

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

BIOPROSPECÇÃO DE ISOLADOS DE TRICHODERMA SPP. DO ECÓTONO AMAZÔNIA – CERRADO NO MARANHÃO PARA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE MILHO (*ZEAMAYS L.*).

**LORENA CUNHA DA SILVA¹, RODRIGO BERNARDO GALDINO DA SILVA²,
RITA DE CÁSSIA SOUSA E SILVA³, THATYANE PEREIRA DE SOUSA⁴**

AFILIAÇÃO

¹Uemasul – CCA – Av. Agrária, 100 – Colina Park, CEP: 65900 – 001, Imperatriz – MA – Bolsista PIBIC/FAPEMA, graduanda em Engenharia Agrônômica; ²Uemasul – CCA – Av. Agrária, 100 – Colina Park, CEP: 65900 – 001, Imperatriz – MA – Bolsista PIBIC/FAPEMA, graduando em Engenharia Agrônômica; ³Uemasul – CCA – Av. Agrária, 100 – Colina Park, CEP: 65900 – 001, Imperatriz – MA – Bolsista PIBIC/FAPEMA, graduanda em Engenharia Agrônômica; ⁴Uemasul – CCA – Av. Agrária, 100 – Colina Park, CEP: 65900 – 001, Imperatriz – MA – Orientadora do projeto PIBIC/FAPEMA, Prof^a. Dr^a em Fitossanidade.

RESUMO

Trichoderma spp. é fungo cosmopolita se caracteriza por colonizar porções rizosféricas do solo e estabelecer interações simbióticas com a planta, que desencadeiam alterações metabólicas levando a promoção de crescimento e indução de crescimento, dessa forma este gênero fúngico se apresenta com potencial inovador para aplicações biotecnológicas na agricultura e a descoberta de novos isolados pode elevar ainda mais os potenciais de biotecnologias sustentáveis para a região. Isolar e caracterizar bioquimicamente cepas de *Trichoderma* spp. do ecótono Amazônia - Cerrado para promoção do crescimento na cultura do milho. A coleta das amostras de solo foram realizadas no estado do Maranhão na região de transição Amazônia - Cerrado. Os isolados de *Trichoderma* foram obtidos através do método de diluição seriada. A caracterização bioquímica foi realizada através da quantificação da solubilização de fosfato e produção de AIA. Para solubilização de fosfato, todos os isolados de *Trichoderma* obtidos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA. A promoção do crescimento foi realizada através de ensaio em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado, via microbiolização de sementes e rega no solo na concentração de 10^7 . Foram avaliados os parâmetros de comprimento de parte aérea e sistema radicular, teor de clorofila com SPAD e biomassa. Todos os dados coletados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas por intermédio do teste de Tukey ($p \leq 0.05$), utilizando-se o software SPSS Statistics 21.

PALAVRAS-CHAVE: Agricultura.; Biocontrole.; Sustentabilidade.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) está entre os principais cereais cultivados em todo o mundo,

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

fornecendo produtos utilizados para a alimentação humana, animal e matérias - primas para a indústria, principalmente em função da quantidade e qualidade das reservas acumuladas nos grãos. A produção de milho desempenha papel de suma importância no desenvolvimento socioeconômico de muitos países pela diversificação de suas utilizações, como produtos alimentares e importante fonte de etanol (Guedes et al., 2021).

No Brasil, grande parte da produção de milho é na forma de grãos. No entanto a produção de milho para consumo verde vem despertando interesse de agricultores que vivem próximos dos grandes centros urbanos, haja vista que aumenta cada vez mais a procura desse produto pelo consumidor (Menegaldo, 2018). No estado do Maranhão, o milho-verde é parte da economia dos agricultores familiares e dos micros e pequenos negócios de produtos hortícolas. Muitas de famílias, tanto do meio rural quanto urbano, têm no milho-verde uma fonte certa para geração de renda (Embrapa, 2020).

Tecnologias que utilizam agentes biológicos para o manejo de plantas cultivadas estão ganhando espaço no campo e conquistando a confiança dos agricultores. O gênero *Trichoderma* (Filo: Ascomycota; Classe: Sordariomycetes; Ordem: Hypocreales; Família: Hypocreaceae) inclui espécies de importância econômica para a produção de antibióticos e enzimas com atividade de controle biológico e de estímulo do crescimento em vegetais (Hoyos-Carvajal; Orduz; Bissett, 2009), são cosmopolitas e apresentam importantes funções ecológicas, pois participam da decomposição e mineralização de resíduos vegetais (Menezes, 2009).

