecanismo para escapar à acidificação do meio. Segundo Cornejo, *Trichoderma* melhora o desenvolvimento das raízes laterais ao invés da formação de novas raízes. Muitos autores relataram que durante o processo de solubilização do P, o pH do meio torna-se acidificado, provavelmente devido à produção de ácidos orgânicos (CHAGAS et al., 2017; GARCÍA-LÓPEZ; AVILÉS; DELGADO, 2016; KAPRI; TEWARI, 2010; LI et al., 2015). Assim, uma correlação entre a diminuição do pH e o aumento da solubilização do P influencia o aumento da biomassa das raízes laterais (NAIK et al., 2013) e conseqüentemente aumenta a superfície de absorção do P pelas plantas. Tandon (2019) demonstrou que ao alcalinizar o meio no processo de solubilização do fósforo, a produção micelial e a atividade da fosfatase por *Trichoderma* diminuíram significativamente, o que contribuí para a importância do pH no processo de solubilização do fósforo (TANDON et al., 2019). Combinado com outro mecanismo, que pode ser importante na formação do sistema radicular, a produção de metabólitos, produzidos por uma gama de espécies de *Trichoderma* (GARNICA-VERGARA et al., 2016; PELAGIO-FLORES et al., 2017).

Foi avaliada a eficiência da absorção de fósforo pelas plantas de soja tratadas com *Trichoderma* spp. Em comparação com os valores do controle no nível 1, a estirpe AMS 34.39 mostrou-se com um maior potencial para disponibilizar fósforo para a planta (Tabela 6). Os valores da porcentagem de absorção foi de 111,2 a 156,1% para AMS 34.39 e de 81,7 a 140,6% para AMS 31.15.

Tabela 6. Fonte de fósforo e níveis aplicados aos tratamentos, porcentagem da eficiência na absorção de P pelas plantas de soja e melhoria da biomassa.

Tratamentos	Fonte de P	Nível de P	Eficiência P (%)	Melhoria da biomassa (%)	
				Aérea	Raiz
Controle	Fosfato de rocha Bayóvar	N1	-	-	-
AMS 34.39	Fosfato de rocha Bayóvar	N1	120,5	33,8	4,9
AMS 31.15	Fosfato de rocha Bayóvar	N1	81,7	3,6	11,8
Controle	Fosfato de rocha Bayóvar	N2	-	-	-
AMS 34.39	Fosfato de rocha Bayóvar	N2	132,8	30,8	27,5
AMS 31.15	Fosfato de rocha Bayóvar	N2	111,5	10,5	3,5
Controle	Fosfato de rocha Bayóvar	N3	-	-	-
AMS 34.39	Fosfato de rocha Bayóvar	N3	156,1	40,7	87,5
AMS 31.15	Fosfato de rocha Bayóvar	N3	140,6	34,8	53,3
Controle	Fosfato de rocha Bayóvar	N4	-	-	-
AMS 34.39	Fosfato de rocha Bayóvar	N4	111,2	10,7	36,8
AMS 31.15	Fosfato de rocha Bayóvar	N4	90,7	12,8	11,1
Controle	Fosfato super triplo	N1	-	-	-
AMS 34.39	Fosfato super triplo	N1	140,9	39,6	10,7
AMS 31.15	Fosfato super triplo	N1	121,8	28,7	0,9
Controle	Fosfato super triplo	N2	-	-	-
AMS 34.39	Fosfato super triplo	N2	121,5	10,5	134,9
AMS 31.15	Fosfato super triplo	N2	87,5	2,1	137,2
Controle	Fosfato super triplo	N3	-	-	-
AMS 34.39	Fosfato super triplo	N3	135,1	21,1	130,2
AMS 31.15	Fosfato super triplo	N3	127	41,1	129,2
Controle	Fosfato super triplo	N4	-	-	-
AMS 34.39	Fosfato super triplo	N4	127,8	22,9	39
AMS 31.15	Fosfato super triplo	N4	119,4	18,9	59,1

Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram observadas na altura das plantas de soja nos tratamentos que receberam o inóculo de *Trichoderma* sp. (Figura 5). Essas diferenças foram evidentes principalmente no fosfato de rocha Bayóvar, quando houve a aplicação de *Trichoderma* junto ao fosfato nos três níveis. Além disso, a estirpe AMS 34.39 apresentou resultados mais promissores quando comparada aos outros tratamentos. A mudança na altura das plantas em relação ao tratamento sem *Trichoderma* variou de 9,3 a 35,5% (AMS 34.39) e de 6,5 a 19,4% (AMS 31.15) para o fosfato de rocha e, 3,8 a 13,1% quando aplicado a estirpe AMS 34.39 e de 1,5 a 5,6% para a AMS 31.15 utilizando o superfosfato triplo.

O fosfato de rocha, sendo um fosfato insolúvel, induz uma maior secreção de fosfatases, por exemplo, o que facilita a liberação de fósforo para a planta, auxiliando no desenvolvimento da cultura (QUALHATO et al., 2013). Os mecanismos de solubilização de fosfato diferem não somente entre os isolados fúngicos, mas também entre as fontes de fósforo aplicadas. O superfosfato triplo é composto de um conteúdo maior de P solúvel disponível para a planta do que o fosfato de rocha, considerando que muito desse fósforo, ao ser aplicado, fica retido nos colóides do solo. Dessa forma, a atividade microbiana quando o fosfato de rocha é aplicado é

maior porque uma grande quantidade de fosfato precisa ser mineralizada. Os resultados significativos obtidos nesse trabalho mostram as diferenças entre a aplicação das duas fontes de fosfato. É importante enfatizar o uso do fosfato de rocha, que tem uma liberação relativamente lenta de fósforo, dificultando a retenção nos colóides do solo, além de ser uma fonte mais barata, pois requer um valor baixo de fabricação (PTÁČEK, 2016). A aplicação combinada de *Trichoderma* e o fosfato de rocha Bayóvar, a resposta da planta foi positiva (Figura 5C, 5D e Tabela 5). Essa aplicação conjunta pode ser de grande importância para a agricultura pois há relativamente um valor de custo menor, além da permanência dessa fonte de P ser maior no solo, com a aplicação de *Trichoderma*, a produtividade pode ser maior.

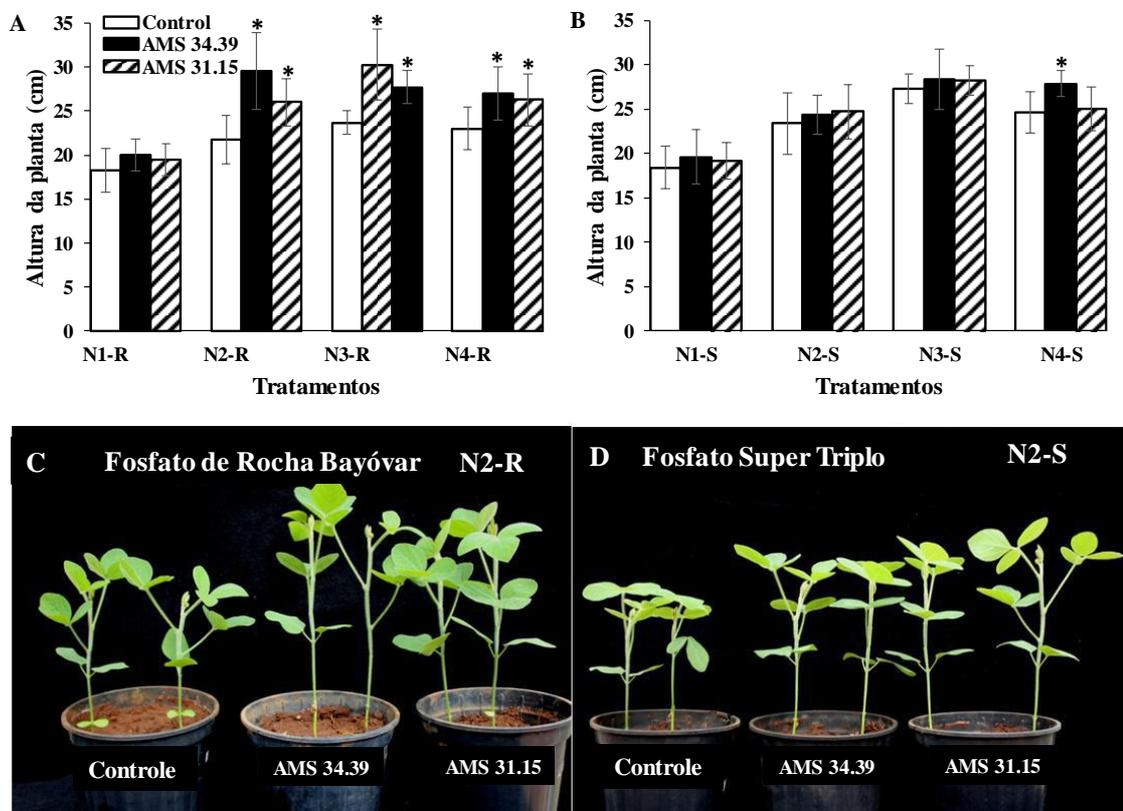


Figura 5. Média da altura de plantas de soja cultivadas em solos com diferentes níveis de P (N1, N2, N3 e N4) e fontes de fósforo (R – Fosfato de rocha Bayóvar, S- Superfosfato triplo) na presença de *Trichoderma* (preto e listrado) e controle (branco). (A) Fosfato de rocha Bayóvar; (B) Superfosfato triplo; (C) Fosfato de rocha Bayóvar; (D) Superfosfato triplo. Letras distintas diferem significativamente de acordo com o teste de Scott Knott ($p < 0,05$).

O índice de clorofila apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) em resposta aos níveis 3 e 4 de fósforo para as duas fontes de fosfato e para as duas estirpes de *Trichoderma* spp. em relação ao controle (Figura 6). Para a fonte de superfosfato triplo, o efeito da aplicação das cepas de *Trichoderma* e o aumento do nível de fósforo foi promissor, sendo significativo

também na aplicação do nível 2 de fósforo. Diferenças foram observadas no aumento da clorofila quando analisado os isolados separadamente. O AMS 34.39 elevou o índice de clorofila de 1,4 a 18,4% para o fosfato de rocha e, de 10,8 a 26% para o super triplo. Assim como, o AMS 31.15 aumentou de 0,8 a 12,7% para o fosfato de rocha e para o super triplo de 10,6 a 24,7%.

A baixa concentração de fósforo no solo reflete uma diminuição na produção de ATP, NADPH e a expressão de genes relacionados à fotossíntese (LAWLOR; CORNIC, 2002). Assim, essas diminuições se refletem no índice de clorofila, pois é uma indicação de pigmentos fotossintéticos (COLLA et al., 2015). Portanto, a aplicação de um fosfato combinado a *Trichoderma* sp. pode ter auxiliado na produção de ATP da planta, bem como na expressão de genes associados à fotossíntese, respondendo ao aumento da clorofila nos resultados obtidos (Figura 6). O superfosfato triplo, uma fonte facilmente disponível no solo, apresentou o resultado mais promissor, pois a análise foi realizada vinte dias após o plantio da cultura, resultado este já esperado. Alguns autores demonstraram o aumento no índice de clorofila devido à presença de *Trichoderma* em diferentes culturas como pepino, trigo, soja e alface (YEDIDIA; BENHAMOU, 1999; ZHANG et al., 2016; ZHANG; GAN; XU, 2016; ZHANG; LI; XIA, 2015).

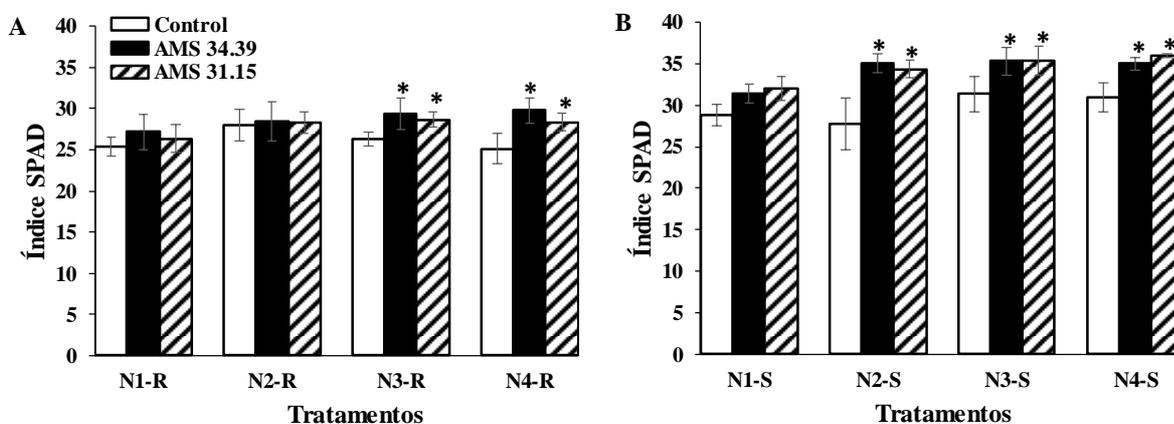


Figura 6. Média do índice de clorofila (SPAD) de plantas de soja cultivadas em solos com diferentes níveis de P (N1, N2, N3 e N4) e fontes de fósforo (R – Fosfato de rocha Bayóvar, S- Superfosfato triplo) na presença de *Trichoderma* (preto e listrado) e controle (branco). (A) Fosfato de rocha Bayóvar; (B) Superfosfato triplo. Letras distintas diferem significativamente de acordo com o teste de Scott Knott ($p < 0,05$).

O desempenho dos isolados de *Trichoderma* spp. foi melhor apresentado na aplicação do fósforo no nível 3, especialmente com a cepa AMS 34.39. Assim, a aplicação de fosfato poderia ser em menor quantidade e com melhor eficiência quando se usa em conjunto

Trichoderma sp. Por exemplo, o nível 3 de fosfato aplicado representa a produtividade média da cultura da soja. Ao aplicar a estirpe AMS 34.39 no nível 3, a eficiência na absorção de P foi de 156,1% e 135,1% em resposta às fontes de fosfato de rocha Bayóvar e superfosfato triplo, respectivamente (Tabela 4). Ao comparar com a eficiência quando aplicado o fósforo no nível 4, o que equivale à alta produtividade do cultivo, observaram-se aumentos de 111,2% e 127,8% para as mesmas fontes de fósforo aplicadas. Assim, ao aplicar 70 kg ha⁻¹ de fosfato (nível 3) o resultado foi melhor para a eficiência na absorção de P pelas plantas de soja do que a aplicação equivalente a 90 kg ha⁻¹ (nível 4).

4.3.3. Atividade enzimática no solo

As fosfatases são enzimas que catalizam a hidrólise de ésteres fosfatados e liberam fósforo solúvel no solo, sendo responsáveis pela mineralização e solubilização do fosfato (NAHAS, 2002). Alguns fatores estão envolvidos no processo de produção de fosfatase por *Trichoderma*, como a presença de um fosfato inorgânico é essencial para uma melhor secreção das fosfatases, além disso, têm sido relatado que a natureza da fonte de fosfato ligada ao processo de solubilização também interfere na atividade (KAPRI; TEWARI, 2010; PELEG et al., 1996; QUALHATO et al., 2013; ZHAO; ZHANG, 2015). Um dos mecanismos de ação de *Trichoderma* para suplementação nutricional das plantas é por meio da produção de enzimas fosfatases. Alguns autores já descreveram a atividade desse gênero fúngico em relação a produção dessas enzimas (GARCÍA-LÓPEZ; AVILÉS; DELGADO, 2015; KAPRI; TEWARI, 2010; SOUZA et al., 2016; ZHAO et al., 2017).

Nossos resultados mostraram-se promissores quanto ao potencial de *Trichoderma* em secretar fosfatase ácida e alcalina. A presença de *Trichoderma* spp., para as duas fontes de fosfato, apresentaram atividade enzimática significativamente maiores ($p < 0,05$) para todos os níveis de P aplicados e para as duas enzimas comparado ao controle correspondente (Figura 7A, 7B, 7C e 7D). Na atividade da fosfatase ácida houve um aumento na secreção da enzima de até 68,4% e 64,7% para a fonte de fosfato de rocha dos isolados AMS 34.39 e AMS 31.15, respectivamente. Para a fonte de superfosfato triplo o aumento foi em até 108,5% e 79,8% para os mesmo isolados. Segundo Naik et al. (2013), a atividade dessa enzima foi maior na presença de uma cepa de *Trichoderma* quando comparadas à outros fungos, como *Aspergillus* e *Penicillium* (NAIK et al., 2013).

Os resultados obtidos para a fosfatase alcalina foram em até 50,4% e 37,7% no aumento da produção da enzima, para a fonte de fosfato de rocha e em até 57% e 52,4% para o

superfosfato triplo, avaliando o potencial dos isolados AMS 34.39 e AMS 31.15, respectivamente, em comparação com o controle.

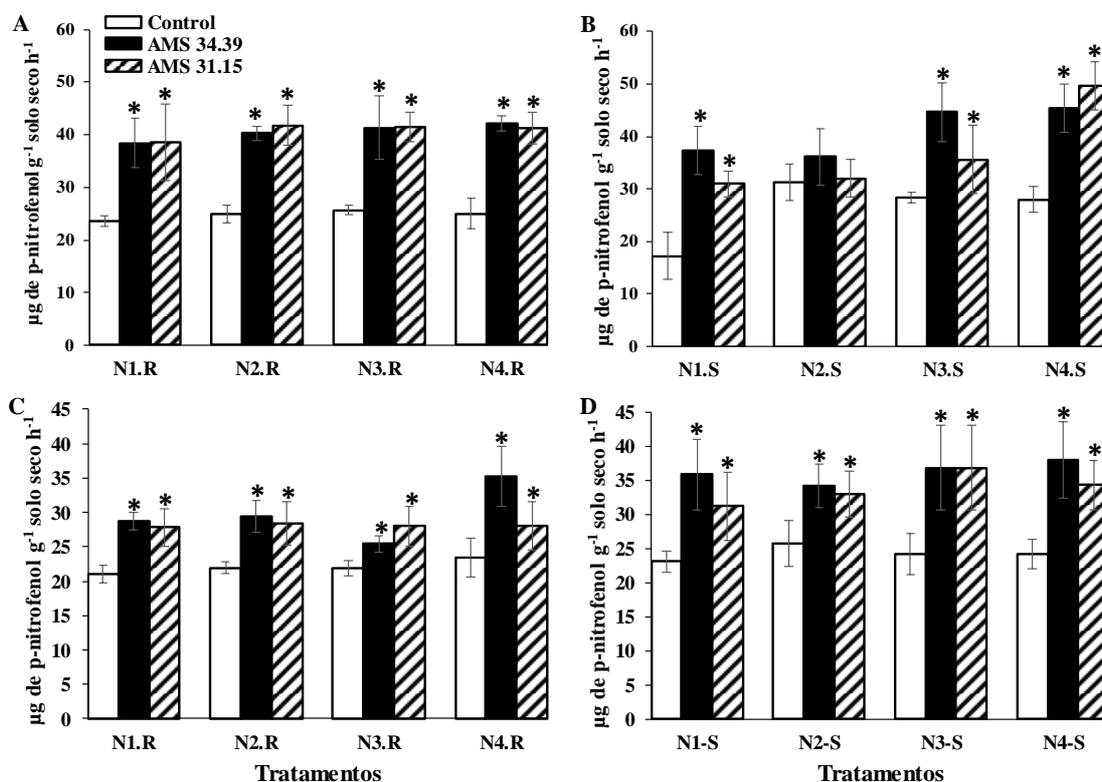


Figura 7. Média da atividade das fosfatases ácida e alcalina no solo com diferentes níveis de P (N1, N2, N3 e N4) e fontes de fósforo (R – Fosfato de rocha Bayóvar, S- Superfosfato triplo) na presença de *Trichoderma* (preto e listrado) e controle (branco). (A) Área foliar - fosfato de rocha Bayóvar; (B) área foliar - superfosfato triplo; (C) raiz - fosfato de rocha Bayóvar; (D) raiz - superfosfato triplo. Letras distintas diferem significativamente de acordo com o teste de Scott Knott ($p < 0,05$).

As fitases são enzimas classificadas dentro do grupo das fosfatases ácidas, com capacidade de hidrolizar o fosfato presente no ácido fítico (ou fitato) gerando mio-inositol e fosfato inorgânico. O fitato é a principal forma de armazenamento de fósforo nas sementes das plantas e, após a sua germinação, esse fitato precisa de degradado para liberar o fósforo que será absorvido pela planta para seu desenvolvimento (CASEY; WALSH, 2003; LEE; CHOI; HWANG, 2005). Dessa forma, alguns microrganismos são capazes de hidrolizar o ácido fítico e liberar P para o ambiente. O gênero *Trichoderma* têm sido relatado pela alta secreção e atividade da fitase (DE SANTIAGO et al., 2013; LI et al., 2015; SARAVANAKUMAR; SHANMUGA ARASU; KATHIRESAN, 2013). Os resultados obtidos com a aplicação de *Trichoderma* corroboram com os já encontrados na literatura. Houve diferenças significativas ($p < 0,05$) nos tratamentos com a presença de *Trichoderma* e aqueles sem a inoculação com o fungo para a atividade da fitase. Todos os níveis de fosfato aplicado e nas duas fontes de P foi

observado essa diferença significativa (Figura 8). Os isolados AMS 34.39 e AMS 31.15 promoveram aumentos na atividade da fitase em até 17% e 16%, respectivamente, com a fonte do fosfato rochoso Bayóvar. Da mesma forma, com o uso do superfosfato triplo favoreceu em até 15% e 10% a atividade enzimática para os isolados AMS 34.39 e AMS 31.15, respectivamente.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com os encontrados por esses autores (Figura 8A e 8B). A alta associação com a fase sólida do solo torna o fósforo ligado ao fitato disponível em baixas quantidades, limitando sua absorção pelas plantas (GAIND; NAIN, 2015). Assim, os fertilizantes fosfatados constituem a maioria dos fertilizantes aplicados no solo para alcançar boa produtividade. Muitos fatores podem interferir na eficiência dos microrganismos fosfatossolubilizantes, como a preparação do inoculante, a forma de aplicação no solo e o local onde ele é aplicado (GARCÍA-LÓPEZ; AVILÉS; DELGADO, 2016). Além disso, Garcia Lopes (2018) demonstrou que o tipo de solo pode estar relacionado com a atividade dos microrganismos (GARCÍA-LÓPEZ et al., 2018). Da mesma forma que a concentração de P aplicado nos diferentes solos não foi afetada, mas sua eficiência foi afetada pelas propriedades físicas e químicas do solo (CHUAN-QING et al., 2014; JIN; TANG; SALE, 2015).

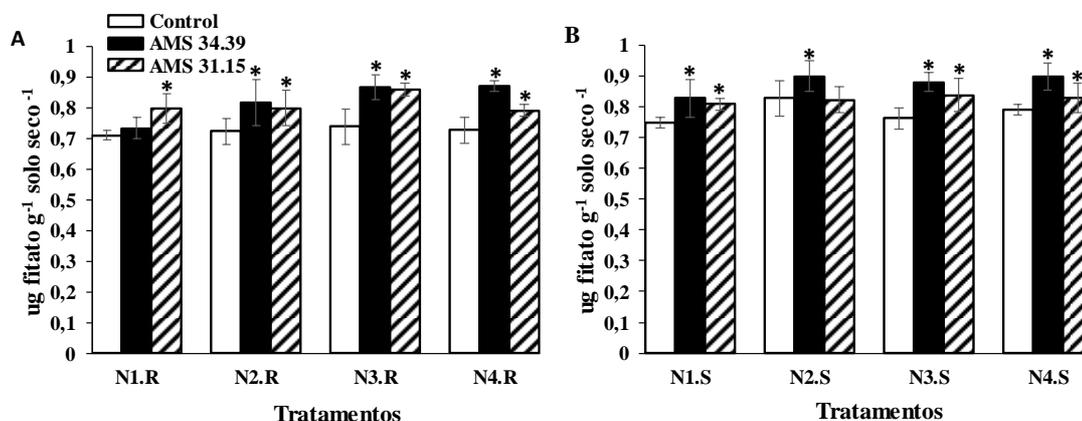


Figura 8. Média da atividade da enzima fitase no solos com diferentes níveis de P (N1, N2, N3 e N4) e fontes de fósforo (R – Fosfato de rocha Bayóvar, S- Superfosfato triplo) na presença de *Trichoderma* (preto e listrado) e controle (branco). (A) Fosfato de rocha Bayóvar; (B) Superfosfato triplo. Letras distintas diferem significativamente de acordo com o teste de Scott Knott ($p < 0,05$).

A hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) é avaliada para quantificar as células ativas no solo e, conseqüentemente, a atividade microbiana (TRANNIN; SIQUEIRA; DE SOUZA MOREIRA, 2007). Dessa forma, os resultados mostraram que a hidrólise da FDA foi estimulada quando aplicado as fontes de fosfato no solo, independente da presença de

Trichoderma e do nível de P (Figura 9). Essas mudanças na hidrólise da FDA apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) principalmente, quando a estirpe AMS 34.39 foi inoculada no solo. No geral, a atividade microbiana no controle foi menor do que nos tratamentos com inoculação dos isolados de *Trichoderma*, o que sugere a presença do fungo na rizosfera das plantas da soja ou alteração na atividade da comunidade microbiana, devido a presença do inóculo.

