

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

**Potencial inseticida de *Trichoderma* spp. produzidos por fermentação
líquida**

Taisa Pavani Gomes

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestra em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

**Piracicaba
2023**

Taisa Pavani Gomes
Bacharela em Ciências Biológicas

Potencial inseticida de *Trichoderma* spp. produzidos por fermentação líquida

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ITALO DELALIBERA JÚNIOR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

Piracicaba
2023

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

Gomes, Taisa Pavani

Potencial inseticida de *Trichoderma* spp. produzidos por fermentação líquida /
Taisa Pavani Gomes - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de
2011. - - Piracicaba, 2023.

108 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de
Queiroz”.

1. Controle biológico 2. Fermentação líquida 3. Enzimas fúngicas 4. Conídios
submersos I. Título

AGRADECIMENTOS

Gostaria, primeiramente, de agradecer à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, pela oportunidade e estrutura. Ao programa de pós-graduação e a todos os professores pelos seus ensinamentos, os 7 anos de aprendizados dentro desta instituição foram valiosos e desafiadores.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos e ao Departamento de Entomologia e Acarologia por sua estrutura excepcional.

À minha família Vânia Navarro Pavani Gomes, Célio Moyses Gomes da Silva, Talita Pavani Brunelli e André Thiago Arthur Brunelli que são minha base, mas principalmente a minha mãe que sempre me deu o suporte necessário e acreditou muito em mim. Ao meu noivo Daniel Antônio Melega, por todo companheirismo, encorajamento, disposição e amor, pois sem isso eu não teria trilhado esse caminho.

Sou grata aos meus amigos, principalmente as minhas companheiras de pós-graduação Sara Giro Moreno e Bárbara Castelano Santos, pois sem todos os conselhos, ajudas e apoio emocional esse não teria sido o fim dessa história.

Agradeço a todas as pessoas que disponibilizaram seu tempo para sanar minhas dúvidas e me ajudar durante essa jornada, em especial: Bruna Laís Merlin, Celeste Paola D’Alessandro, Nayla Del Bianco Gontijo Souki e Cassiara Gonçalves. Agradeço também ao professor Dr. Italo Delalibera Júnior por ter sido meu orientador e por todas as oportunidades proporcionadas ao longo desses 4 anos no laboratório.

A todos que fazem parte do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano meu agradecimento, pois de alguma forma cada um ali me ensinou algo durante esses anos, mas em especial a Natasha Sant’Anna Iwanicki por ter me ajudado nessa reta final com toda a parte de análise estatística deste trabalho. Meu muito obrigada também ao laboratório de Interações em insetos e ao professor Fernando Luis Cònsoli por estar sempre de portas abertas disponibilizando a utilização de seus equipamentos e reagentes.

Por último e não menos importante, agradeço à Deus por minha jornada, pois entre acertos e erros eu sou muito feliz com tudo o que conquistei ao longo desse caminho. Gratidão pelo ontem, pelo hoje e pelo amanhã, AMÉM.

EPÍGRAFE

“Sou feita de retalhos.

Pedacinhos coloridos de cada vida que passa pela minha e que vou costurando na alma.

Nem sempre bonitos, nem sempre felizes, mas me acrescentam e me fazem ser quem eu sou.

Em cada encontro, em cada contato, vou ficando maior...

Em cada retalho, uma vida, uma lição, um carinho, uma saudade...

Que me tornam mais pessoa, mais humana, mais completa.

E penso que é assim mesmo que a vida se faz: de pedaços de outras gentes que vão se tornando parte da gente também.

E a melhor parte é que nunca estaremos prontos, finalizados...

Haverá sempre um retalho novo para adicionar à alma.

Portanto, obrigada a cada um de vocês, que fazem parte da minha vida e que me permitem engrandecer minha história com os retalhos deixados em mim.

Que eu também possa deixar pedacinhos de mim pelos caminhos e que eles possam ser parte das suas histórias.

E que assim, de retalho em retalho, possamos nos tornar, um dia, um imenso bordado...”

Regina Souza

SÚMARIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 O gênero <i>Trichoderma</i>	11
2.2 Gênero <i>Trichoderma</i> no sistema agrícola	11
2.2.1 Gênero <i>Trichoderma</i> como promotor de crescimento e indutor de resistência	11
2.2.2 Gênero <i>Trichoderma</i> como antagonista de doenças e nematoides.....	12
2.2.3 Gênero <i>Trichoderma</i> e seu potencial no controle de pragas	27
2.3 O gênero <i>Cordyceps</i>	34
2.4 Insetos praga.....	34
2.5 Fermentação de <i>Trichoderma</i> spp.....	35
2.5.1 Fermentação líquida para produção de conídios submersos	35
2.5.2 Fermentação submersa para produção de enzimas	36
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1 Descrição dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	41
3.2 Fermentação submersa e quantificação de conídios submersos	43
3.3 Fermentação submersa e quantificação de enzimas	44
3.3.1 Pré-teste	44
3.3.2 Fermentação submersa para produção de enzimas.....	45
3.3.3 Quantificação de enzimas quitinolíticas	45
3.3.4 Quantificação de enzimas proteolíticas	47
3.4 Criação de insetos pragas	47
3.4.1 <i>Chrysodeixis includens</i>	47
3.4.2 <i>Spodoptera frugiperda</i>	48
3.4.3 <i>Euschistus heros</i>	48
3.5 Teste de virulência com os insetos pragas	48
3.5.1 <i>Chrysodeixis includens</i>	49
3.5.2 <i>Spodoptera frugiperda</i>	50
3.5.3 <i>Euschistus heros</i>	51
3.6 Análise estatística.....	52
4. RESULTADOS	55
4.1 Identificação molecular	55

4.2	Produção de conídios submersos	58
4.3	Fermentação para produção de enzimas quitinolíticas	61
4.4	Fermentação para produção de enzimas proteolíticas	64
4.5	Bioensaio com <i>Chrysodeixis includens</i>	66
4.5.1	Conídios submersos	66
4.5.2	Fermentado filtrado contendo enzimas e metabólitos	67
4.6	Bioensaio com <i>Spodoptera frugiperda</i>	69
4.6.1	Conídios submersos	69
4.6.2	Fermentado filtrado contendo enzimas e metabólitos	70
4.7	Bioensaio com <i>Euschistus heros</i>	73
5.	DISCUSSÃO	77
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
	REFERÊNCIAS	87

RESUMO

Potencial inseticida de *Trichoderma* spp. produzidos por fermentação líquida

A multifuncionalidade do gênero *Trichoderma* no setor agrícola vem sendo estudada há anos, porém os produtos disponíveis para comercialização ainda exploram de forma limitada seus diversos benefícios, refletindo a necessidade de estudos mais aplicados. Neste sentido, o uso de *Trichoderma* spp. para controle de insetos é uma possibilidade tangível, que ocorre devido a produção de metabólitos, enzimas inseticidas, compostos anti-alimentares ou repelentes e ativação de respostas interespecíficas na planta. Neste estudo testou-se a hipótese de que a indução da produção de enzimas e conídios submersos produzidos em meio líquido poderia resultar em aumento da virulência para insetos. Foram utilizados 15 isolados de *Trichoderma*, pertencentes às espécies *T. ghanense*, *T. saturnisporum*, *T. koningiopsis*, *T. spirale*, *T. asperelloides* e *T. endophyticum*, contra três importantes pragas agrícolas, *Chrysodeixis includens*, *Spodoptera frugiperda* e *Euschistus heros*. Inicialmente observou-se que o meio indutor da produção de quitinases não resultou na produção de conídios submersos, a partir de então meios específicos foram utilizadas para cada finalidade. Observou-se grande variabilidade na produção de conídios submersos e enzimas das diferentes espécies de *Trichoderma* por fermentação líquida. O isolado ESALQ-2943 (*T. endophyticum*) se destacou quanto a produção de conídios submersos e, também se sobressaiu na atividade proteolítica, inferior apenas ao ESALQ-2917 (*T. spirale*) e ESALQ-2916 (*T. endophyticum*). Em contrapartida, na atividade quitinolítica, devido à grande variabilidade dos resultados foi possível separar os isolados apenas em maiores (n=8) e menores (n=7) produtores de quitinases. Conídios submersos do isolado ESALQ-5613 (*T. asperelloides*) causaram elevada mortalidade de *S. frugiperda*, por outro lado, na aplicação do caldo fermentado filtrado contendo enzimas e metabólitos dos fungos para o controle de *S. frugiperda* o destaque foi o ESALQ-2763 (*T. koningiopsis*). Já para *C. includens* os isolados ESALQ-2943 (*T. endophyticum*), ESALQ-1750 (*T. saturnisporum*), ESALQ-5633 (*T. asperelloides*) e ESALQ-2917 (*T. spirale*) foram promissores no bioensaio com o fermentado (> 80% mortalidade), sendo que este último também causou mortalidade elevada utilizando conídios submersos. Não foi detectada uma clara correlação entre a produção de quitinases e proteases com a mortalidade às espécies de lagartas. Na etapa seguinte, avaliou-se o potencial do filtrado fermentado produzido por cinco isolados de *Trichoderma* spp. em combinação com conídios aéreos do fungo entomopatogênico *Cordyceps fumosorosea* (ESALQ-1296) no controle de *E. heros*, escolhido por ser uma praga com tegumento esclerotizado. Esse ensaio permitiu comprovar efeito aditivo entre *C. fumosorosea* e o fermentado de *Trichoderma* spp., sendo que a aplicação da combinação de meia dose de cada tratamento estatisticamente semelhante a dose cheia destes isoladamente. Esse estudo revela o potencial da utilização de diferentes estruturas de espécies de *Trichoderma* no controle de insetos pragas polífagas.

Palavras-chave: Controle biológico, Fermentação líquida, Enzimas fúngicas, Conídios submersos

ABSTRACT

Insecticidal potential of *Trichoderma* spp. produced by liquid fermentation

The multifunctionality of the genus *Trichoderma* in the agricultural sector has been studied for years, however the products available for commercialization still explore in a limited way its several benefits, reflecting the need for more applied studies. In this sense, the use of *Trichoderma* spp. for insect control is a tangible possibility, which occurs due to the production of metabolites, insecticidal enzymes, anti-food or repellent compounds and activation of interspecific responses in the plant. In this study, the hypothesis was tested that the induction of enzyme production and submerged conidia produced in liquid medium could result in increased virulence for insects. Fifteen *Trichoderma* isolates belonging to the species *T. ghanense*, *T. saturnisporum*, *T. koningiopsis*, *T. spirale*, *T. asperelloides* and *T. endophyticum* were used against three important agricultural pests, *Chrysodeixis includens*, *Spodoptera frugiperda* and *Euschistus heros*. Initially, it was observed that the medium inducing the production of chitinases did not result in the production of submerged conidia, from then on specific means were used for each purpose. Great variability was observed in the production of submerged conidia and enzymes of different *Trichoderma* species by liquid fermentation. The isolate ESALQ-2943 (*T. endophyticum*) stood out in the production of submerged conidia and also stood out in proteolytic activity, inferior only to ESALQ-2917 (*T. spirale*) and ESALQ-2916 (*T. endophyticum*). On the other hand, regarding chitinolytic activity, due to the great variability of the results, it was possible to separate the isolates only into major (n=8) and minor (n=7) chitinase producers. Submerged conidia of isolated ESALQ-5613 (*T. asperelloides*) caused high mortality of *S. frugiperda*, on the other hand, in the application of filtered fermented broth containing enzymes and metabolites of fungi to control *S. frugiperda*, the highlight was ESALQ-2763 (*T. koningiopsis*). As for *C. includens*, the isolates ESALQ-2943 (*T. endophyticum*), ESALQ-1750 (*T. saturnisporum*), ESALQ-5633 (*T. asperelloides*) and ESALQ-2917 (*T. spirale*) were promising in the bioassay with the fermented product (> 80% mortality), and the latter also caused high mortality using submerged conidia. A clear correlation was not detected between the production of chitinases and proteases with the mortality of caterpillar species. In the next step, the potential of the fermented filtrate produced by five *Trichoderma* spp. in combination with aerial conidia of the entomopathogenic fungus *Cordyceps fumosorosea* (ESALQ-1296) in the control of *E. heros*, chosen because it is a pest with sclerotized tegument. This test allowed us to prove the additive effect between *C. fumosorosea* and the fermented product of *Trichoderma* spp., with the application of the half-dose combination of each treatment being statistically similar to the full dose of these alone. This study reveals the potential of using different structures of *Trichoderma* species to control polyphagous insect pests.

Keywords: Biological control, Liquid fermentation, Fungal enzymes, Submerged conidia

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Trichoderma* Persoon, 1794 pertencente a ordem Hypocreales, é encontrado naturalmente no solo e possui grande importância agrícola devido ao seu antagonismo a diferentes fitopatógenos e nematoides (DRUZHININA et al., 2011; PERSON, 1794; SAMUEL; HADAVI, 1996). A capacidade deste grupo fúngico em colonizar diferentes ecossistemas está relacionada as adaptações evolutivas que garantem seu sucesso, como por exemplo a produção de compostos bioquímicos de ações antagônicas, seu arsenal de enzimas que degradam diferentes tipos de substratos e a sua capacidade de desenvolver diferentes propágulos em função do ambiente em que se encontra (HARMAN et al., 2004; HOWELL, 2003; WAGHUNDE et al., 2016).

Trichoderma spp. são tradicionalmente produzidos por fermentação sólida, uma prática onde o fungo cresce sob grãos de arroz e produz conídios aéreos, ingrediente ativo muito utilizado nos produtos biológicos à base desse gênero no Brasil (MASCARIN et al., 2019b). O sistema de fermentação sólida apresenta algumas limitações, sendo elas: exigência de muita mão de obra, grande espaço para produção, riscos de contaminação e geração de um passivo que é o substrato, após o término no processo. A procura por métodos mais eficazes para obtenção de alta produtividade de estruturas fúngicas vem crescendo e é um reflexo da alta demanda, impulsionada pelo crescimento do mercado de bioinsumos nos últimos anos (JARONSKI; MASCARIN, 2017; FONTES; INGLIS, 2020; SCHÄFER, 2022).

Desta maneira, novas pesquisas buscam otimizar a fermentação submersa de *Trichoderma* para o cultivo de diferentes estruturas fúngicas, como por exemplo: conídios submersos, clamidósporos, microescleródios e também a produção de metabólitos e enzimas com efeitos biológicos que possam ser explorados na agricultura (LEWIS; PAPAIVIZAS, 1983; MASCARIN et al., 2019).

Neste contexto, as enzimas quitinolíticas e proteolíticas apresentam um grande potencial a ser explorado, já que o tegumento dos insetos é constituído predominantemente por quitina e proteína. Consequentemente, essas enzimas, em níveis adequados ou no estágio certo de desenvolvimento podem vencer as barreiras da praga alvo, deixando-as mais vulneráveis e propensas à morte, agregando assim as novas táticas de biocontrole contra pragas agrícolas (RUDAL, 1963; HEPBURN, 1985; KRAMER; MUTHUKRISHNAN, 1997).

Concluindo, estudar diferentes metodologias para controle de insetos e entender como aplicá-las de forma efetiva na agricultura abrirá novos caminhos para a utilização do gênero *Trichoderma* no controle biológico, que cresce exponencialmente nos últimos anos.

Desta forma, os objetivos deste estudo foram: 1) caracterizar o potencial produtivo de conídios submersos, e enzimas com potencial inseticida de diferentes isolados do gênero *Trichoderma*; 2) avaliar o potencial inseticida da aplicação de enzimas e conídios submersos de *Trichoderma* contra as pragas *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), e *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Hemiptera: Pentatomidae); 3) avaliar a interação de *Trichoderma* com conídios aéreos do fungo entomopatogênico *Cordyceps fumosorosea* (Wize, 1904) (Hypocreales: Cordycipitaceae) na mortalidade de insetos-praga.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O gênero *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* foi descrito em 1794 por Persoon com a espécie *Trichoderma viride* (PERSOON, 1794). Atualmente, existem cerca de 370 espécies, muitas delas de importância econômica (NCBI, 2022; SILVA, 2022). Sua classificação é descrita como: **Reino** Fungi, **Sub-reino** Dikarya, **Filo** Ascomycota, **Sub-filo** Pezizomycotina, **Classe** Sordariomycetes, **Sub-classe** Hypocreomycetidae, **Ordem** Hypocreales e **Família** Hypocreaceae (MYCOBANK, 2022).

A ampla distribuição deste gênero se deve aos seus múltiplos comportamentos adaptativos, como por exemplo: habitar diferentes tipos de solo, viver em associação com plantas, tolerar condições climáticas adversas, diferentes pHs, além de ser um excelente antagonista, pois produz diferentes antibióticos e metabólitos secundários (GHISALBERTI; SIVASITHAMPARAM., 1991; PAPAVIDAS, 1985; SAITO et al., 2009). Devido a sua multifuncionalidade, esse gênero vem sendo amplamente estudado ao longo dos anos, possibilitando entender melhor suas características morfológicas, moleculares e taxonômicas (BISSETT, 1991; POVEDA, 2021). *Trichoderma* spp. é explorado comercialmente pelas indústrias médica, agrícola, alimentícia e química.