Os fungos do gênero *Trichoderma* spp. presentes com frequência em solos de regiões de clima temperado e tropical, podendo ser isolados das porções rizosféricas do solo onde estão presentes com grande quantidade de micélio; também colonizam madeira, onde frequentemente é encontrada a fase sexual, teleomórfica (gênero *Hypocrea*) (Machado, 2012).

A inoculação com *Trichoderma* aumenta o crescimento das plantas, especialmente das raízes (Harman, 2000; Shores; Harman; Mastouri, 2010), tornando-as mais profundas e robustas (Shores; Harman; Mastouri, 2010). Tais melhorias no desenvolvimento das raízes são frequentemente associadas ao aumento da biomassa e produtividade (Harman, 2004). *Trichoderma* spp. pode solubilizar nutrientes para as plantas (efeito indireto) e também induzir às plantas a absorção de mais nutrientes (efeito direto) ((Shores; Harman; Mastouri, 2010). Os efeitos do *Trichoderma* na promoção do crescimento têm sido evidenciados pelo aumento da biomassa, pela absorção e translocação de nutrientes como P, Zn, Mn e Fe, pelo

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

aumento da resistência a estresse biótico e abiótico, pela promoção de germinação de sementes e pelo aumento da produtividade (Hoyos-Carvajal; Orduz; Bissett, 2009).

A presença de *Trichoderma* na rizosfera evoca uma resposta proteômica e metabólica na planta (Mukherjee et al., 2012) e aumenta a eficiência fotossintética em 20 plantas tratadas (Mastouri, 2010). *T. harzianum* T22 proporcionou alteração proteômica em plantas de milho inoculadas, tendo sido identificadas 117 proteínas que tiveram maior expressão, sendo que alguns processos foram mais afetados que outros. As proteínas com alterações significativas foram aquelas envolvidas na respiração e fotossíntese (Shores; Harman, 2008).

A diversidade de espécies desse gênero ainda não é totalmente conhecida, e a descoberta de novas espécies pode ampliar a possibilidade de exploração de seu grande potencial biotecnológico. No Maranhão a região de transição entre os biomas Amazônia e Cerrado é caracterizada pela alta diversidade de ecossistemas e biodiversidade (Silva, 2016), se apresentando ambiente favorável para isolamento de cepas de *Trichoderma* spp. Dessa forma o trabalho se mostra relevante uma vez que visa fornecer subsídios para desenvolvimentos de novas tecnológicas a partir do isolamento e caracterização de novas cepas de *Trichoderma* spp. com mecanismos de ação e metabolismo secundário adaptados a região do ecotono, assim novas bioformulações podem ser desenvolvidas e empregadas dentro do manejo integrado de culturas agrícolas como a cultura do milho, com vistas à sustentabilidade do meio ambiente.

METODOLOGIA

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Vegetal e Sementes do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão (UEMASUL). As amostras de solo rizosférico para obtenção de cepas de *Trichoderma* spp. foram realizadas no estado do Maranhão na região do ecotono Amazônia - Cerrado, após a coleta as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e levada ao laboratório, permanecendo a uma constante refrigeração até ser utilizado nos ensaios de isolamento (Figura 1).

Figura 1 - Acondicionamento do solo em sacos plásticos para uma constante refrigeração em laboratório e pesagem do solo para a realização do processo de diluição seriada.

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

Fonte: Autor (2023).

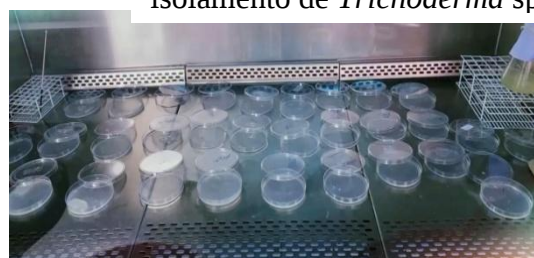
Os isolados de *Trichoderma spp.* foram obtidos através do método de diluição seriada, sendo diluídos 10 g de cada amostra de solo rizosférico em 90 ml de água destilada estéril. A solução de solo obtida foi agitada por 10 minutos a 85 rpm até se tornar uma suspensão homogênea. As diluições foram procedidas nas concentrações 10^{-1} a 10^{-6} e em seguidas plaqueadas 100µl da suspensão de solo em placas de Petri contendo meio de BDA (Batata Dextrose - Ágar) e espalhada com auxílio de alça de Drigalski. As placas foram mantidas a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ sob uma luz contínua e após 48 horas foi realizada a contagem das colônias na diluição onde as mesmas encontrarem-se isoladas (Figuras 2 e 3).