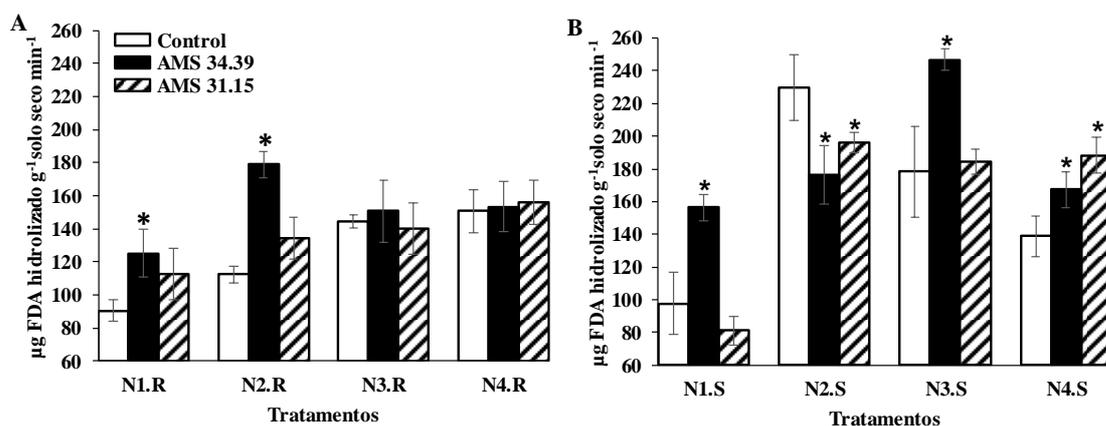


Figura 9. Média da atividade da FDA no solos com diferentes níveis de P (N1, N2, N3 e N4) e fontes de fósforo (R – Fosfato de rocha Bayóvar, S- Superfosfato triplo) na presença de *Trichoderma* (preto e listrado) e controle (branco). (A) Fosfato de rocha Bayóvar; (B) Superfosfato triplo. Letras distintas diferem significativamente de acordo com o teste de Scott Knott ($p < 0,05$).

Ao final do experimento de promoção de crescimento por meio da disponibilidade de fósforo para a planta de soja por *Trichoderma* spp., as raízes foram lavadas, cortadas em pequenos fragmentos e dispostas sobre meio de cultura BDA. Após sete dias de incubação, a avaliação da capacidade de colonização das raízes foi feita pela visualização das estirpes crescidas ao redor das raízes. Os dois isolados foram capazes de colonizar as raízes (Figura 10). Essa habilidade de *Trichoderma* spp. na colonização de raízes é uma característica importante para a atuação desses agentes no controle biológico ou promoção de crescimento de plantas. Para competir com patógenos ou outros microrganismos prejudiciais às plantas, por espaço e/ou nutrientes, esses fungos devem ser capazes de crescer na rizosfera (HARMAN, 2000; SAMUELS, 2006), bem como se estabelecer para poder garantir a interação com a planta.

A eficiência dos microrganismos que ajudam na disponibilidade de P no solo está correlacionada com sua capacidade de promover o crescimento das plantas e de controlar os fitopatógenos que estão presentes no solo. Os agentes de controle biológico com recursos para disponibilizar nutrientes às plantas estão sendo cada vez mais alvo de estudos (DE SANTIAGO et al., 2013; GARCÍA-LÓPEZ et al., 2018). Neste contexto, o gênero *Trichoderma* compreende

fungos de grande importância na agricultura, estes fungos são conhecidos como agentes de controle de doenças para vários patógenos e atuam como promotores de crescimento de várias espécies de culturas (DE FRANÇA et al., 2015; SHARMA et al., 2013; ZHANG et al., 2019; ZHOU et al., 2018).

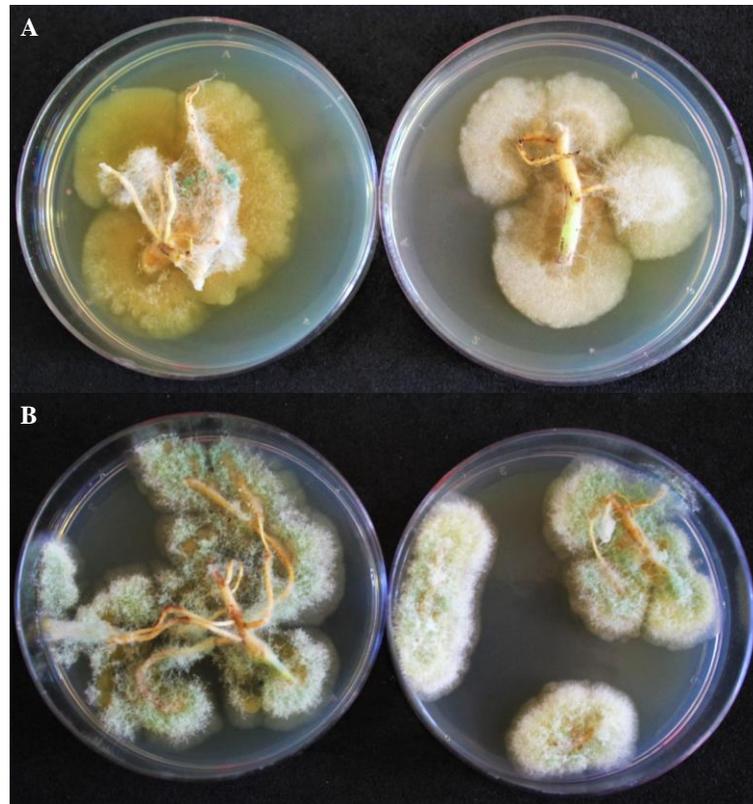


Figura 10. Fragmentos de raízes de soja colonizadas por *Trichoderma* spp. ao final do experimento de promoção de crescimento. (A) AMS 34.39; (B) AMS 31.15.

4.4. Conclusão

Neste estudo, *Trichoderma* spp. isolados dos solos da floresta amazônica demonstraram o potencial de solubilização do fosfato e aumento do crescimento da planta da soja, destacando a importância do bioma Amazônia como fonte de novas cepas microbianas com importância biotecnológica. O fungo, aplicado em conjunto com uma fonte de fósforo, promoveu o crescimento da planta da soja. As duas fontes de fósforo avaliadas neste estudo mostraram efeitos positivos mais elevados quando combinadas com as estirpes de *Trichoderma* spp. do que quando aplicadas isoladamente. Estes efeitos também foram dependentes do nível de P. Pesquisas envolvendo diferentes cepas de *Trichoderma* com atributos benéficos, incluindo a

promoção do crescimento de plantas e o biocontrole de fitopatógenos, devem ser considerados no desenvolvimento de formulações.

Referências

ABDULLAH, M. T.; ALI, N. Y.; SULEMAN, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, v. 27, n. 10, p. 1354–1359, 2008.

ADESEMOYE, A. O.; KLOEPPER, J. W. Plant – microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. **Applied Microbiol Biotechnol**, v. 85, p. 1–12, 2009.

ALMEIDA, A. M. R. et al. Doenças da soja. In: **Manual de Fitopatologia**. 1997. p. 597–618.

ALORI, E. T.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–8, 2017.

ALTOMARE, C. et al. Solubilization of Phosphates and Micronutrients by the Plant-Growth-Promoting and Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2926–2933, 1999.

ALVARADO-MARCHENA, L.; RIVERA-MÉNDEZ, W. Molecular Identification of *Trichoderma* spp . in Garlic and Onion Fields and In Vitro Antagonism Trials on *Sclerotium cepivorum*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 40, p. 1–9, 2016.

AMES, B. Assays of phosphate and phosphatases 115. In: **Methods in enzymology**. 1966. v. 235p. 115–118.

AMIN, F. et al. E Ffect of Volatile Metabolites of *Trichoderma* Species Against Seven Fungal Plant. **Mycological Research**, v. 2, n. 10, p. 34–37, 2010.

ANAND, K.; KUMARI, B.; MALLICK, M. A. Phosphate solubilizing microbes: An effective and alternative approach as biofertilizers. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 2, p. 37–40, 2016.

ANDRADE, C. M. et al. Host-induced gene silencing in the necrotrophic fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, v. 65, n. 4, p. 626–632, 2016.

ASERI, G. K.; JAIN, N.; TARAFDAR, J. C. Hydrolysis of Organic Phosphate Forms by Phosphatases and Phytase Producing Fungi of Arid and Semi Arid Soils of India. **American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci**, v. 5, n. 4, p. 564–570, 2015.

ÁVILA, Z. R. DE et al. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. antagonísticos a *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, p. 30, 2005.

BAE, Y. S.; KNUDSEN, G. R. Effect of sclerotial distribution pattern of *Sclerotinia sclerotiorum* on biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. **Applied Soil Ecology**, v. 35, n. 1, p. 21–24, 2007.

BENÍTEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249–260, 2004.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012.

BINI, D.; LOPEZ, M. V. Transformação microbiana do P. In: **Microbiologia do solo**. 2016. p. 149–163.

BIRHANU, G. et al. Phosphate solubilizing fungi isolated and characterized from TEFF rhizosphere soil collected from North Showa zone, Ethiopia. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 17, p. 687–696, 2017.

BOLAN, N. S. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. **Plant and Soil**, v. 134, p. 189–207, 1991.

BORGES CHAGAS, L. F. et al. Evaluation of the phosphate solubilization potential of *Trichoderma* strains (Trichoplus JCO) and effects on rice biomass. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 15, n. 3, p. 794–804, 2015.

BROTMAN, Y. et al. *Trichoderma*-Plant Root Colonization: Escaping Early Plant Defense Responses and Activation of the Antioxidant Machinery for Saline Stress Tolerance. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 3, 2013.

BUTT, T. M. Fungal biological control agents. **The Royal Society of Chemistry**, p. 186–191,

2000.

C. JULIATTI, F. et al. *Trichoderma* as a Biocontrol Agent against *Sclerotinia* Stem Rot or White Mold on Soybeans in Brazil: Usage and Technology . ***Trichoderma - The Most Widely Used Fungicide***, p. 1–23, 2019.

CAMARGO, M. S. A importância do uso de fertilizantes para o meio ambiente. ***Pesquisa & Tecnologia***, v. 9, n. 2, p. 1–4, 2012.

CASEY, A.; WALSH, G. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. ***Bioresource Technology***, v. 86, n. 2, p. 183–188, 2003.

CENCIANI, K. et al. Bacteria diversity and microbial biomass in forest, pasture and fallow soils in the southwestern Amazon basin. ***Revista Brasileira de Ciência do Solo***, v. 33, n. 4, p. 907–916, 2009.

CHAGAS, L. F. B. et al. *Trichoderma asperellum* efficiency in soybean yield components. ***Comunicata Scientiae***, v. 8, n. 1, p. 165–169, 2017.

CHUAN-QING, Z. et al. Dissolving mechanism of strain P17 on insoluble phosphorus of yellow-brown soil. ***Brazilian Journal of Microbiology***, v. 45, n. 3, p. 937–943, 2014.

COLLA, G. et al. Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops. v. 95, n. 8, p. 1706–15, 2015.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A. et al. *Trichoderma virens* , a Plant Beneficial Fungus , Enhances Biomass Production and Promotes Lateral Root Growth through an Auxin-Dependent. ***Plant Physiology***, v. 149, n. March, p. 1579–1592, 2009.

COUTINHO, F. P.; FELIX, W. P.; YANO-MELO, A. M. Solubilization of phosphates in vitro by *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. ***Ecological Engineering***, v. 42, p. 85–89, 2012.

DA COSTA SIMÕES, D.; CAIXETA-FILHO, J. V.; PALEKAR, U. S. Fertilizer distribution flows and logistic costs in Brazil: Changes and benefits arising from investments in port terminals. ***International Food and Agribusiness Management Review***, v. 21, n. 3, p. 407–422, 2018.

DANIELSON, G. A.; NELSON, B. D.; HELMS, T. C. Effect of *Sclerotinia* stem rot on yield of soybean inoculated at different growth stages. **Plant Disease**, v. 88, p. 297–300, 2004.

DE FRANÇA, S. K. S. et al. Biocontrol of sheath blight by *Trichoderma asperellum* in tropical lowland rice. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, n. 1, p. 317–324, 2015.

DE SANTIAGO, A. et al. Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 and glucose addition on iron nutrition in cucumber grown on calcareous soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 57, p. 598–605, 2013.

DELABONA, P. DA S. et al. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 517–521, 2012.

DEVI, P. et al. Characterization of Indian native isolates of *Trichoderma* spp. and assessment of their bio-control efficiency against plant pathogens. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 85, p. 15150–15160, 2012.

DRUZHININA, I.; KUBICEK, C. P. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? **Journal of Zhejiang University. Science**, v. 6, n. 2, p. 100–112, 2005.

DRUZHININA, I. S. et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 749–59, 2011.

DRUZHININA, I. S.; SHELEST, E.; KUBICEK, C. P. Novel traits of *Trichoderma* predicted through the analysis of its secretome. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 337, p. 1–9, 2012.

FAO. Fertilizer use by crop in Brazil. **Development Division. Food and Agriculture Organization of the United Nations**, p. 64, 2004.

FAO; OECD. **OECD-FAO Agricultural**. 2015.

FINK, J. R. et al. Iron oxides and organic matter on soil phosphorus availability. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 4, p. 369–379, 2016.

FORTES, F. DE O. et al. Root induction from microcutting of an *Eucalyptus* sp. clone by *Trichoderma* spp. **Revista Árvore**, v. 31, n. 2, p. 221–228, 2007.

FREITAS, V. D. S. et al. Disponibilidade de cádmio e chumbo para milho em solo adubado com fertilizantes fosfatados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 6, p. 1899–1907, 2009.

GAIND, S.; NAIN, L. Soil–Phosphorus Mobilization Potential of Phytate Mineralizing Fungi. **Journal of Plant Nutrition**, v. 38, n. 14, p. 2159–2175, 2015.

GARCÍA-LÓPEZ, A. M. et al. Effect of *Bacillus subtilis* QST713 and *Trichoderma asperellum* T34 on P uptake by wheat and how it is modulated by soil properties. **Journal of Soils and Sediments**, v. 18, n. 3, p. 727–738, 2018.

GARCÍA-LÓPEZ, A. M.; AVILÉS, M.; DELGADO, A. Plant uptake of phosphorus from sparingly available P- sources as affected by *Trichoderma asperellum* T34. **Agricultural and Food Science**, v. 24, n. 3, p. 249–260, 2015.

GARCÍA-LÓPEZ, A. M.; AVILÉS, M.; DELGADO, A. Effect of various microorganisms on phosphorus uptake from insoluble Ca-phosphates by cucumber plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 179, n. 4, p. 454–465, 2016.

GARNICA-VERGARA, A. et al. The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ethylene insensitive functioning. **New Phytologist**, v. 209, n. 4, p. 1496–1512, 2016.

GOMES, M. A. F. et al. Nutrientes vegetais no meio ambiente: ciclos bioquímicos, fertilizantes e corretivos. **Embrapa Meio Ambiente: Documentos 66**, p. 62, 2008.

GRANT, C. et al. Soil and fertilizer phosphorus : Effects on plant P supply and mycorrhizal development. **J.Plant Sci.**, p. 3–14, 2005.

HADDAD, P. E. et al. Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *S. sclerotiorum* in soybean. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 52, n. 12, p. 1140–1148, 2017.

HARMAN, G. E. Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v. 84, n. 4, p. 377–393, 2000.

HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43–56, 2004.

HARMAN, G. E. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp . **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 190–194, 2006.

HARMAN, G. E. What are. **Phytopathology**, p. 1–14, 2008.

HARMAN, G. E. Multifunctional fungal plant symbionts: New tools to enhance plant growth and productivity. **New Phytologist**, v. 189, n. 3, p. 647–649, 2011.

HENNEBERG, L. et al. Incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja e sensibilidade dos testes de detecção. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 47, n. 6, p. 763–768, 2012.

HERRERA-ESTRELLA, A. The Biological Control Agent *Trichoderma* From Fundamentals To Applications. In: **Handbook of Fungal Biotechnology**. Irapuato: 2004. p. 147–156.

HINSINGER, P. Bioavailability os soil inorganic P in the rhizosphere as effected by root-induced chemical changes A review. **Plant and Soil**, v. 237, p. 173–195, 2001.

HOLANDA SENA, H. et al. Erratum to “Production of Biosurfactants by Soil Fungi Isolated from the Amazon Forest”. **International Journal of Microbiology**, v. 2018, p. 1–8, 2018.

HOLMES, K. A. et al. Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin of South America. **Mycological Progress**, v. 3, n. 3, p. 199–210, 2004.

HOORN, C. et al. Amazonia Through Time : Andean Uplift, Climate Change, Landscape Evolution, and Biodiversity. **Science**, v. 330, n. November, p. 927–931, 2010.

HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological Control**, v. 51, n. 3, p. 409–416, 2009.

JAIN, R.; SAXENA, J.; SHARMA, V. Effect of phosphate-solubilizing fungi *Aspergillus awamori* S29 on mungbean (*Vigna radiata* cv. RMG 492) growth. **Folia Microbiologica**, v. 57, n. 6, p. 533–541, 2012.

JAOUANI, A. et al. Purification and characterization of a highly thermostable esterase from the actinobacterium *Geodermatophilus obscurus* strain G20. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, p. 653–660, 2012.

JESUS, E. P. DE et al. Avaliação do potencial de *Trichoderma asperellum* como condicionador de substrato para a produção de mudas de café. **Cerrado Agrociências**, v. 7, n. 2, p. 7–19, 2011.

JIANG, H. et al. Revealing new insights into different phosphorus-starving responses between two maize (*Zea mays*) inbred lines by transcriptomic and proteomic studies. **Scientific Reports**, v. 7, n. December 2016, p. 1–9, 2017.

JIN, J.; TANG, C.; SALE, P. The impact of elevated carbon dioxide on the phosphorus nutrition of plants: A review. **Annals of Botany**, v. 116, n. 6, p. 987–999, 2015.

JUNGK, A. Root hairs and the acquisition of plant nutrients from soil. **Journal Plant Nutr. Soil Sci.**, v. 164, p. 121–129, 2001.

JÚNIOR, A. C. G. Descontaminação e monitoramento de águas e solos na região amazônica utilizando materiais adsorventes alternativos , visando a remoção de metais pesados tóxicos e pesticidas. **Inc. Soc., Brasília, D.F.**, v. 6, p. 105–113, 2013.

JÚNIOR, J. Q. DE O. et al. Nitrogen-fixing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 95–100, 2017.

KAPRI, A.; TEWARI, L. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 787–795, 2010.

KERSHAW, M. J.; TALBOT, N. J. Hydrophobins and Repellents: Proteins with Fundamental Roles in Fungal Morphogenesis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 23, n. 1, p. 18–33, 1998.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; WANI, P. A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – A review. **Agron. Sustain.**, v. 27, p. 29–43, 2007.

KNUDSEN, G. R.; DANDURAND, L. C. Ecological Complexity and the Success of Fungal Biological Control Agents. **Advances in agriculture**, v. 2014, p. 2–11, 2014.

KUMAR, D. P.; KUMAR, R.; ANUPAMA, S. P. D. Studies on Exo-Chitinase Production from *Trichoderma asperellum* UTP-16 and Its Characterization. **Indian J. Microbiol**, v. 52, n. 3, p. 388–395, 2012.

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, cell & environment**, v. 25, n. 2, p. 275–294, 2002.

LEE, D.-H.; CHOI, S.-U.; HWANG, Y.-I. Culture conditions and characterizations of a new phytase-producing fungal isolate, *Aspergillus* sp. L117. **Mycobiology**, v. 33, n. 4, p. 223–229, 2005.

LEITE, R. M. V. B. D. C. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. **Comunicado Técnico**, p. 1–3, 2005.

LI, R. et al. Solubilisation of Phosphate and Micronutrients by *Trichoderma harzianum* and Its Relationship with the Promotion of Tomato Plant Growth. **PLoS ONE**, p. 1–16, 2015.

LO, C.-T. General mechanisms of action of microbial biocontrol agents. **Plant Pathology Bulletin**, v. 7, p. 155–166, 1998.

LOPES, C. A.; REIS, A. Doenças do tomateiro cultivado em ambiente protegido. **Embrapa Hortaliças, Circular técnica**, p. 1–26, 2011.

LÓPEZ-QUINTERO, C. et al. Macrofungal diversity in Colombian Amazon forests varies with regions and regimes of disturbance. **Biodiversity and Conservation**, v. 21, n. 9, p. 2221–2243, 2012.

LUCON, C. M. M. *Trichoderma*: uso do bioagente na produção agrícola brasileira. **Tecnologia Sustentável: Trichoderma**, 2016.

MACRAE, A. et al. Tropical Soil Microbial Communities. In: ROSENBERG E., DELONG E.F., LORY S., STACKEBRANDT E., T. F. (Ed.). **The Prokaryotes**. Springer International Publishing, 2013. p. 85–95.

MARCO, J. L. DE; FELIX, C. R. Purification and Characterization of a β -Glucanase Produced by *Trichoderma harzianum* Showing Biocontrol Potential. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 21–29, 2007.

MARCO, J. L. DE; VALADARES-INGLIS, M. C.; FELIX, C. R. Production of reduction of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *crinipellis*

perniciosa , the causal agent of witches ' broom of cocoa. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 33–38, 2003.

MARTINS, J. C. R. et al. Nitrogen symbiotically fixed by cowpea and gliricidia in traditional and agroforestry systems under semiarid conditions. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 50, n. 2, p. 178–184, 2015.

MASUNAKA, A.; HYAKUMACHI, M.; TAKENAKA, S. Plant Growth – Promoting Fungus ,*Trichoderma koningi* Suppresses Isoflavonoid Phytoalexin Vestitol Production for Colonization on / in the Roots of Lotus japonicus. **Microbes Environment**, v. 26, n. 2, p. 128–134, 2011.

MELO, I. S. *Trichoderma* E *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 4, p. 261–295, 1996.

MENDES, G. D. O.; LUIZ, A.; FREITAS, M. DE. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. **Ann Microbiol**, v. 64, p. 239–249, 2014.

METCALFE, D. B. et al. Impacts of fire on sources of soil CO₂ efflux in a dry Amazon rain forest. **Global Change Biology**, v. 24, n. 8, p. 3629–3641, 2018.

MIRANSARI, M. Soil microbes and the availability of soil nutrients. **Acta Physiol Plant**, p. 10 p., 2013.

MOHIDDIN, F. A. et al. Why *Trichoderma* is considered super hero (super fungus) against the evil parasites? **Plant Pathology**, 2010.

MONTERO-BARRIENTOS, M. et al. Overexpression of a *Trichoderma* HSP70 gene increases fungal resistance to heat and other abiotic stresses. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 11, p. 1506–1513, 2008.

MUKHERJEE, M. et al. *Trichoderma* – Plant – Pathogen Interactions : Advances in Genetics of Biological Control. **Indian J. Microbiol**, v. 52, n. 4, p. 522–529, 2012.

MURPHY, J.; RIPELY, J. P. Determination Single Solution Method For The In Natural Waters. **Analytica Chimica Act**, v. 27, p. 31–36, 1962.

NAHAS, E. Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas.

Bragantia, v. 61, n. 3, p. 267–275, 2002.

NAHER, L. et al. *Trichoderma* spp. : a biocontrol agent for sustainable management of plant diseases. **Pak J Bot**, v. 46, n. 4, p. 1489–1493, 2014.

NAIK, S. K. et al. Inorganic phosphate solubilization by phosphate solubilizing fungi isolated from acidic soils. **African journal of microbiology research**, v. 7, n. 34, p. 4310–4316, 2013.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 170, n. 436, p. 265–270, 1999.

OLIVEIRA, A. G. DE et al. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 3, p. 149–155, 2012.

ORDÓÑEZ-VALENCIA, C. et al. Morphological development of sclerotia by *Sclerotinia sclerotiorum*: a view from light and scanning electron microscopy. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 765–770, 2015.

PACHAURI, R. K. **Climate Change 2014 Synthesis Report**. [s.l: s.n.].

PAPAVIZAS, G. C. **Survival of *Trichoderma harzianum* in Soil and in Pea and Bean Rhizospheres** **Phytopathology**, 1982.

PELAGIO-FLORES, R. et al. *Trichoderma*-induced acidification is an early trigger for changes in Arabidopsis root growth and determines fungal phytostimulation. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. May, p. 1–13, 2017.

PELEG, Y. et al. Translocation of *Neurospora crassa* transcription factor NUC-1 into the nucleus is induced by phosphorus limitation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 20, n. 3, p. 185–191, 1996.

PEREIRA, J. O. et al. Overview on Biodiversity, Chemistry, and Biotechnological Potential of Microorganisms from the Brazilian Amazon Jose. **Springer International Publishing**, p. 71–103, 2017.

PRASHAR, P.; SHAH, S. Impact of Fertilizers and Pesticides on Soil Microflora in Agriculture. In: **Sustainable Agriculture Reviews**. [s.l: s.n.]. p. 331–361.

PTÁČEK, P. Phosphate Rocks. **Intech**, p. 13, 2016.

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum* : History, Diseases and Symptomatology, Host Range, Geographic Distribution, and Impact. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 875–880, 1979.

QUALHATO, T. F. et al. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: Evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 9, p. 1461–1468, 2013.

RAJESH, R. W.; RAHUL, M. S.; AMBALAL, N. S. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 22, p. 1952–1965, 2016.

RAMESH, A. et al. Phytase, Phosphatase Activity and P-Nutrition of Soybean as Influenced by Inoculation of *Bacillus*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 94–99, 2011.

REINO, J. L. et al. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 1, p. 89–123, 2008.

RIBAS, P. P.; RECH, R.; TEREZINHA, A. Potencial in vitro para solubilização de fosfato por *Trichoderma* spp . **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 14, n. 2, p. 70–75, 2016.

RICHARDSON, A. E. et al. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant Soil**, v. 321, p. 305–339, 2009.

RICHARDSON, A. E.; HADOBAS, P. A.; HAYES, J. E. Acid phosphomonoesterase and phytase activities of wheat (*Triticum aestivum* L.) roots and utilization of organic phosphorus substrates by seedlings grown in sterile culture. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, n. 4, p. 397–405, 2000.

RICHARDSON, A. E.; SIMPSON, R. J. Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability Update on Microbial Phosphorus. **Plant Physiology**, v. 156, n. 3, p. 989–996, 2011.