2.2 Gênero *Trichoderma* no sistema agrícola

Trichoderma é utilizado na agricultura há muitos anos, pois oferece novas perspectivas para o controle biológico, e neste cenário o Brasil já dispõe de 55 produtos registrados legalmente no MAPA (Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento) (AGROFIT, 2023a). A busca por novas táticas de controle tem ampliado as vertentes de estudo, portanto a revisão foi percorrida em tópicos dos usos ou possíveis aplicabilidades do gênero *Trichoderma* no setor agrícola.

2.2.1 Gênero *Trichoderma* como promotor de crescimento e indutor de resistência

Uma relação simbiótica pode ocorrer entre *Trichoderma* spp. e as plantas, devido a colonização do fungo nas camadas externas das raízes. Essa relação permite que a planta aumente sua resposta a estresses bióticos e abióticos, gerando uma resistência sistêmica, além de promover o crescimento vegetal (MASTOURI; BJÖRKMAN; HARMAN, 2010; MAYO-PRIETO et al., 2020; POVEDA; EUGUI; ABRIL-URIAS, 2020).

Neste sentido, sabe-se que esse gênero pode aumentar a disposição de nutrientes para a planta, como por exemplo fosfato, dióxido de manganês, zinco e óxido de ferro. Isso ocorre devido aos diferentes metabólitos, enzimas e compostos acidificantes liberados pelo fungo, sendo que a espécie *Trichoderma harzianum* (Rifai, 1969) (Hypocreales: Hypocreacea) foi uma das primeiras do gênero a ser estudada neste aspecto (ALTOMARE et al., 1999). Outro ponto relevante para o crescimento vegetal é a produção de ácido indol-acético (AIA), um hormônio conhecido por modificar a disposição do sistema radicular, gerando um aumento de biomassa e de ramificações das raízes, o que melhora a capacidade da planta em absorver água, adquirir nutrientes e na taxa fotossintética (BAUGH; ESCOBAR, 2007; CONTRERAS-CORNEJO et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2012; GOMES et al., 2015).

Além desses benefícios, o fungo *Trichoderma* auxilia no combate a outros organismos devido ao seu potencial antagônico e sua influência na diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela planta. O ROS é um extenso conjunto de respostas de defesa, que demanda um grande gasto energético, prejudica as atividades metabólicas e causa a oxidação dos componentes celulares da planta (ASMAWATI; WIDIASTUTI; SUMARDIYONO, 2017; MØLLER; SWEETLOVE, 2010; YOUSSEF; TARTOURA; ABDELRAOUF, 2016). Por outro lado, essa relação (fungo-planta) é positiva para o fungo devido a umidade presente no solo, temperatura amena e pelo aumento da matéria orgânica, o que garante sua perpetuação dentro do sistema no qual está inserido (HARMAN et al., 2010; HARMAN, 2011; MEYER et al., 2019).

No Brasil existem produtos como o “QUALITY” e o “TRICHO TURBO”, que garantem a indução de resistência na planta. Em contrapartida o mercado internacional já conta com um número maior de produtos nesse âmbito, na promoção de crescimento e na solubilização de nutrientes, como por exemplo: “BLINDER SC MYCROS” na Colômbia, o “PLANTSHIELD HC” e o “T-22-HC” nos Estados Unidos, “ROOTGARD SP” no Quênia e África do Sul, “NICODERMA” na Índia, entre outros (BETTIOL; SILVA; CASTRO, 2019).

2.2.2 Gênero *Trichoderma* como antagonista de doenças e nematoides

Em 1987 foi relatado pela primeira vez o uso de um produto a base de *T. viride*, colonizado em grãos de sorgo, para o controle de uma doença conhecida por causar a podridão das raízes (VALDEBENITO-SANHUEZA, 1991). Desde então o gênero *Trichoderma* vem sendo integrado aos métodos de controle para as mais diversas culturas,

esse caráter se deve ao seu alto poder de detecção dos estímulos químicos produzidos pelo hospedeiro (BETTIOL; SILVA; CASTRO, 2019; MELO, 1991).

Em vista disso, sabe-se que *Trichoderma* spp. possui diferentes modos de ação, que vão ser descritos ao longo desse tópico. Um potencial importante são os compostos orgânicos voláteis (COVs), com atualmente mais de 480 compostos com capacidades antimicrobianas conhecidas, são relatados em diversos trabalhos para diferentes espécies do gênero (DA SILVA et al., 2018; FIPKE; PAZINI; ETHUR, 2017; SIDDIQUEE, 2014; SILVA et al., 2020). A Tabela 1 reúne alguns trabalhos disponíveis na literatura que evidenciaram essa função.

Tabela 1 – Resumo de alguns trabalhos que utilizaram os compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. para controle de fitopatógenos.

ESPÉCIE	COVs	ALVO	FONTE
<i>T. virens</i>	Gliotoxin	<i>Rhizoctonia solani</i> *	Howell (2003)
	Gliovirin	<i>Pythium</i> sp.*	
<i>T. azevedoi</i>	30 compostos detectados	<i>Laccaria bicolor</i> *	Guo et al. (2019)
<i>T. hamatum</i> , <i>T. harzianum</i> e <i>T. velutinum</i>	22 compostos detectados	<i>Pythium ultimum</i> *, <i>R. solani</i> * e <i>Botrytis cinerea</i> *	Vinale et al. (2014)
<i>T. gamsii</i>	Dissulfeto de dimetila, dibenzofurano, metanotio 1 e cetonas	<i>Phoma herbarum</i> *, <i>Scybalidium lignicola</i> *, <i>Epicocum nigrum</i> * e <i>Fusarium flocciferum</i> *	Chen et al. (2016)
<i>T. cerinum</i>	Cerinolactona	<i>Pythium ultimum</i> *, <i>R. solani</i> * e <i>Botrytis cinerea</i> *	Vinale et al. (2014)
<i>T. koningii</i> , <i>T. viride</i> e <i>T. virens</i>	Viridin	<i>B. allii</i> *, <i>Colletotrichum lini</i> *, <i>Fusarium caeruleum</i> *, <i>Penicillium expansum</i> * e <i>Aspergillus niger</i> *	Reino et al. (2008); Vinale et al. (2014)
<i>T. polysporum</i> , <i>T. koningii</i> , <i>T. viride</i> e <i>T. harzianum</i>	Trichodermin, Trichodermol, Harzianum A	<i>Cladosporium</i> spp. *	Patil et al. (2016)
<i>T. brevocompactum</i> e <i>T. harzianum</i>	Trichodermin	<i>Rhizoctonia solani</i> *	Xu-Ping et al. (2015)
<i>T. atroviride</i> , <i>T. koningii</i> , <i>T. viride</i> e <i>T. harzianum</i>	6-pentyl-2H-pyran-2-one [6-pentyl-apyrone (6PP)]	<i>Fusarium moniliforme</i> *	El-Hasan e Buchenauer (2009); Patil et al. (2016)
<i>T. harzianum</i>	Harzianopiridona	<i>B. cinerea</i> *, <i>R. solani</i> *, <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> * e <i>P. ultimum</i> *	Vinale et al. (2014); Patil et al. (2016)
	Ácido harziânico	<i>P. irregulare</i> *, <i>S. sclerotiorum</i> * e <i>R. solani</i> *	
	Azaphilone	<i>R. solani</i> *, <i>P. ultimum</i> * e <i>G. graminis</i> var. <i>tritici</i> *	

*Fungos;

Além dos COVs, há trabalhos, como o de HURMANN et al., (2020), que relatam a utilização de metabólitos secundários (ácido harziânico, alameticinas, antraquinonas, azafilonas, daucanas, harzialactonas, bisorbicillinoídes, butenolides, tricholina, glisopreninas, ácido heptelídico, gliovirina, pironas, tricotecenos, isocianatos, trichosetina, viridina e peptaiboles) com potencial antagônico para sete fitopatógenos, entre eles bactérias e fungos. Esses metabólitos contribuem com a perpetuação do fungo no ambiente, sendo que cada

espécie possui suas singularidades e capacidades biológicas (DEMAIN; FANG, 2000; GHISALBERTI; SIVASITHAMPARAM, 1991).

Sabendo disso, o tratamento de sementes vem sendo recomendado a fim de evitar a ocorrência de doenças no cultivar desde o início do plantio, visto que as interações que decorrem no ambiente são determinantes para ativar os mecanismos de ação do gênero *Trichoderma* (BERNARDES; SILVEIRA; MESQUITA, 2010; DE MOURA et al., 2022; DRUZHININA et al., 2011; JUNGES et al., 2016; RESENDE et al., 2004).

Trichoderma spp. já foi observado controlando diversas doenças, como por exemplo: pinta preta, mofo cinzento, cancro bacteriano, mancha de mirotécio, mancha-foliar., cancro cítrico, mancha de *Cylindrocladium*, podridão de carvão, ferrugem asiática, Murcha de verticílio, fusariose, murcha de fusarium, podridão-radicular, helmintosporiose, podridão radicular de fitóftora, atracnoses, mofo-branco, comprovando assim um extenso potencial antagonista deste gênero (BASSO et al., 2021; CHÁVEZ et al., 2022; GRIMES, 2019; JUNIOR et al., 2016; KRAEMER et al., 2022; LOHMANN et al., 2022; LÓPEZ-VALENZUELA et al., 2022; PEÑALBA, 2022; PRAYOGO et al., 2003; SARZI, 2016).

Esse micoparasitismo, observado na Figura 1, também se mostrou relevante para o controle de fitonematoides, que são amplamente conhecidos desde 1930 por serem parasitas obrigatórios de plantas. Essas pragas ocasionam danos severos as raízes, resultando na diminuição da produtividade, alteração da composição mineral e consequentemente perdas econômicas para o setor agrícola. Seu controle com *Trichoderma* spp. é bem-sucedido, já que esse fungo está relacionado com as plantas, com o solo, e acaba competindo pela perpetuação no ambiente (KIRIGA et al., 2018; MANZANILLA-LÓPEZ et al., 2004; SHARMA; SHARMA, 2017).

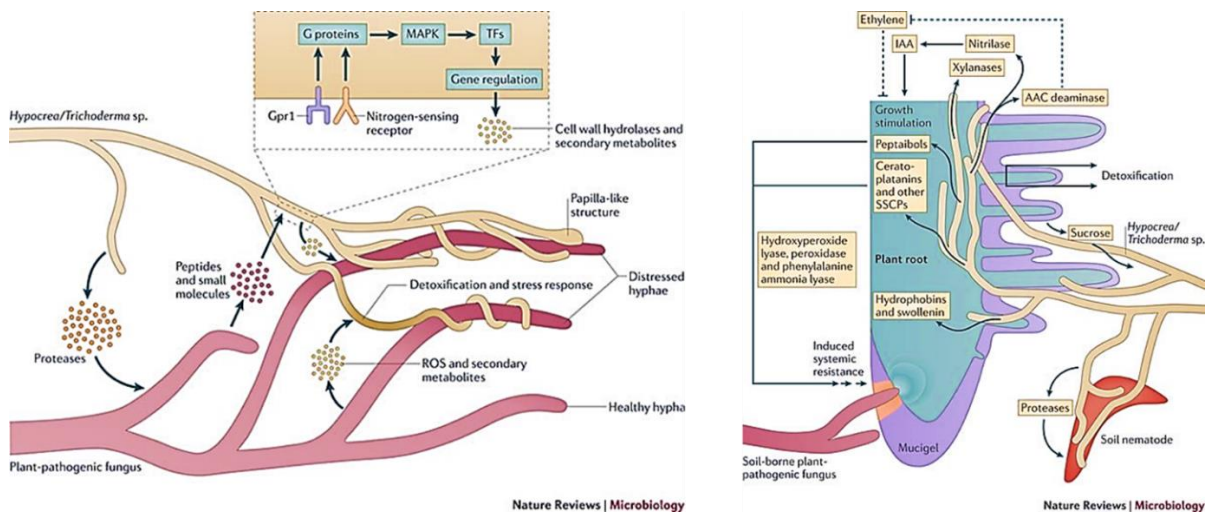


Figura 1 - Interações entre *Trichoderma*, fitopatígeno e a planta. **Fonte:** DRUZHININA et al., (2011).

A ação ocorre desde a fase de ovo dos nematoides, isso porque a quitina, um importante polissacarídeo presente na casca do ovo, pode ser degradada com a liberação das enzimas quitinolíticas pelo fungo (FERRAZ; BROWN, 2016). Alguns trabalhos demonstraram efeito na diminuição dos ovos de *Heterodera glycines* (Ichinohe, 1952) (Tylenchida: Heteroderidae) quando se aplica *Trichoderma asperellum* (Samuels, 1999) (Hypocreales: Hypocreaceae) e um efeito letal sob cistos de *Heterodera avenae* (Wollenweber, 1924) (Tylenchida: Heteroderidae) utilizando *T. longibrachiatum* (Rifai, 1969) (Hypocreales: Hypocreaceae) (SCHETINI, 2017; ZHANG et al., 2014).

Ainda neste sentido, foi observado que o tratamento de plantas de tomate com *T. harzianum* aumentou da síntese de compostos como composto orgânico polifenol, das enzimas oxidase, peroxidase e fenilalanina amônia-liase o que resulta em uma maior resistência da planta aos ataques de *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) (Tylenchida: Heteroderidae) (SAHEBANI; HADAVI, 2008). Já um outro trabalho que utilizou *Trichoderma afroharzianum* (Degenkolb & Samuels, 2015) (Hypocreales: Hypocreaceae), também em tomateiro, demonstrou o potencial deste fungo para reduzir, além do número de ovos, a taxa de reprodução de *Meloidogyne enterolobii* (Yang & Eisenback, 1983) (Tylenchida: Heteroderidae) (SANTOS; LIRA; MOURA, 2019).

Dentro dessa temática, a Tabela 2 (AGROFIT, 2023a) exemplifica os produtos comerciais que possuem o gênero *Trichoderma* em sua composição e quais são os alvos comprovados para registro, é possível observar que dos 55 produtos 94,5% são indicados para controle de doenças e somente 16,3% para controle de nematoides. É importante salientar que

é imprescindível ampliar cada vez mais as pesquisas nesta área, com comprovações a nível de campo, pois o gênero *Trichoderma* dispõe de muitos mecanismos de ação ainda não explorados, sendo que cada nova cepa estudada precisa ser avaliada quanto seu potencial antagônico, custo de produção e formulação para viabilizar sua utilização na agricultura.