Figura 2 - Processo de diluição seriada realizada ante aos solos coletados.



Fonte: Autor (2023).

Figura 3 - Realização de umas das etapas constituintes para efetuação do isolamento de *Trichoderma spp.*



Fonte: Autor (2023).

Os isolados foram submetidos à caracterização bioquímica em ensaio de delineamento inteiramente casualizado, para solubilização de fosfato foi realizada utilizando-se fosfato de cálcio tribásico como fonte de fosfato, e incubados por um período de 48 horas.

Para a promoção de crescimento, o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, os tratamentos foram constituídos pelos isolados de *Trichoderma spp.* obtidos segundo item 4.1 e aplicados via microbiolização de sementes e rega no solo, conforme metodologia descrita por Silva et. al. (2012).

Aos 20 dias após a emergência, imediatamente antes, das quantificações de comprimento e acúmulo de biomassa, foi feita a leitura correspondente ao teor de clorofila na folha com o clorofilômetro (SPAD, Minolta Corp. Japão), no folíolo terminal da quarta folha

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

a partir do ápice da haste principal de duas plantas representativas de cada parcela. Em cada folha serão efetuadas leituras com o clorofilômetro (Figuras 4 e 5). Em seguida foram coletadas 5 plantas de cada tratamento para quantificação dos parâmetros de comprimento de parte aérea e sistema radicular e biomassa. Essas plantas foram lavadas, onde logo em seguida foi determinado o comprimento da parte aérea (cm) e comprimento da raiz (cm). As amostras foram levadas em estufa a 70 graus até atingir o peso constante e em seguida pesadas para determinação do acúmulo de massa seca das raízes e da parte aérea.

Figura 4 - Plantio da cultura do milho em casa de vegetação.



Fonte: Autor (2023).

Figura 5 - Determinação do comprimento da raiz e comprimento da parte aérea.



Fonte: Autor (2023).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do método de diluição seriada das amostras de solo coletadas na região do écotono Amazônia – Cerrado foram isolados 11 cepas de *Trichoderma* spp., conforme segue a tabela abaixo.

Tabela 1. Isolados de *Trichoderma* spp.

Nº	Local de coleta	Localização geográfica	Vegetação	Isolado
----	-----------------	------------------------	-----------	---------

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

		S	W		
1	Gov. Edson Lobão	5° 44' 58"	47° 21' 33"	Pastagem	TR01
2	São Miguel, TO	5° 33' 17"	47° 34' 31"	Pastagem	TR02
3	Cidelândia	5° 9' 8"	47° 44' 6"	Vegetação Nativa	TR03
4	Carolina 1	7° 20' 16"	47° 28' 4"	Pastagem	TR04
5	Carolina 2	7° 20' 16"	47° 28' 4"	Pastagem	TR05
6	Carolina	7° 20' 16"	47° 28' 4"	Vegetação Nativa	TR06
7	Porto Franco	6° 20' 29"	47° 24' 6"	Vegetação Nativa	TR07
8	Porto Franco 1	6° 20' 29"	47° 24' 6"	Pastagem	TR08
9	Porto Franco 2	6° 20' 29"	47° 24' 6"	Pastagem	TR09
10	Porto Franco	6° 20' 29"	47° 24' 6"	Floresta	TR10
11	Imperatriz			Pastagem	TR11

Fonte: Autor (2022).

Tabela 2. Comprimento da parte aérea e raiz e acúmulo de biomassa.

Nº	Tratamento	Clorofila	Comprimento		Biomassa
			Parte Aérea	Raiz	
1	TR1	24,05a	11,75c	17,50a	2,59a
2	TR2	19,37a	12,00abc	24,50a	3,05a
3	TR3	22,67a	13,75abc	24,00a	2,59a
4	TR4	25,27a	14,00abc	27,25a	5,18a
5	TR5	24,47a	14,75abc	29,00a	2,69a
6	TR6	25,30a	14,75abc	35,00a	4,75a
7	TR7	23,97a	15,50a	31,00a	5,08a
8	TR8	26,25a	13,25abc	21,25a	2,89a
9	TR9	27,17a	16,00a	23,25a	2,67a
10	TR10	25,72a	15,25abc	28,50a	5,42a
11	TR11	29,60a	14,25abc	28,50a	4,29a
12	TR12	21,97a	13,00abc	23,50a	3,25a

De acordo com os dados analisados das plantas de milho aos 20 dias após plantio pode - se observar que somente a avaliação para comprimento de parte aérea apresentou diferença significativa, com incremento no crescimento das plantas submetidas aos tratamentos TR7 e TR9, respectivamente.