RIMANDO, A. M.; DUKE, S. O. Natural Products for Pest Management. In: **ACS Symposium Series**. 2016. v. 927, p. 2–21.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth

promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 319–339, 1999.

ROPER, M. M.; GUPTA, V. V. S. R. Enhancing Non-symbiotic N₂ Fixation in Agriculture. **The Open Agriculture Journal**, v. 10, n. 1, p. 7–27, 2016.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 195–206, 2006.

SANDHYA, C. et al. Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation. **J. Basic Microbiol**, v. 44, n. 1, p. 49–58, 2004.

SARAVANAKUMAR, K.; SHANMUGA ARASU, V.; KATHIRESAN, K. Effect of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of *Avicennia marina*. **Aquatic Botany**, v. 104, p. 101–105, 2013.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiol Biotechnol**, v. 87, p. 787–799, 2010.

SHANMUGAIAH, V. et al. Effect of single application of *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorescens* on growth promotion in cotton plants. **African Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 11, p. 1220–1225, 2009.

SHARMA, S. B. et al. Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 1–14, 2013.

SHORESH, M.; HARMAN, G. E.; MASTOURI, F. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 48, p. 21–43, 2010.

SINGH, R.; MAURYA, S.; SANMUKH, R. The improvement of competitive saprophytic capabilities of *Trichoderma* species through the use of chemical mutagens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 10–17, 2015.

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**, v. 12, n. 1, p. 131–143, 2007.

SOUZA, A. A. et al. *Trichoderma harzianum* produces a new thermally stable acid phosphatase, with potential for biotechnological application. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–18,

2016.

SOUZA, V. F. DE; REBELLO, F. D. F. P.; ASCHERI, J. L. R. Fitase: Aspectos gerais e suas principais aplicações. **Revista Acta Tecnológica**, v. 6, n. 2, p. 69–76, 2011.

STEFFEN, G. P. K.; STEFFEN, R. B.; ANTONIOLLI, Z. I. Contaminação do solo e da água pelo uso de agrotóxicos. **Revista Tecno-lógica**, v. 15, n. 1, p. 15–21, 2011.

STEWART, A.; HILL, R. Applications of *Trichoderma* in Plant Growth Promotion. In: **Biotechnology and Biology of Trichoderma**. p. 415–425, 2014.

STÜRMER, S. L.; SIQUEIRA, J. O. Species richness and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi across distinct land uses in Western Brazilian Amazon. **Mycorrhiza**, v. 21, n. 4, p. 255–267, 2011.

TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Bd. Biochem.**, v. 1, p. 301–307, 1969.

TALBOYS, P. J. et al. Phosphate depletion modulates auxin transport in *Triticum aestivum* leading to altered root branching. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 17, p. 5023–5032, 2014.

TANDON, A. et al. Phosphate solubilization by *Trichoderma koningiopsis* (NBRI-PR5) under abiotic stress conditions. **Journal of King Saud University - Science**, p. 1–8, 2019.

THONAR, C. et al. Potential of three microbial bio-effectors to promote maize growth and nutrient acquisition from alternative phosphorous fertilizers in contrasting soils. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 4, n. 1, p. 1–16, 2017.

TILMAN, D. et al. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, v. 418, n. August, p. 671–677, 2002.

TRANNIN, I. C.; SIQUEIRA, J. O.; DE SOUZA MOREIRA, F. M. Características biológicas do solo indicadoras de qualidade após dois anos de aplicação de biossólido industrial e cultivo de milho. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 31, n. 5, p. 1173–1184, 2007.

ÜLKER, S. et al. Isolation , production , and characterization of an extracellular lipase from *Trichoderma harzianum* isolated from soil. **Turk J Biol**, v. 35, p. 543–550, 2011.

- VAZ, A. B. M. et al. A multiscale study of fungal endophyte communities of the foliar endosphere of native rubber trees in Eastern Amazon. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.
- VELOSO, C. A. C. et al. Efeito de diferentes materiais no pH do solo. **Scientia Agricola**, v. 49, n. 1, p. 123–128, 1992.
- VINALE, F. et al. Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. January, p. 705–711, 2009.
- VITTI, G. C.; TREVISAN, W. Manejo de macro e micronutrientes para alta produtividade da soja. **PotaFos - Informações Agronômicas**, n. 90, p. 1–16, 2000.
- WAGHUNDE, R. R.; SHELAKI, R. M.; SABALPARA, A. N. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 22, p. 1952–1965, 2016.
- WANG, X.; PAN, Q.; CHEN, F. Effects of co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on soybean growth as related to root architecture and availability of N and P. **Mycorrhiza**, v. 21, p. 173–181, 2011.
- WITHERS, P. J. A. et al. Transitions to sustainable management of phosphorus in Brazilian agriculture. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.
- XIAO, C. et al. Evaluation for rock phosphate solubilization in fermentation and soil-plant system using a stress-tolerant phosphate-solubilizing *Aspergillus niger* WHAK1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 1, p. 123–133, 2013.
- YEDIDIA, I. et al. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant and Soil**, v. 235, p. 235–242, 2001.
- YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N. Induction of Defense Responses in Cucumber Plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1061–1070, 1999.
- ZANDONÁ, R. R. et al. Chemical and biological seed treatment and their effect on soybean

development and yield. **Revista Caatinga**, v. 32, n. 2, p. 559–565, 2019.

ZHANG, F. et al. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloé against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 100, p. 64–74, 2016.

ZHANG, F. et al. *Trichoderma*-inoculation and mowing synergistically altered soil available nutrients, rhizosphere chemical compounds and soil microbial community, potentially driving alfalfa growth. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JAN, 2019.

ZHANG, S.; GAN, Y.; XU, B. Application of Plant-Growth-Promoting Fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 Enhances Tolerance of Wheat to Salt Stress through Improvement of Antioxidative Defense System and Gene Expression. **Frontiers in plant science**, v. 7, n. September, 2016.

ZHANG, X.; LI, X.; XIA, L. Heterologous Expression of an Alkali and Thermotolerant Lipase from *Talaromyces thermophilus* in *Trichoderma reesei*. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 176, p. 1722–1735, 2015.

ZHAO, L. et al. Effect of acid phosphatase produced by *Trichoderma asperellum* Q1 on growth of *Arabidopsis* under salt stress. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 16, n. 6, p. 1341–1346, 2017.

ZHAO, L.; ZHANG, Y. Q. Effects of phosphate solubilization and phytohormone production of *Trichoderma asperellum* Q1 on promoting cucumber growth under salt stress. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 8, p. 1588–1597, 2015.

ZHOU, D. et al. *Trichoderma gamsii* affected herbivore feeding behaviour on *Arabidopsis thaliana* by modifying the leaf metabolome and phytohormones. **Microbial Biotechnology**, v. 11, n. 6, p. 1195–1206, 2018.

5. CONTROLE BIOLÓGICO DE *S. SCLEROTIORUM* POR *TRICHODERMA* SPP. DE SOLOS DA FLORESTA AMAZÔNICA EM PLANTAS DE SOJA

Resumo

No Brasil, a presença de uma gama de patógenos de solo estão entre os fatores limitantes para a produção agrícola. Entre os principais patógenos estão os fungos de solo, como *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofo branco. Devido à agressividade e produção de estruturas de resistência, torna-se difícil o controle desse fungo nas áreas agrícolas. O uso de microrganismos como agentes de biocontrole vêm sendo uma estratégia promissora. Entre os agentes de biocontrole mundialmente conhecidos e empregados, as espécies do gênero *Trichoderma* são proeminentes por controlar vários fitopatógenos, promover o crescimento e melhorar a produtividade de culturas economicamente importantes. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial antagônico de 251 estirpes de *Trichoderma* spp., em condições de laboratório e em casa de vegetação na cultura da soja. Os vasos contendo solo foram infestados com *Sclerotinia sclerotiorum* e mantidos em câmara úmida, por sete dias. Após esse período, grãos de arroz colonizados com cada isolado de *Trichoderma* spp. foram incorporados, separadamente, ao solo. Posteriormente foi feito o plantio de sementes de soja. Foram atribuídas notas para avaliar a severidade da doença, considerando as notas de 0 à 4, onde 0 são plantas sem sintomas e 4 plantas tombadas ou mortas. Também foram avaliados a altura, massa de matéria seca da parte aérea e raiz das plantas. Três estirpes de *Trichoderma* spp. aumentaram significativamente a altura, massa de matéria seca da área foliar e raiz e não apresentaram nenhum sintoma do mofo branco. Assim, esse estudo demonstrou o potencial de *Trichoderma* da floresta Amazônica como prováveis futuros inoculantes para a cultura da soja no controle do mofo branco.

Palavras-chave: Biocontrole, Soja, Mofo branco, *Trichoderma*

Abstract

In Brazil, the presence of a range of soil pathogens is one of the limiting factors for agricultural production. Among the main pathogens are the soil fungi, such as *Sclerotinia sclerotiorum*, which causes white mold. Due to the aggressiveness and production of resistance structures, it is difficult to control this fungus in agricultural areas. The use of microorganisms as biocontrol agents has been a promising strategy. Among the world known and employed biocontrol agents, species of the genus *Trichoderma* are prominent for controlling various phytopathogens, promoting growth and improving the productivity of economically important crops. The goal of this work was to evaluate the antagonistic potential of 251 strains of *Trichoderma* spp., under laboratory conditions and in the green house in soybean culture. The pots containing soil were infested with *Sclerotinia sclerotiorum* and kept under moisture for seven days. After this period, grains of rice colonized with each isolate of *Trichoderma* spp. were incorporated separately into the soil. Later, soya seeds were planted. Classifications were

given to assess the severity of the disease, considering the classifications from 0 to 4, where 0 are plants without symptoms and four are plants fallen or dead. The height, dry matter mass of the aerial part and root of the plants were also evaluated. Three strains of *Trichoderma* spp. significantly increased height, dry matter mass of the leaves area and root and showed no symptoms of white mold. Thus, this study demonstrated the potential of *Trichoderma* from the Amazon rainforest as a likely future inoculant for soybean cultivation to control white mold.

Keywords: Biocontrol, Soybean, White mold, *Trichoderma*

5.1. Introdução

O agente causal do mofo branco pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Leotiomycetes, Ordem Helotiales, Família *Sclerotiniaceae*, Gênero *Sclerotinia* (Index Fungarum, 2019). Atualmente são conhecidas taxonomicamente 263 espécies de *Sclerotinia*. A doença causada por esse fungo vem assumindo grande importância devido a diversos fatores como a utilização de sementes contaminadas e/ou infectadas, safras contínuas com monocultivo e sucessão de culturas com espécies suscetíveis ou hospedeiras, além de temperaturas noturnas amenas (abaixo de 18 °C), chuvas prolongadas durante o cultivo, excesso de nitrogênio e irrigação sem controle da quantidade de água fornecida (CAMPOS et al., 2017; LEITE, 2005). Na cultura da soja, a doença relatada a primeira vez, no Brasil, em 1975, no sul do estado do Paraná, causando perdas de até 70% de plantas infectadas em lavouras destinadas a produção de sementes. Estima-se que 23% da área cultivada com soja esteja infestada no país, e os danos podem chegar a 70% (MEYER, 2014). A espécie *Sclerotinia sclerotiorum* foi descrita pela primeira vez por Anton de Bary em 1884 (PURDY, 1979). A fase mais vulnerável ao ataque do patógeno estende-se da floração plena ao início da formação de vagens e enchimento dos grãos (DANIELSON; NELSON; HELMS, 2004). Mesmo com os danos causados por esse patógeno de solo para a cultura da soja, algumas práticas, ou manejos integrados no campo podem auxiliar na diminuição da incidência do mofo branco, como sementes não infestadas, limpeza dos equipamentos, rotação de culturas, uso de cultivares resistentes, controle químico na parte foliar e controle biológico (CAMPOS et al., 2017).

Trichoderma spp. atua no controle biológico dessas doenças, por deter de características importantes para tal finalidade, como crescimento em diferentes meios de cultura, são oportunistas, produtores de grandes quantidades de esporos, competitivos por espaço, nutrientes e luz (BUTT, 2000; HERRERA-ESTRELLA, 2004; MONTERO-BARRIENTOS et al., 2008; SCHUSTER; SCHMOLL, 2010). São fungos encontrados em diferentes tipos de solo, plantas e materiais em decomposição, além de apresentarem características como rápido desenvolvimento (INCH et al., 2011; LUCON, 2016; MELO, 1996). Atuam sobre os patógenos

presentes no solo por meio de diferentes mecanismos de ação, tais como antibiose, competição, parasitismo e indução de resistência (HARMAN, 2006; LO, 1998). O micoparasitismo ocorre por meio da ação de enzimas hidrolítica responsáveis pela morte do microrganismo predado, de modo a servir como alimento ao outro (KUMAR; KUMAR; ANUPAMA, 2012; MARCO; FELIX, 2007; MARCO; VALADARES-INGLIS; FELIX, 2003; SANDHYA et al., 2004; ÜLKER et al., 2011; ZHANG; LI; XIA, 2015). Diversos estudos mostram a eficiência de *Trichoderma* no controle de fitopatógenos em diferentes culturas (HADDAD et al., 2017; JULIATTI et al., 2019; LOUZADA et al., 2009; ZHANG et al., 2016). *Trichoderma* atua de forma preventiva no solo, assim é necessário estar presente ou ser aplicado antes da ocorrência da doença (LUCON, 2016).

Atualmente o uso de agentes de biocontrole ocorre em diferentes países (BABU; PALLAVI, 2013; BAE et al., 2015; GREEN et al., 1999; NAHER et al., 2014). Entretanto, é uma estratégia ainda em crescimento em países da América Latina (COLMENAREZ et al., 2012). *Trichoderma* é o microrganismo mais estudado e utilizado no Brasil como agente de biocontrole (BETTIOL; MORANDI, 2009). No mercado brasileiro há a comercialização de 23 produtos à base de estruturas de *Trichoderma* spp. para o controle de diversos fitopatógenos de solo e 246 bioprodutos à base de *Trichoderma* encontrados mundialmente (BETTIOL et al., 2019; BETTIOL; SILVA; CASTRO, 2019). Nesse contexto, cinco produtos, no Brasil, a base de *Trichoderma* registrado para o controle de *S. sclerotiorum*. Portanto o objetivo do trabalho foi selecionar estirpes de *Trichoderma* spp. providos de solos da floresta Amazônica, para o controle do mofo branco em soja, encontrando uma cepa eficaz para formulação de um possível bioinoculante para aplicação na cultura.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. *Trichoderma* spp.

Foram avaliadas 251 estirpes de *Trichoderma* spp., isolados de solos da floresta Amazônica, que estão depositados na Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA), localizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental na Embrapa Meio Ambiente em Jaguariúna/SP. As estirpes foram mantidas pelos métodos de Castellani e em papel de filtro, mantidos a -20 °C.

5.2.2. *Sclerotinia sclerotiorum*

O isolado de *Sclerotinia sclerotiorum* utilizado nos ensaios foi o CMAA 1105 e foi mantido pelo método de repicagem sucessiva e produção de escleródios.

5.2.3. Inóculo de *Trichoderma* spp. para os experimento em casa de vegetação

As estirpes foram crescidas em placas de Petri contendo meio BDA por sete dias. Dois discos de 8 mm de diâmetro contendo estruturas propagativas das *Trichoderma* spp. foram transferidas assepticamente para sacos de plástico de polipropileno transparentes, capacidade de 500 mL, contendo 100 g de arroz umedecido em água, proporção de 1:1, previamente autoclavado a 121°C e 1 atm de pressão, por 30 minutos. As culturas foram incubadas em B.O.D a 27°C com fotoperíodo de doze horas, por quinze dias (PAPAVIZAS, 1982).

5.2.4. Inóculo de *Sclerotinia sclerotiorum*

Os escleródios foram produzidos em meio de fubá e cenoura, proporção de 20 g de fubá para 80 g de cenoura, autoclavados a 121°C a 1 atm por uma hora. Discos de 8 mm contendo estruturas do fungo foram transferidas para os frascos contendo o meio de cultura. A incubação foi no decorrer de 30 dias à uma temperatura de 22°C. Após o período de incubação, os escleródios foram lavados em água corrente e depositados em papel absorvente dentro da câmara de fluxo laminar até a completa secagem. Os escleródios foram mantidos em geladeira a 4°C.

Para os ensaios em casa de vegetação, os escleródios foram depositados sobre meio de cultura BDA e mantidos por sete dias a 22°C. Após os sete dias, quatro discos de 8 mm foram transferidos para sacos plásticos de polipropileno contendo arroz umedecido, preparados como descrito anteriormente (XXX). Os inóculos foram mantidos a 22°C por 15 dias.

5.2.5. Teste de Patogenicidade de *Sclerotinia sclerotiorum*

O teste de patogenicidade foi realizado com 10 trifólios de plantas de soja sadias no estágio de desenvolvimento V3. Cada trifólio foi considerado uma repetição. Os trifólios foram desinfetados (1 minuto no hiplorito de sódio 2%, 3 minutos em álcool 70% e três lavagens sucessivas com água destilada autoclavada) e dispostos em placas de Petri sobre três folhas de

papel filtro umedecidos e esterilizados. Um disco de 5 mm com estruturas de *S. sclerotiorum* foi depositado sobre o trifólio na superfície adaxial da folha próximo a nervura central. As placas foram incubadas no escuro, com temperatura ambiente, próximo dos 25°C. A avaliação foi realizada após 48, 66 e 90 horas do depósito dos discos de *S. sclerotiorum*, observando a presença ou ausência de lesões (HADDAD et al., 2017).

5.2.6. Seleção de *Trichoderma* spp. quanto ao potencial antagônico a *Sclerotinia sclerotiorum*

Para esse teste foram avaliadas as 251 *Trichoderma* spp., crescidas em meio BDA a 25°C por sete dias. O fungo *S. sclerotiorum* foi crescido em placas de Petri contendo meio BDA a 25°C por sete dias. Após o período de crescimento, um disco de 8 mm contendo estruturas do fungo fitopatogênico foi depositado em uma das extremidades da placa de Petri de 90mm. Um dia após a incubação, discos de 8 mm contendo estruturas das estirpes de *Trichoderma* spp. foram depositadas na outra extremidade da placa de Petri. Sete dias depois foi feita a avaliação do crescimento dos fungos sobre a placa e avaliado a porcentagem de crescimento do patógeno. As placas foram novamente incubadas e após dez dias avaliou-se o potencial antagônico de *Trichoderma* no crescimento sobre as estruturas do patógeno.

As estirpes selecionadas como antagônicas a *S. sclerotiorum* foram avaliadas quanto ao potencial antagônico na germinação de escleródios. Para isso, em tubos de ensaio contendo água destilada com Tween 20[®], estruturas dos fungos foram transferidas e seguida da contagem de conídios com auxílio na câmara de Neubauer até atingir as concentrações de 1×10^7 conídios/mL. Os escleródios foram imersos nas suspensões por 30 minutos sob agitação e transferidos para uma placa de Petri com papel filtro úmido e esterilizado. Foram incubados a 25°C por quinze dias. Após esse período, os escleródios foram desinfetados (3 minutos em hipoclorito de sódio a 1 %, 3 minutos em álcool a 70% e três vezes em água destilada esterilizada) e imediatamente depositados em placas contendo cenoura, previamente desinfetada, por sete dias. A avaliação foi por meio da contagem de escleródios germinados (GÖRGEN et al., 2009).

5.2.7. Teste de Competitividade de *Trichoderma* no solo

A avaliação de competitividade no solo é realizado de acordo com o método de disco difusão em ágar (BAUER et al., 1996). Para isso utilizou-se dois solos de origens distintas, o solo usado nos experimentos em casa de vegetação e o solo de floresta (solo coletado na floresta Amazônica). Os solos foram homogeneizados, separadamente, com Ágar-água e dispostos em placas de Petri. Após solidificar, três discos de 8 mm contendo estruturas propagativas de *Trichoderma* spp. foram depositadas sobre a placa contendo o solo solidificado. Para cada estirpe de *Trichoderma* sp. selecionada nos testes anteriores foram feitas três repetições. No tratamento controle foi depositado discos de 8 mm de BDA sem a presença do fungo. As placas foram incubadas por cinco dias. A capacidade competitiva de *Trichoderma* foi estimada pelo desenvolvimento de uma escala de notas, com valores de 1 a 5, onde (Figura 1):

1. *Trichoderma* cresce por toda a superfície do meio de cultura sem a presença de microrganismos;
2. *Trichoderma* cresce 2/3 sobre o meio de cultura;
3. *Trichoderma* e microrganismos crescem igualmente sobre o meio de cultura;
4. Microrganismos crescem 2/3 sobre o meio de cultura;
5. Microrganismos crescem por toda a superfície do meio, sem a presença de *Trichoderma*.

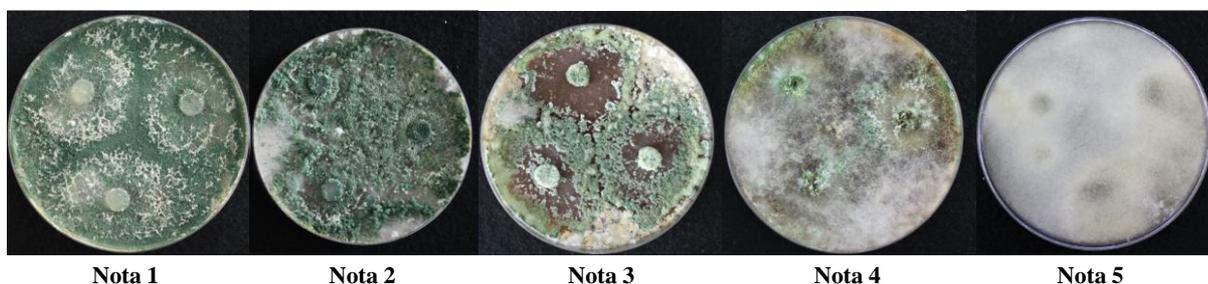


Figura 1. Escala de notas do teste de competitividade de *Trichoderma* spp. no solo.

Adicionalmente, foi feita a avaliação dos isolados de *Trichoderma* spp. em meio BDA no decorrer de sete dias. As placas foram feitas em triplicata para cada estirpe e mantidas incubadas a 27°C. A avaliação foi feita pela medida em centímetro do crescimento da colônia a cada 24h.

5.2.8. Avaliação de *Trichoderma* spp. no controle do mofo branco em casa de vegetação

O experimento foi conduzido na Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna- São Paulo, em vasos com capacidade de três litros. Os inóculos dos fungos selecionados nos testes anteriores e o inóculo de *S. sclerotiorum* foram preparados como descrito nas seções XXX (Figura 2). Cada vaso contendo solo natural da área experimental da Embrapa Meio Ambiente foi infestado com um por cento (relação peso:volume de solo) de arroz colonizado pelo patógeno, de maneira homogênea, e mantido em câmara úmida por sete dias. Após esse período, dois por cento (peso:volume de solo) de arroz colonizados por *Trichoderma* spp. foram incorporados, separadamente, ao solo previamente infestado pelo patógeno. Em seguida, foi realizado o plantio de seis sementes de soja, variedade NA 5909, por vaso. O delineamento experimental aplicado foi Inteiramente Casualizado, com seis repetições para cada *Trichoderma* avaliado. Foram mantidas três plântulas por vaso até o final do experimento. No tratamento controle, arroz sem a presença do patógeno e do antagonista foi adicionado ao solo e, ao tratamento testemunha foi adicionado estruturas de *S. sclerotiorum*, apenas. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação sob irrigação diária, pelo período de 35 dias, com temperatura e umidade verificadas diariamente.

A avaliação do experimento foi pela incidência de sintomas do mofo branco, de acordo com a porcentagem de plantas com sintomas e relação às plantas sem o sintoma e pela escala de notas da doença (COTXARRERA et al., 2002). Além da medida de massa de matéria seca da parte aérea e raiz das plantas e altura. Para identificar os sintomas nas plantas foram observados a haste principal, os pecíolos e as folhas, com a finalidade de constatar a presença de lesões encharcadas de coloração parda e consistência mole, com micélio branco e cotonoso, cobrindo partes dos tecidos nos órgãos afetados.

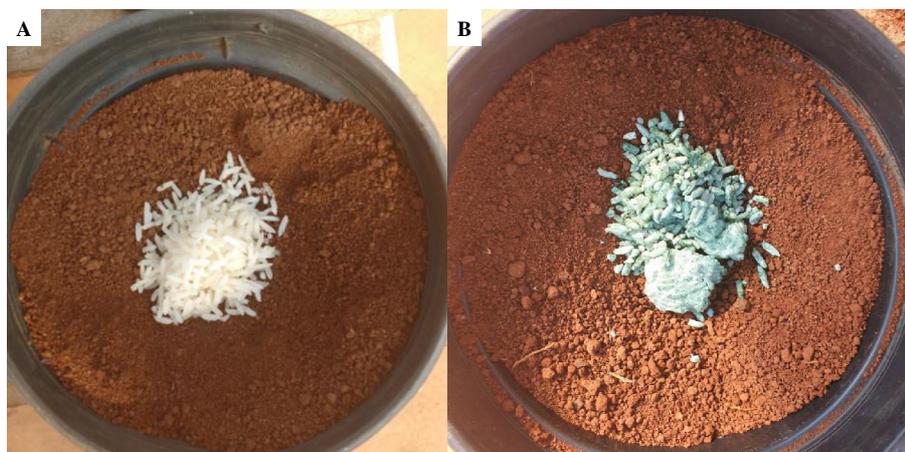


Figura 2. Grãos de arroz depositados no solo para experimento de controle biológico. (A) Grãos de arroz sem colonização de microrganismos; (B) grãos de arroz colonizados com *Trichoderma* sp. (AMS 9.42).

5.2.9. Teste de colonização radicular

Ao final do experimento, foram coletadas três raízes, aleatoriamente, para cada estirpe de *Trichoderma* avaliado, lavadas em água corrente, cortadas em fragmentos e depositadas sobre meio de cultura BDA, contendo pentabiótico (0,05 g por litro de meio) e redutor de colônia Triton X-100. As placas foram incubadas a 27°C por sete dias. A avaliação foi feita por meio do crescimento ou não das estirpes ao redor das raízes.