Tabela 2 - Relação dos 55 produtos biológicos à base do gênero *Trichoderma* registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

(Continua)

Produto	Empresa	Ingredientes ativos	Organismo Alvo	Formulação	Nº Registro
SHOCKER	Agrivalle	<i>Trichoderma harzianum*</i> e <i>Bacillus amyloliquefaciens**</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum*</i> , <i>Rhizoctonia solani*</i> e <i>Fusarium solani*</i>	WP- Pó molhável	33918
OUOTRIX	Ballagro	<i>Trichoderma harzianum*</i> , <i>Trichoderma asperellum*</i> e <i>Bacillus amyloliquefaciens**</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum*</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum*</i> e <i>Rhizoctonia solani*</i>	WG- Granulado dispersível	420
TANUS	Biota	<i>Trichoderma harzianum*</i> , <i>Trichoderma asperellum*</i> e <i>Bacillus amyloliquefaciens**</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum*</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum*</i> e <i>Rhizoctonia solani*</i>	WG- Granulado dispersível	1820
PARDELLA	Ballagro	<i>Trichoderma harzianum*</i> , <i>Trichoderma asperellum*</i> e <i>Bacillus amyloliquefaciens**</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum*</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum*</i> e <i>Rhizoctonia solani*</i>	WG- Granulo dispersível	520
ORGANIC WP	Lallemand	<i>Trichoderma asperellum*</i>	<i>Fusarium solani*</i> e <i>Rhizoctonia solani*</i>	WP- Pó molhável	12616
LALSTOP ORGANIC DS	Lallemand	<i>Trichoderma asperellum*</i>	<i>Fusarium solani*</i> e <i>Rhizoctonia solani*</i>	DS - Pó para Tratamento a Seco de Sementes	10332
LALNIX RESIST	Lallemand	<i>Trichoderma endophyticum*</i>	<i>Pratylenchus brachyurus***</i> , <i>Heterodera glycines***</i> e <i>Meloidogyne incognita***</i>	WG- Granulo dispersível	20518

(Continuação)

Produto	Empresa	Ingredientes ativos	Organismo Alvo	Formulação	Nº Registro
QUALITY	Lallemand	<i>Trichoderma asperellum*</i>	<i>Fusarium solani*</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum*</i> e <i>Rhizoctonia solani*</i>	WG- Granulo dispersível	8611
TRICHO TURBO	Vittia	<i>Trichoderma asperellum*</i>	<i>Fusarium oxysporum*</i> , <i>Rhizoctonia solani*</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum*</i> e <i>Pratylenchus brachyurus***</i>	EC - Concentrado Emulsionável	34018
TRICHODERMAX EC	Novozymes	<i>Trichoderma asperellum*</i>	<i>Fusarium solani*</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum*</i> e <i>Rhizoctonia solani*</i>	EC - Concentrado Emulsionável	12511
GREENCONTROL	Simbiose	<i>Trichoderma harzianum*</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum*</i> e <i>Fusarium solani*</i>	WP- Pó molhável	21321
PLANT PROTECTION	Simbiose	<i>Trichoderma harzianum*</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum*</i> e <i>Rhizoctonia solani*</i>	SC - Suspensão Concentrada	12919
TRYDA	Symborg	<i>Trichoderma harzianum*</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum*</i>	SC - Suspensão Concentrada	11322
ECOTRICH WP	Ballagro	<i>Trichoderma harzianum*</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum*</i> , <i>Macrophomina phaseolina*</i> e <i>Rhizoctonia solani*</i>	WP- Pó molhável	4213

(Continuação)

Produto	Empresa	Ingredientes ativos	Organismo Alvo	Formulação	Nº Registro
BIAGRO SOLO	Simbiose	<i>Trichoderma harzianum</i> *	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> * e <i>Rhizoctonia solani</i> *	SC - Suspensão Concentrada	37819
NATUCONTROL	Mezfer	<i>Trichoderma harzianum</i> *	<i>Fusarium solani</i> *, <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> * e <i>Rhizoctonia solani</i> *	WP- Pó molhável	6619
PREDATOX	Ballagro	<i>Trichoderma harzianum</i> *	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> * e <i>Rhizoctonia solani</i> *	SC - Suspensão Concentrada	5015
RIZODERMA	Ballagro	<i>Trichoderma harzianum</i> *	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> * e <i>Rhizoctonia solani</i> *	WP- Pó molhável	8619
STIMUCONTROL	Simbiose	<i>Trichoderma harzianum</i> *	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> * e <i>Rhizoctonia solani</i> *	SC - Suspensão Concentrada	22516
STIMUCONTROL EVOLUTION	Simbiose	<i>Trichoderma harzianum</i> *	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> *	OD - Dispersão de óleo ou Suspensão Concentrada em óleo	13220
TRIANUM DS	Koppert	<i>Trichoderma harzianum</i> *	<i>Fusarium oxysporum</i> *, <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> *, <i>Pratylenchus brachyurus</i> *** e <i>Macrophomina phaseolina</i> *	WG- Granulo dispersível	27618

(Continuação)

Produto	Empresa	Ingredientes ativos	Organismo Alvo	Formulação	Nº Registro
TRIANUM WG	Koppert	<i>Trichoderma harzianum</i> *	<i>Pratylenchus brachyurus</i> * e <i>Macrophomina phaseolina</i> *	WG- Granulo dispersível	32117
TRICHODERMIL	Koppert	<i>Trichoderma harzianum</i> *	<i>Fusarium solani</i> *, <i>Rhizoctonia solani</i> *, <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> *, <i>Pratylenchus zeae</i> *** e <i>Thielaviopsis paradoxa</i> *	SC - Suspensão Concentrada	2007
DAYTONA	Koppert	<i>Trichoderma harzianum</i> *	<i>Fusarium solani</i> *, <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> *, <i>Rhizoctonia solani</i> *, <i>Thielaviopsis paradoxa</i> * e <i>Pratylenchus zeae</i> ***	SC - Suspensão Concentrada	19318
KBR PDG07	Koppert	<i>Trichoderma harzianum</i> *	<i>Fusarium solani</i> *, <i>Rhizoctonia solani</i> *, <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> *, <i>Pratylenchus brachyurus</i> ***, <i>Macrophomina phaseolina</i> *, <i>Heterodera glycines</i> *** e <i>Meloidogyne incognita</i> ***	OD - Dispersão de óleo ou Suspensão Concentrada em óleo	21922
TRICHODERMIL SUPER	Koppert	<i>Trichoderma harzianum</i> *	<i>Rhizoctonia solani</i> *, <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> *, <i>Pratylenchus zeae</i> *** e <i>Thielaviopsis paradoxa</i> *	SC - Suspensão Concentrada	22318
TRICOVAB	Ceplac	<i>Trichoderma stromaticum</i> *	<i>Moniliophthora perniciosa</i> * (CACAU)	WP- Pó molhável	1312
KBR PDG08	Koppert	<i>Trichoderma harzianum</i> *	<i>Fusarium solani</i> *, <i>Rhizoctonia solani</i> *, <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> *, <i>Pratylenchus brachyurus</i> ***, <i>Macrophomina phaseolina</i> *, <i>Heterodera glycines</i> *** e <i>Meloidogyne incognita</i> ***	WP- Pó molhável	25022

(Continuação)

Produto	Empresa	Ingredientes ativos	Organismo Alvo	Formulação	Nº Registro
TRYCHONYD FR 25	TZ Biotech	<i>Trichoderma harzianum</i> *	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> *	GL - Gel Emulsionável	3919
WALKER	Koppert	<i>Trichoderma harzianum</i> *	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> * e <i>Fusarium oxysporum</i> *	WG- Granulo dispersível	27718
TRICOZAK	Comdeagro	<i>Trichoderma harzianum</i> *, <i>Trichoderma asperellum</i> * e <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> **	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> *, <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> * e <i>Rhizoctonia solani</i> *	WG- Granulo dispersível	25621
TORPENO	Massen	<i>Trichoderma harzianum</i> * e <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> **	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> * e <i>Rhizoctonia solani</i> *	WP- Pó molhável	21120
NATIVE	Agrivalle	<i>Trichoderma harzianum</i> * e <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> **	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> * e <i>Rhizoctonia solani</i> *	WP- Pó molhável	21220
RIZODERMA TSI	Rizobacter	<i>Trichoderma afroharzianum</i> *	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> *, <i>Fusarium solani</i> *, <i>Macrophomina phaseolina</i> * e <i>Rhizoctonia solani</i> *	SC - Suspensão Concentrada	29421
TRITTER	Ballagro	<i>Trichoderma harzianum</i> *	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> * e <i>Rhizoctonia solani</i> *	WP- Pó molhável	24318

(Continuação)

Produto	Empresa	Ingredientes ativos	Organismo Alvo	Formulação	Nº Registro
GNC 006-3	Gênica	<i>Trichoderma asperellum*</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum*</i>	WP- Pó molhável	15922
GLADIADOR	Gênica	<i>Trichoderma asperellum*</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum*</i>	WP- Pó molhável	31521
TRÍPEL TRICHOTRIX	Agrobiológica	<i>Trichoderma asperellum*</i>	<i>Rhizoctonia solani* e Fusarium oxysporum*</i>	SL - Concentrado Solúvel	10721
POWERFUNG	Agrobiológica	<i>Trichoderma asperellum*</i>	<i>Rhizoctonia solani* e Fusarium oxysporum*</i>	SL - Concentrado Solúvel	31621
TRICHODERMAIZ WP	Agrobiológica	<i>Trichoderma harzianum*</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum*</i>	WP- Pó molhável	15721
BIOTRICO	Biomip	<i>Trichoderma harzianum* e Trichoderma viride*</i>	<i>Rhizoctonia solani* e Fusarium oxysporum*</i>	WP- Pó molhável	11522
CONGREGGA	Gênica	<i>Trichoderma asperellum*</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum*</i>	WP- Pó molhável	27220

Produto	Empresa	Ingredientes ativos	Organismo Alvo	Formulação	Nº Registro
MBYO TRIC	MB Enzymas	<i>Trichoderma harzianum</i> * e <i>Trichoderma viride</i> *	<i>Fusarium oxysporum</i> * e <i>Rhizoctonia solani</i> *	SC - Suspensão Concentrada	34522
HABITAT	Bionat	<i>Trichoderma afroharzianum</i> *	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> * e <i>Rhizoctonia solani</i> *	SC - Suspensão Concentrada	25422
BIOATRIA	Bionat	<i>Trichoderma afroharzianum</i> *	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> * e <i>Rhizoctonia solani</i> *	WP- Pó molhável	25522
TRICHOAGRO JCO	JCO Indústria e Comércio de Fertilizantes Ltda.	<i>Trichoderma harzianum</i> * e <i>Trichoderma viride</i> *	<i>Rhizoctonia solani</i> * e <i>Fusarium oxysporum</i> *	WP- Pó molhável	26922
TRICHOADVANCE	Café Brasil	<i>Trichoderma harzianum</i> *	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> *	WP- Pó molhável	33722
BIO GREEN	Solubio	<i>Trichoderma harzianum</i> *	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> *	WP- Pó molhável	28422
TRIKOFIT	Solubio	<i>Trichoderma harzianum</i> *	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> *	WP- Pó molhável	28322

(Conclusão)

Produto	Empresa	Ingredientes ativos	Organismo Alvo	Formulação	Nº Registro
TRIKOSOIL	Ballagro	<i>Trichoderma harzianum</i> * e <i>Trichoderma viride</i> *	<i>Fusarium oxysporum</i> * e <i>Rhizoctonia solani</i> *	WP- Pó molhável	28022
TRICHOFOURT	Ballagro	<i>Trichoderma harzianum</i> * e <i>Trichoderma viride</i> *	<i>Fusarium oxysporum</i> * e <i>Rhizoctonia solani</i> *	WP- Pó molhável	31922
TRICHODERMA BOM FUTURO	Bom futuro	<i>Trichoderma harzianum</i> * e <i>Trichoderma viride</i> *	<i>Fusarium oxysporum</i> * e <i>Rhizoctonia solani</i> *	WP- Pó molhável	33122
SLT 06	Prophyto	<i>Trichoderma harzianum</i> * e <i>Trichoderma viride</i> *	<i>Fusarium oxysporum</i> * e <i>Rhizoctonia solani</i> *	SC - Suspensão Concentrada	1823
Trichoningyd FR 25	TZBIOTEC	<i>Trichoderma koningiopsis</i> *	<i>Fusarium oxysporum</i> *	GL - Gel Emulsionável	29222
Trichonyd RS FR 25	TZBIOTEC	<i>Trichoderma reesei</i> *	<i>Fusarium oxysporum</i> *	GL - Gel Emulsionável	34422

*Fungos; **Bactérias; ***Nematoide.

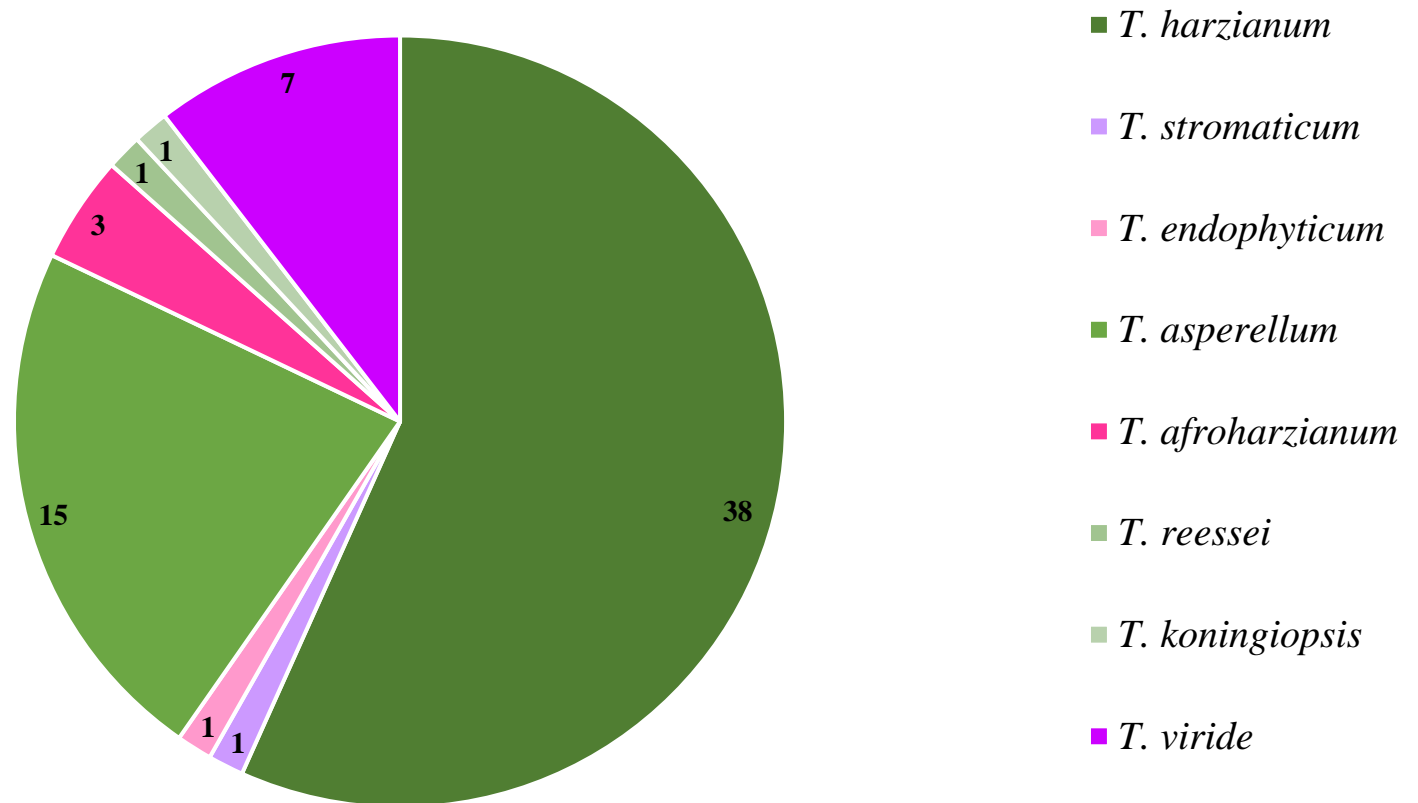


Figura 2 - Produtos à base de espécies de *Trichoderma* registrados no Brasil.

2.2.3 Gênero *Trichoderma* e seu potencial no controle de pragas

O setor agrícola sofre grandes perdas econômicas devido aos insetos, portanto nos últimos anos diversos trabalhos vêm denotando o potencial de *Trichoderma* spp. também como controlador de insetos-praga. Um aspecto que tem muito a ser explorado são os efeitos que os metabólitos secundários podem desempenhar na preferência do alimento, como observado em pulgões por EVIDENTE et al., (2008), no qual a praga optou por folhas que não foram tratadas com o *T. citrinoviride* (Bissett, 1984) (Hypocreales: Hypocreaceae), que é um produtor de compostos como citrantifidiene e citrantifidiol. Já em outro trabalho com feijão foi testemunhado que as plantas pulverizadas com *Trichoderma* provocaram uma repelência em *Acanthoscelides obtectus* (Say, 1831) (Coleoptera: Chrysomelidae) o que resultou tanto na diminuição de grãos atacados como em seu controle direto, chegando a 81,7% em até quinze dias (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2020).

Outra metodologia testada foi o contato direto com o inseto, um trabalho com *T. harzianum* visando o controle de baratas demonstrou uma alta mortalidade da praga, provavelmente devido a liberação de enzimas e metabólitos pelo fungo (OMAR; SHEREEN, 2012). Ainda neste contexto, foi constatada a alta letalidade de diferentes fases de desenvolvimento do *Xylotrechus arvícola* (Olivier, 1795) (Coleoptera: Cerambycidae) quando utilizado conídios aéreos de *T. harzianum* ou *Trichoderma gamsii* (Samuels & Druzhinina, 2006) (Hypocreales: Hypocreaceae), o que ressalta que diferentes espécies do gênero possuem potencial inseticida (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2017; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2018b).

Além dessas metodologias, muitas outras vem sendo testadas, como por exemplo a utilização de conídios submersos, biomassa, extratos fúngicos, nanopartículas, diferentes tipos de enzimas e até mesmo compostos voláteis do fungo. Esses estudos exploram a possível utilização do gênero *Trichoderma* como bioinseticida, de forma direta ou indireta, sendo necessário validar a nível de campo, portanto entender todos esses mecanismos é primordial para o futuro agroecológico, pois isso vai validar produtos mais efetivos e com múltiplas funcionalidades.