Inúmeros trabalhos mostram o efeito benéfico de espécies de *Trichoderma spp.* no desenvolvimento vegetal em diversas culturas agrícolas. No bojo dessa discussão Lima (2023)

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

observou maiores médias ante ao comprimento da parte aérea e comprimento total de plantas de arroz tratadas com *Trichoderma spp.*

Em conexão com as considerações acima citadas, Adkins (2010), trabalhando com crescimento de tomates tratados com isolados de *Trichoderma spp.* observou que o fungo promoveu maior crescimento de plantas, maior acúmulo de massa fresca e seca total. Assim, percebe – se que a capacidade de um isolado de *Trichoderma spp.* de promover o crescimento de plantas atribuiu-se ao seu material genético, dessa forma, o mesmo pode conter distintas respostas.

Partindo dessa premissa, faz – se relevante frisar a tamanha essencialidade que se tem através da obtenção dessas onze cepas de *Trichoderma* já isoladas com a realização deste trabalho científico, visto que podem ser usado na cultura do milho, alvo da pesquisa feita e por intermédio ainda podem ser utilizadas na formulação de bioprodutos de baixo custo, seja na redução de riscos ambientais gerados pela a utilização excessiva ou inadequada de defensivos agrícolas, sejam no aumento da produtividade em geral, influenciando na diferenciação do produto, na redução perante a intensa dependência de fertilizantes minerais, na ação inibitória em determinadas doenças, na evolução ante a uma agricultura sustentável e na diminuição dos custos feitos pelo agricultor mediante ao planejamento da safra.

CONCLUSÕES

Em virtude do que foi mencionado nos resultados deste trabalho, é absolutamente imprescindível afirmar que avaliações em estágios mais avançados tendem a apresentar mais diferenças significativas entre os isolados e os parâmetros de promoção de crescimento avaliados, devido ao estabelecimento da interação e especificidade entre o microrganismo hospedeiro.

APOIO FINANCEIRO



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADKINS, B. J. Overall growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L. cv. Glacier) inoculated with species of *glomus* and *trichoderma* growing under greenhouse conditions. 2010, 24 p. Dissertação (Horticulture and Crop Science Department), California Polytechnic State University San Luis Obispo, 2010.

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

Embrapa. Cultivo do milho-verde irrigado na Baixada Maranhense / Valdemício Ferreira de Sousa, João Batista Zonta, editores; [autores] Candido Athayde Sobrinho ... [et al.]. - São Luís: Embrapa Cocais 2020.

Guedes, T. M.; Melo, H. C.; Kran, C. S.; Vale, L. S. R.; Santos, W. M.; Oliveira, E. J. Produção e qualidade fisiológica de sementes de linhagem de milho em função de doses de nitrogênio e umidade na colheita. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 9, e23410917144, 2021.

Harman, G.E. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature**, v. 2, p. 43-56, 2004.

Harman, G.E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**. V. 84, p.377–393. 2000.

Hoyos-Carvajal, L.; Orduz, S.; Bissett, J. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. **Fungal Genetic Biological**. v. 46, p.615–631, 2009.

Lima, L. S. D. *et al.* Uso de *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento na cultura do arroz. **Ipê Agronomic Journal - ISSN: 2595-6206**, Anápolis, GO, v. 7, n. 1, p. 1-16, fev./2023.

Machado, D. F. M. *et al.* *Trichoderma* no Brasil: O fungo e o bioagente. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 35, n. 1, p. 274–288, 2012.

Menegaldo, J. G. A importância do milho na vida das pessoas.

Menezes, J. P. Fungos em Bibliotecas: Frequência dos gêneros em livros e elaboração de teste para avaliação da biorreceptividade em papéis. 2009, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Mukherjee, M.; Mukherjee, P. K.; Horwitz, B. A.; Zachow C.; Berg G.; Zeilinger, S. *Trichoderma* – Plant – Pathogen Interactions: Advances in Genetics of Biological Control. **Indian Journal Microbiology** v. 52, n.4, p. 522–529, 2012.

Shores, M.; Harman, G.E. Mastouri F Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Annual Review Phytopathology** v. 48, p. 21–43, 2010.

Shores, M.; Harman, G.E. The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomic approach. **Plant Physiology**. v. 147, p. 2147–2163, 2008.

Silva, F. B.; Santos, J. R. N.; Feitosa, F. E. C. S.; Silva, I. D. C.; Araújo, M. L. S.; Guterres; Evidências de Mudanças Climáticas na Região de Transição Amazônia - Cerrado no Estado do Maranhão. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 31, n. 3, 330-336, 2016.