5.2.10. Análise dos dados e estatística

Os testes e experimentos foram realizados com repetições e os valores finais foram expressos pelas médias entre eles. As análises estatísticas dos dados foram calculadas pelo software estatístico R Studio, usando o pacote *Agricolae* e *ExpDes*. Todas as médias foram submetidas ao teste de variância (ANOVA) para avaliar se houve diferença significativa entre elas. Quando positivo, após considerar os pressupostos de normalidade testados pelo teste de Shapiro-Wilk e igualdade de variância pelo teste de Bartlett, as médias foram comparadas pelo teste de comparação de médias Tukey a 5% de probabilidade.

5.3. Resultados e Discussão

O efeito antagônico de *Trichoderma* spp. foi primeiro verificado por meio do cultivo simultâneo em condições *in vitro*, determinando a área da placa ocupada pelas colônias de *Trichoderma* e *S. sclerotiorum*. No teste de antagonismo direto 61 estirpes de *Trichoderma* spp. cresceram mais de 30% nas placas de Petri, sobre o meio BDA (Tabela 1). Além disso, após 15 dias de incubação, foi feita a avaliação da capacidade em parasitar o fitopatógeno. Mesmo com crescimento menor que o de *S. sclerotiorum*, em placa, algumas estirpes de *Trichoderma* spp. foram capazes de micoparasitar o isolado (Figura 3A, 2B e 2E). Os valores em porcentagem de crescimento de *Trichoderma* variaram entre 31 a 73,8%. Também consideramos, dentre essas estirpes, o potencial em atrasar a produção de escleródios (Figura 3B, 2F e 2G).

Tabela1. Porcentagem de crescimento de *Trichoderma* spp. no teste de antagonismo direto.

Tratamentos	Crescimento de <i>Trichoderma</i> spp. (%)	Tratamentos	Crescimento de <i>Trichoderma</i> spp. (%)
AMS1.43	42,4	AMS18.30	48,1
AMS2.1	44,8	AMS19.1	43,8
AMS2.6a	37,1	AMS19.4	39,5
AMS2.19b	73,8	AMS19.7	39,0
AMS2.3	54,8	AMS19.11	47,1
AMS2.43	42,4	AMS19.15	39,0
AMS4.16	51,4	AMS20.4	39,0
AMS5.19	43,3	AMS20.5	53,8
AMS5.22	31,0	AMS21.2	40,5
AMS5.40	41,0	AMS21.5	51,9
AMS7.26	52,9	AMS21.8	52,9
AMS9.2	45,7	AMS23.12	46,7
AMS9.3	36,7	AMS23.40	50,5
AMS9.7	46,7	AMS24.9	48,1
AMS9.42	44,3	AMS25.7a	44,3
AMS12.8	31,4	AMS25.7b	46,2
AMS12.18	45,7	AMS25.8	59,5
AMS12.20	43,3	AMS27.1	40,5
AMS12.21a	52,9	AMS27.2	35,2
AMS12.21b	51,0	AMS27.40	59,0
AMS12.24	41,9	AMS29.40	31,9
AMS14.18	43,8	AMS32.40	51,9
AMS14.35	47,6	AMS33.12	41,9
AMS14.41	41,4	AMS33.40	43,8
AMS15.19	47,6	AMS33.43	45,7
AMS15.23	58,6	AMS34.10	39,4
AMS15.25	43,3	AMS34.12	42,9
AMS16.20	36,2	AMS34.24	35,2
AMS17.6	52,9	AMS35.5	59,5
AMS17.14	43,3	AMS35.6	64,3
AMS18.7	39,0	Controle	100

A redução do crescimento do fitopatógeno pode ser atribuída a capacidade de *Trichoderma* em competir por espaço e nutriente. Além disso, esses fungos têm um crescimento rápido e uma alta produção de esporos tornando-os altamente competitivos em relação a outros microrganismos (SMOLÍNSKA; KOWALSKA, 2018). Outro mecanismo conhecido de *Trichoderma* é o micoparasitismo, ou hiperparasitismo, no qual o fungo tem a capacidade de colonizar as hifas de outro fungo, penetrar e estrangular. As hifas são detectadas por estímulos químicos liberados pelo próprio fungo predado e ao penetrá-la, ele degrada (CARVALHO et al., 2008; MELO, 1996). Esse processo ocorre por meio da produção de uma gama de enzimas extracelulares, que auxiliam na degradação da parede celular do fungo oportunista, tais como quitinases, glucanases e proteases (AISSAOUI et al., 2017; KREDICS et al., 2005; LIU et al., 2010; MARCO; FELIX, 2007; VAN NGUYEN et al., 2008). *Trichoderma* spp. já foi relatado

como antagonista a *S. sclerotiorum* em condições de laboratório (JULIATTI et al., 2019; LOUZADA et al., 2009; SUMIDA et al., 2018). Segundo Juliatti et al. (2019) os testes de antagonismo em placa são importantes para a seleção de agentes de biocontrole, uma vez que são conduzidos em condições ambientais controladas, como temperatura, umidade e luz. Dessa forma, avaliando apenas o contato direto entre os microrganismos, sem fontes ambientais externas.

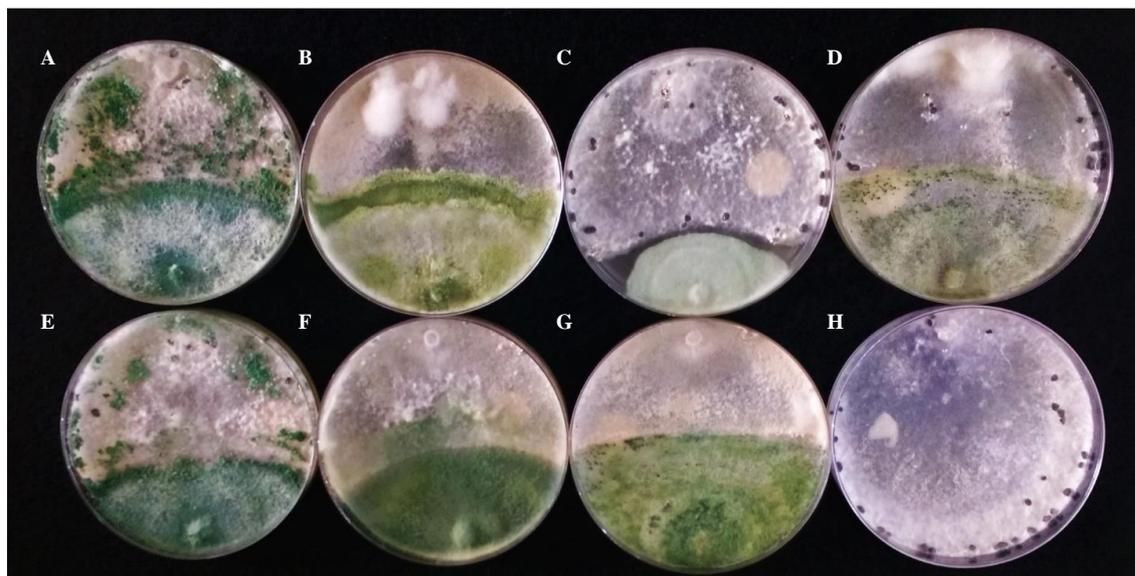


Figura 3. Teste de antagonismo direto de *Trichoderma* spp. e *S. sclerotiorum*. (A) AMS9.42; (B) AMS19.1; (C) AMS26.7; (D) AMS2.3; (E) AMS33.40; (F) AMS19.15; (G) AMS2.33; (H) Controle.

Para a avaliação do potencial de inibição dos escleródios de *S. sclerotiorum* foram utilizadas 46 estirpes de *Trichoderma* spp. que apresentaram resultados satisfatórios, crescimento acima de 40% da colônia, na presença do fitopatógeno, no teste de antagonismo direto. Destes, doze foram capazes de inibir a germinação dos escleródios em 100 % (AMS 1.43; 2.43; 4.16; 9.42; 12.21a; 14.41; 15.19; 17.14; 19.11; 20.5; 21.8; 29.38), dois isolados foram capazes de controlar a germinação em 93,3 % (AMS 25.7a; 25.8), quatro isolados em 86,6 % de inibição (AMS 5.40; 14.35; 15.25; 23.12) e seis inibiram a germinação dos escleródios em 80 % (AMS 12.8; 12.20; 14.18; 21.5; 23.40; 32.40). Houve diferença significativa ($p < 0,01$) na quantidade de escleródios germinados (Tabela 2). A importância em avaliar o antagonismo em condições ambientais favoráveis para o patógeno é devido a algumas cepas de *Trichoderma* serem capazes de colonizar os escleródios, mas não em penetrar as células, o que não interfere em seu controle. O potencial de cepas de *Trichoderma* em micoparasitar escleródios já são conhecidas (GÖRGEN et al., 2009; HADDAD et al., 2017; SMITH et al., 2013).

Essas estruturas são importantes para a sobrevivência de *Sclerotinia* no solo, pois são estruturas de resistência, que podem estar presentes no solo por cerca de dez anos (ORDÓÑEZ-VALENCIA et al., 2015). Um dos fatores propostos para o controle de escleródios é em relação a distribuição dessas estruturas no solo. Agentes de biocontrole foram mais efetivos quando ocorreu um agregado de escleródios no solo, em comparação aos escleródios distribuídos aleatoriamente (BAE; KNUDSEN, 2007). Dessa forma, os fungos antagonistas são importantes para minimizar os danos causados por *Sclerotinia* (JEGER et al., 2004; KNUDSEN et al., 1991), uma vez que suas hifas são capazes de crescer e ocupar um espaço maior no solo, quando comparados a uma aplicação química.

Tabela 2. Média de escleródios germinados e porcentagem de inibição por *Trichoderma* spp.

Isolados	Escleródios germinados	Porcentagem de inibição	Isolados	Escleródios germinados	Porcentagem de inibição
Controle	15 b	0	AMS 17.14	0. a	100
AMS 1.43	0. a	100	AMS 18.30	15 b	0
AMS 2.1	15 b	0	AMS 19.1	6 ab	60
AMS 2.19b	7 ab	53,3	AMS 19.11	0. a	100
AMS 2.43	0. a	100	AMS 20.5	0. a	100
AMS 4.16	0. a	100	AMS 21.2	15 b	0
AMS 5.19	11 ab	26,6	AMS 21.5	3 ab	80
AMS 5.40	2 ab	86,6	AMS 21.8	0. a	100
AMS 7.26	11 ab	26,6	AMS 23.12	2 ab	86,6
AMS 9.2	6 ab	60	AMS 23.40	3 ab	80
AMS 9.7	5 ab	66,6	AMS 24.9	15 b	0
AMS 9.42	0. a	100	AMS 25.7a	9 ab	40
AMS 12.18	3 ab	80	AMS 25.7b	1. a	93,3
AMS 12.20	3 ab	80	AMS 25.8	1. a	93,3
AMS 12.21a	0. a	100	AMS 27.1	10 ab	33,3
AMS 12.21b	12 ab	20	AMS 27.40	6 ab	60
AMS 14.18	3 ab	80	AMS 32.40	3 ab	80
AMS 14.35	2 ab	86,6	AMS 33.12	7 ab	53,3
AMS 14.41	0. a	100	AMS 33.43	9 ab	40
AMS 15.19	0. a	100	AMS 34.12	8 ab	46,6
AMS 15.23	5 ab	66,6	AMS 35.5	9 ab	40
AMS 15.25	2 ab	86,6	AMS 29.38	0. a	100
AMS 16.20	13 ab	13,3	AMS 35.15	10 ab	33,3
AMS 17.6	15 b	0			

Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,01$). (Cinza) isolados que inibiram 100% a germinação de escleródios.

O gênero *Trichoderma* é descrito na literatura como agentes de biocontrole (DRUZHININA et al., 2011; HARMAN, 2006) e são relatadas por alguns autores a correlação entre biocontrole com a capacidade de disponibilizar nutrientes para as plantas e no solo (BENÍTEZ et al., 2004; HARMAN, 2008). Esses fungos agem por diferentes mecanismos de ação no solo, dentre eles a competição por nichos (HARMAN, 2006), uma disputa por espaço

físico e nutriente. Altomare et al. (1999) relatou a possibilidade de um isolado de *Trichoderma* (T-22), com alta eficiência competitiva no solo poder desempenhar um papel na supressão de alguns fitopatógenos de plantas, como *Pythium* e *Rhizoctonia*. Dessa forma, realizou-se um teste de competitividade no solo, com os doze isolados selecionados para o experimento em casa de vegetação (Figura 4). Os resultados mostraram que, no geral, todos apresentaram eficiência competitiva no solo da área experimental da Embrapa Meio Ambiente e, também no solo de floresta (Tabela 3) considerando o solo de origem das estirpes e o solo utilizado nos experimentos em casa de vegetação.

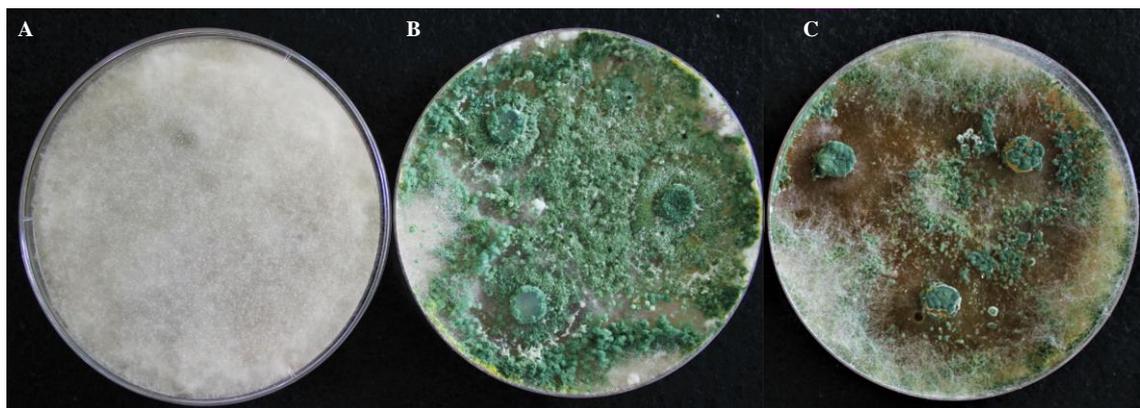


Figura 4. Teste de competitividade no solo. (A) Controle; (B) AMS9.42; (C) AMS29.38

Tabela 3. Índice de competitividade dos isolados de *Trichoderma* spp. selecionados para experimento com plantas de soja.

Tratamentos	Origem do solo	
	Área Experimental	Floresta
	Nota de competitividade	
Testemunha	5	5
AMS1.43	2	2
AMS2.43	1	2
AMS4.16	2	2
AMS9.42	1	2
AMS 12.21a	4	2
AMS 14.41	2	4
AMS 15.19	1	3
AMS17.14	2	2
AMS 19.11	2	3
AMS 20.5	2	4
AMS 21.8	2	3
AMS29.38	2	3

As estirpes de *Trichoderma* mostraram-se com um rápido crescimento. Após três dias de incubação as estirpes já haviam crescido por toda a superfície da placa de Petri sobre o meio

BDA. E com três e quatro dias já estavam esporuladas (Figura 5). Esses resultados são promissores para microrganismos envolvidos no controle biológico. Características importantes para competição com outros microrganismos no solo.

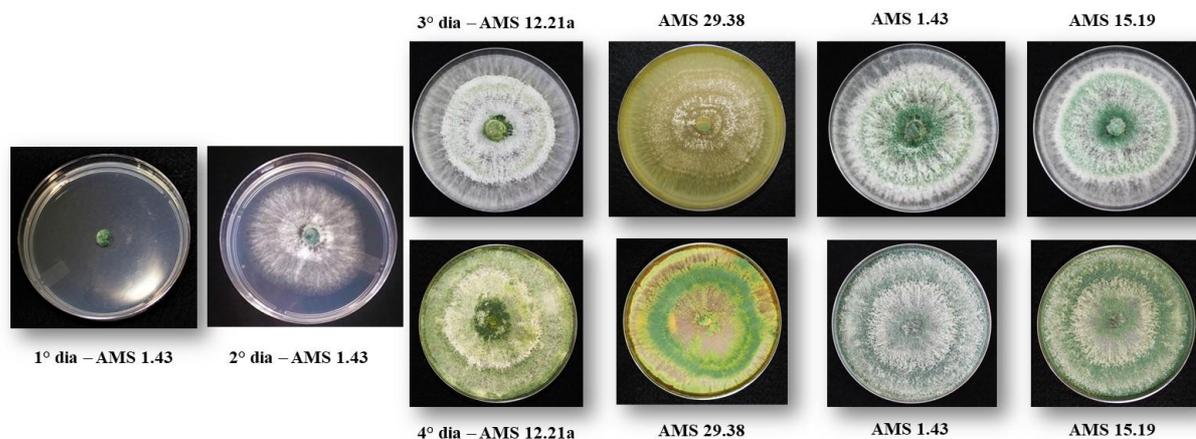


Figura 5. Crescimento de estirpes de *Trichoderma* sobre o meio BDA.

5.3.1. Potencial de *Trichoderma* spp. no controle do mofo branco em plantas de soja

Os sintomas causados pelo mofo branco, no geral são caracterizadas, por necrose no caule ou haste e murchamento seguido de seca das folhas. Para detectar a doença, o sinal é o crescimento de micélio branco na superfície dos tecidos lesionados e a presença de inúmeros escleródios irregulares (SMOLIŃSKA; KOWALSKA, 2018). Dessa forma, o isolado de *Sclerotinia sclerotiorum*, CMAA 1105 mostrou-se viável e patogênico a cultivar da soja NA 5909 (Figura 6). Os sintomas foram visíveis após o terceiro dia de incubação (Figura 6B) aumentando conforme o contato com a folha de soja (Figura 6C).



Figura 6. Teste de patogenicidade de *S. sclerotiorum* em plantas de soja. (A) 1º dia de incubação; (B) 3º dia de incubação; (C) 5º dia de incubação.

O experimento para avaliar o potencial das estirpes de *Trichoderma* dos solos amazônicos em controlar o mofo branco mostrou resultados significativamente ($p < 0,05$) positivos. Foram levados para o experimento de biocontrole em plantas de soja, 12 estirpes

selecionadas nos testes em condições de laboratório, que controlaram 100% a germinação dos escleródios. A temperatura no decorrer do experimento variou de 22°C a 31 °C e a umidade foi mantida entre 70-80%. Os dados observados para a altura das plantas demonstraram que em todos os tratamentos que receberam um isolado de *Trichoderma* sp. diferiram significativamente do tratamento apenas recebendo *S.sclerotiorum* (Figura 7). Os tratamentos que se destacaram em relação a medida da altura das plantas de soja foram AMS9.42 e AMS17.14, com uma eficiência de 263,6 e 252,3% em relação ao controle. Os demais tratamentos variaram de 165 a 237%. Esses resultados mostram que as estirpes de *Trichoderma* spp. foram capazes de controlar o fitopatógeno e, provavelmente, influenciar na promoção de crescimento das plantas.

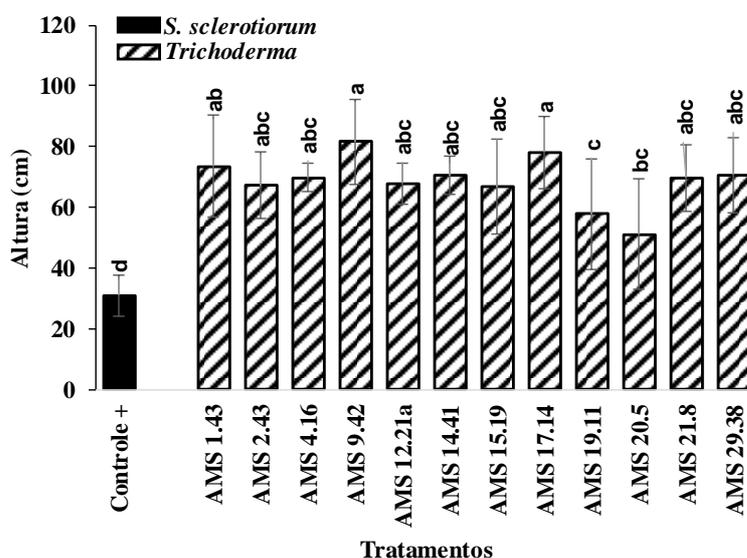


Figura 7. Média na altura de plantas de soja com *Trichoderma* spp. e *S. sclerotiorum* em casa de vegetação. Letras distintas diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os sintomas nas plantas foram avaliados no decorrer de todo o experimento e foi atribuída uma nota na escala de doenças do mofo branco. Ao final do experimento, uma avaliação final foi feita (Tabela 4) observando o total de plantas com sintomas por tratamento e cada um recebeu uma nota (Figura 8). Os isolados de *Trichoderma* spp. com potencial no controle do mofo branco foram AMS9.42, AMS17.14 e AMS29.38, sem a presença de plantas com sintomas e dessa forma, recebendo a nota 1. Apenas uma estirpe, AMS4.16 apresentou mais de 50% de plantas com sintomas do mofo branco. Porém, quando comparamos com as notas da escala da doença, sete estirpes tiveram as notas três e quatro, que já apresenta um estágio avançado da doença.

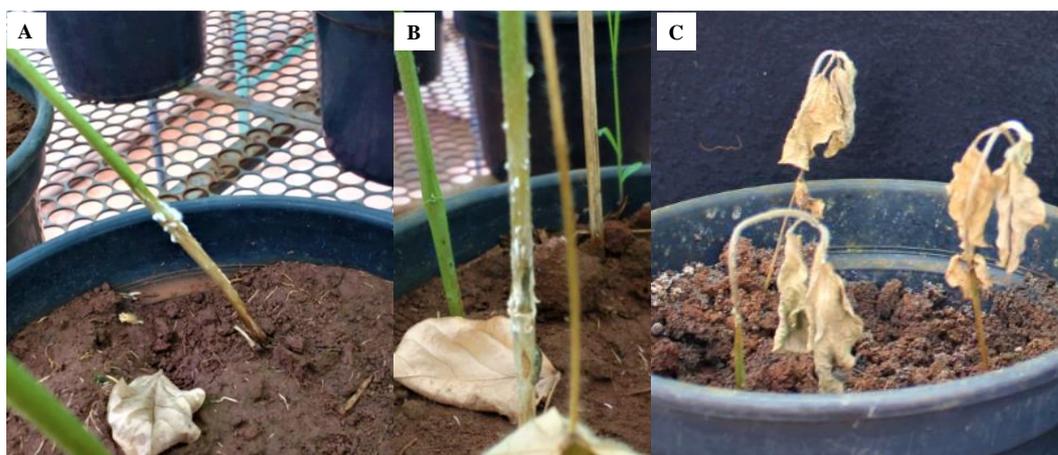


Figura 8. Sintomas do mofo branco em plantas de soja. (A) Caule com necrose e crescimento micelial de *S.sclerotiorum*; (B) crescimento micelial de *S. sclerotiorum*; (C) plantas secas e mortas.

Tabela 4. Número de plantas de soja com sintomas de mofo branco e escala de notas da doença para os tratamentos avaliados em casa de vegetação.

Tratamentos	Plantas com sintomas (%)	Escala de notas-doença
Controle Positivo	87	2,3 e 4
AMS 1.43	17	2 e 4
AMS 2.43	17	2 e 3
AMS 4.16	58	2 e 3
AMS 9.42	0	1
AMS 12.21a	8	2
AMS 14.41	37	2 e 4
AMS 15.19	8	2
AMS 17.14	0	1
AMS 19.11	42	2,3 e 4
AMS 20.5	46	2,3 e 4
AMS 21.8	21	2 e 3
AMS 29.38	0	1

A predominância de *Trichoderma* no controle de *S. sclerotiorum* pode ser explicada pelo grande arsenal de metabólitos secundários produzidos por esses microrganismos, muitos deles com atividade antibiótica, e pela alta excreção de enzimas hidrolíticas, caracterizando seu potencial micoparasita (DRUZHININA et al., 2011). No geral, o gênero *Trichoderma* são potenciais parasitas de fitopatógenos do solo (DRUZHININA et al., 2018), como forma de se alimentar, são biotróficos. A grande diversidade de enzimas produzidas por espécies de *Trichoderma* para degradar a parede celular de fitopatógenos é o que permite a ação micoparasita desse gênero fúngico, tornando-se difícil para o patógeno criar resistência (MONTE; BETTIOL; HERMOSA, 2019). O micoparasitismo envolve o mecanismo de antibiose, quando o antagonista inibe a ação do fitopatógeno pela produção de metabólitos secundários voláteis e não voláteis (HARMAN, 2006). Dentre os fungos estudados para o controle de doenças de plantas, *Trichoderma* têm as maiores reservas de genes relacionados a

biossíntese de metabólitos secundários com ação antagonista (DRUZHININA et al., 2011; MUKHERJEE et al., 2012). Além disso, são fungos de crescimento rápido e capacidade de desenvolvimento em diferentes substratos, bem como sua capacidade de produzir uma alta quantidade de conídios para se estabelecer no solo ou rizosfera (DEVI et al., 2012). Adicionalmente, colonizam as raízes das plantas crescendo rápido por todo o sistema radicular (HARMAN, 2011), característica importante na proteção da planta contra fitopatógenos de solo, além da produção de hormônios de crescimento, que auxiliam na promoção de crescimento das plantas.