Na Tabela 3 foram reunidos 54 trabalhos, que estudaram o controle de insetos de 8 ordens e 1 ácaro com *Trichoderma*. Essa é uma revisão dos trabalhos que buscam entender o potencial inseticida, a fim de exemplificar e enfatizar tudo o que foi descrito neste tópico. Sendo assim, ela foi organizada da seguinte forma: **Grupo** (ordem do inseto estudado), **Espécie** (qual espécie do gênero *Trichoderma*), **Efeito** (o que o fungo ocasionou no inseto),

Organismo alvo (nome científico e comum do inseto praga), **Resultado** (dados do trabalho), **Metodologia** (qual estrutura que foi utilizada e se disponível a concentração) e por último a **Referência** do trabalho citado.

Tabela 3 - Resumo dos trabalhos encontrados na literatura que visaram ao controle de pragas com a utilização do gênero *Trichoderma*.

(Continua)

ESPÉCIE	EFEITO	ORGANISMO ALVO	GRUPO	RESULTADO	METODOLOGIA	REFERÊNCIA
<i>T. viride</i>	Repelência	<i>Odontotermes formosanus</i> (Cupim-subterrâneo)	Insecta - Blattodea	Formou menos túneis	Conídios submersos no solo 1x10 ⁶	XIONG et al., 2018.
<i>T. harzianum</i>	Mortalidade	<i>Periplaneta Americana</i> (Barata-americana)	Insecta - Blattaria	Adultos (100%) em até 3 dias	Aplicação de esporos em uma concentração de 5x10 ⁶ em pão para alimentação	OMAR; SHEREEN, 2012
<i>T. longibrachiatum</i>	Mortalidade	<i>Bemisia tabaci</i> (Mosca-branca)	Insecta: Hemiptera	Ninfa (73%) em 5 dias + Adulto (40%) em 6 dias	Aplicação de conídios aéreos 4x10 ⁸	ANWAR et al., 2016.
<i>T. harzianum</i>	Repelência	<i>Bemisia tabaci</i> (Mosca-branca)	Insecta: Hemiptera	Diminuiu a oviposição das fêmeas	Aplicação de <i>Trichoderma</i> na raiz	JAFARBEIGI et al., 2020.
<i>T. harzianum</i>	Metamorfose	<i>Nezara viridula</i> (Percevejo-verde)	Insecta: Hemiptera	Taxa de crescimento das ninfas foi afetada	Tratamento de sementes com conídios aéreos em uma concentração de 1x10 ⁷ conídios por mL	ALINÇ et al., 2021.
<i>T. harzianum</i>	Mortalidade	<i>Ceratovacuna lanigera</i> (Pulgão-da-cana-de-açúcar)	Insecta: Hemiptera	Adultos (72,31%)	Conídios aéreos em uma concentração de 1x10 ⁸ conídios por mL	ISLAM; SUBBIAH; SIDDIQUEE, 2021.
<i>T. harzianum</i>	Mortalidade	<i>Schizaphis graminum</i> (Pulgão-verde-dos-cereais)	Insecta: Hemiptera	Larvas (50%)	50 mg/mL de conídios aéreos	GANASSI et al., 2001.
<i>T. harzianum</i>	Mortalidade	<i>Diuraphis noxia</i> (Pulgão-do-trigo-russo)	Insecta: Hemiptera	Adulto (73,3%)	Biomassa fúngica	RAHIM; IQBAL.,2019.
<i>T. harzianum</i>	Repelência	<i>Macrosiphum euphorbiae</i> (Pulgão-da-batata)	Insecta: Hemiptera	Adultos	Atratividade para inimigos naturais mediados por salicilato e terpenóides.	COPPOLA et al., 2017.
<i>Trichoderm sp.</i>	Mortalidade	<i>Aphis gossypii</i> (Pulgão-do-algodoeiro)	Insecta: Hemiptera	Adultos (73,3%) em 3 dias	Conídios submersos 10 ⁸ UFC/mL	NAWAZ et al., 2020.
<i>T. harzianum</i>	Mortalidade	<i>Aphis gossypii</i> (Pulgão-do-algodoeiro)	Insecta: Hemiptera	Adultos (100%) em 3 dias	Conídios aéreos 1x10 ⁷ esporos por mL	MUKHERJEE, A.; GHOSH, S. K., 2023.
<i>T. harzianum</i>	Mortalidade	<i>Cimex hemipterus</i> (Percevejos-da-cama)	Insecta: Hemiptera	Adulto (90%) em 14 dias	Tecido embebido de conídios aéreos em contato por 1 h sob concentração de 1x10 ⁴	ZAHARAN et al., 2017.
<i>Trichoderm sp.</i>	Fagodeterrente	<i>Myzus persicae</i> (Pulgão-verde)	Insecta: Hemiptera	Insetos adultos	Extratos fúngicos - ácidos graxos	KAUSHIK et al., 2020.
<i>T. citrinoviride</i>	Fagodeterrente	<i>Schizaphis graminum</i> (Pulgão-do-Trigo)	Insecta: Hemiptera	Insetos adultos	Metabólitos Bioativos - Citrancitrantifidiol e Citrantifidiol	EVIDENTE et al., 2008.
<i>Trichoderm sp.</i>	Mortalidade	<i>Amrasca biguttula</i> (Cigarrinha)	Insecta: Hemiptera	Adultos (53,3%) em 3 dias	Conídios submersos 10 ⁸ UFC/mL	NAWAZ et al., 2020.

(Continuação)

ESPÉCIE	EFEITO	ORGANISMO ALVO	GRUPO	RESULTADO	METODOLOGIA	REFERÊNCIA
<i>Trichoderma sp.</i>	Mortalidade	<i>Oryctes rhinoceros</i> (Besouro-rinoceronte)	Insecta: Coleoptera	Larvas (96,67%) em 14 dias	Conídios aéreos (gramas) 5×10^6	NASUTION et al., 2018.
<i>T. citrinoviride</i>	Ovicida	<i>Xylotrechus arvicola</i> (Coleoptera-polífago)	Insecta: Coleoptera	Ovos (90%) entre 7 e 15 dias	Conídios aéreos em uma concentração de 1×10^7 conídios por mL	RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2017.
<i>T. gamsii</i>	Mortalidade	<i>Xylotrechus arvicola</i> (Coleoptera-polífago)	Insecta: Coleoptera	Ovos (92%); Larvas (65%); Adultos (87,5%)	Conídios aéreos em uma concentração de 1×10^7 conídios por mL	RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2018.
<i>T. harzianum</i>	Fagodeterrente	<i>Xylosandrus germanus</i> (Besouro-invasor-da-ambrosia)	Insecta: Coleoptera	Micoparasitismo	Redução do fungo utilizado para alimentação das larvas do inseto	KUSHIYEV et al., 2021.
<i>T. harzianum</i>	Ovicida	<i>Acanthoscelides obtectus</i> (Caruncho- do-feijão)	Insecta: Coleoptera	Ovos (96,6%) entre 7 e 15 dias	Conídios aéreos em uma concentração de 1×10^7 conídios por mL	RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2020.
<i>T. atroviride</i>	Ovicida	<i>Acanthoscelides obtectus</i> (Caruncho- do-feijão)	Insecta: Coleoptera	Ovos (74,2%) entre 7 e 15 dias	Conídios aéreos em uma concentração de 1×10^7 conídios por mL	RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2017.
<i>T. harzianum</i>	Mortalidade	<i>Acanthoscelides obtectus</i> (Caruncho- do-feijão)	Insecta: Coleoptera	Adultos (quase 90%) em até 15 dias	Compostos Orgânicos Voláteis	ÁLVAREZ-GARCÍA et al., 2022.
<i>T. harzianum</i>	Repelência	<i>Acanthoscelides obtectus</i> (Caruncho- do-feijão)	Insecta: Coleoptera	Reduziu para 10% a perda de grãos de feijão	Tratamento de sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i> com conídios submersos 1×10^7	RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2018.
<i>T. album</i>	Mortalidade	<i>Rhyzopertha dominica</i> (Gorgulho-dos-cereais)	Insecta: Coleoptera	Adultos (77%) e larvas (97%)	Conídios aéreos em uma concentração de 7×10^7 conídios por mL	MOHAMED; TAHA, 2017.
<i>T. harzianum</i>	Mortalidade	<i>Tenebrio molitor</i> (Larva-da-farinha)	Insecta: Coleoptera	Larvas (100%) em 15 dias	Conídios submersos em uma concentração de 7×10^8 conídios por mL	SHAKERI; FOSTER, 2007.
<i>T. asperellum</i>	Mortalidade	<i>Zophobas morio</i> (Tenébrio-gigante)	Insecta: Coleoptera	Adultos (86,7%)	Conídios aéreos em uma concentração de $2,7 \times 10^7$ conídios por mL	SEBUMPAN et al., 2022.
<i>T. harzianum</i>	Mortalidade	<i>Tribolium castaneum</i> (Besouro-castanho)	Insecta: Coleoptera	Adultos (76,6%) em 24 horas	Biomassa fúngica	RAHIM; IQBAL, 2019.
<i>T. harzianum</i>	Mortalidade	<i>Scolytus scolytus</i> e <i>Scolytus multistriatus</i> (Vetor de doenças)	Insecta: Coleoptera	Larvas (96,2% e 80%, sucessivamente)	Aplicação de conídios aéreos 1×10^6	JASSIM; FOSTER; FAIRHURST, 1990.
<i>T. harzianum</i>	Anti-cópula	<i>Sitophilus oryzae</i> (Gorgulho)	Insecta: Coleoptera	Diminuição de progênie	Integração de spinosad com <i>T. harzianum</i> melhora sua eficiência	GAD; AL-ANANY; ABDELGALEIL, 2020.
<i>T. harzianum</i>	Mortalidade	<i>Sitophilus granarius</i> (Caruncho-do-trigo)	Insecta: Coleoptera	Adultos (97%) em 9 dias	Espinosina com <i>T. harzianum</i> a uma concentração de 10^9	ANDRADE-BUSTAMANTE et al., 2023.

(Continuação)

ESPÉCIE	EFEITO	ORGANISMO ALVO	GRUPO	RESULTADO	METODOLOGIA	REFERÊNCIA
<i>T. longibrachiatum</i>	Mortalidade	<i>Leucinodes orbonalis</i> (Broca-da-Berinjela)	Insecta: Lepidóptera	Larvas (80%)	Conídios aéreos em uma concentração de 1×10^8 conídios por mL	GHOSH; PAL, 2016.
<i>T. reesei</i>	Fagodeterrente	<i>Plutella xylostella</i> (Traças-crucíferas)	Insecta: Lepidóptera	Potente atividade antialimentar contra larvas	Compostos ativos: Tricocelina AI e Tricocelina B-II	RATNAWEERA et al., 2022.
<i>T. harzianum</i>	Mortalidade	<i>Pectinophora gossypiella</i> (Lagarta-rosada)	Insecta: Lepidóptera	Larvas (instar 1) 40%	Conídios aéreos em uma concentração de 2×10^5 conídios por mL	EL-MASSRY; SHOKRY; HEGAB, 2016.
<i>T. harzianum</i>	Mortalidade	<i>Earias insulana</i> (Lagarta-Egípcia)	Insecta: Lepidóptera	Larvas (instar 1) 60%	Conídios aéreos em uma concentração de 2×10^5 conídios por mL	EL-MASSRY; SHOKRY; HEGAB, 2016.
<i>T. viride</i>	Mortalidade	<i>Corcyra cephalonica</i> (Traça)	Insecta: Lepidóptera	Larvas de 4 ínstar (38%) em 7 dias	Enzimas quitinolíticas na alimentação	VIJAYAKUMAR; ALAGAR; MADANAGOPAL, 2016.
<i>T. harzianum</i>	Mortalidade	<i>Helicoverpa armigera</i>	Insecta: Lepidóptera	Larvas (70%)	Utilização de enzimas quitinolíticas	BINOD et al., 2007.
<i>T. viride</i>	Mortalidade	<i>Helicoverpa armigera</i>	Insecta: Lepidóptera	Larvas de 1/2 ínstar (100%) e 3 ínstar (92,34%)	Nanopartículas de dióxido de titânio (TDNPs) provenientes do fungo	CHINNAPERUMAL et al., 2018.
<i>Trichoderma sp.</i>	Mortalidade	<i>Spodoptera litura</i> (Lagarta-desfolhadora)	Insecta: Lepidóptera	Larvas (78,49%)	Nanopartículas de selênio micossintetizadas	ARUNTHIRUMENI; VEERAMMAL; SHIVAKUMAR, 2022.
<i>T. atroviride</i>	Mortalidade	<i>Spodoptera littoralis</i>	Insecta: Lepidóptera	Diminuição de pupação	Tratamento de sementes de Tomate com conídios aéreos 1×10^7	COPPOLA et al., 2019.
<i>T. atroviride</i>	Fagodeterrente	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Lagarta-do-cartucho)	Insecta: Lepidóptera	Terpenos voláteis e metabólitos que reduzem a herbivoria	Tratamento de sementes de milho com conídios aéreos 1×10^6	CONTRERAS-CORNEJO et al., 2018.
<i>T. asperellum</i>	Mortalidade	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Lagarta-do-cartucho)	Insecta: Lepidóptera	Larvas de 2º instar (81%)	1×10^8 conídios aéreos por mL	AFANDHI et al., 2022.
<i>T. viride</i>	Mortalidade	<i>Bombyx mori</i> (Bicho-da-seda)	Insecta: Lepidóptera	Larvas de 5 ínstar (46,6%)	Enzimas quitinolíticas na alimentação	BERINI et al., 2016.
<i>T. asperellum</i>	Mortalidade	<i>Ostrinia furnacalis</i> (Broca-asiática-do-milho)	Insecta: Lepidóptera	Larvas (55%)	Conídios aéreos em uma concentração de 1×10^9 conídios por mL	BATOOL et al., 2020.
<i>T. koningiopsis</i>	Mortalidade	<i>Diatraea saccharalis</i> (Broca-da-cana-de-açúcar)	Insecta: Lepidóptera	Larvas (94,2%)	Extrato bruto contendo 0,06 U/mL de quitinases em conjunto com <i>Beauveria bassiana</i> 1×10^6	MEJÍA et al., 2021.
<i>T. atroviride</i>	Mortalidade	<i>Drosophila melanogaster</i> (Mosca-da-fruta)	Insecta: Diptera	Larvas (75%)	Micélio utilizado na alimentação de larvas	ATRIZTÁN-HERNÁNDEZ et al., 2019.

(Conclusão)

ESPÉCIE	EFEITO	ORGANISMO ALVO	GRUPO	RESULTADO	METODOLOGIA	REFERÊNCIA
<i>T. asperellum</i>	Mortalidade	<i>Aedes aegypti</i> (Mosquito)	Insecta: Diptera	Larvas (100%) em até 3 dias	Enzimas quitinolíticas (10 mg/ml -1)	SILVEIRA et al., 2021.
<i>T. harzianum</i>	Mortalidade	<i>Aedes aegypti</i> (Mosquito)	Insecta: Diptera	Pupas (80%)	Filtrados extracelular com metabólitos	SUNDARAVADIVELAN; PADMANABHAN, 2014.
<i>T. asperellum</i>	Mortalidade	<i>Anopheles</i> (Mosquito)	Insecta: Diptera	Larvas	Enzimas quitinolíticas (245,204 ± 30,4 µg mL ⁻¹) e proteolíticas (298,652 ± 54,09 µg mL ⁻¹)	GHOSH; PODDER; MUKHERJEE, 2021.
<i>T. koningiopsis</i>	Mortalidade	<i>Delia radicum</i> (Larvas-do-repolho)	Insecta: Diptera	Larvas (68%)	Conídios aéreos em uma concentração de 1x10 ⁸ conídios por mL no solo	RAZINGER et al., 2014.
<i>T. viride</i>	Atratividade	<i>Culex quinquefasciatus</i> (Pernilongo)	Insecta: Diptera	Atração de fêmeas para oviposição	Metabólitos secundários	GEETHA et al., 2003.
<i>T. asperellum</i>	Mortalidade	<i>Aedes aegypti</i> (Mosquito)	Insecta: Diptera	Larvas (100%) em até 2,5 dias	Enzimas quitinolíticas (20 mg/ml -1)	AGUIAR et al., 2020.
<i>T. harzianum</i>	Mortalidade	<i>Chrotogonus trachypterus</i> (gafanhoto-da-cana-de-açúcar)	Insecta: Orthoptera	Adultos (75%)	Conídios aéreos em uma concentração de 2x10 ⁸ conídios por mL	HAMZEI et al., 2018.
<i>Trichoderma sp.</i>	Mortalidade	<i>Locusta migratoria</i> (Gafanhoto-Migrador)	Insecta: Homoptera	Adultos (56,2%) em 3 dias	0,3 g/L de extrato fúngico	LAIB et al., 2020.
<i>T. asperellum</i>	Mortalidade	<i>Tetranychus urticae</i> (Ácaro-rajado)	Acari: Tetranychidae	Adultos (100% em 48 horas)	Voláteis	KOTTB et al., 2017.