O efeito da aplicação de *Trichoderma* spp. no solo para a massa de matéria seca das plantas de soja foi eficaz. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) para todos os tratamentos, com exceção do AMS20.5 (Figura 9). Os isolados que mostraram o melhor desempenho na produção de biomassa, mesmo na presença do fitopatógeno foram AMS9.42; AMS17.14 e AMS29.38. A eficiência no aumento da biomassa comparado ao controle foi de 411, 456 e 372%, para a área foliar, e em 528, 584 e 549%, para a raiz, respectivamente. O controle biológico e a promoção de crescimento de plantas por microrganismos são mecanismos associados. Quando o antagonista protege a planta da infecção de um fitopatógeno, a planta consegue se desenvolver, promovendo seu crescimento. *Trichoderma* é capaz de produzir fitohormônios ou induzir a planta a produzir e se defender (HERMOSA et al., 2013). Estudos com finalidade de controlar *S. sclerotiorum* com cepas de *Trichoderma* vêm sendo desenvolvidos, com a finalidade de diminuir o uso de agentes químicos no campo. Os resultados corroboram com os encontrados em nosso trabalho para a cultura da soja (HADDAD et al., 2017; SUMIDA et al., 2018; ZHANG et al., 2016).

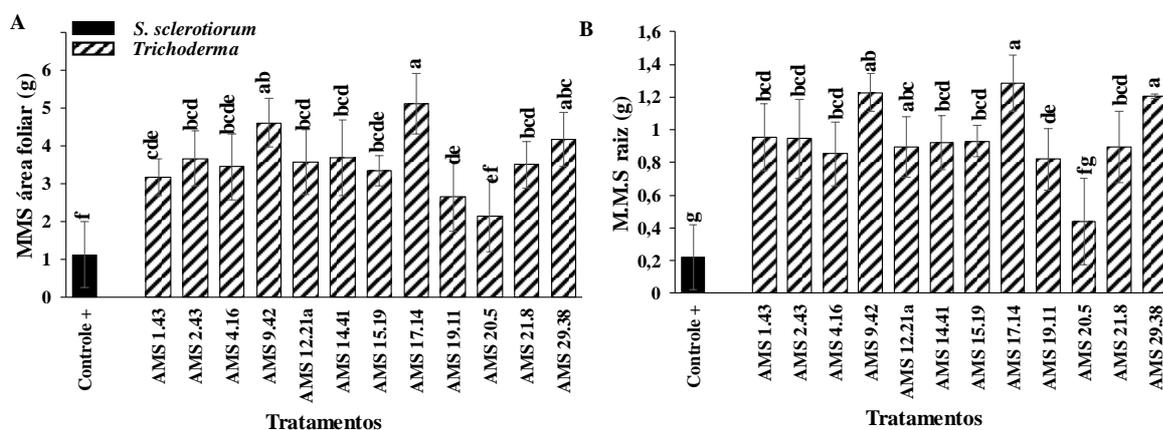


Figura 9. Média no peso da massa de matéria seca de plantas de soja com *Trichoderma* spp. e *S. sclerotiorum* em casa de vegetação. (A) Área foliar; (B) Raiz. Letras distintas diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Ao final do experimento de controle biológico de *S. sclerotiorum* por *Trichoderma* spp., as raízes foram lavadas, cortadas em pequenos fragmentos e dispostas sobre meio de cultura BDA. Após sete dias de incubação, a avaliação da capacidade de colonização das raízes foi feita pela visualização das estirpes crescidas ao redor das raízes. Os três isolados (AMS9.42, AMS17.14 e AMS29.38) que são prováveis potenciais estirpes para controlar o mofo branco em soja, foram capazes de colonizar as raízes (Figura 10).

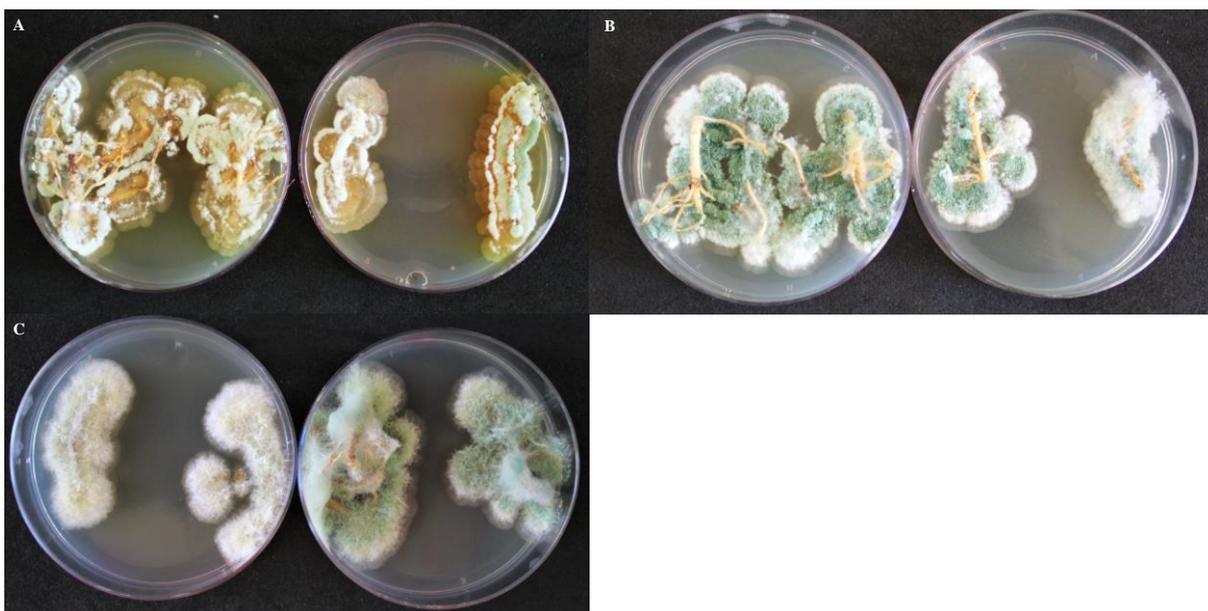


Figura 10. Fragmentos de raízes de soja colonizadas por *Trichoderma* spp. ao final do experimento de promoção de crescimento. (A) AMS 29.38; (B) AMS 31.15; (C) AMS 34.39.

5.4. Conclusão

No geral, as estirpes de *Trichoderma* spp. isolados dos solos da floresta amazônica demonstraram o potencial de controlar *S. sclerotiorum* em condições de laboratório e em plantas da soja, destacando, novamente, a importância do bioma Amazônia como fonte de novas manchas microbianas com importância biotecnológica. Três fungos foram eficazes no experimento em condições de casa de vegetação, AMS9.42, AMS17.14 e AMS29.38, não apresentando nenhuma planta com sintomas do mofo branco. Pesquisas envolvendo diferentes cepas de *Trichoderma* com atributos benéficos, incluindo a promoção do crescimento de plantas e o biocontrole de fitopatógenos, devem ser considerados no desenvolvimento de formulações.

Referências

- AISSAOUI, N. et al. Purification and Biochemical Characterization of a Neutral Serine Protease from *Trichoderma harzianum*. Use in Antibacterial Peptide Production from a Fish By-Product Hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 182, n. 2, p. 831–845, 2017.
- BABU, K. N.; PALLAVI, P. N. Isolation , identification and mass multiplication of *Trichoderma*- an important bio-control agent. **International Journal of Pharmacy and Life Sciences**, v. 4, n. 1, p. 2320–2323, 2013.
- BAE, S.-J. et al. *Trichoderma* metabolites as Biological Control Agents against *Phytophthora Pathogens*. **Biological Control**, 2015.
- BAE, Y. S.; KNUDSEN, G. R. Effect of sclerotial distribution pattern of *Sclerotinia sclerotiorum* on biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. **Applied Soil Ecology**, v. 35, n. 1, p. 21–24, 2007.
- BAUER, A. W. et al. Antibiotic Susceptibility testing by a standardized single disk method. v. 36, n. 3, p. 493–496, 1996.
- BENÍTEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249–260, 2004.
- BETTIOL, W. et al. Produtos comerciais à base de *Trichoderma*. In: **Trichoderma Uso na Agricultura**. Brasília: 2019. p. 538.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. *Trichoderma* in Brazil: history1, research, commercialization and perspectives. v. 43, p. 235–237, 2009.
- BETTIOL, W.; SILVA, J. C.; CASTRO, M. L. M. P. *Trichoderma* Uso Na Agricultura. In: **Trichoderma Uso na Agricultura**. 1ª edição ed. Brasilia: 2019. p. 538.
- BUTT, T. M. Fungal biological control agents. **The Royal Society of Chemistry**, p. 186–191, 2000.
- CAMPOS, H. D. . et al. **Mofa branco em soja: cenário atual e manejo**. 2017.
- CARVALHO, D. D. C. et al. Isolados de *Trichoderma* sp. Antagônicos a *Fusarium oxysporum*.

2008.

COLMENAREZ, Y. C. et al. Uso do Manejo Integrado de Pragas e Controle Biológico pelos Agricultores na América Latina e no Caribe: Desafios e Oportunidades. In: **Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas impacto**. 2012. p. 802–853.

COTXARRERA, L. et al. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium wilt* of tomato. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 4, p. 467–476, 2002.

DANIELSON, G. A.; NELSON, B. D.; HELMS, T. C. Effect of *Sclerotinia* stem rot on yield of soybean inoculated at different growth stages. **Plant Disease**, v. 88, p. 297–300, 2004.

DEVI, P. et al. Characterization of Indian native isolates of *Trichoderma* spp . and assessment of their bio-control efficiency against plant pathogens. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 85, p. 15150–15160, 2012.

DRUZHININA, I. S. et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 749–59, 2011.

DRUZHININA, I. S. et al. Massive lateral transfer of genes encoding plant cell wall-degrading enzymes to the mycoparasitic fungus *Trichoderma* from its plant-associated hosts. **Plos Genetics**. v. 14, 1-33, 2018.

GÖRGEN, C. A. et al. Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 44, n. 12, p. 1583–1590, 2009.

GREEN, H. et al. Suppression of the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum* by Mycelium of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus* intraradices in Root-Free Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1428–1434, 1999.

HADDAD, P. E. et al. Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *sclerotiorum* in soybean. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 52, n. 12, p. 1140–1148, 2017.

HARMAN, G. E. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp . **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 190–194, 2006.

HARMAN, G. E. What are *Trichoderma*?. **Phytopathology**, p. 1–14, 2008.

HARMAN, G. E. Multifunctional fungal plant symbionts: New tools to enhance plant growth and productivity. **New Phytologist**, v. 189, n. 3, p. 647–649, 2011.

HERMOSA, R. et al. The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. **International Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 69–80, 2013.

HERRERA-ESTRELLA, A. The Biological Control Agent *Trichoderma* From Fundamentals To Applications. In: **Handbook of Fungal Biotechnology**. [s.l: s.n.]. p. 147–156.

INCH, S. et al. The development of a model to predict the potential efficacy of *Trichoderma harzianum* isolates on perithecial production of *Gibberella zea* based on secondary metabolite production. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 33, n. 3, p. 337–346, 2011.

JEGER, M. J. et al. The effect of spatial distributions of mycoparasites on biocontrol efficacy: A modelling approach. **Biocontrol Science and Technology**, v. 14, n. 4, p. 359–373, 2004.

JULIATTI, F. et al. *Trichoderma* as a Biocontrol Agent against *Sclerotinia* Stem Rot or White Mold on Soybeans in Brazil: Usage and Technology. **Trichoderma - The Most Widely Used Fungicide**, p. 1–23, 2019.

KNUDSEN, G. R. et al. Method to enhance growth and sporulation of pelletized biocontrol fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 2864–2867, 1991.

KREDICS, L. et al. Extracellular proteases of *Trichoderma* species: A review. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 52, n. 2, p. 169–184, 2005.

KUMAR, D. P.; KUMAR, R.; ANUPAMA, S. P. D. Studies on Exo-Chitinase Production from *Trichoderma asperellum* UTP-16 and Its Characterization. **Indian J. Microbiol**, v. 52, n. 3, p. 388–395, 2012.

LEITE, R. M. V. B. D. C. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. **Comunicado Técnico**, p. 1–3, 2005.

LIU, S. Y. et al. Purification and characterization of novel glucanases from *Trichoderma harzianum* ets 323. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 19, p. 10309–10314, 2010.

LO, C.-T. General mechanisms of action of microbial biocontrol agents. **Plant Pathology**

Bulletin, v. 7, p. 155–166, 1998.

LOUZADA, G. et al. Potencial antagonico de *Trichoderma* spp. originarios de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 3, p. 145–148, 2009.

LUCON, C. M. M. *Trichoderma*: uso do bioagente na produção agrícola brasileira. **Tecnologia Sustentável: Trichoderma**, 2016.

MARCO, J. L. DE; FELIX, C. R. Purification and Characterization of a β -Glucanase Produced by *Trichoderma harzianum* Showing Biocontrol Potential. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 21–29, 2007.

MARCO, J. L. DE; VALADARES-INGLIS, M. C.; FELIX, C. R. Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *crinipellis perniciososa*, the causal agent of witches' broom of cocoa. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 33–38, 2003.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 4, p. 261–295, 1996.

MEYER, M. C. Ensaio cooperativos de manejo do mofo branco em soja. **Implementation Science**, v. 39, n. 1, p. 1–15, 2014.

MONTE, E.; BETTIOL, W.; HERMOSA, R. *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. In: **Trichoderma Uso na Agricultura**. 2019. p. 538.

MONTERO-BARRIENTOS, M. et al. Overexpression of a *Trichoderma* HSP70 gene increases fungal resistance to heat and other abiotic stresses. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 11, p. 1506–1513, 2008.

MUKHERJEE, M. et al. *Trichoderma* – Plant – Pathogen Interactions : Advances in Genetics of Biological Control. **Indian J. Microbiol**, v. 52, n. 4, p. 522–529, 2012.

NAHER, L. et al. *Trichoderma* spp. : a biocontrol agent for sustainable management of plant diseases. **Pak J Bot**, v. 46, n. 4, p. 1489–1493, 2014.

ORDÓÑEZ-VALENCIA, C. et al. Morphological development of sclerotia by *Sclerotinia*

sclerotiorum: a view from light and scanning electron microscopy. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 765–770, 2015.

PAPAVIZAS, G. C. Survival of *Trichoderma harzianum* in Soil and in Pea and Bean Rhizospheres. **Phytopathology**, 1982.

PURDY, L. H. *Sclerotinia sclerotiorum* : History, Diseases and Symptomatology, Host Range, Geographic Distribution, and Impact. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 875–880, 1979.

SANDHYA, C. et al. Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation. **J. Basic Microbiol**, v. 44, n. 1, p. 49–58, 2004.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiol Biotechnol**, v. 87, p. 787–799, 2010.

SMITH, A. et al. Diversity of soil-dwelling *Trichoderma* in Colombia and their potential as biocontrol agents against the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Journal of General Plant Pathology**, v. 79, n. 1, p. 74–85, 2013.

SMOLIŃSKA, U.; KOWALSKA, B. Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* — a review. **Journal of Plant Pathology**, v. 100, n. 1, p. 1–12, 2018.

SUMIDA, C. H. et al. *Trichoderma asperelloides* antagonism to nine *Sclerotinia sclerotiorum* strains and biological control of white mold disease in soybean plants. **Biocontrol Science and Technology**, v. 28, n. 2, p. 142–156, 2018.

ÜLKER, S. et al. Isolation , production , and characterization of an extracellular lipase from *Trichoderma harzianum* isolated from soil. **Turk J Biol**, v. 35, p. 543–550, 2011.

VAN NGUYEN, N. et al. Antifungal activity of chitinases from *Trichoderma aureoviride* DY-59 and *Rhizopus microsporus* VS-9. **Current Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 28–32, 2008.

ZHANG, F. et al. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 100, p. 64–74, 2016.

ZHANG, X.; LI, X.; XIA, L. Heterologous Expression of an Alkali and Thermotolerant Lipase from *Talaromyces thermophilus* in *Trichoderma reesei*. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 176, p.

1722–1735, 2015.

6. POTENCIAL DO CONSÓRCIO DE *TRICHODERMA* SPP. NA DISPONIBILIDADE DE FÓSFORO E CONTROLE DO MOFO BRANCO EM PLANTAS DE SOJA

Resumo

Os consórcios de microrganismos benéficos para a saúde da planta estão cada vez mais sendo estudados e empregados no campo. A busca por essa nova alternativa de aplicação é para aumentar a produtividade e a aplicabilidade desses microrganismos em uma gama de culturas agrícolas. Fungos do gênero *Trichoderma* são conhecidos por muitos benefícios que trazem para as culturas, como a solubilização de P e o controle biológico de *S. sclerotiorum*. Assim, o objetivo para esse trabalho foi a aplicação conjunta de duas cepas de *Trichoderma* spp. com finalidades diferentes, mas que auxiliam a planta no seu desenvolvimento. Além disso, foi analisada a alteração da estrutura da comunidade bacteriana e fúngica presentes no solo com o consórcio. Os resultados observados com a aplicação foram positivos para altura, massa de matéria seca, clorofila e aquisição de fósforo pela planta. A aplicação do consórcio não alterou a comunidade bacteriana, porém a fúngica foi alterada, provavelmente pela presença de *Trichoderma* que é um fungo micoparasita. A aplicação do consórcio de *Trichoderma* promoveu o crescimento das plantas de soja e o controlou o mofo branco, sugerindo como um provável bioinoculante.

Palavras-chave: Consórcio, Probiótico vegetal, *Trichoderma*, Bioinoculante

Abstract

Consortia of microorganisms are beneficial to the plant health and are increasingly being studied and employed in the field. The search for this new alternative application is due the need to increase the productivity and the applicability of these microorganisms in a range of crops. Fungi of the *Trichoderma* genus are known for many benefits they bring to crops, such as the solubilization of P and the biological control of *S. sclerotiorum*. Thus, the goal of this work was the joint application of two strains of *Trichoderma* spp. with different purposes, which can help the plant in its development. Besides that, the alteration of the structure of the bacterial and fungal communities present in the soil was analyzed with the consortium. The results observed with the application were positive for height, dry matter mass, chlorophyll and phosphorus acquisition by the plant. The application of the consortium did not alter the bacterial community, but the fungal community was altered, probably by the presence of *Trichoderma* which is a mycoparasite fungus. The application of the *Trichoderma* consortium promoted the growth of soy plants and controlled the white mold, suggesting it as a probable bioinoculant.

Keywords: Consortia, Plant probiotic, *Trichoderma*, Bioinoculant

6.1. Introdução

O termo comunidade sintética vêm sendo bastante requisitado nos últimos anos, no qual utiliza-se microrganismos com funções diferentes trabalhando juntos para beneficiar o crescimento e produtividade de culturas agrícolas. Outro termo utilizado para essa prática é o probiótico agrícola (WOO; PEPE, 2018) que nada mais são que inoculantes microbianos eficazes que estimulam o crescimento da cultura, seja por disponibilidade de nutrientes ou por diminuir ou erradicar a incidência de algum patógeno no solo. Os microrganismos associados as plantas desempenham os mais diferentes papéis, desde auxiliar a suprimir doenças, estimular o crescimento, ocupar espaços que poderiam estar presentes organismos oportunistas, promover resistência ao estresses abióticos e influenciar no rendimento da cultura (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009; MENDES; GARBEVA; RAAIJMAKERS, 2013; YANG; KLOEPPER; RYU, 2009). Sendo assim, são essenciais para a saúde da planta.

As plantas se associam com diferentes microrganismos, mas não são todos que são capazes de colonizar e sobreviver (RASTOGI et al., 2012). Os fungos têm uma vantagem sobre as bactérias pois conseguem manter um agregado no solo por causa do crescimento de suas hifas, e dessa forma auxiliar a planta na aquisição de nutrientes, água e do ataque de fitopatógenos. Diversas espécies de *Trichoderma* ganharam interesse devido ao uso na agricultura como biofungicidas ou biofertilizantes (HERMOSA et al., 2013; MUKHERJEE et al., 2014; ZHANG et al., 2018). E podem ser encontrados como endofíticos ou em associação com a raiz da planta (HARMAN et al., 2004). Mas fatores bióticos e abióticos podem afetar a eficiência desses fungos, como por exemplo o hospedeiro. A planta é um fator determinante para o resultado positivo desse fungo (NIETO-JACOBO; STEYAERT; SALAZAR-BADILLO, 2017) em condições de casa de vegetação ou campo.

Para se alcançar resultados melhores nos campos de cultivo e superar os fatores limitantes para um bom desempenho de uma estirpe de *Trichoderma*, pode-se utilizar mais de uma estirpe em uma única aplicação ou ainda adotar técnicas de melhoramento das cepas (MEDEIROS et al., 2019). Consórcios microbianos tornaram-se uma área de interesse para aplicabilidade. Interações positivas de *Trichoderma* spp. podem ajudar a planta a se desenvolver e produzir em grande quantidade nos campos. Na agricultura, o uso de *Trichoderma* ajuda na melhoria da germinação de sementes, no desenvolvimento das áreas foliares e raízes, clorofila e tamanho ou número de flores ou frutos (HARMAN, 2011; HERMOSA et al., 2012; MENDOZA-MENDOZA et al., 2017). O que sugere que esse gênero pode ser utilizado para o desenvolvimento de um novo bioestimulante. Nessa linha de pesquisa, nesse trabalho

selecionamos cepas de *Trichoderma* que disponibilizam fósforo para plantas de soja, e também, as que conseguem controlar os efeitos nocivos de *S. sclerotiorum* para a cultura. Dessa forma, aplicamos as duas estirpes em solos com a presença desse patógeno e com diferentes fontes de P, para avaliar sua eficiência no desenvolvimento e produtividade da cultura da soja.

6.2. Material e Métodos

6.2.1. *Trichoderma* spp.

Foram avaliadas duas estirpes de *Trichoderma* spp. que estão depositados na Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA), localizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental na Embrapa Meio Ambiente em Jaguariúna/SP. As estirpes foram mantidos pelos métodos de Castellani e em papel de filtro, mantidos a -20 °C (BOTELHO et al.,2013).

6.2.2. Inóculo de *Trichoderma* spp. para os experimentos em casa de vegetação

As estirpes foram crescidas em placas de Petri contendo meio BDA por sete dias. Dois discos de 8 mm de diâmetro contendo estruturas propagativas das *Trichoderma* spp. foram transferidas assepticamente para sacos de plástico de polipropileno transparentes, capacidade de 500 mL, contendo 100 g de arroz umedecido em água, proporção de 1:1, previamente autoclavado a 121°C e 1 atm de pressão, por 30 minutos. As culturas foram incubadas em B.O.D a 27°C com fotoperíodo de doze horas, por quinze dias (PAPAVIZAS, 1982).

6.2.3. Antagonismo das estirpes de *Trichoderma* spp.

A verificação da compatibilidade entre as estirpes de *Trichoderma* spp. foi feita por meio do confronto direto dos isolados, depositando-se discos com estruturas dos dois fungos em extremidades opostas de uma placa de Petri, de 90 mm, contendo meio de cultura BDA. O teste foi realizado em triplicada e as placas foram incubadas por sete dias a 27°C. A avaliação foi feita por meio do crescimento dos fungos e a presença ou não de um halo de antibiose.

6.2.4. Consórcio de *Trichoderma* spp. como solubilizadores de fosfato e controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum*

O experimento foi realizado em casa de vegetação situada na Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna – São Paulo, a fim de verificar o potencial de duas estirpes de *Trichoderma* spp. como um possível bioinoculante para a cultura da soja, na promoção de crescimento, por meio da solubilização de fosfato e na diminuição ou ausência do mofo branco na cultura. Em vasos com capacidade de seis litros e com as duas estirpes testadas foram selecionadas nos experimentos descritos anteriormente, AMS 34.39 (solubilizadora de fosfato) e AMS 9.42 (controle biológico). Dezesesseis tratamentos foram avaliados (Tabela 1) com seis repetições. O delineamento experimental foi Inteiramente Casualizado, avaliando as duas fontes de fósforo, duas estirpes de *Trichoderma* spp., presença e ausência de *S. sclerotiorum* e apenas no nível três de aplicação de fosfato (70 kg/ha).

Tabela 1. Tratamentos aplicados ao experimento de consórcio de *Trichoderma* spp.

Tratamentos	<i>Trichoderma</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	Fonte de fosfato
T1	AMS 9.42	-	-----
T2	AMS 34.39	-	-----
T3	AMS 9.42	+	-----
T4	AMS 34.39	-	Fosfato de rocha Bayóvar
T5	AMS 34.39	-	Superfosfato triplo
T6	AMS 9.42 e AMS 34.39	+	-----
T7	AMS 9.42 e AMS 34.39	-	Fosfato de rocha Bayóvar
T8	AMS 9.42 e AMS 34.39	-	Superfosfato triplo
T9	Sem <i>Trichoderma</i> (Controle)	-	Fosfato de rocha Bayóvar
T10	Sem <i>Trichoderma</i> (Controle)	-	Superfosfato triplo
T11	Sem <i>Trichoderma</i> (Controle)	+	-----
T12	Sem <i>Trichoderma</i> (Controle)	-	-----
T13	AMS 9.42 e AMS 34.39	+	Fosfato de rocha Bayóvar
T14	AMS 9.42 e AMS 34.39	+	Superfosfato triplo

(+) Presença de *S. sclerotiorum*; (-) Ausência de *S. sclerotiorum*; (-----) Sem aplicação de uma fonte de fosfato.

Plantas de soja, variedade Na 5909, foram crescidas nos vasos contendo solo natural da área experimental da Embrapa Meio Ambiente. Foram plantadas seis sementes por vaso, e após a germinação foi mantida uma planta por vaso, nos dois experimentos. O inóculo do patógeno foi preparado como descrito anteriormente e infestado com um por cento (peso:volume de solo) nos tratamentos que o receberam, mantidos em câmara úmida por sete dias. Os inóculos das

estirpes de *Trichoderma* spp. foram incorporados ao solo após o período de incubação do patógeno, sete dias, e em seguida foi feita a semeadura das sementes de soja. Nos tratamentos que receberam o consórcio microbiano, foi feita aplicação de meio por cento de cada estirpe, de maneira homogênea. Adicionalmente, foi realizada adubação de nitrogênio e potássio conforme requisitos da cultura.

No experimento, vasos de seis litros, foram mantidos em casa de vegetação, por três meses, até o estágio fenológico R5.5 da cultura, representando a etapa de enchimento dos grãos de soja. A avaliação do experimento foi por meio da medida de massa de matéria seca da parte aérea e raiz das plantas, além da clorofila avaliada após 21 dias do plantio utilizando medidor portátil (SPAD-502Plus – Konica Minolta) e a altura das plantas.

No experimento foram verificados o teor de fósforo absorvido pelas plantas, para isso, as folhas foram coletadas, e lavadas em água corrente. Após secas a 60°C em estufa atingindo peso constante, o material foi triturado e encaminhado para o Laboratório de Tecido Vegetal da ESALQ/USP em Piracicaba-São Paulo. Foi feita a avaliação da atividade da fosfatase ácida (TABATABAI; BREMNER, 1969). A atividade foi avaliada em três estádios fenológicos diferentes do crescimento da cultura. A primeira coleta de solo, solo rizosférico, foi realizado no estágio R1 (início da floração), representando 20% de absorção de fósforo pela planta. A segunda coleta de solo foi no estágio R5 (enchimento dos grãos), representando 60% de absorção de fósforo pela cultura. E, a terceira coleta de solo foi feita no estágio R5.5 (enchimento dos grãos de 70 a 100%), representando 100% da absorção de fósforo pela cultura da soja. Adicionalmente, foi feita a coleta de cinco gramas de solo, armazenadas em freezer a -20°C para análise da comunidade de fungos e bactérias, quantificação do gene *phoD* dos tratamentos aplicados visando a solubilização de fosfato.

6.2.5. Análise dos dados e estatística

O experimento foi realizado com repetições e os valores finais foram expressos pelas médias entre eles. As análises estatísticas dos dados foram calculadas pelo software estatístico R Studio, usando o pacote *Agricolae* e *ExpDes*. Todas as médias foram submetidas ao teste de variância (ANOVA) para avaliar se houve diferença significativa entre elas. Quando positivo, após considerar os pressupostos de normalidade testados pelo teste de Shapiro-Wilk e igualdade de variância pelo teste de Bartlett, as médias foram comparadas pelo teste de comparação de médias Tukey ($p < 0,05$).

A avaliação da eficácia da aplicação de *Trichoderma* spp. para cada nível de fósforo nas duas fontes de P foi por meio dos valores absolutos de peso seco (g/planta⁻¹) na melhoria da biomassa das plantas (em %) para cada uma das estirpes calculado em relação ao tratamento sem a presença de *Trichoderma*. Para isso, aplicou-se a seguinte equação:

$$Eficácia (\%) = \frac{(Trichoderma \ x \ * \ 100)}{Controle}$$

Onde cada uma das estirpes de *Trichoderma* spp. (x), é comparado ao controle.

6.2.6. Estudo da comunidade de bactérias e fungos

6.2.6.1. Extração de DNA metagenômico do solo

Para extração do DNA total do solo, utilizou-se o kit comercial *Power Soil*TM DNA *Extraction Kit* (MoBio, Laboratories, EUA), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante a partir de 0,25 g de solo. Para verificar a integridade e quantidade do DNA extraído, uma alíquota de 5 µL de DNA e 5 µL de GelRed (*Biotium*) + LB (*loading buffer*) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v), sendo visível as bandas quando expostas a luz ultravioleta. O DNA restante foi armazenado no freezer (-80 °C) para as etapas posteriores. Onze tratamentos foram avaliados (T2, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T12, T13 e T14), priorizando a solubilização de fosfato, nas três coletas feitas, totalizando 99 amostras de DNA.

6.2.6.2. Construção da biblioteca de *amplicons* dos genes 16S rRNA e ITS rRNA

Para realizar o sequenciamento em larga escala do gene 16S rRNA das amostras, utilizou-se o *forward primer* A-967F (SOGIN et al., 2006) e sequências de barcodes a extremidade 5' dos iniciadores. O *reverse primer* (WANG; QIAN, 2009) foi o mesmo utilizado em todas as bibliotecas. Para o gene ITS rRNA das amostras, utilizou-se os primers ITS1f (GARDES; BRUNS, 1993), ITS2 (WHITE et al., 1990) e sequências de barcodes com cinco nucleotídeos para diferenciar as amostras. As reações de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foram amplificadas segundo protocolo de Sogin (2006) para um volume de 25 µL, água ultrapura (Milliq), 2,50 µL de *Buffer*, 2,50 µL de MgCl₂, 0,50 µL de dNTP's, 0,25 µL de *reverse primer* e 0,50 µL da Taq DNA polimerase, para o Mix, após foram adicionados 0,25 µL de barcode e 0,50 µL do DNA das amostras. A reação foi realizada em termociclador 96 *Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*), programado para o ciclo de 94 °C por 5 minutos

(desnaturação), seguido de 30 ciclos de 94 °C/ 30 segundos (desnaturação); 55 °C/ 30 segundos (anelamento); 72 °C/ 1 minuto e 30 segundos (extensão), por fim a extensão final a 72 °C/ 5 minutos. Após a amplificação, a reação foi submetida a gel de agarose 1 %. Após a quantificação as amostras foram purificadas no E-Gel® SizeSelect™ 2% Agarose Gel (*Life Technologies*), utilizando como referência o marcador 100 bp (pares de bases) DNA Ladder (100 a 1000 pb). Inicialmente foi feito um mix de 5 µL de cada amostra de DNA, e destas, 20 µL foram depositadas nos poços do *E-Gel* e ao final os mesmos 20 µL (amostra e água) foram coletados no tamanho entre 200/300 pb para bactéria e de 300/450 para fungo. Em seguida, a purificação em barra magnética foi realizada adicionando 150 µL de Agencourt® AMPure® XP Reagent em cada amostra coletada, seguida da adição de etanol 70 % e 30 µL de Low TE, seguindo o protocolo Ion Xpress™ Plus gDNA *Fragment Library Preparation User Guide*. A quantificação foi realizada no aparelho Qubit® 2.0 Fluorometer (*Invitrogen, Life Technologies*), para obter a quantidade de 1 µL de DNA na concentração µg/µL. Os amplicons foram misturados de maneira equimolar.

6.2.6.3. Avaliação da comunidade microbiana

O sequenciamento em larga escala foi realizado por meio do equipamento Ion torrent (*Life Technologies*), onde as amostras foram submetidas ao Ion OneTouch 2, seguindo o protocolo Ion PGM™ Template OT2 400 Kit disponibilizado pela *Life Technologies*. Após estas etapas, foi realizado o sequenciamento dos fragmentos das bibliotecas de amplicons nos *chips* Ion 316™ por meio do kit Ion PGM™ 400 sequencing kit em equipamento PGM Ion Torrent para o sequenciamento.

A análise das sequências obtidas foram realizadas no QIIME e no programa estatístico R, onde a separação das sequências foi realizada no QIIME por meio do comando `split_libraries.py`. A partir dos dados já separados, no programa R utilizou-se o protocolo `dada2`, versão 1.8, para analisar os dados do sequenciamento. Ao final foi gerada uma tabela de OTUs, agrupadas a um nível de similaridade de 97% a partir dos “barcodes”, com análises taxonômicas utilizando o banco de dados Silva 132 (Quast, 2013) para bactéria e para fungo. A PERMANOVA (Análise de Variância Multivariada Permutacional) foi realizada para verificar a diferença entre os variáveis aplicadas aos tratamentos usando o ADONIS no pacote *Vegan* (DIXON, 2003; OKSANEN et al., 2019). Os índices de diversidade foram calculados utilizando o pacote *phyloseq* (v. 1.14.0) (MCMURDIE; HOLMES, 2013).

6.2.6.4. Quantificação da comunidade solubilizadora de fósforo pelo gene *phoD*

A PCR quantitativa (qPCR) foi realizada com as amostras de solo coletadas no experimento de consórcio por meio do aparelho StepOne™ Real-Time PCR System (AppliedBiosystems®). Nas reações de amplificação foram utilizadas o marcador fluorescente Syber® Green PCR Master Mix 2x (AppliedBiosystems®). Para a quantificação da comunidade solubilizadora de P foi utilizado o iniciador do gene *phoD* (ALPS-F730 CAGTGGGACGACCACGAGGT, ALPS-R1101 GAGGCCGATCGGCATGTTCG) (SAKURAI et al., 2008), gerando um fragmento de 370 pares de base, com valores de R² obtidos na curva de 1,00. A reação de qPCR foi feita com 1µL de DNA total, 12,5 µL de PCR tampão 2x (SYBR Green PCR Kit), 0,5 µL de albumina de soro bovino (BSA) e 0,2 µL de cada iniciador, o volume final foi ajustado com água deionizada esterilizada par 25 µL. As condições de amplificação foram a desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 57°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos e extensão final a 72°C durante 7 minutos.

As reações foram realizadas em triplicata e em todas as análises, dois controles negativos (ausência de DNA) foram submetidos às mesmas condições que as amostras alvo, excluindo uma possível contaminação externa. Além disso, as curvas de *melting* também foram adicionadas em cada corrida para monitorar a especificidade dos produtos amplificados.

6.2.7. Identificação das espécies

6.2.7.1. Caracterização molecular das estirpes de *Trichoderma* selecionadas

As estirpes de *Trichoderma* foram submetidas à extração de DNA total utilizando o kit MO BIO *UltraClean Microbial DNA Isolation* (MO BIO Laboratories Inc, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Alíquotas de 3 µL do DNA extraído de cada estirpe foram acrescidas de tampão de carregamento e a integridade dos mesmos foram verificadas em gel de agarose 1,5 % e corrida eletroforética em tampão TAE 1 X (TBE: Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). A documentação do gel foi feita usando o fotodocumentador LAB TRADE, com câmera Canon acoplada e a visualização do gel no programa EOS *utility*. O volume de 50 µL contendo o DNA será armazenado a temperatura de -20°C até os procedimentos seguintes.

6.2.7.2. Amplificação do DNA das estirpes de *Trichoderma*

Para amplificação por PCR do fragmento do gene de elongação alfa 1 foi utilizado o conjunto de iniciadores TEF1F e TEF1R (CARBONE et al., 1999) o qual gera fragmentos com tamanho esperado de aproximadamente 600 pares de base e ITS 1 e 4 com o mesmo tamanho de fragmento. A amplificação foi feita em solução contendo: 2,5µl tampão para reação PCR 10X; 2µl dNTP a 10 mM; 1µ de MgCl₂ a 50 mM; 0,2µ de Taq DNA Polimerase (ABM); 1µ de DNA; 1µl de cada *primer* a 10 mM, e água ultrapura (Millipore) esterilizada para o volume final de 25 µL. A reação foi realizada em termociclador AB *Applied Biosystems Veriti 96 well Thermal Cycle*, nas seguintes condições: 94°C/2min; 15 ciclos de 94°C/30 seg, 65°C/30 seg, 72°C/1 min; seguido de mais 35 ciclos de 94°C/30 seg, 48°C/30 seg, 72°C/1; extensão final a 72°C/5 min (CARBONE et al., 1999; SAMUELS et al., 2002).

6.2.7.3. Purificação dos produtos de PCR e reação de sequenciamento

Os produtos de PCR com tamanho aproximado de 400 - 600 pb foram purificados usando o kit *Wizard[®] SV and PCR Clean-UP System* (Promega[®]). As amostras foram quantificadas em gel de agarose a 2% com o marcado *Low mass* e submetidas a reação de sequenciamento usando as seguintes concentrações de reagente: 2µl tampão 5x ABI; 1µl *Primer*; 1µl *BigDye*; 1µl DNA e água ultrapura (Millipore) ajustada para o volume final de 10µl, sendo a reação realizada em termociclador AB *Applied Biosystems Veriti 96 well Thermal Cycle*, nas seguintes condições 96°C/1min; 35 ciclos de 96°C/15seg, 50°C/15 seg, 60°C/4 min; 4°C infinito, após o término as amostras foram precipitadas e ressuspendidas com 10µl de formamida HIDI.

6.2.7.4. Análise das sequências

Após o sequenciamento, as sequências foram trabalhadas e alinhadas usando o software CLC sequence e checadas quanto à qualidade e sua identidade no banco de dados do *GenBank*.

6.3. Resultados e Discussão

6.3.1. Influência do consórcio de *Trichoderma* spp. na disponibilidade de fósforo e controle de *Sclerotinia sclerotiorum*

As análises dos dados do experimento de consórcio de *Trichoderma* spp. para diversidade, análise do gene *phoD* e atividade da fosfatase ácida foram realizadas para os tratamentos voltados para a solubilização de fosfato. Dessa forma, os tratamentos T2, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T12, T13 e T14 são referentes ao estudo da disponibilidade de P para a planta. No experimento foi avaliado o potencial de duas estirpes de *Trichoderma* spp., simultaneamente, em promover o crescimento de plantas de soja, pela disponibilização de P, e no controle do mofo branco. Para isso foi realizado o teste para avaliar se ocorre inibição no contato direto entre as duas estirpes. Os resultados mostraram que o crescimento das colônias foram semelhantes e não houve a presença de um halo de inibição (Figura 1).

O efeito positivo com a aplicação de *Trichoderma* na agricultura para o controle biológico de *S. sclerotiorum* já foram reportadas na literatura (HADDAD et al., 2017; SUMIDA et al., 2018; ZHANG; GAN; XU, 2016), e também, como potencial solubilizador de fosfato (GARCÍA-LÓPEZ; AVILÉS; DELGADO, 2015; LI et al., 2015; SARAVANAKUMAR; SHANMUGA ARASU; KATHIRESAN, 2013). A aplicação de *Trichoderma* nos campos, seja como agente de biocontrole ou como biofertilizante, ainda é realizada de forma individual. Sabe-se que esse gênero fúngico têm capacidade de colonizar a região radicular das plantas (HARMAN, 2000; SAMUELS, 2006), requisito importante para um bioinoculante eficiente no solo. Mas para que a colonização seja eficaz, a compatibilidade entre as estirpes microbianas é um pré-requisito importante para o uso de um consórcio microbiano no campo (PRASAD; BABU, 2017). No solo, as comunidades microbianas convivem em harmonia e com suas funções que beneficiam as plantas ou a vida no solo, devido a compatibilidade entre os grupos para sobreviver juntas.

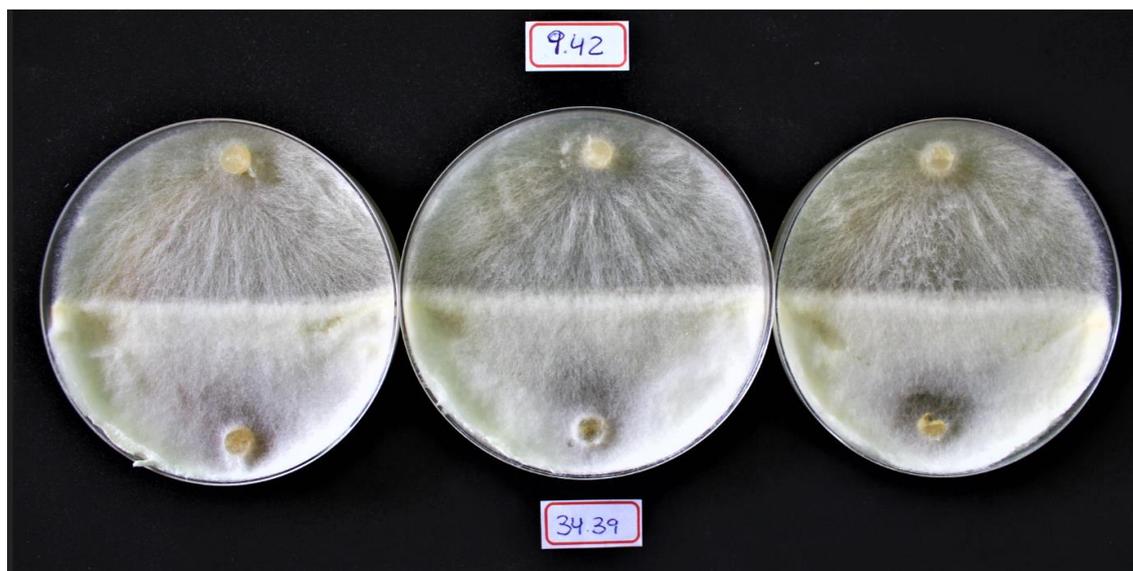


Figure 1. Teste de compatibilidade das estirpes AMS 9.42 e AMS 34.39 em meio BDA.

Plantas de soja, variedade NA 5909, receberam a aplicação de um consórcio de *Trichoderma* spp., selecionados anteriormente (Capítulo 1 e 2) a fim de avaliar a capacidade em disponibilizar fósforo para o seu desenvolvimento, quando comparadas a aplicação individual de *Trichoderma* ou apenas com uma fonte de P. Os resultados foram promissores para a utilização do consórcio, para a biomassa da área foliar (Figura 2). Os tratamentos que receberam as duas estirpes tiveram resultados significativamente ($p < 0,05$) maiores no peso da biomassa, quando comparados aos tratamentos controle (sem *Trichoderma* sp. e sem uma fonte de P) e com as estirpes aplicadas separadamente. A inoculação individual do isolado mostrou-se eficiente na presença do fosfato de rocha (T4). Os tratamentos T3, T6, T13 e T14 foram infestados com o fitopatógeno *S. sclerotiorum*. Nessas condições, a biomassa foliar foi maior nos tratamentos que receberam o consórcio de *Trichoderma* spp. (Figura 2) e o menor valor foi para o tratamento que recebeu apenas o patógeno (T11). Para a biomassa radicular, também observou-se o potencial do consórcio. Além disso, o ganho da biomassa foi significativa ($p < 0,05$) na presença do fosfato de rocha Bayóvar. O isolado AMS9.42, na presença do fitopatógeno, no consórcio ou isoladamente, foi capaz de controlar o mofo branco, comparando com o tratamento só com a doença.

A presença de *S. sclerotiorum* já causou danos na biomassa de plantas de soja em até 46% (BOTELHO et al., 2013). No geral, a perda na produção agrícola é de 30% (Andrade, 2016), podendo chegar, dependendo das condições ambientais à perdas de 100% (HENNEBERG et al., 2012). *Trichoderma* é um fungo conhecido no biocontrole de *S. sclerotiorum*, com produtos registrados no mercado para o controle do mofo branco na cultura

do soja (BETTIOL et al., 2019). Assim, o controle da doença auxilia no aumento da biomassa da planta, como apresentados nos dados obtidos nesse estudo (Figura 2). Outros autores demonstraram o efeito de *Trichoderma* spp. no ganho de biomassa pela cultura (HADDAD et al., 2017; KHOMARI; DAVARI, 2017; ZANDONÁ et al., 2019).

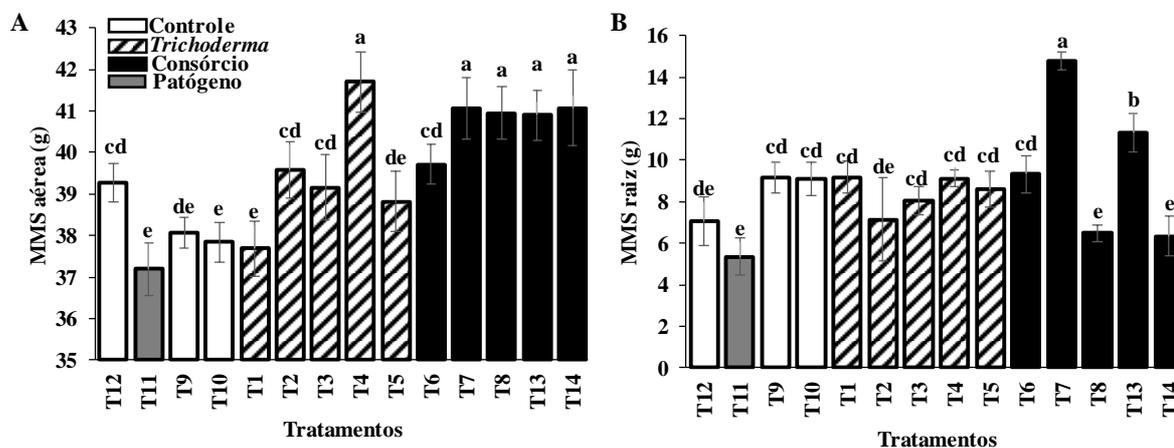


Figura 2. Média da massa de matéria seca das plantas de soja na presença de *Trichoderma* (preto e listrado) e controle (branco). (A) Massa matéria seca aérea; (B) Massa matéria seca raiz. Letras distintas diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram observadas na altura das plantas de soja. Os tratamentos que receberam as estipes de *Trichoderma* spp., seja individual ou no consórcio mostraram um resultado promissor (Figura 3). O tratamento infestado com o fitopatógeno e com aplicação do fosfato de rocha foi o que a planta melhor se desenvolveu (T13). A eficiência no aumento do tamanho das plantas de soja variou de 28,1 a 75,4% para aplicação do consórcio em relação ao tratamento controle (T12). Os tratamentos que receberam apenas a estirpe solubilizadora de P foram entre 29 a 52,5% e as que receberam apenas fontes de fosfato, 7,2 e 4,1%, para o fosfato de rocha e superfosfato triplo, respectivamente. Para a estirpe AMS9.42, de controle biológico, a eficiência foi de 16,3 e 41,8%. O efeito de *Trichoderma* spp. no desenvolvimento da cultura da soja foi evidente nos resultados apresentados nesse trabalho, sendo possivelmente um bom bioestimulante para a aplicação no campo para a cultura. Kuchlan et al., (2017) mostrou o efeito positivo na altura de plantas de soja quando tratadas com *Trichoderma viride* (KUCHLAN; KUCHLAN; ANSARI, 2017). O mesmo efeito com cepas de *Trichoderma* sp. foi evidenciado por Zandona et al. (2017) e Yusnawan et al. (2019)(YUSNAWAN; INAYATI; BALIADI, 2019).

A eficiência na absorção de fósforo na área foliar mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) para a aplicação do consórcio (Figura 4). A aquisição de fósforo pela planta de soja

nos tratamentos que receberam o consórcio variou de 39,6 a 49%. Esse resultado é bastante promissor, pois a aplicação de um consórcio de *Trichoderma* com finalidades diferentes estimulou a aquisição de fósforo pela planta. Provavelmente houve um efeito antagonista da estirpe AMS9.42 no solo, que auxiliou o desenvolvimento da planta com a presença de uma comunidade microbiana e da estirpe AMS34.39 que estimularam a solubilização e a absorção do fósforo pela planta. Esse resultado é de grande importância na procura de um bioinoculante para soja.

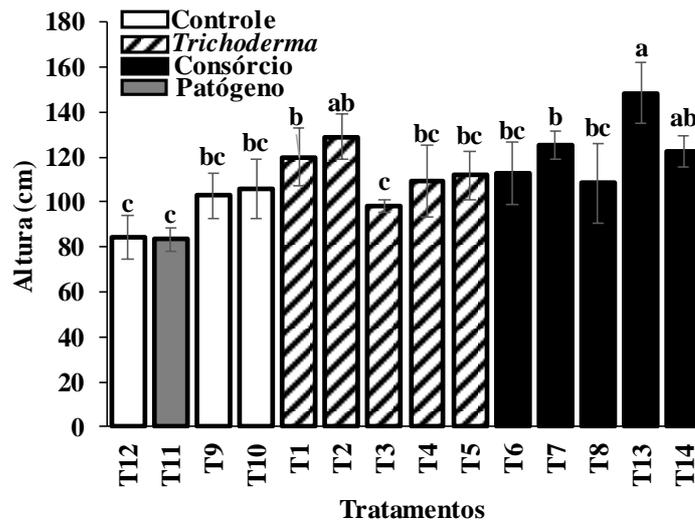


Figura 3. Média da altura das plantas de soja na presença de *Trichoderma* (preto e listrado) e controle (branco). (A) Vasos de 6 litros; (B) vasos de 3 litros. Letras distintas diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

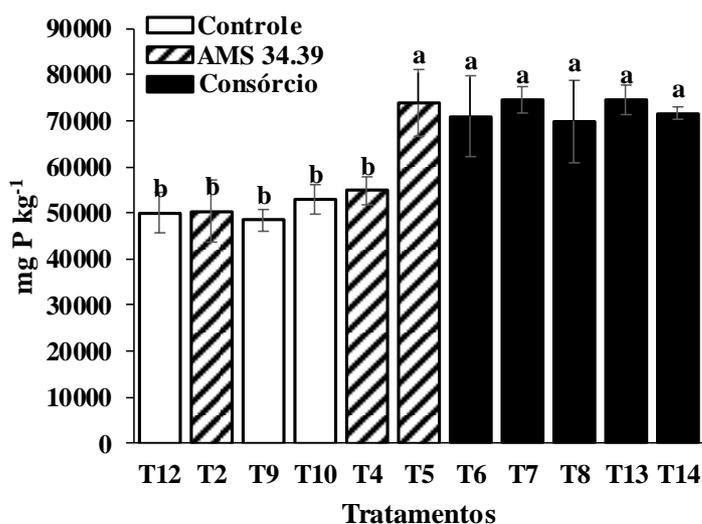


Figura 4. Média da absorção de P pela área foliar das plantas de soja na presença de *Trichoderma* (preto e listrado) e controle (branco). Letras distintas diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os valores no índice de clorofila foram significativos ($p < 0,05$). Os tratamentos com a presença apenas do *Trichoderma* sp. solubilizador de fosfato foi o que demonstrou os melhores resultados (Figura 5). A presença de *S. sclerotiorum* no solo provavelmente pode ter afetado a taxa fotossintética das plantas de soja (T6, T13 e T14). O efeito negativo na fotossíntese pela presença de *S. sclerotiorum* já foi reportado na literatura (KOPACKI; WAGNER, 2016).