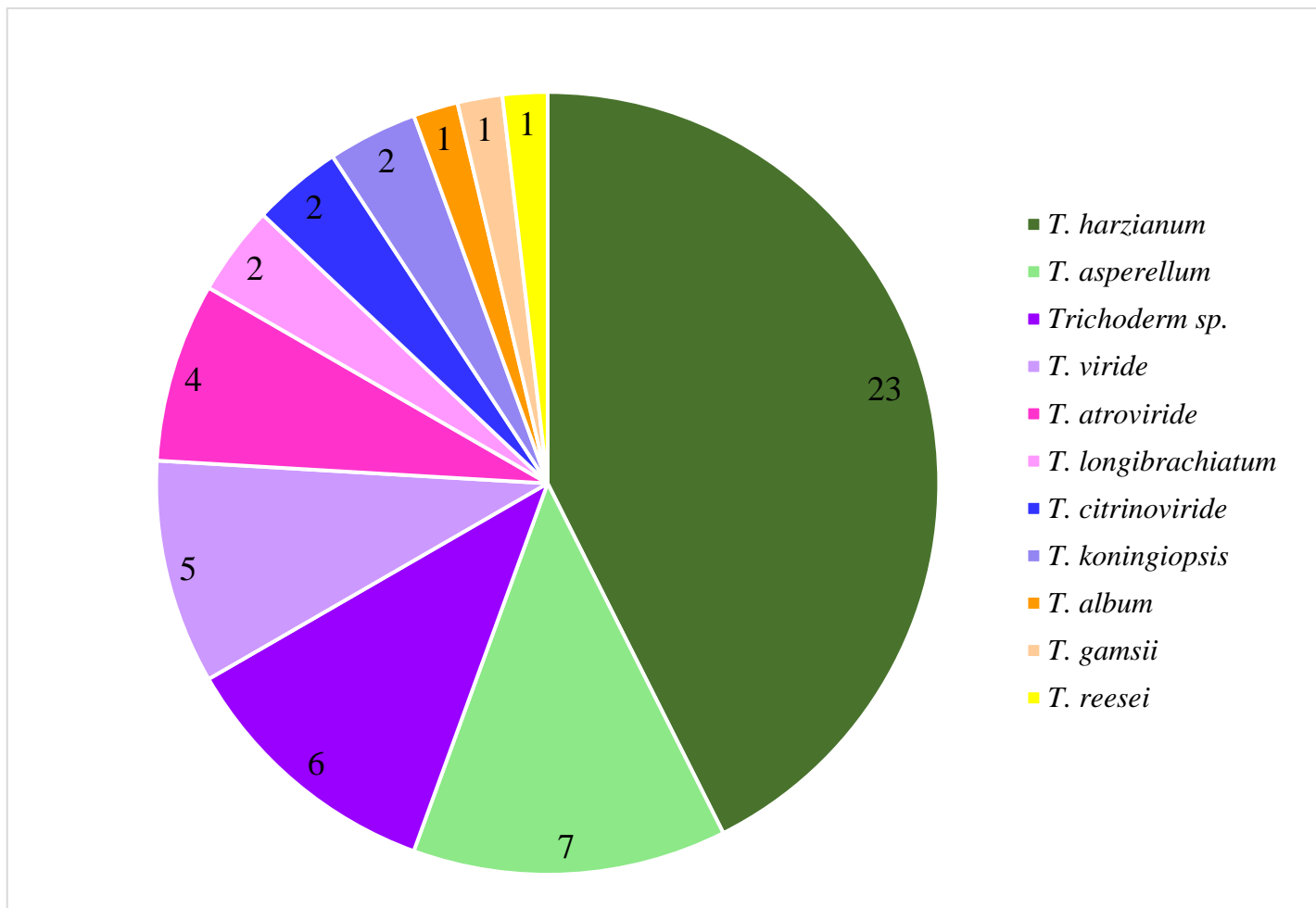


Figura 3 – Quantidade de trabalhos com efeitos inseticidas por espécie de *Trichoderma*.

A Figura 3 demonstra a baixa quantidade de espécies de *Trichoderma* estudadas (10) e ressalta a importância dos estudos nessa área perante o número de cepas disponíveis para pesquisa. Dessa forma, como abordado ao longo do texto, o gênero *Trichoderma* é bem conhecido na agricultura por sua capacidade micoparasítica e suas múltiplas formas de ação despertam interesses em busca de inovação em estratégias sustentáveis (MANIVEL; RAJKUMAR, 2018; POVEDA, 2021). Esse empenho tem se tornado essencial nas últimas décadas, portanto este trabalho teve como objetivo oferecer mais respostas dentro dessa temática e ainda entender se o gênero *Trichoderma* poderia potencializar os efeitos entomopatogênicos do gênero *Cordyceps*.

2.3 O gênero *Cordyceps*

Espécies de *Cordyceps* sp., anteriormente conhecido como gênero *Isaria*, possuem ampla distribuição, podem ser encontrados tanto no solo quanto infectando artrópodes (KOBAYASI, 1941; ZIMMERMANN, 2008). O Brasil já conta com 7 produtos desse gênero registrados no MAPA, indicados para diferentes pragas, como: *Diaphorina citri* (Kuwayama, 1908) (Hemiptera: Liviidae), *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae), *Helicoverpa armígera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae) (AGROFIT, 2022b).

Há um vasto número de trabalhos que validam esse gênero como um grande controlador de pragas, porém atualmente não há estudos que evidenciem a interação entre *Cordyceps* e *Trichoderma* (ZHOU et al., 2020; LEI et al., 2021). No entanto, a combinação de *Trichoderma* spp. com fungos entomopatogênicos é promissora e foi demonstrada para *Beauveria bassiana* (Bals; Criv; Vuill, 1912) (Hypocreales: Cordycipitaceae) (BATOOL et al., 2020; MEJÍA et al., 2021).

2.4 Insetos praga

Os insetos pragas escolhidos para a realização deste trabalho possuem interesse agrícola, pois causam grandes perdas no campo e estudar novas formas de controle é importante. Portanto, *Chrysodeixis includens*, conhecida popularmente como a falsa-medideira, é uma praga polífaga responsável por grandes danos na cultura de soja, devido ao seu hábito alimentar voraz (MITCHELL et al., 1967; MOSCARDI et al., 2012).

A segunda praga selecionada foi a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, pois apresenta mais de 80 plantas hospedeiras, sendo considerada uma das principais causadoras de danos para a cultura do milho. Sabe-se que essa praga pode ocasionar perdas e, portanto, está categorizada como de risco muito alto pelo Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em uma lista que elencou as pragas de maior risco fitossanitário do Brasil (PENCOE; MARTIN, 1981; CAPINERA, 2002; MAPA, 2022). Esse cenário é crítico devido a sua resistência a diferentes inseticidas químicos e ao seu ávido hábito de alimentação, que resulta em uma intensa desfolha (CAPINERA, 2002).

A terceira praga escolhida foi um inseto de tegumento mais esclerotizado, o percevejo-marrom, *Euschistus heros*. Seu hábito alimentar é danoso a cultura da soja, pois afeta desde o início da formação das vagens até o desenvolvimento das sementes, podendo prejudicar o potencial produtivo em até 30% e isso é notório já que o Brasil é o segundo maior produtor de soja no mundo (GODOY et al., 2007; MANDARINO, 2017; HOFFMANN; CORRÊA-FERREIRA; MOSCARDI, 2012).

2.5 Fermentação de *Trichoderma* spp.

2.5.1 Fermentação líquida para produção de conídios submersos

Os propágulos fúngicos podem ser produzidos de três diferentes formas. A mais comumente utilizada é a fermentação sólida, na qual utiliza-se cereais, geralmente arroz, previamente hidratado e esterilizado, mantido em um ambiente com temperatura e fotoperíodo controlados até o dia final de produção. O propágulo fúngico produzido a partir desta técnica são os conídios aéreos. Nota-se que não é necessário alta tecnologia nesse processo, por outro lado tem-se um alto custo com a mão de obra e um grande risco de contaminação devido ao manuseio, além da desvantagem do tempo necessário para produção (10-15 dias) (JARONSKI; MASCARIN, 2017).

Outra forma de produção é a fermentação líquida, na qual utiliza-se meios de cultura específicos, que podem conter diferentes concentrações de carbono, nitrogênio, sais e vitaminas. As estruturas fúngicas são produzidas em biorreatores ou frascos de fermentação (meio de cultura + inóculo fúngico) onde várias características podem ser controladas até o final da produção, como por exemplo a luminosidade, pH, temperatura e oxigênio. Essa técnica exige uma maior tecnologia, mas com a vantagem de produção de diferentes estruturas fúngicas em menor tempo de produção. Há ainda a fermentação bifásica, que utiliza

uma etapa de cada fermentação citada anteriormente, iniciando com a fermentação submersa e utilizando o produto dessa fermentação como inóculo para uma fermentação sólida. Os benefícios desse tipo de técnica são o armazenamento de inóculo e conseqüentemente diminuição dos dias de produção (JARONSKI; MASCARIN, 2017).

A procura por métodos eficazes, com redução de custos, para a alta produção de propágulos fúngicos ocorre devido ao grande interesse agrícola pelo controle biológico nos últimos anos, sabe-se que mais de 50% dos produtos à base de *Trichoderma* spp. são constituídos por conídios aéreos derivados de fermentação sólida (grãos), porém estudos que visam entender e melhorar essa metodologia são indispensáveis (BETTIOL, 2011; MASCARIN et al., 2019a; WOO et al., 2014).

Neste contexto novas pesquisas buscam produzir diferentes propágulos fúngicos e metabólitos de *Trichoderma* spp. para explorar a sua capacidade de resistência a fatores abióticos e efetividade no campo. A fermentação submersa viabiliza esses estudos, já que possibilita o desenvolvimento de meios de cultura específicos e fatores abióticos controlados, sendo esses elementos determinantes para a produção da estrutura desejada, seja ela conídios submersos, clamidósporos, microescleródios, enzimas ou metabólitos (JACKSON, 1997; LEWIS; PAPAVIDAS, 1983; MASCARIN et al., 2019b).

2.5.2 Fermentação submersa para produção de enzimas

Enzimas Quitinolíticas

A quitina é um polissacarídeo encontrado em abundância no planeta, perdendo apenas para a celulose. Sabe-se que esse composto é constituído por N-acetil- β -D-glucosamina (GlcNAc) com ligações glicosídicas β -1,4 que formam um homopolímero linear (GORTARI; HOURS, 2013; RINAUDO, 2006). Esse polímero é encontrado na parede celular de diferentes organismos, como no exoesqueleto dos insetos, em fungos, algas, caranguejos, lagostas, nematoides, entre outros (KRAMER; MUTHUKRISHNAN, 1997; SHAHIDI; ABUZAYTOUN, 2005).

Outro fato relevante é sua natureza polimórfica, que pode apresentar três modificações cristalinas, que são: α -, β - e γ -quitina. Essas modificações ocorrem devido ao grau de hidratação, tamanho e sentido das cadeias poliméricas, que podem ser paralelas ou anti-paralelas (HEPBURN, 1976; RUDALL; KENCHINGTON, 1973). Segundo Vermeulen e

Wessels (1986) a α -quitina apresenta cadeia de orientação antiparalela, que a caracteriza como a mais compacta, já a β -quitina possui uma orientação totalmente paralela e a γ -quitina exibe a cada duas fitas paralelas uma fita simples antiparalela (Figura 4). As setas representam o sentido da hidroxila no carbono, onde o carbono 1 é a extremidade redutora e o carbono 4 a extremidade não redutora (CAMPANA-FILHO et al., 2007; KURITA, 2006).

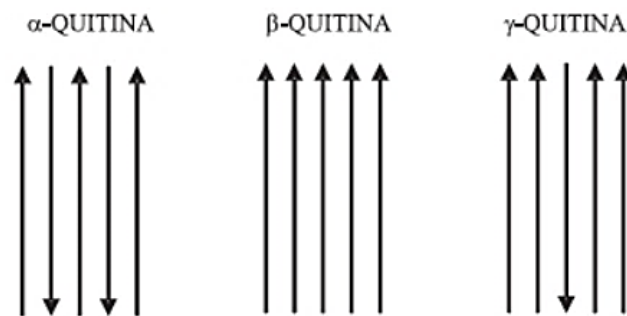


Figura 4 - Diferença entre as cadeias polimórficas α -, β - e γ -quitina, estão representadas por setas no sentido terminal não redutor para o redutor. **Fonte:** CAMPANA-FILHO et al, 2007.

Sabe-se que a quitina é insolúvel em água e solventes orgânicos, dessa forma são necessários três processos para obtenção desses polissacarídeos. Os processos são: desproteinização (utiliza-se solventes, como por exemplo o NaOH), desmineralização (utiliza-se ácidos, como por exemplo o HCl) e despigmentação (utiliza-se frequentemente acetona ou etanol) (GOYCOOLEA; AGULLÓ; MATO, 2004; NO; MEYERS, 1995).

Outra forma de quebra dessas cadeias são as quitinases, um grupo de enzimas capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas β - (1,4) da quitina. Essas enzimas podem ser produzidas por vários organismos como bactérias, fungos e plantas, pois está envolvida em funções morfológicas, fisiológicas ou até mesmo antagônicas, o que vêm ganhando notoriedade no mercado (MERZENDORFER; ZIMPOCH, 2003; OYELEYE; NORMI, 2018).

Vários estudos demonstraram que os fungos são capazes de produzir até 25 tipos de quitinases diferentes, sendo que as bactérias contam com no máximo 4. Todo esse potencial enzimático ainda não é totalmente compreendido, dessa forma são necessários mais estudos nesse aspecto visando sanar as dúvidas e explicar o papel de cada uma delas dentro do organismo produtor (DUO-CHUAN, 2006; SEIDL, 2008).

Neste sentido, sabe-se que de forma geral existem dois tipos de ação, chamadas de endo e exo-quitinases, que se diferem de acordo com o produto formado após a degradação da quitina. As endo-quitinases quebram aleatoriamente as ligações glicosídicas da cadeia de quitina produzindo dímeros e multímeros solúveis, como por exemplo a quitotriose e quitotetraose. Já as exo-quitinases realizam uma quebra progressiva ao longo da cadeia de quitina, convertendo-a em monômeros, podendo clivar até mesmo o produto da endo-quitinase (JUNG; PARK, 2014; PRAKASH et al., 2010). Segundo Kramer e Muthukrishnan (1997) as exo-quitinases são menos eficazes em realizar a degradação quando comparada às endo-quitinases, portanto seria mais vantajoso focar nesta segunda opção.

Outro ponto relevante dentro dessa complexidade das enzimas é entender que existem diferentes tipos de quitinases, elas se distinguem de acordo com a sua sequência de aminoácidos e propriedades catalíticas, podendo ser subdivididas em famílias, sendo elas 18, 19, 23 e 48 glicosil hidrolases (GH) (CAZY, 2022; HENRISSAT; BAIROCH, 1993). A família 18 possui uma ampla distribuição entre os organismos produtores, sendo eles plantas, bactérias, fungos, insetos e outros animais, podendo ainda ser classificada em classes de acordo com seu domínio catalítico, que é responsável pela hidrólise da molécula de quitina (HAMID et al., 2013; PATIL; GHORMADE; DESHPANDE, 2000; WATANABE et al., 1999).

Os fungos, mais especificamente, produzem as enzimas quitinolíticas para as mais diversas funções em função de sua perpetuação no ambiente, podendo ser utilizada para atuar nas mudanças ocorrentes na parede celular durante o ciclo de vida fúngico, processos nutricionais, sobrevivência e defesa, garantindo a competição dentro do ecossistema (SEIDL, 2008).

Sabendo disso, muitos trabalhos já comprovaram a eficiência do gênero *Trichoderma* como produtor de quitinases, tanto em fermentação sólida quanto submersa (BALDONI et al., 2016; MORAES, 2004; SANDHYA et al., 2004). Além de que, as interações que ocorrem no ambiente são determinantes para estimular seus mecanismos de ação, podendo ativar a síntese de um extenso grupo de enzimas hidrolíticas que degradam a parede celular do organismo concorrente (DRUZHININA et al., 2011).

Dessa forma, as quitinases do gênero *Trichoderma* podem ser utilizadas no controle de pragas agrícolas, contando com diversos trabalhos na literatura dentro desta temática. Um exemplo é o efeito larvicida contra *Helicoverpa armígera*, como comprovado por Binod

et al. (2007), que observou uma mortalidade de até 50% dessa praga após a aplicação enzimática de *T. harzianum* nas lagartas.

Neste sentido, a fermentação submersa vem sendo utilizada para produção de diferentes estruturas fúngicas do gênero *Trichoderma* e isso somado a uma formulação adequada poderá obter um melhor efeito contra o organismo de interesse no campo (KESWANI et al., 2014; MASCARIN et al., 2019b). Concluindo, o uso de enzimas fúngicas é uma alternativa que pode abrir novos caminhos para o controle biológico de pragas.