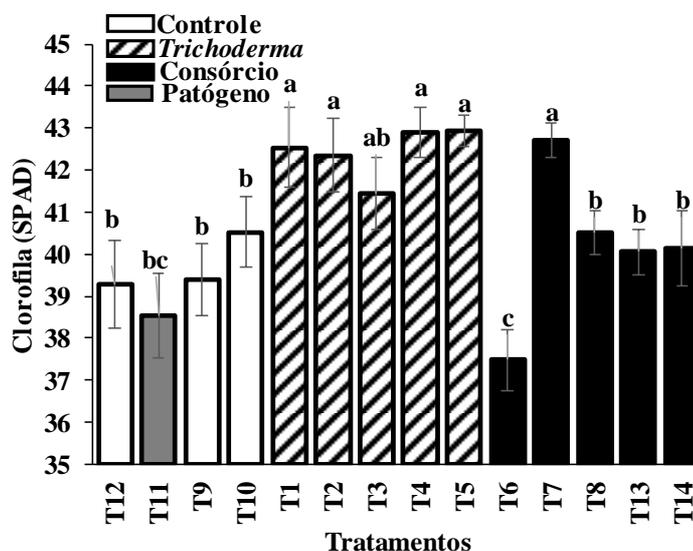


Figura 5. Média do índice de clorofila das plantas de soja na presença de *Trichoderma* (preto e listrado) e controle (branco). Letras distintas diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

A produtividade no experimento foi avaliada pela produção de vagens entre os tratamentos. Adicionalmente, foi avaliado a quantidade de trifólios produzidos pelas plantas. Houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos para essas duas variáveis (Tabela 2). O número de trifólios produzido em menor quantidade pelo tratamento controle e com apenas a fonte de superfosfato triplo. Os demais tratamentos, que receberam as estirpes de *Trichoderma* spp. a quantidade de trifólios foram maiores e significativamente melhores. A produção de vagens também apresentou diferenças significativas. Nos tratamentos sem a presença de *Trichoderma* os número de vagens foram menores. A presença do isolado solubilizador de fosfato melhorou a produção de vagens, e a combinação com o isolado de controle biológico aumentou a produtividade, mesmo na presença do fitopatógeno (T14). O melhor tratamento na produção de vagens foi o consórcio com a fonte de fosfato de rocha.

O aumento no número de vagens produzidas pela cultura da soja foi relatado recentemente por Zandoná et al. (2019). Eles avaliaram a interferência de insumos químicos e biológicos no desenvolvimento e produtividade da cultura. O número de vagens foi significativamente maior quando se utilizou *Trichoderma*, seja aplicado sozinho ou junto com os produtos químicos, em relação ao produto químico e ao controle. No campo, *Trichoderma* sp. aumentou a produtividade de soja em três áreas com plantação da cultura diferentes (GONÇALVES et al., 2018). *Trichoderma* spp. podem aumentar a produtividade da soja (CHAGAS et al., 2017; KUCHLAN; KUCHLAN; ANSARI, 2017).

Tabela 2. Número de trifólios e vagens produzidos no experimento de consórcio de *Trichoderma* spp. em plantas de soja.

Tratamentos	Nº de trifólios	Nº de vagens
T12	25 bc	15 d
T2	30 a	27 abc
T9	31 a	16 cd
T10	25 c	17 bcd
T4	32 a	20 bcd
T5	30 a	27 abc
T6	31 a	23 abc
T7	31 a	32 a
T8	31 a	28 abc
T13	32 a	30 ab
T14	28 ab	26 abc

Letras distintas diferem significativamente segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$)

Nos últimos anos, houve um aumento de estudos voltados para comunidades sintéticas de microrganismos, com mecanismos de ação diferentes, seja para promoção de crescimento ou para o biocontrole de doenças de plantas (OLANREWaju et al., 2019; SARAF; PANDYA; THAKKAR, 2014). Para se desenvolver um consórcio microbiano e aplicá-lo no campo, é necessário alguns conhecimentos sobre as cepas utilizadas. Tais como identificação das culturas com potencial bioestimulante ou biocontrolador, avaliação da compatibilidade entre as cepas, estudo da causa e efeito na comunidade nativa do solo e por fim, uma formulação que seja adequada para todas as cepas presentes na comunidade (BERG et al., 2014; KONG et al., 2018; WOO; PEPE, 2018). O consórcio com estirpes de *Trichoderma* spp. pode trazer vantagens no processo de formulação, por ter características fisiológicas parecidas e portanto, crescerem em substratos semelhantes. Nos capítulos anteriores, foi selecionado as estirpes solubilizadoras de fosfato e para o controle biológico. Nesse capítulo, foi avaliado o potencial dessas estirpes na

aplicação em conjunto, e observado os resultados positivos em relação aos parâmetros analisados na cultura da soja. Dessa forma, foi verificado o efeito que a aplicação desse consórcio microbiano teve sobre a comunidade de bactérias e fungos do solo.

Um total de 7705 OTUs foram geradas no sequenciamento, para fungos e bactérias, após um pré-processamento de filtragem de mitocôndrias e cloroplastos dos dados brutos. Em média, o número de OTUs observadas, o índice de Shannon e o de Simpson não diferiram na aplicação do consórcio em relação ao controle ou à cepa solubilizadora de fosfato (Figura 6). Esses resultados sugerem que a aplicação de *Trichoderma* spp. como um probiótico para a soja não alterou a estrutura da comunidade bacteriana presente no solo. Os resultados foram positivos para o desenvolvimento das plantas nos experimentos. Porém, as bactérias podem trazer benefícios ou não para as culturas agrícolas. As rizobactérias promotoras de crescimento, por exemplo, são benéficas para as plantas, capazes de melhorar a disponibilidade de nutrientes por diversos mecanismos de ação (OLANREWAJU et al., 2019; WOO; PEPE, 2018). Por outro lado, existem no solo uma gama de bactérias fitopatogênicas, que são prejudiciais para a produtividade de uma variedade de culturas agrícolas (MARTINS et al., 2018). Há poucos estudos que mostram o efeito de *Trichoderma* spp. no controle de doenças bacterianas de plantas (KONAPPA et al., 2018; NIKOLIĆ et al., 2013).

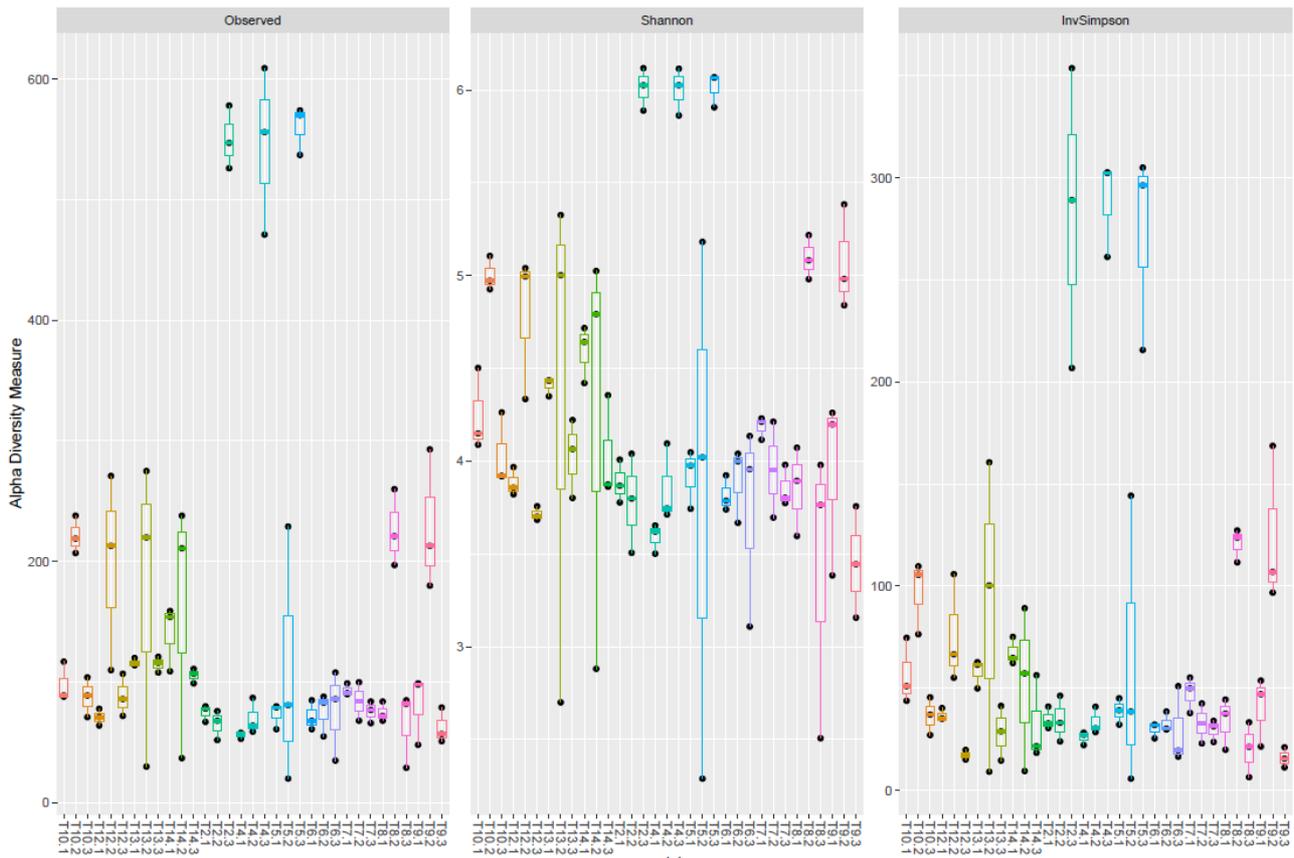


Figura 6. Índice de alfa diversidade para a comunidade bacteriana do solo entre os tratamentos com consórcio, AMS 34.39 e o controle. (A) Número de OTUs observadas; (B) índice de diversidade de Shannon; (C) índice de Simpson.

Para a comunidade fúngica houve diferença entre os tratamentos (Figura 7). O número de OTUs observadas foi menor quando aplicado o consórcio de *Trichoderma*. Provavelmente, por *Trichoderma* ser um fungo micoparasita e com crescimento rápido, colonizou grande parte da rizosfera das plantas (HARMAN, 2011). Além disso, é um fungo bastante conhecido no biocontrole de fitopatógenos fúngicos, o que sugere a diminuição desses grupos no solo (DRUZHININA et al., 2011; HARMAN, 2006), considerando que no consórcio o isolado AMS9.42 é para biocontrole. Portanto, pode estar relacionado com os resultados observados para os índices de Shannon e Simpson, sugerindo a baixa diversidade quando comparados com o tratamento controle e com o solubilizador de fosfato.

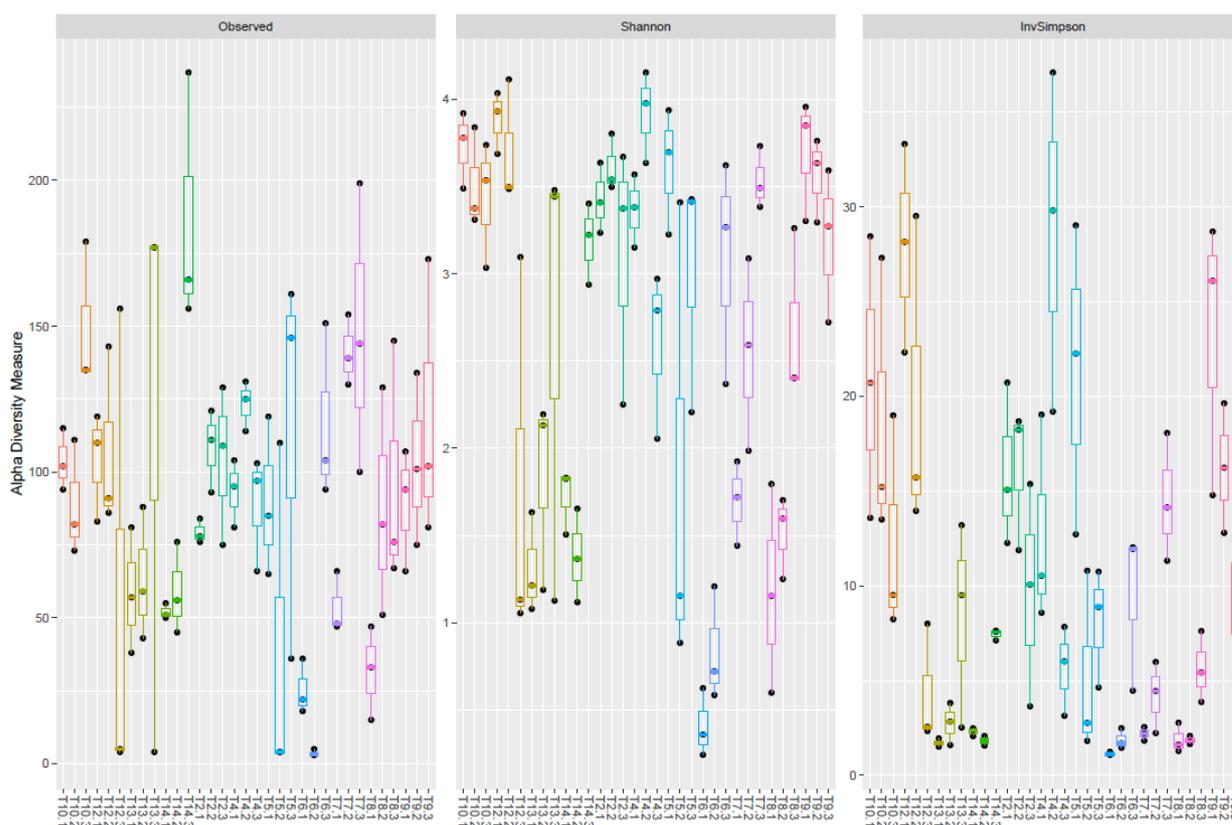


Figura 7. Índice de alfa diversidade para a comunidade fúngica do solo entre os tratamentos com consórcio, AMS 34.39 e o controle. (A) Número de OTUS observadas; (B) índice de diversidade de Shannon; (C) índice de Simpson.

Para conhecer os grupos taxômicos presentes nos tratamentos aplicados ao experimento, as sequências pertencentes ao Domínio *Bactéria* foram dispostas nos dezessete principais gêneros presentes no solo e treze filos (Figura 8), acima de 5% de representatividade. Os filos Proteobacteria e Firmicutes mostraram um padrão similar, diminuindo sua abundância no terceiro ciclo em todos os tratamentos. Em contrapartida, os demais filos aumentaram sua abundância no terceiro ciclo. O gênero de *Sphingomonas* apareceu em todos os tratamentos, principalmente na primeira e segunda coleta e em maior frequência na presença de *Trichoderma* spp. Esse grupo bacteriano foi relatado na literatura como promotor de crescimento de plantas, auxilia a planta contra estresse abiótico e na fixação de nitrogênio (LUO et al., 2019; VIDEIRA et al., 2009; YANG et al., 2014). Nos tratamentos com o consórcio houve uma diminuição do gênero *Bacillus*, na rizosfera das plantas de soja. Esse grupo bacteriano e Burkholderia são potenciais solubilizadores de fosfato (ALORI; GLICK; BABALOLA, 2017; MATOS et al., 2017). A abundância dos gêneros bacterianos alteraram no decorrer do experimento e também, nos diferentes tratamentos aplicados. Porém a diversidade não foi alterada (Figura 8).

tratamentos que receberam o consórcio de *Trichoderma* spp. a abundância desse gênero foi aproximadamente 80%, na primeira e segunda coleta. Os mesmos tratamentos, na terceira coleta, estágio em que a planta já está em senescência, a abundância do fungo diminuiu. Além disso, nos demais tratamentos, em que a abundância de *Trichoderma* foi menor ou sem a presença, o gênero *Fusarium* foi o mais abundante no solo. É um fungo comum presente no solo, causa necrose radicular de diversas culturas e apresentam diferenças no número de espécies, hospedeiro e virulência (WALKER et al., 2016). A comunidade fúngica sofreu alterações na sua comunidade com a presença do consórcio, corroborando com os resultados obtidos para alfa diversidade e OTUs observadas. Provavelmente pela predominância do gênero *Trichoderma* no solo.

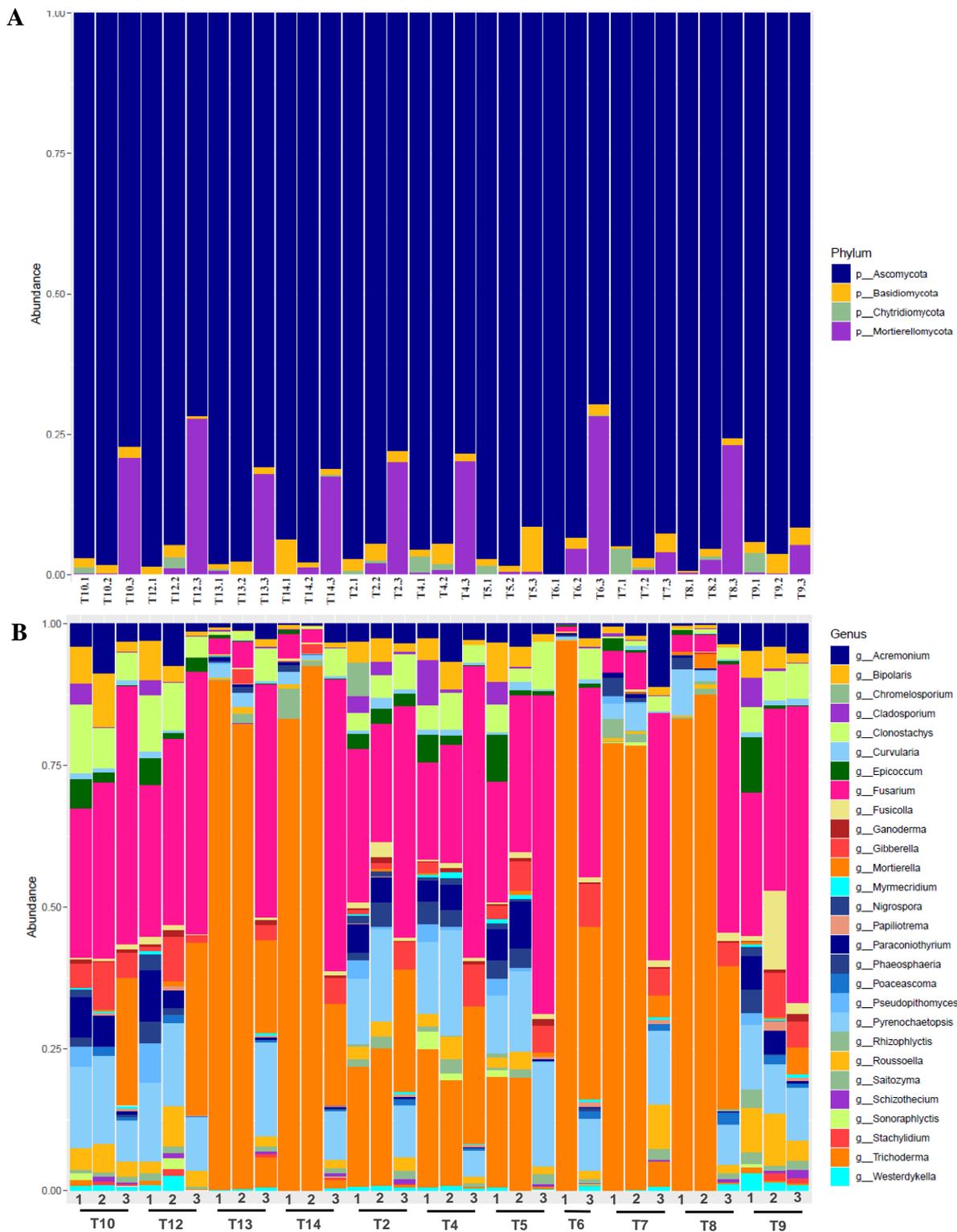


Figura 9. Abundância relativa da comunidade fúngica do solo entre os tratamentos. .1 – 1^a coleta; .2 – 2^a coleta e .3 – 3^a coleta.

O efeito na abundância relativa da comunidade de fungos quando se compara o uso do consórcio em relação ao controle e a estirpe solubilizadora de fosfato é variável (Figura 10). A estabilidade das cepas de *Trichoderma* na rizosfera da soja foi evidenciada pelos resultados

observados de diversidade. A abundância de *Trichoderma* nos tratamentos que receberam o consórcio foram em até três vezes maiores que os que receberam apenas o *Trichoderma* solubilizador de fosfato. A capacidade de se estabelecer na rizosféra das plantas sugere o grande potencial desses fungos como um probiótico para a cultura da soja. Além disso, também houve o controle de *S. sclerotiorum*, pois a abundância relativa do gênero não é relevante entre os 28 gêneros mais abundantes. Muitos trabalhos destacam a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. em colonizar raízes de plantas (HARMAN, 2011; HOWELL, 2003). Essa habilidade dos isolados de *Trichoderma* spp. na colonização de raízes é uma característica importante para a atuação desses agentes no controle biológico ou promoção de crescimento de plantas. Para competir com patógenos ou outros micro-organismos prejudiciais às plantas, por espaço e/ou nutrientes, esses fungos devem ser capazes de crescer na rizosfera (HARMAN, 2000; SAMUELS, 2006), bem como se estabelecer para poder garantir a interação com a planta.

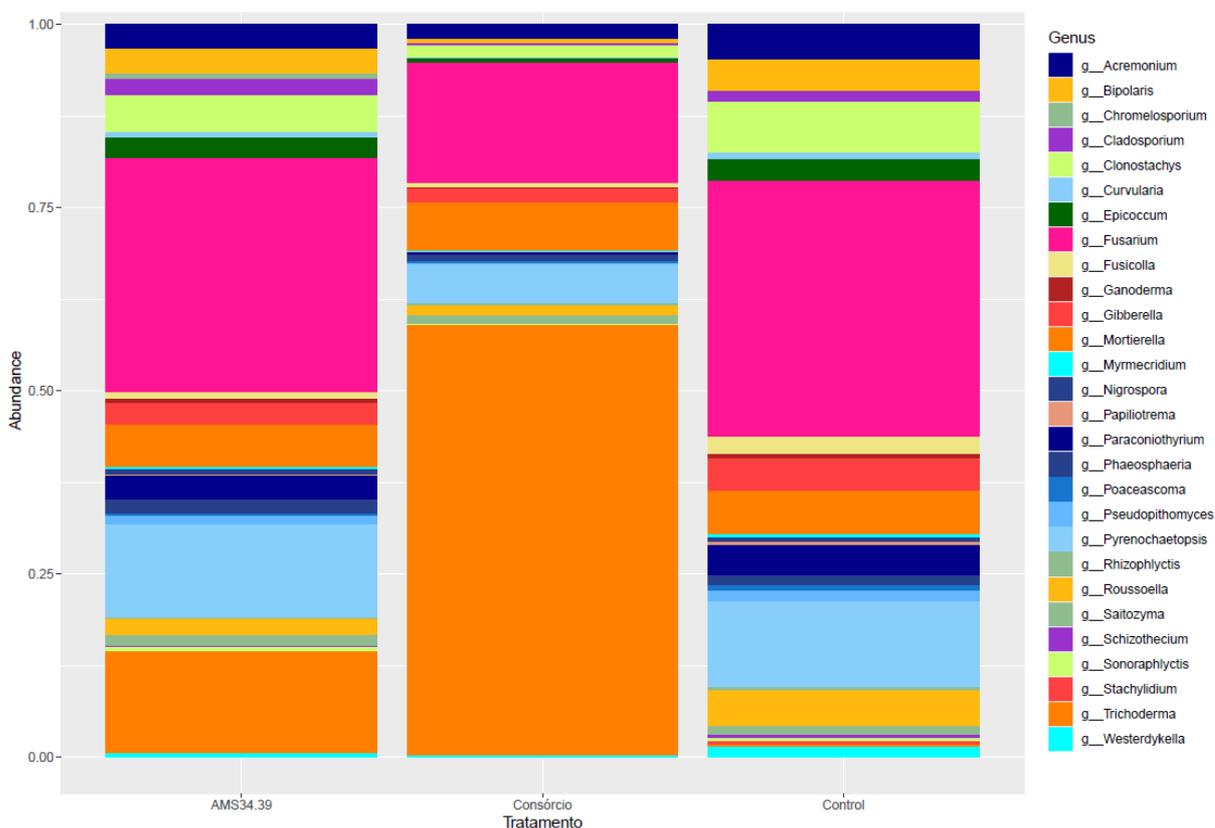


Figura 10. Abundância relativa da comunidade fúngica do solo entre os tratamentos com consórcio, AMS 34.39 e o controle.

Quando comparamos as fontes de P aplicadas ao solo, o resultado foi promissor para a abundância relativa do gênero *Trichoderma* com a presença destas (Figura 11). A maior abundância foi para o fosfato de rocha, corroborando com os resultados avaliados nas plantas de soja (altura, MMS foliar e raiz), bem como para a produção de vagens. A Figura x também

mostrou que a medida que a abundância de *Trichoderma* diminui, a de *Fusarium* e *Pyrenochaetopsis* aumentam. Esses dois fungos são fitopatógenos de culturas agrícolas (DA SILVA et al., 2019; WALKER et al., 2016).

Uma publicação recente, mostrou que as plantas quando têm uma quantidade suficiente de fósforo no solo, recrutam mais bactérias do que fungos. Porém, se o P presente no solo não for suficiente para seu desenvolvimento o recrutamento da comunidade fúngica é maior (ZUCCARO, 2019). Dessa forma, o uso de um fungo solubilizador de fosfato em conjunto com um de biocontrole, pode ser um bioinoculante promissor para a aplicação nos solos agrícolas. Uma vez que os solos brasileiros são deficientes em fósforo.

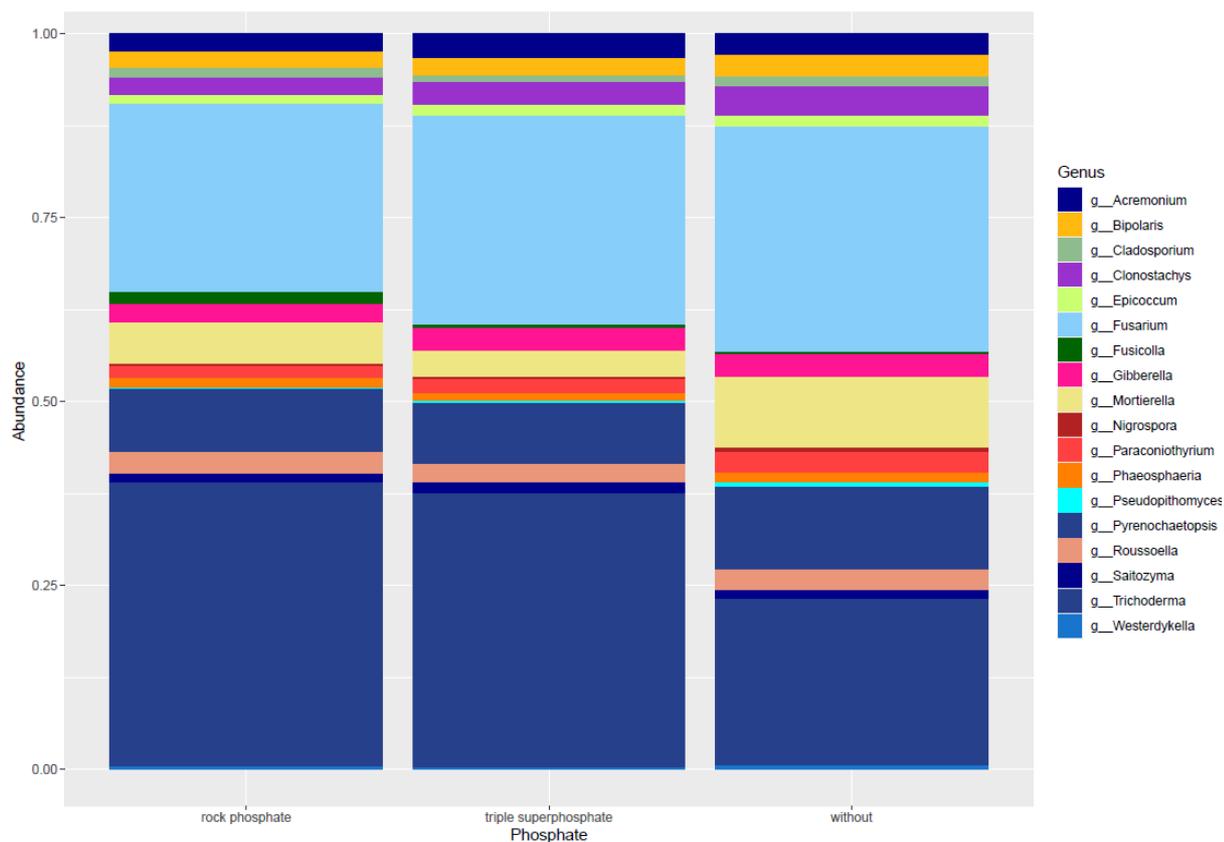


Figura 11. Abundância relativa da comunidade fúngica do solo entre os tratamentos com fosfato de rocha Bayóvar, superfosfato triplo e sem fosfato.

A análise de correspondência canônica (CCA) foi feita para correlacionar as variáveis analisadas nas plantas de soja, ao final do experimento com os tratamentos com e sem aplicação do consórcio (Figura 12). Foi aplicado o teste de permutação de Monte Carlo ($p < 0,05$). O que mostrou que os dados estavam sempre correlacionados com os tratamentos que receberam o consórcio ou a estirpe solubilizadora de fosfato. Mais uma vez, essa associação mostrou o potencial de *Trichoderma* em auxiliar o desenvolvimento da soja, bem como proteger a planta de *S. sclerotiorum*.

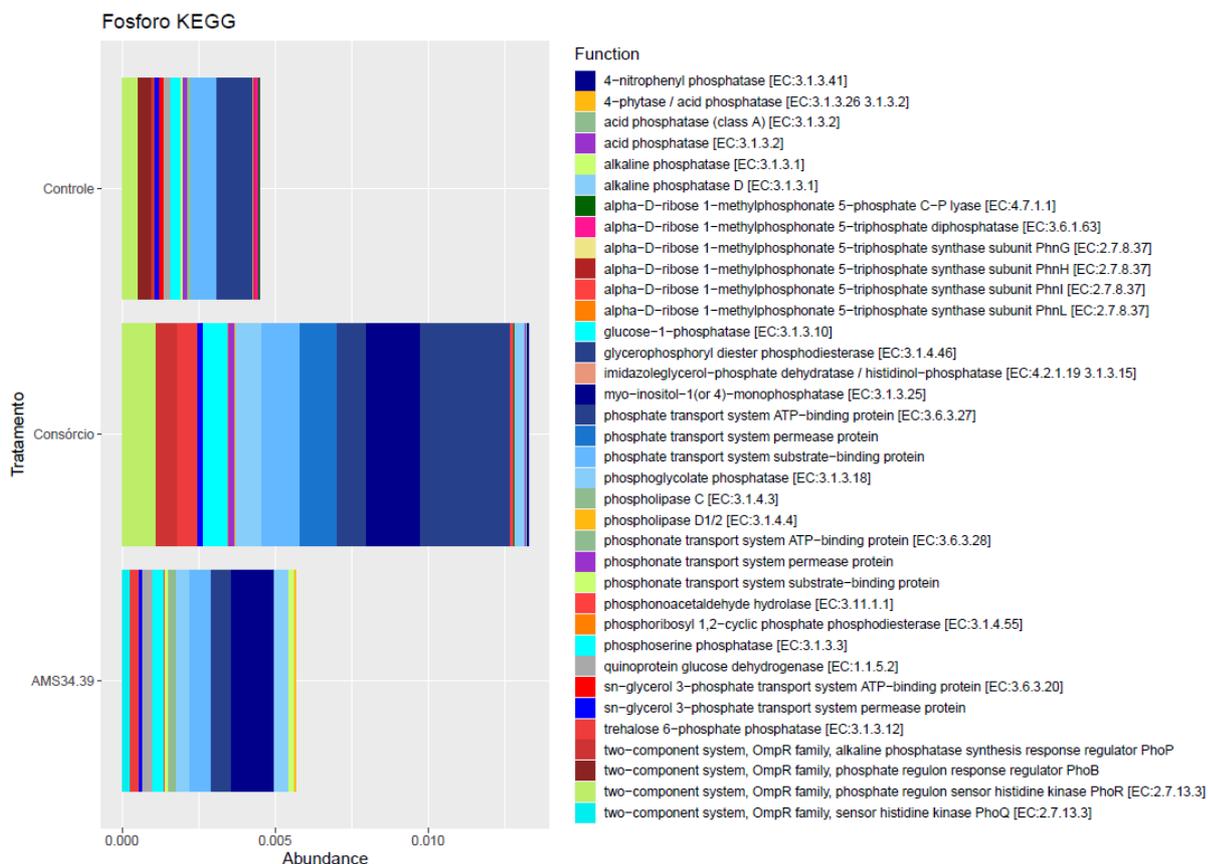


Figura 13. Predição de função das comunidades bacterianas solubilizadoras de fosfato nos tratamentos do consórcio, AMS34.39 e controle, nas três coletas em relação as variáveis da planta de soja.

A atividade da fosfatase ácida e a quantificação do gene *phoD*, relacionados ao processo de solubilização de fosfato foram avaliados nas três coletas (Figura 16). A atividade da fosfatase foi maior com a presença de *Trichoderma*, independente se presente no consórcio ou não, e em geral, para a segunda coleta. Esse resultado é esperado pois é a o período de enchimento dos grãos de soja, e o requerimento de fósforo pela planta é maior. A atividade da fosfatase disponibiliza P para seu metabolismo (NANNIPIERI et al., 2011) o que pode justificar o aumento dessa enzima na segunda coleta. Já a abundância do gene *phoD* foi maior na segunda e principalmente, terceira coleta, quando a planta já está no estágio final de enchimento dos grãos. Esse resultado foi observado inclusive no tratamento controle, o que sugere que a planta possa estar recrutando a comunidade microbiana solubilizadora de fosfato para manter a disponibilidade de fósforo na planta.

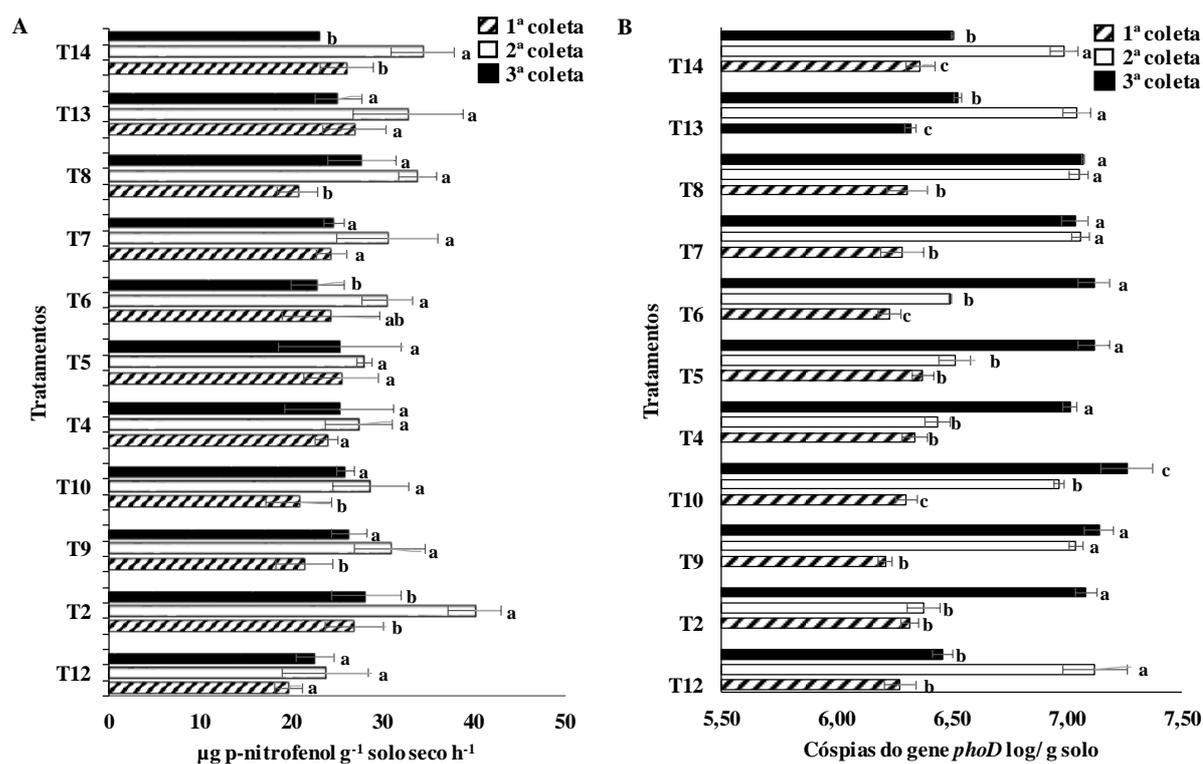


Figura 16. Média da atividade da fosfatase ácida e quantificação do gene *phoD* nas três coletas realizadas no experimento. (A) Fosfatase ácida; (B) gene *phoD*. Letras distintas diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Foi realizada a identificação taxonômica dos dois isolados de *Trichoderma* spp. pertencentes ao consórcio, pelo conjunto de primers ITS e TEF. O índice de similaridade entre as sequências das estirpes selecionadas e as mais próximas estão na tabela x=3. Muitos trabalhos envolvendo o controle biológico de *S. sclerotiorum* citam espécie de *Trichoderma harzianum* como um eficiente agente de biocontrole (ABDULLAH; ALI; SULEMAN, 2008; BAE; KNUDSEN, 2007; ZHANG et al., 2016). Porém existe produto no mercado brasileiro, para tratamentos de sementes, no controle de *S. sclerotirum* à base de *Trichoderma asperellum*. Além disso, essa espécie auxilia no desenvolvimento e produtividade de plantas de soja (CHAGAS et al., 2017; ZANDONÁ et al., 2019). *Trichoderma spirale* é reportado na literatura como agente de controle biológico (BAIYEE et al., 2019; VARGAS INCIARTE et al., 2018).

Tabela 3. Inferência taxonômica e número de acesso para as sequências de *Trichoderma*.

Código	Gênero	Táxon mais próximo	Identidade (% GenBank)
AMS 34.39	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma spirale</i>	99,46 MK808807.1
AMS 9.42	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>	99,04 MK850832.1

6.4. Conclusão

Neste estudo, a aplicação do consórcio de *Trichoderma* spp. mostrou resultados promissores, destacando a importância do bioma Amazônia como fonte de novas manchas microbianas com importância biotecnológica. Os fungos, aplicado em conjunto, e com uma fonte de fósforo e *S.sclerotiorum*, promoveu o crescimento da planta da soja e controlou o avanço da doença. Além disso, a aplicação do consórcio não alterou a comunidade bacteriana do solo, mas estimulou os grupos envolvidos na aquisição de fósforo. Pesquisas envolvendo diferentes cepas de *Trichoderma* com atributos benéficos, incluindo a promoção do crescimento de plantas e o biocontrole de fitopatógenos, devem ser considerados no desenvolvimento de formulações. Ainda é preciso aplicar o consórcio no campo para referenciar seu benefício para a cultura, dessa forma podendo-se desenvolver um bioinoculante.

Referências

- ABDULLAH, M. T.; ALI, N. Y.; SULEMAN, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, v. 27, n. 10, p. 1354–1359, 2008.
- ALORI, E. T.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–8, 2017.
- BAE, Y. S.; KNUDSEN, G. R. Effect of sclerotial distribution pattern of *Sclerotinia sclerotiorum* on biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. **Applied Soil Ecology**, v. 35, n. 1, p. 21–24, 2007.
- BAIYEE, B. et al. *Trichoderma spirale* T76-1 displays biocontrol activity against leaf spot on lettuce (*Lactuca sativa* L.) caused by *Corynespora cassiicola* or *Curvularia aeria*. **Biological Control**, v. 129, p. 195–200, 2019.
- BERG, G. et al. Unraveling the plant microbiome: Looking back and future perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. JUN, p. 1–8, 2014.
- BETTIOL, W. et al. Produtos comerciais à base de *Trichoderma*. In: **Trichoderma Uso na Agricultura**. Brasília: 2019. p. 538.

BOTELHO, S. et al. Performance of common bean seeds infected by pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 2, p. 153–160, 2013.

CARBONE, I. et al. Mycological Society of America A Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, n. 3, p. 553–556, 1999.

CHAGAS, L. F. B. et al. *Trichoderma asperellum* efficiency in soybean yield components. **Comunicata Scientiae**, v. 8, n. 1, p. 165–169, 2017.

DA SILVA, R. R. et al. Biochemical Properties and Catalytic Specificity of a Novel Neutral Serine Peptidase Secreted by Fungus *Pyrenochaetopsis* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187, n. 4, p. 1158–1172, 2019.

DIXON, P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. **Journal of Vegetation Science**, v. 14, p. 927–930, 2003.

DRUZHININA, I. S. et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 749–59, 2011.

GARCÍA-LÓPEZ, A. M.; AVILÉS, M.; DELGADO, A. Plant uptake of phosphorus from sparingly available P- sources as affected by *Trichoderma asperellum* T34. **Agricultural and Food Science**, v. 24, n. 3, p. 249–260, 2015.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v. 2, p. 113–118, 1993.

GONÇALVES, A. H. et al. *Trichoderma* efficiency in the maintenance and productivity of soybean plants in producing savanna regions, Tocantins, Brazil Eficiência de *Trichoderma* na manutenção e produtividade de plantas de soja. **Revista de Ciências Agrária**, v. 41, n. 1, p. 175–181, 2018.

HADDAD, P. E. et al. Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *sclerotiorum* in soybean. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 52, n. 12, p. 1140–1148, 2017.

HARMAN, G. E. Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum*

T-22. **Plant Disease**, v. 84, n. 4, p. 377–393, 2000.

HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species--opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43–56, 2004.

HARMAN, G. E. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 190–194, 2006.

HARMAN, G. E. Multifunctional fungal plant symbionts: New tools to enhance plant growth and productivity. **New Phytologist**, v. 189, n. 3, p. 647–649, 2011.

HAYASHI, S. et al. The glycerophosphoryl diester phosphodiesterase-like proteins SHV3 and its homologs play important roles in cell wall organization. **Plant and Cell Physiology**, v. 49, n. 10, p. 1522–1535, 2008.

HENNEBERG, L. et al. Incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja e sensibilidade dos testes de detecção. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 47, n. 6, p. 763–768, 2012.

HERMOSA, R. et al. Mini-Review Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v. 158, p. 17–25, 2012.

HERMOSA, R. et al. The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. **International Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 69–80, 2013.

HOWELL, C. R. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases : The History and Evolution of Current Concepts. **USDA/ARS Southern Plains Agricultural Research Center**, v. 87, n. 1, p. 4–10, 2003.

KHOMARI, S.; DAVARI, M. *Trichoderma*-Induced Enhancement of Soybean Seedling Performance in Response to Salt Stress *Trichoderma* -Induced Enhancement of Soybean Seedling Performance in Response to Salt Stress. **Journal of Plant Physiology and Breeding**, v. 7, n. January, p. 27–39, 2017.

KONAPPA, N. et al. Evaluation of biological efficacy of *Trichoderma asperellum* against tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, n. 1, 2018.

KONG, W. et al. Designing microbial consortia with defined social interactions. **Nature Chemical Biology**, v. 14, n. 8, p. 821–829, 2018.

KOPACKI, M.; WAGNER, A. Pathogenicity of *Fusarium oxysporum*, *Fusarium avenaceum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and their effect on photosynthetic activity of chrysanthemum plants *avenaceum* and *sclerotinia sclerotiorum* and their effect on photosynthetic activity of chrysanthemum. **Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus**, v. 15, n. 3, p. 59–70, 2016.

KUHLAN, P.; KUHLAN, M. K.; ANSARI, M. M. Efficient application of *Trichoderma viride* on soybean [*Glycine max* (L .) Merrill] seed using thin layer polymer coating. **AGRICULTURAL RESEARCH COMMUNICATION CENTRE**, p. 2–5, 2017.

LI, R. et al. Solubilisation of Phosphate and Micronutrients by *Trichoderma harzianum* and Its Relationship with the Promotion of Tomato Plant Growth. **PLoS ONE**, p. 1–16, 2015.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 63, p. 541–556, 2009.

LUO, Y. et al. *Sphingomonas* sp. Cra20 increases plant growth rate and alters rhizosphere microbial community structure of *Arabidopsis thaliana* under drought stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JUN, 2019.

MARTINS, P. M. M. et al. Persistence in phytopathogenic bacteria: Do we know enough? **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 1–14, 2018.

MATOS, A. D. M. et al. Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 4, p. 2945–2954, 2017.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. v. 8, n. 4, 2013.

MEDEIROS, F. H. V. et al. *Trichoderma*: interações e estratégias. In: **Trichoderma Uso na Agricultura**. 2019. p. 538.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J. M. The rhizosphere microbiome: **FEMS Microbiology Rev**, v. 37, n. 5, p. 634–663, 2013.

MENDOZA-MENDOZA, A. et al. Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots : Role

of the fungal secretome. **Fungal Biology Reviews**, p. 1–24, 2017.

MUKHERJEE, A. K. et al. Biocontrol potential of three novel *Trichoderma* strains : isolation , evaluation and formulation. p. 275–281, 2014.

NANNIPIERI, P. et al. Phosphorus in Action. In: **Soil Biology**. 2011: v. 26p. 215–243.

NIETO-JACOBO, M. F.; STEYAERT, J. M.; SALAZAR-BADILLO, F. B. Environmental Growth Conditions of *Trichoderma* spp . Affects Indole Acetic Acid Derivatives , Volatile Organic Compounds , and Plant Growth Promotion. v. 8, n. February, p. 1–18, 2017.

NIKOLIĆ, I. et al. Antibacterial activities of some *Bacillus* spp . and *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic bacteria. v. 64, n. 4, p. 189–197, 2013.

OKSANEN, A. J. et al. Package ‘vegan’. v. 1, p. 296p, 2019.

OLANREWAJU, O. S. et al. Plant health: feedback effect of root exudates-rhizobiome interactions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 3, p. 1155–1166, 2019.

PAPAVIZAS, G. C. Survival of *Trichoderma harzianum* in Soil and in Pea and Bean Rhizospheres. **Phytopathology**, 1982.

PRASAD, A. A.; BABU, S. in growth promotion of groundnut (*Arachis hypogea* L .). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, p. 1027–1040, 2017.

RASTOGI, G. et al. Leaf microbiota in an agroecosystem : spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. **The ISME Journal**, p. 1812–1822, 2012.

SAKURAI, M. et al. Analysis of bacterial communities on alkaline phosphatase genes in soil supplied with organic matter. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 54, p. 62–71, 2008.

SAMUELS, G. J. et al. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, v. 94, n. 1, p. 166–170, 2002.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 195–206, 2006.

SARAF, M.; PANDYA, U.; THAKKAR, A. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 18–

29, 2014.

SARAVANAKUMAR, K.; SHANMUGA ARASU, V.; KATHIRESAN, K. Effect of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of *Avicennia marina*. **Aquatic Botany**, v. 104, p. 101–105, 2013.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics for studying unculturable microorganisms: Cutting the Gordian knot. **Genome Biology**, v. 6, n. 8, p. 6–9, 2005.

SCHROEDER, P. J.; JENKINS, D. G. How robust are popular beta diversity indices to sampling error. **Ecosphere**, v. 9, n. 2, 2018.

SOGIN, M. L. et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. **PNAS**, v. 103, n. 32, p. 12115–12120, 2006.

SUMIDA, C. H. et al. *Trichoderma asperelloides* antagonism to nine *Sclerotinia sclerotiorum* strains and biological control of white mold disease in soybean plants. **Biocontrol Science and Technology**, v. 28, n. 2, p. 142–156, 2018.

TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Bd. Biochem.**, v. 1, p. 301–307, 1969.

VARGAS INCIARTE, L. et al. Use of different *Trichoderma* species in cherry type tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) Against *Fusarium oxysporum* wilt in tropical greenhouses. **Agronomía Costarricense**, v. 43, n. 1, p. 85–100, 2018.

VIDEIRA, S. S. et al. Occurrence and diversity of nitrogen-fixing Sphingomonas bacteria associated with rice plants grown in Brazil. **FEMS Microbiology Letters**, v. 293, n. 1, p. 11–19, 2009.

WALKER, C. et al. Caracterização morfológica, molecular e patogenicidade de *Fusarium acuminatum* E *Fusarium verticillioides* A *Cordia americana*. **Ciencia Florestal**, v. 26, n. 2, p. 463–473, 2016.

WANG, Y.; QIAN, P. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. v. 4, n. 10, 2009.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for

phylogenetics. **Academic Press**, Inc., 1990.

WOO, S. L.; PEPE, O. Microbial Consortia : Promising Probiotics as Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture. **Frontiers in plant science**, v. 9, n. 2003, p. 7–12, 2018.

YANG, J.; KLOEPPER, J. W.; RYU, C. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 1, p. 1–4, 2009.

YANG, S. et al. Growth-promoting *Sphingomonas paucimobilis* ZJSH1 associated with *Dendrobium officinale* through phytohormone production and nitrogen fixation. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 6, p. 611–620, 2014.

YUSNAWAN, E.; INAYATI, A.; BALIADI, Y. Effect of soybean seed treatment with *Trichoderma virens* on its growth and total phenolic content Effect of Soybean Seed Treatment with *Trichoderma virens* on Its Growth and Total Phenolic Content. v. 020003, n. July, 2019.

ZANDONÁ, R. R. et al. Chemical and biological seed treatment and their effect on soybean development and yield. **Revista Caatinga**, v. 32, n. 2, p. 559–565, 2019.

ZHANG, F. et al. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 100, p. 64–74, 2016.

ZHANG, F. et al. *Trichoderma* Biofertilizer Links to Altered Soil Chemistry , Altered Microbial Communities , and Improved Grassland Biomass. v. 9, n. April, p. 1–11, 2018.

ZHANG, S.; GAN, Y.; XU, B. Application of Plant-Growth-Promoting Fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 Enhances Tolerance of Wheat to Salt Stress through Improvement of Antioxidative Defense System and Gene Expression. **Frontiers in plant science**, v. 7, n. September, 2016.

ZUCCARO, A. Plant phosphate status drives host microbial preferences: a trade-off between fungi and bacteria. **The EMBO Journal**, p. 1–2, 2019.

7. CONCLUSÃO GERAL

As estirpes de *Trichoderma* spp. dos solos da floresta Amazônica têm potencial para solubilização de fosfato e na disponibilização de fósforo para plantas de soja. A disponibilidade foi resultado da solubilização de duas fontes diferentes de fosfato, fosfato de rocha e supefosfato triplo.

Como resultado do experimento de controle biológico, três *Trichoderma* spp. foram eficientes em controlar o mofo branco na cultura e não apresentaram sintomas nenhum na planta. Além disso, inibiram a germinação dos escleródios, estruturas de resistência de *Sclerotinia sclerotiorum*.

O consórcio de *Trichoderma* spp. mostrou-se capaz de solubilizar fósforo e controlar o fitopatógeno *S. sclerotiorum*, quando comparado aos tratamentos sem a aplicação das estirpes em conjunto. E foram eficientes na disponibilidade de P para as plantas. Além disso a comunidade bacteriana não alterou quanto a diversidade, mas aumentou os grupos ligados ao metabolismo do fósforo na planta, com a aplicação do consórcio. O trabalho poderá se continuado, visto que é necessário a aplicação do consórcio no campo e uma possível formulação de um bioinoculante para a cultura da soja.