Enzimas Proteolíticas

As proteases constituem um grande grupo de enzimas que realizam a clivagem das ligações peptídicas das proteínas, gerando peptídeos menores e aminoácidos, isso ocorre devido a sua capacidade hidrolítica. Essas enzimas vêm obtendo um grande interesse industrial, principalmente as de origem microbiana, pois apresentam maior versatilidade, são mais estáveis e de menor custo de produção (GACESA; HUBBLE, 1990; RAO et al., 1998; VERMELHO, 2008).

É importante destacar que as proteases fazem parte de um extenso grupo enzimático, classificado de acordo com o tipo de reação que catalisa, natureza química e relação evolutiva de sua estrutura (BARRET, 1994). Portanto, essas enzimas podem ser divididas em endopeptidases e exopeptidases, se diferenciando de acordo com o sítio de clivagem. As endopeptidases realizam a clivagem na parte interna da cadeia polipeptídica do terminal amino ou carboxi do substrato, já as exopeptidases clivam as extremidades, sendo contrárias uma à outra (HARTLEY, 1960; RAO et al., 1998).

As enzimas proteolíticas de origem fúngica são as mais utilizadas devido a sua variabilidade, mudando de acordo com o isolado e com as condições de fermentação oferecida, pois a concentração de carbono e nitrogênio é determinante no tipo de protease produzida (GUPTA et al., 2002; PAVLUKOVA; BELOZERSKY; DUNAEVSKY, 1998).

O gênero *Trichoderma* vem sendo explorado neste sentido, demonstrando uma alta produtividade de enzimas quando se utiliza fontes orgânicas de nitrogênio (MENEZES, et al., 2021; SUN, 2021). Porém, esse tema possui muitas variáveis sem respostas, mesmo com vários trabalhos comprovando o potencial de *Trichoderma* spp. para a produção de enzimas,

há pouca informação sobre suas diversas alternativas de uso contra pragas (MUKHERJEE et al., 2022; SEIDL et al., 2009).

Visando sua utilização no controle de insetos praga, alguns trabalhos já demonstraram êxito na utilização de enzimas proteolíticas e quitinolíticas em conjunto. Um trabalho publicado na Nature, observou a adesão de esporos fúngicos de *T. asperellum* na superfície larval de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) e posterior liberação de enzimas, por método espectrofotométrico (GHOSH; PODDER; MUKHERJEE, 2021). Essas enzimas são de grande interesse produzidas em conjunto, pois sabe-se que o tegumento dos insetos é composto por duas importantes camadas, a mais externa é chamada de epicutícula, que evita a perda de água e a camada interna a procutícula, que é composta, predominantemente, por quitina e proteína (RUDAL, 1963; HEPBURN, 1985; MORA; CASTILHO; FRAGA, 2018; SCHATZ, 1952).

Desse modo, esse trabalho buscou as melhores condições de fermentação para a alta produção de quitinases, proteases e conídios submersos de *Trichoderma* spp., além de investigar o papel dessas estruturas quando aplicadas contra pragas agrícolas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição dos isolados de *Trichoderma* spp.

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram obtidos da Coleção “Prof. Sérgio Batista Alves” localizada no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo (ESALQ-USP), Piracicaba, Brasil.

Os quinze isolados selecionados são provenientes de diferentes biomas do Brasil, como Amazônia, Cerrado, Pampa, Caatinga e Mata Atlântica, a fim de obter a maior variedade possível para experimentação (Tabela 4). Para reativação de cada isolado, a semeadura foi feita em placa de Petri contendo meio BDA (Difco® Sparks, MD, EUA - batata 200 g/L, dextrose 15 g/L, ágar 20 g/L) com 0,5 g/L do Pentabiótico Zoetis®, espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalsky e incubadas em câmara climatizada tipo B.O.D. (Biological Oxygen Demand) a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotoperíodo por 6 dias.

Posteriormente, foi feita a preservação dos isolados fúngicos, onde pequenos pedaços de meio contendo o fungo esporulado foram acondicionados em tubos criogênicos estéreis com solução de glicerol a 10% e mantidos em freezer a -80°C . A partir disso, todos os experimentos foram realizados utilizando-se essa preservação.

Tabela 4 - Isolados de *Trichoderma* spp. da Coleção “Prof. Sérgio Batista Alves” da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo de acordo com a região, estação e ano de coleta.

Isolado	Região	Estação	Ano de coleta
ESALQ2763	Pampa - Vegetação Nativa	ÚMIDA	2012
ESALQ2950	Pampa - Vegetação Nativa	SECA	2012
ESALQ3018	Amazônia - Vegetação nativa	SECA	2012
ESALQ5613	Amazônia - Banana	ÚMIDA	2012
ESALQ2845	Mata Atlântica	SECA	2012
ESALQ2917	Mata Atlântica	ÚMIDA	2013
ESALQ2943	Caatinga - Vegetação nativa	SECA	2013
ESALQ1750	Caatinga - Feijão	ÚMIDA	2012
ESALQ2600	Cerrado - Vegetação Nativa	SECA	2012
ESALQ2901	Cerrado - Soja	ÚMIDA	2013
ESALQ2916	Cerrado - Cana	SECA	2013
ESALQ5632	Amazônia - Jazida	SECA	2014
ESALQ5633	Amazônia - Jazida	ÚMIDA	2014
ESALQ5634	Amazônia - Rizosfera	ÚMIDA	2014
ESALQ5635	Amazônia - Rizosfera	ÚMIDA	2014

3.1.2 Identificação molecular dos isolados de *Trichoderma* spp.

Para extração do DNA dos isolados de *Trichoderma* spp. foi utilizado o Kit PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit (Qiagen Laboratories, Carlsbad, CA, USA). As amostras de conídios foram colhidas e acondicionadas em tubos de eppendorf do kit de extração, que contém *beads*. A extração ocorreu de acordo com as especificações do protocolo do fabricante. A qualidade e quantidade aproximada de DNA de cada isolado foi conferida em gel de agarose 1% (SAMBROOK et al., 1989) e em nanodrop. Após, iniciou-se a etapa de amplificação dos genes específicos para cada amostra de DNA. As amplificações foram conduzidas em termociclador (Applied Biosystems™ 2720 Thermal Cycler, USA), com os primers selecionados RPB25F2 (5'- GAYGAYMGWGATCAYTTYGG), fRPB2-7cR (3'-CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT), EF1728M (5'- CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG) e EF2T (3'- GGA AGT ACC AGT GAT CAT GTT). Todas as reações em cadeia da polimerase (PCRs) foram padronizadas para 25 µl de volume total, contendo 1 µL de DNA, 2,5 µL de 10 x PCR Buffer, 1,5 µl de 50 mM MgCl₂, 1 µl de cada primer a 10 µM, 0,2 µl de Platinum® Taq DNA Polymerase, 0,5 µl de 10 mM de dNTP (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific, USA) e 0,25 µl de BSA (1%) e 17,05 µl de água destilada autoclavada.

A amplificação de todas as amostras foi conduzida da seguinte forma: ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 s, anelamento a 61 °C para RPB2 (RPB25F2 - fRPB2-7cR) e 52 °C TEF (F1728M - EF2T) por 60 segundos, polimerização a 72°C por 2 min, para finalizar uma extensão final a 72°C por 7 min e resfriamento a 4°C por tempo indeterminado. A qualidade dessas amplificações foi analisada em gel de agarose (1% w/v), com 1x TBS. A purificação das amostras para o sequenciamento foi conduzida utilizando o kit QIAquick® PCR Purification (Qiagen Laboratories, Carlsbad, CA, USA). As sequências de DNA individuais geradas nos sentidos “forward” e “reverse” foram verificadas quanto a sua qualidade através da análise dos respectivos eletroferogramas no programa BioEdit (versão 7.0.4.1). Posteriormente, aquelas com alta qualidade foram alinhadas para obtenção dos contigs e submetidas no programa BLAST do site NCBI (National Center for Biotechnology Information) para uma identificação preliminar da espécie. As sequências *type* e de referência para os marcadores RPB2 e EF foram obtidas do trabalho de Cai & Druzhinina (2021) e o alinhamento múltiplo com essas sequências foi construído utilizando a ferramenta ClustalW do programa BioEdit.

A análise de Máxima Verossimilhança foi realizada no programa MEGA X (KUMAR et al. 2018), implementando o modelo evolutivo Kimura com dois parâmetros para

o marcador RPB2 e Hasegawa-Kishino-Yano para o marcador TEF, escolhidos com base no menor valor de AIC. A análise foi conduzida considerando “gaps” como dados faltantes e o suporte dos relacionamentos obtidos foi acessado a partir de 1000 réplicas de “bootstrap”. As árvores geradas para cada marcador foram visualizadas e editadas no programa MEGA X e os nós foram considerados com bom suporte estatístico quando os valores de “bootstrap” de MV foi superior ou igual a 70%.

3.2 Fermentação submersa e quantificação de conídios submersos

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram multiplicados em placas de Petri contendo meio BDA (Difco® Sparks, MD, EUA - batata 200 g/L, dextrose 15 g/L, ágar 20 g/L) com 0,5 g/L do Pentabiótico Zoetis® e incubados em câmara climatizada tipo B.O.D. (Biological Oxygen Demand) a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotoperíodo entre quatro e seis dias. As suspensões de conídios foram preparadas em câmara de fluxo laminar, onde os isolados fúngicos esporulados foram raspados e suspensos em solução 0,05% do adjuvante monoleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80, Synth®, Diadema, SP, Brasil). A contagem de conídios foi realizada em câmara de Neubauer (Grid Optik, Piracicaba, Brasil), no aumento de 400x em microscópio óptico e, posteriormente os inóculos foram padronizados na concentração de 5×10^5 conídios aéreos/mL.

A fermentação submersa foi conduzida em frascos de vidro denominados “Baffled flasks” de 250 mL (Bellco ®Glass, Vineland, NJ, EUA), onde em cada frasco foram adicionados 45 mL de meio cultura desenvolvido no laboratório de patologia da ESALQ (LPCM1 - passível de proteção de propriedade intelectual), previamente autoclavado, com pH regulado entre 5,5 e 6,0. O volume de inóculo utilizado foi de 5 mL em uma concentração de 5×10^5 conídios/mL. Cada isolado foi produzido em duplicata e os frascos foram mantidos sob agitação orbital a 250 rpm durante 6 dias em uma temperatura constante de 28°C (Shaker - Marconi®, Piracicaba, SP, Brasil). As avaliações ocorreram no 2º, 4º e 6º dia de cultivo, sendo que alíquotas 1 mL foram retiradas assepticamente em câmara de fluxo laminar para quantificação dos conídios submersos em microscópio óptico, na objetiva de 400x, com o auxílio da câmara de Neubauer (Grid Optik, Piracicaba, Brasil). Esse ensaio foi repetido duas vezes no tempo, o que totaliza considerando os três experimentos, seis “Baffled flasks” (unidades experimentais) para cada isolado fúngico.

3.3 Fermentação submersa e quantificação de enzimas

3.3.1 Pré-teste

Um teste preliminar foi realizado com três meios de cultura, visando a produção de quitinases. A seleção ocorreu a partir de uma revisão dos meios comumente utilizados na literatura com modificações, sendo eles: **Sabouraud modificado** (LACEY, 2012), quitina coloidal de casca de caranguejo (*practical grade* - SIGMA[®]) 10 g/L, extrato de levedura 2,5 g/L, peptona bacteriológica 2,5 g/L; **Czapek-Dox modificado** (de REZENDE, 2017), quitina coloidal de casca de caranguejo (*practical grade* - SIGMA[®]) 10 g/L, caseína hidrolisada 1 g/L, C₆H₁₄N₂O₇ 4 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, MgSO₄ 0,5 g/L, FeSO₄ 0,01 g/L e KCL 0,5 g/L; **LPCMI** com quitina coloidal de casca de caranguejo (*practical grade* - SIGMA[®]).

A fermentação submersa foi conduzida em frascos de vidro denominados “Baffled flasks” de 250mL (Bellco [®]Glass, Vineland, NJ, EUA) com 45 mL de cada meio modificado, previamente autoclavado e com 5 mL de inóculo do isolado selecionado (ESALQ-5632) em uma concentração de 5×10^5 conídios aéreos/mL. A fermentação se sucedeu com uma agitação orbital a 250 rpm durante seis dias em temperatura constante de 28°C e um pH de 5,5 para todos os meios. Os resultados demonstraram que o meio Sabouraud modificado se destacou na produção de quitinases, esse meio foi então o escolhido para dar continuidade nas fermentações enzimáticas. No entanto, surgiu o interesse em aumentar essa produção, já que uma atividade máxima de 2,4 U/mL foi considerada baixa, mesmo com relatos análogos de 4,4 U/mL para *T. viride* (MUKHAMMADIEV et al., 2020).

Dessa forma, um segundo pré-teste foi realizado, onde a quitina de casca de caranguejo (*practical grade* - SIGMA[®]) foi utilizada sem o protocolo de desmineralização, com HCL, para sua transformação em quitina coloidal. Esse protocolo realizado no ensaio anterior é ordinariamente encontrado em trabalhos com enzimas quitinolíticas e foi descrito por Yamaguchi (2003). Outro ponto explorado foi a variação de pH para 7,0, isso porque foi constatado que um pH neutro poderia intensificar a produção de enzimas (SANTOS, 2011). As condições de fermentação foram similares a anterior, mudando apenas o pH para 7,0 e os resultados foram satisfatórios, com o potencial quitinolítico chegando a 30 U/mL, demasiadamente maior que no ensaio com quitina coloidal. Portanto, essas condições foram definidas para continuidade do estudo.

3.3.2 Fermentação submersa para produção de enzimas

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram multiplicados em placas de Petri como detalhado anteriormente. As suspensões de conídios foram preparadas em câmara de fluxo laminar, onde os isolados fúngicos esporulados foram raspados e suspensos em solução 0,05% do adjuvante monoleato de polioxietilenosorbitano (Tween 80, Synth®, Diadema, SP, Brasil). A contagem de conídios foi realizada em câmara de Neubauer (Grid Optik, Piracicaba, Brasil), no aumento de 400x em microscópio óptico e, posteriormente os inóculos foram padronizados a 5×10^5 conídios aéreos/mL.

A fermentação submersa foi conduzida em frascos de vidro denominados “Baffled flasks” de 250mL (Bellco® Glass, Vineland, NJ, EUA) com 45 mL do meio Sabouraud modificado (LACEY, 2012), previamente autoclavado, com pH 7,0 (Tabela 5). O volume de inóculo utilizado foi de 5mL em uma concentração de 5×10^5 conídios/mL para cada isolado fúngico, em duplicata, sendo que os frascos foram mantidos sob agitação orbital a 250 rpm durante seis dias em uma temperatura constante de 28°C (Shaker - Marconi®, Piracicaba, SP, Brasil). As avaliações ocorreram no 2º, 4º e 6º dia de agitação para quitinases e no 6º dia para proteases, sendo que alíquotas 1 mL, de cada isolado, foram retiradas assepticamente para quantificação. Esse ensaio foi repetido duas vezes no tempo, o que totaliza, considerando os três experimentos, seis “Baffled flasks” (unidades experimentais) para cada isolado fúngico.

Tabela 5 - Composição do meio de cultura Sabouraud modificado para produção de enzimas de diferentes espécies do gênero *Trichoderma* (LACEY, 2012).

Quantidades de ingredientes (g/L)	
Componentes	Sabouraud modificado
Quitina casca de caranguejo (<i>practical grade</i> - SIGMA®)	10
Extrato de Levedura	2,5
Peptona bacteriológica	2,5
Água	1L

* C:N = 5:1, com base no Laboratório de Bromatologia da Universidade Nacional da Colômbia, Campus Medellín.

3.3.3 Quantificação de enzimas quitinolíticas

Para essa análise foi utilizado o protocolo descrito por Miller (1959) modificado, no qual utiliza-se um reagente colorimétrico dinitrosalicílico (DNS) para detecção de açúcares redutores (glicose) produzidos através da ação das enzimas quitinolíticas sob a quitina de

casca de caranguejo (*practical grade SIGMA®*) bruta 0,5% diluída em tampão citrato fosfato 50 mM de pH 5,6. Foi necessário construir e estabelecer uma curva padrão de glicose, para isso foram feitos nove pontos de concentração, sendo elas: 3,9 µg/mL, 5 µg/mL, 7,8 µg/mL, 15,6 µg/mL, 31,25 µg/mL, 50 µg/mL, 62,5 µg/mL, 125 µg/mL e 150 µg/mL. Essa etapa é essencial para posterior avaliação e conversão dos dados.

O reagente DNS foi preparado da seguinte forma: pesou-se 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio, ou popularmente conhecido como Sal de Rochelle. Após a pesagem o ácido 3,5-dinitrosalicílico foi dissolvido em 200 mL de NaOHaq (2 mol.L⁻¹) e o sal de Rochelle em 500 mL de água destilada. Para que ocorresse a total dissolução dessas misturas foi necessário mantê-las sob agitação em placa magnética, em seguida as duas soluções foram misturadas, homogeneizadas e armazenadas em um recipiente envolvido com papel alumínio (fotossensível) em geladeira de 5°C por até 10 dias.

Para a reação, 1 mL do caldo fermentado foi centrifugado (Eppendorf® - 5804, Hamburg, Germany) a 1.200 rpm por 5 minutos e 250 µL do sobrenadante foi coletado. Este sobrenadante foi adicionado a 250 µL de quitina (0,5%) e 500 µL do tampão citrato fosfato com um pH 5,6. Para que ocorresse a reação, as misturas foram mantidas a 50°C por 60 minutos para a quebra de quitina, caso houvesse a presença de quitinase no sobrenadante. Após o tempo proposto, foi realizada a coloração das amostras para a detecção de açúcares redutores, para isso cada ponto da curva de açúcar e cada uma das amostras contendo fermentado foi pipetado 300 µL, em duplicata, em conjunto com 300 µL de DNS, sendo que essa reação foi mantida a 100°C em banho-maria por 5 minutos.

A leitura da coloração das amostras foi realizada em espectrofotômetro Synergy™ H1 (Biotek, Vermont, USA) com comprimento de onda de 540 nm, utilizando água destilada como branco em conjunto com DNS para zerar a coloração. O equipamento fornece os dados em uma concentração de µg/mL, dessa forma foi necessário realizar a transformação dos dados para U/mL (unidade enzimática por mL). Para essa transformação de dados foi necessário primeiramente determinar a média da dupla pipetagem de cada ponto da curva, com esses resultados um gráfico de dispersão foi gerado com os valores de R² e equação de regressão, essencial para correção dos valores para µg/mL. Logo após, no site ENDMEMO foi transformado o valor da glicose de µg/mL para µmol/mL. Esse valor (5,5507 µmol/mL) multiplicado pelo valor das amostras corrigiu todos os valores para µmol/mL. Por último, para transformação de µmol/mL para unidade enzimática por mL (U/mL) foi utilizada a seguinte equação:

$$U = \frac{\mu\text{mol de glicose}}{\text{Tempo de reação} \times \text{Volume do extrato enzimático}}$$

3.3.4 Quantificação de enzimas proteolíticas

Para essa análise foi escolhida a metodologia de Charney e Tomarelli (1947), porém foram realizadas modificações para uma maior detecção das enzimas. Após seis dias de fermentação submersa, uma alíquota de 1 mL foi coletada e misturada com 1 mL de azocaseína 0,5% (SIGMA® Aldrich) diluída em tampão fosfato 5M de pH 6,0, em duplicata. Para confirmação de protocolo, uma reação de referência foi utilizada para confirmar a veracidade da leitura. As amostras foram mantidas em banho-maria por 40 minutos a 40°C. Após o tempo determinado, todas as reações foram paralisadas com a adição de 1 mL do ácido tricloroacético 10% (TCA) e levadas para a centrifuga (Eppendorf® - 5804, Hamburg, Germany) por 15 minutos a 3.000 rpm sob temperatura de 25°C. Finalizando essa etapa, uma alíquota de 2 mL da reação foi adicionada em 2 mL de KOH 5M, pois o agrupamento de azocaseína em pH alcalino induz a formação da cor laranja e, posteriormente a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro (SHIMADZU UV-1800, Nishinokyo, Japan) a 430 nm, sendo que uma unidade enzimática (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar em 0,01 a absorbância por minuto.

3.4 Criação de insetos pragas

3.4.1 *Chrysodeixis includens*

A criação foi mantida em dieta artificial, cuja composição consta na Tabela 6. Para o início da criação, ovos do inseto foram cedidos pelo laboratório de Biologia de Insetos localizado no departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

Em uma sala com condições de temperatura ($27 \pm 1^\circ\text{C}$) e 12 horas de fotófase controlados, a criação foi mantida da seguinte forma: A fase larval, individualizada em copinhos plásticos, foi alimentada com dieta artificial (Tabela 6). Já os insetos adultos sexados, pelo menos 20, foram acondicionados em gaiolas de PVC com algodão embebido de uma solução de mel 10%, além de folhas de soja sobre o *voil* que cobre a gaiola para estimular a oviposição. As pupas foram mantidas em placas de Petri após a sexagem e os ovos em copinhos plásticos com algodão embebido com água destilada, para manter a umidade.

Tabela 6 - Composição da dieta utilizada para alimentação de *Chrysodeixis includens* (PARRA, 1996).

Componentes	1 Receita
Feijão	112,5g
Germe de Trigo	90,0g
Proteína de Soja	45,0g
Caseína	45,0g
Levedura	56,3g
Solução Vitamínica	13,5mL
Ácido Ascórbico	5,4g
Ácido Sórbico	2,7g
Nipagin	4,5g
Tetraciclina	169,5mg
Formaldeído	5,4mL
Ágar	34,5g
Água Destilada	1800mL

3.4.2 *Spodoptera frugiperda*

Os ovos foram obtidos da empresa Pragas.com insumos biológicos, localizada em Piracicaba/SP. Após a eclosão, as lagartas foram mantidas em alface orgânica durante a criação e execução dos experimentos.

3.4.3 *Euschistus heros*

Os insetos foram criados em caixas plásticas (21x18x18cm) em condições controladas ($26 \pm 1^\circ\text{C}$; $60 \pm 10\%$ UR; fotoperíodo de 14 h), o alimento oferecido foi vagem verde de feijão e sementes de amendoim, além de água em algodão umedecido. Para facilitar a coleta dos ovos, foi colocado para os adultos pequenas porções de algodão seco dentro da caixa plástica. Após a oviposição esse algodão com os ovos foi colocado em placas de Petri com umidade para evitar dessecação e mantidos até a eclosão das ninfas.

3.5 Teste de virulência com os insetos pragas

Para cada praga utilizada ao longo do desenvolvimento deste trabalho, foi empregada uma metodologia de aplicação e concentração de inóculo. Abaixo encontra-se a descrição do protocolo de bioensaio seguido para cada inseto.

3.5.1 *Chrysodeixis includens*

Conídios submersos

Conídios submersos foram obtidos após quatro dias de cultivo em meio LPCM1. Suspensões de 1×10^6 conídios submersos/mL foram preparadas para cada isolado e para o controle foi utilizada água destilada com adjuvante monoleato de polioxietilenosorbitano (Tween 80) a 0,05%. O ensaio contou com 16 tratamentos (15 isolados de *Trichoderma* + Controle) com três unidades experimentais cada, contendo dez lagartas acondicionadas em placa de Petri e totalizando trinta lagartas de terceiro instar por tratamento.

Foram aplicados 2 mL de cada tratamento (1×10^6 conídios/mL) em cada unidade experimental, com o auxílio de uma torre de Potter (Burkard Manufacturing, Rickmansworth, UK) calibrada em 15 PSI. Após a aplicação, cada lagarta foi individualizada em células de bandejas plásticas de 32 células (B32, Biosupply Soluções Biológicas) forradas com papel filtro e com um pedaço de alface americana orgânica como alimento. As avaliações foram conduzidas diariamente por dez dias seguidos, sendo contabilizada a mortalidade diária para posterior análise de sobrevivência. O experimento foi repetido uma vez no tempo.

Enzimas

Os quinze isolados de *Trichoderma* foram cultivados por seis dias em meio Sabouraud modificado para produção de enzimas (LACEY, 2012). O caldo fermentado foi submetido a centrifugação (3.000 rpm por 5 minutos) e posterior reação do protocolo enzimático para observação da coloração amarela, confirmando a atividade quitinolítica, porém não se padronizou a concentração das unidades enzimáticas para aplicação nos insetos. Para o tratamento controle foi utilizada água destilada com Tween 80 a 0,05%. O ensaio contou com 16 tratamentos (15 isolados de *Trichoderma* + Controle), com três unidades experimentais, contendo dez lagartas cada, acondicionadas em placa de Petri, o que totalizou trinta lagartas de terceiro instar por tratamento.

Foram aplicados 2 mL de cada tratamento em cada unidade experimental, com o auxílio de uma torre de Potter (Burkard Manufacturing, Rickmansworth, UK) calibrada em 15 PSI. Após a aplicação, cada lagarta foi individualizada em células de bandejas plásticas de 32 células (B32, Biosupply Soluções Biológicas) forradas com papel filtro e com um pedaço de alface americana orgânica como alimento. As avaliações foram conduzidas diariamente por

dez dias seguidos, sendo contabilizada a mortalidade diária para posterior análise de sobrevivência. O experimento foi repetido uma vez no tempo.

3.5.2 *Spodoptera frugiperda*

Conídios submersos

Quinze isolados de *Trichoderma* foram cultivados por quatro dias em meio LPCM1. O caldo fermentado dos isolados foi centrifugado (3.000 rpm por 5 minutos) para descarte do sobrenadante, a biomassa foi ressuspensa em água destilada com Tween 80 a 0,05% e padronizada para 1×10^7 conídios submersos/mL. Para o controle foi utilizado somente água destilada com Tween 80 a 0,05%. O ensaio contou com 16 tratamentos (15 isolados de *Trichoderma* + Controle), cada tratamento com quatro unidades experimentais com oito insetos cada, acondicionadas em placa de Petri, totalizando trinta e duas lagartas de terceiro ínstar por tratamento.

Foram aplicados 2 mL da suspensão de conídios de cada tratamento em cada unidade experimental, sendo aplicado com o auxílio de uma torre de Potter (Burkard Manufacturing, Rickmansworth, UK) calibrada em 15 PSI. Após a aplicação, cada lagarta foi individualizada em células de bandejas plásticas de 32 células (B32, Biosupply Soluções Biológicas) forradas com papel filtro e com um pedaço de alface americana orgânica como alimento. As avaliações foram conduzidas diariamente por dez dias seguidos, sendo contabilizada a mortalidade diária para posterior análise de sobrevivência. O experimento foi realizado uma única vez.

Enzimas

Os quinze isolados de *Trichoderma* foram cultivados por seis dias em meio Sabouraud modificado para produção de enzimas (LACEY, 2012). O caldo fermentado foi submetido a centrifugação (3.000 rpm por 5 minutos) e posterior reação do protocolo enzimático para observação da coloração amarela, confirmando a atividade quitinolítica, porém não se padronizou a concentração das unidades enzimáticas para aplicação nos insetos. Para o tratamento controle foi utilizada água destilada com Tween 80 a 0,05%. O ensaio contou com 16 tratamentos (15 isolados de *Trichoderma* + Controle) com quatro unidades experimentais cada contendo oito lagartas acondicionadas em placa de Petri e totalizando trinta e duas lagartas de terceiro ínstar por tratamento.

A execução se sucedeu com a utilização de 1 mL, de cada tratamento enzimático, contendo o sobrenadante após a centrifugação, e 1 mL de água destilada com Tween 80® a 0,05%, para cada unidade experimental, já para o controle foi utilizado somente 2 mL de água destilada com Tween 80 a 0,05%. Todos os tratamentos foram aplicados em uma torre de Potter (Burkard Manufacturing, Rickmansworth, UK) calibrada em 15 PSI. Após a execução, cada lagarta foi individualizada em células de bandejas plásticas de 32 células (B32, Biosupply Soluções Biológicas) forradas com papel filtro e com um pedaço de alface americana orgânica como alimento. As avaliações foram conduzidas diariamente por dez dias seguidos, sendo contabilizada a mortalidade diária para posterior análise de sobrevivência. O experimento foi realizado uma única vez.

3.5.3 *Euschistus heros*

Esse ensaio teve como objetivo avaliar os isolados fúngicos de *Trichoderma* que foram promissores no ensaio de *C. includens* com enzimas em conjunto com o gênero *Cordyceps*, para investigar se haveria interação entre os fungos. Os isolados de *Trichoderma* selecionados foram os ESALQ-2943 (*T. endophyticum*), ESALQ-1750 (*T. saturnisporum*), ESALQ-5633 (*T. asperelloides*) e ESALQ-2917 (*T. spirale*), além do ESALQ-5634 (*T. asperelloides*) por ter gerado bons resultados com a utilização do fermentado filtrado em um trabalho anterior realizado no laboratório de Patologia e Controle Microbiano. Para o teste de interação avaliou-se o efeito da aplicação conjunta de conídios aéreos do isolado ESALQ-1296 de *Cordyceps fumosorosea* com o fermentado filtrado contendo enzimas de isolados de *Trichoderma* spp. Os outros tratamentos foram de conídios submersos, fermentado filtrado contendo enzimas e metabólitos de *Trichoderma* spp., além de conídios aéreos de *C. fumosorosea* aplicados isoladamente (Tabela 8).

A suspensão de *C. fumosorosea* foi preparada a partir da raspagem da placa contendo conídios aéreos do fungo, sendo que a diluição se sucedeu em água destilada com adjuvante monoleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80) a 0,05%. A quantificação foi realizada em câmara de Neubauer (Grid Optik, Piracicaba, Brasil) com um aumento de 400x no microscópio óptico e posteriormente o inóculo foi padronizado a 5×10^6 conídios aéreos/mL.

A Tabela 7 ilustra os 17 tratamentos utilizados neste bioensaio, para total compreensão da concentração aplicada em uma torre de Potter (Burkard Manufacturing, Rickmansworth, UK) calibrada em 15 PSI.

Tabela 7 - Descrição dos 17 tratamentos utilizados nos bioensaios com *Euschistus heros*, definindo concentração e quantidade da aplicação por repetição de cada tratamento.

Controle	2 mL de água destilada com tween 80® 0,05%
ESALQ1750 - Fermentado Trich	1 mL de fermentado + 1 mL de água destilada com tween 80® 0,05%
ESALQ2917 - Fermentado Trich	
ESALQ2943 - Fermentado Trich	
ESALQ5634 - Fermentado Trich	
ESALQ5633 - Fermentado Trich	
ESALQ1750 - Fermentado Trich + Cf	1 mL de fermentado + 1 mL de <i>Cordyceps fumosorosea</i> 5×10^6 conídios/mL
ESALQ2917 - Fermentado Trich + Cf	
ESALQ2943 - Fermentado Trich + Cf	
ESALQ5634 - Fermentado Trich + Cf	
ESALQ5633 - Fermentado Trich + Cf	
<i>Cordyceps fumosorosea</i>	2 mL de 5×10^6 conídios aéreos/mL
ESALQ1750 - CONÍDIOS Trich	2 mL de 1×10^7 conídios submersos/mL
ESALQ2917 - CONÍDIOS Trich	
ESALQ2943 - CONÍDIOS Trich	
ESALQ5634 - CONÍDIOS Trich	
ESALQ5633 - CONÍDIOS Trich	

* Fermentado Trich = Fermentado filtrado contendo enzimas e metabólitos de *Trichoderma*; Fermentado Trich+Cf = Fermentado filtrado contendo enzimas e metabólitos de *Trichoderma* em conjunto com *Cordyceps fumosorosea*; Conídios Trich = Conídios submersos de *Trichoderma*.

3.6 Análise estatística

Os dados de produção de conídios submersos, produção de enzimas quitinolíticas e proteolíticas foram inicialmente submetidos a análise exploratória para determinação das médias dos tratamentos, erro-padrão, “outliers” e tipo de distribuição no programa “R” de estatística (R Core Team (2016)). Em seguida, os dados foram verificados quanto ao ajuste de modelos lineares generalizados (mlg) com diferentes famílias de distribuições para os erros. Os melhores modelos foram selecionados através da visualização do half-normal plot com o auxílio do pacote “hnp” do programa R (MORAL et al., 2017) e da análise comparativa dos critérios de informação de Akaike (AIC). Os dados de concentração (conídios submersos/mL) foram ajustados a um modelo com distribuição binomial negativa para os erros, considerando-se os efeitos dos tratamentos para cada data de avaliação. Os dados de produção de quitinases e proteases foram ajustados a um modelo com distribuição Gamma considerando-se os efeitos de tratamento e bloco, este último definido como cada experimento no tempo. No caso da produção de enzimas quitinolíticas, o tempo de cultivo foi considerado no modelo. Após o ajuste do melhor modelo, o efeito de tratamento, bloco e tempo foi verificado na análise de variância e quando significativo, as médias dos mesmos foram comparadas utilizando o Teste

de Tukey ao nível de 5% de significância. Para os dados de produção de enzimas no sexto dia de cultivo foi feita também uma análise de agrupamento das médias pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade utilizando o pacote Scott Knott do programa R.

Os dados de mortalidade diária das lagartas e adultos de percevejos foram utilizados para análise de sobrevivência utilizando a distribuição Weibull ou o modelo não paramétrico Kaplan- Meier, ao nível de 5%. A comparação entre as curvas de sobrevivência foi feita pelo teste de Log-Rank, considerando-se o nível de 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS

4.1 Identificação molecular

As análises filogenéticas das sequências dos quinze isolados de *Trichoderma* prospectados neste estudo resultaram na classificação dos isolados em seis espécies. De acordo com a reconstrução da árvore de Máxima Verossimilhança dos marcadores RPB2 (Figura 5) e TEF (Figura 6) as espécies encontradas foram: *Trichoderma ghanense* (Yoshim.Do; Y.Abe & Sugiy, 1987) (ESALQ-2600), *Trichoderma saturnisporum* (Hammill, 1970) (ESALQ-1750), *Trichoderma koningiopsis* ((Samuels & Druzhinina, 2006) (ESALQ-2763), *Trichoderma spirale* (Bissett, 1992) (ESALQ-2845, ESALQ-2901, ESALQ-2917, ESALQ-2950 e ESALQ-3018), *Trichoderma asperelloides* (Samuels, 2010) (ESALQ-5635, ESALQ-5633, ESALQ-5634, ESALQ-5632 e ESALQ-5613) e *Trichoderma endophyticum* (P.Chaverri; F.B.Rocha; Samuels, 2015) (ESALQ-2943 e ESALQ-2916).

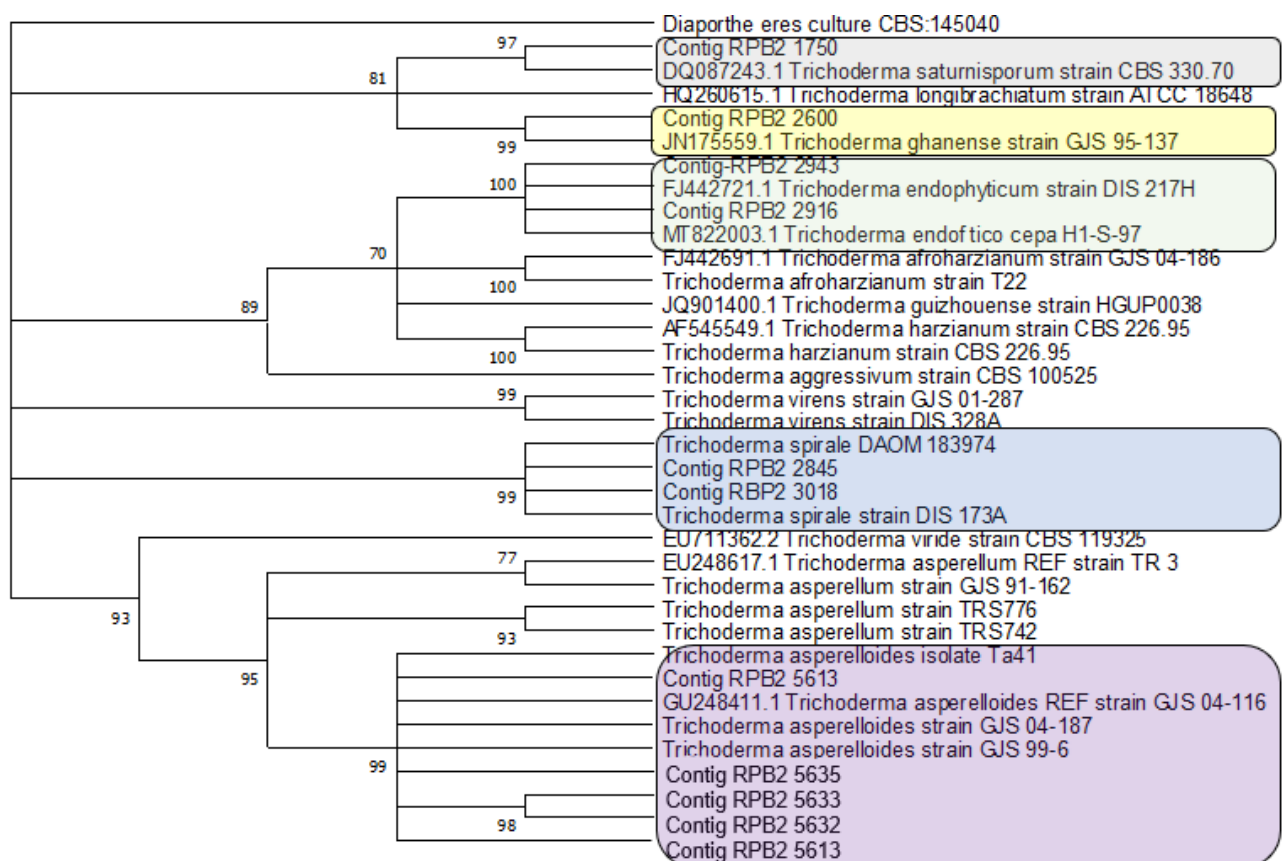


Figura 5 - Árvore de Máxima Verossimilhança construída a partir do alinhamento de 36 sequências da segunda subunidade maior da RNA Polimerase II (RPB2) de isolados de *Trichoderma*. Apenas os valores de bootstrap (1000 repetições) acima de 70% estão representados nos nós da árvore. Os isolados prospectados neste estudo estão identificados como: Contig RPB2 “número do isolado”. Sequências com tamanho de 803 pares de base.

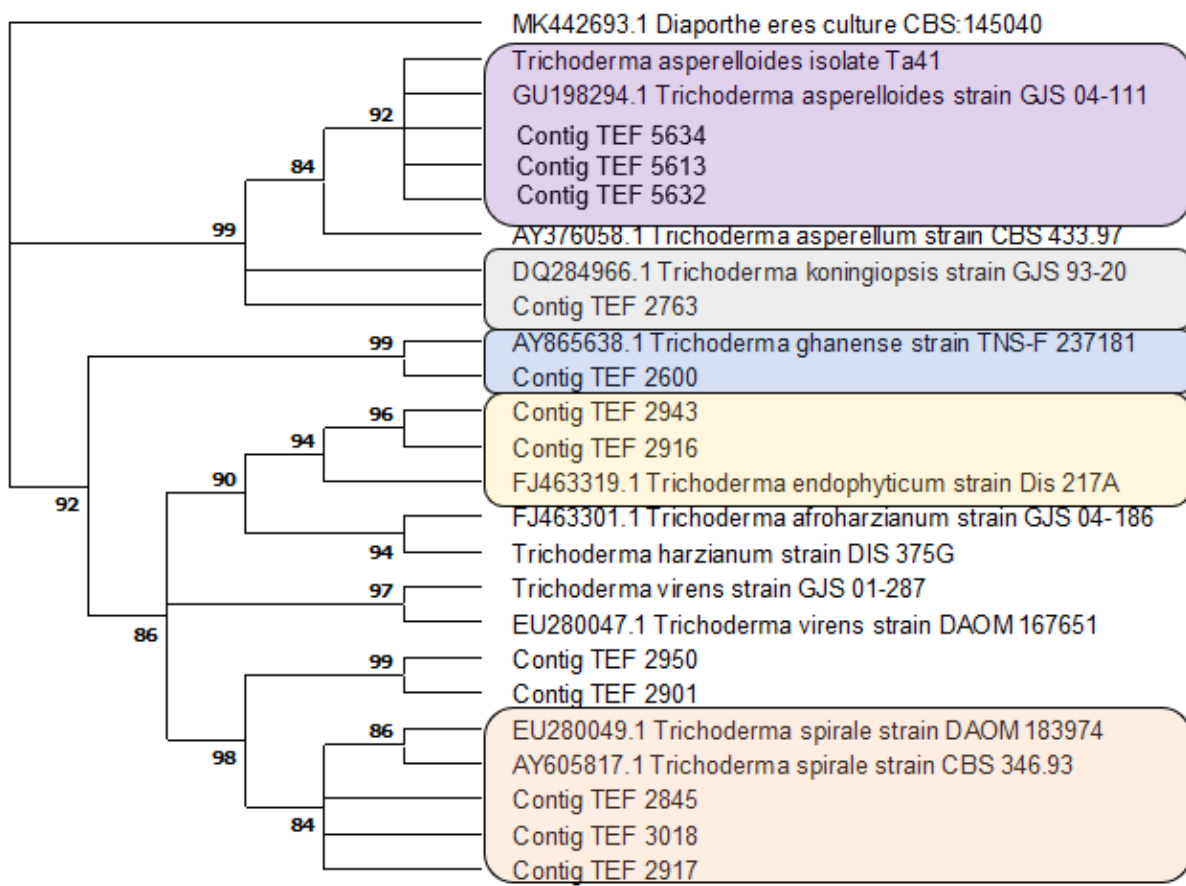


Figura 6 - Árvore de Máxima Verossimilhança construída a partir do alinhamento de 25 seqüências do fator de alongação (EF) de isolados de *Trichoderma*. Apenas os valores de bootstrap (1000 repetições) acima de 70% estão representados nos nós da árvore. Os isolados prospectados neste estudo estão identificados como: Contig TEF “número do isolado”. Seqüências com tamanho de 599 pares de base.

Considerando a árvore filogenética do marcador RPB2 (Figura 5), todos os isolados se agruparam com isolados de referência em clados bem definidos com alto valor de *bootstrap* (>70%). Curiosamente, os isolados ESALQ-2943 e ESALQ-2916 que formaram clados bem específicos para *T. endophyticum* na árvore filogenética do marcador TEF e RPB2, quando submetidas no BLASTN para as sequências depositadas no *GenBank* foram identificadas como *T. harzianum*. Já os isolados que ficaram no clado de *T. asperelloides* quando submetidas no BLASTN para as sequências depositadas no *GenBank*, eram similares a essa espécie e a *T. asperellum*. O que é comum já que são espécies parecidas, mas morfologicamente diferentes, sendo comumente necessário uma recolocação (SAMUELS, 2010).

Na árvore do marcador TEF os isolados ESALQ-2950 e ESALQ-2901, que no BLASTN no *GenBank* apresentaram alto valor de similaridade com isolados da espécie *T.*

spirale, na árvore formam um clado irmão das sequências de referência dessa mesma espécie. Já o isolado ESALQ-2763 apresentou alto valor de similaridade com isolados da espécie *T. koningiopsis*, e na árvore ficou próximo desta espécie, mas não formou um clado.

Para os isolados cujas sequências *contig* ficaram boas para ambos os marcadores (RPB2 e TEF), é notório que as espécies estão bem definidas, como é o caso do ESALQ-2600 (*T. ghanense*), ESALQ-2845 (*T. spirale*), ESALQ-2916 (*T. endophyticum*), ESALQ-2943 (*T. endophyticum*), ESALQ-3018 (*T. spirale*), ESALQ-5613 e ESALQ-5632.

Devido à baixa qualidade das sequências, não foi possível classificar os isolados ESALQ-1750, ESALQ-5633 e ESALQ-5635 com o marcador TEF e os isolados ESALQ-2763, ESALQ-2901, ESALQ-2917, ESALQ-2950 e ESALQ-5634 com o marcador RPB2. A Figura 7 expõe tanto as espécies quanto a coloração da esporulação em placa de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose e ágar), e a Tabela 8 resume os resultados obtidos com as árvores filogenéticas, para ambos os marcadores.

Tabela 8 - Identificação de espécies de *Trichoderma* com base no sequenciamento de dois marcadores: RPB2 e EF.

Isolados	RPB2	TEF
1750	<i>Trichoderma saturnisporum</i>	*
2600	<i>Trichoderma ghanense</i>	<i>Trichoderma ghanense</i>
2763	*	<i>Trichoderma koningiopsis</i>
2845	<i>Trichoderma spirale</i>	<i>Trichoderma spirale</i>
2901	*	<i>Trichoderma spirale</i>
2916	<i>Trichoderma endophyticum</i>	<i>Trichoderma endophyticum</i>
2917	*	<i>Trichoderma spirale</i>
2943	<i>Trichoderma endophyticum</i>	<i>Trichoderma endophyticum</i>
2950	*	<i>Trichoderma spirale</i>
3018	<i>Trichoderma spirale</i>	<i>Trichoderma spirale</i>
5613	<i>Trichoderma asperelloides</i>	<i>Trichoderma asperelloides</i>
5633	<i>Trichoderma asperelloides</i>	*
5634	*	<i>Trichoderma asperelloides</i>
5635	<i>Trichoderma asperelloides</i>	*
5632	<i>Trichoderma asperelloides</i>	<i>Trichoderma asperelloides</i>

* Sequências que não ficaram boas e conseqüentemente não foram usadas para construção das árvores.

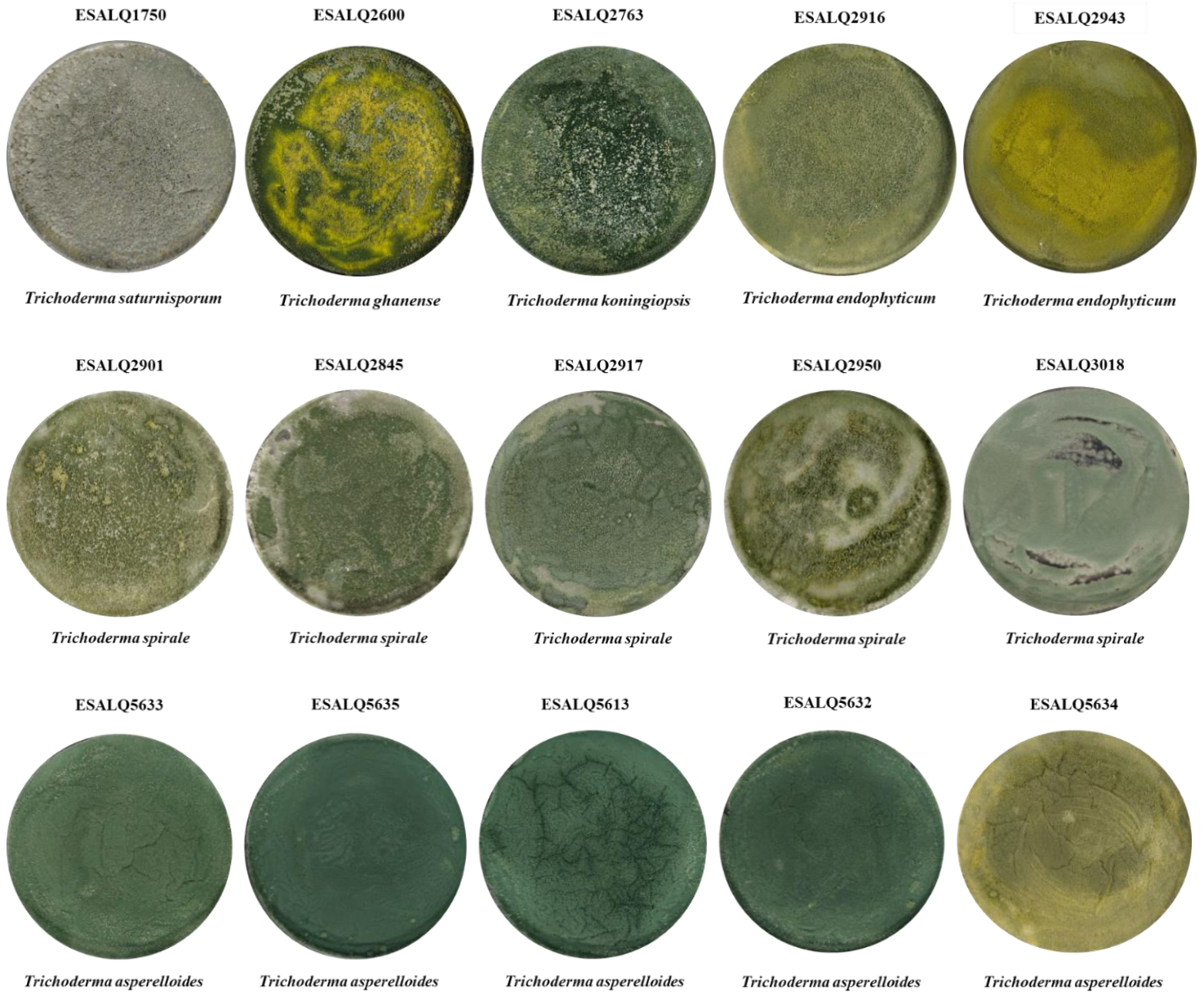


Figura 7 - Esporulação dos quinze isolados do gênero *Trichoderma* em meio de cultura BDA entre 5 e 8 dias de incubação à 26°C e sua identificação molecular.

4.2 Produção de conídios submersos

Esse ensaio conduzido por seis dias objetivou-se avaliar o potencial de conídios submersos de diferentes isolados de *Trichoderma* spp., sob as mesmas condições de cultivo (Figura 8).

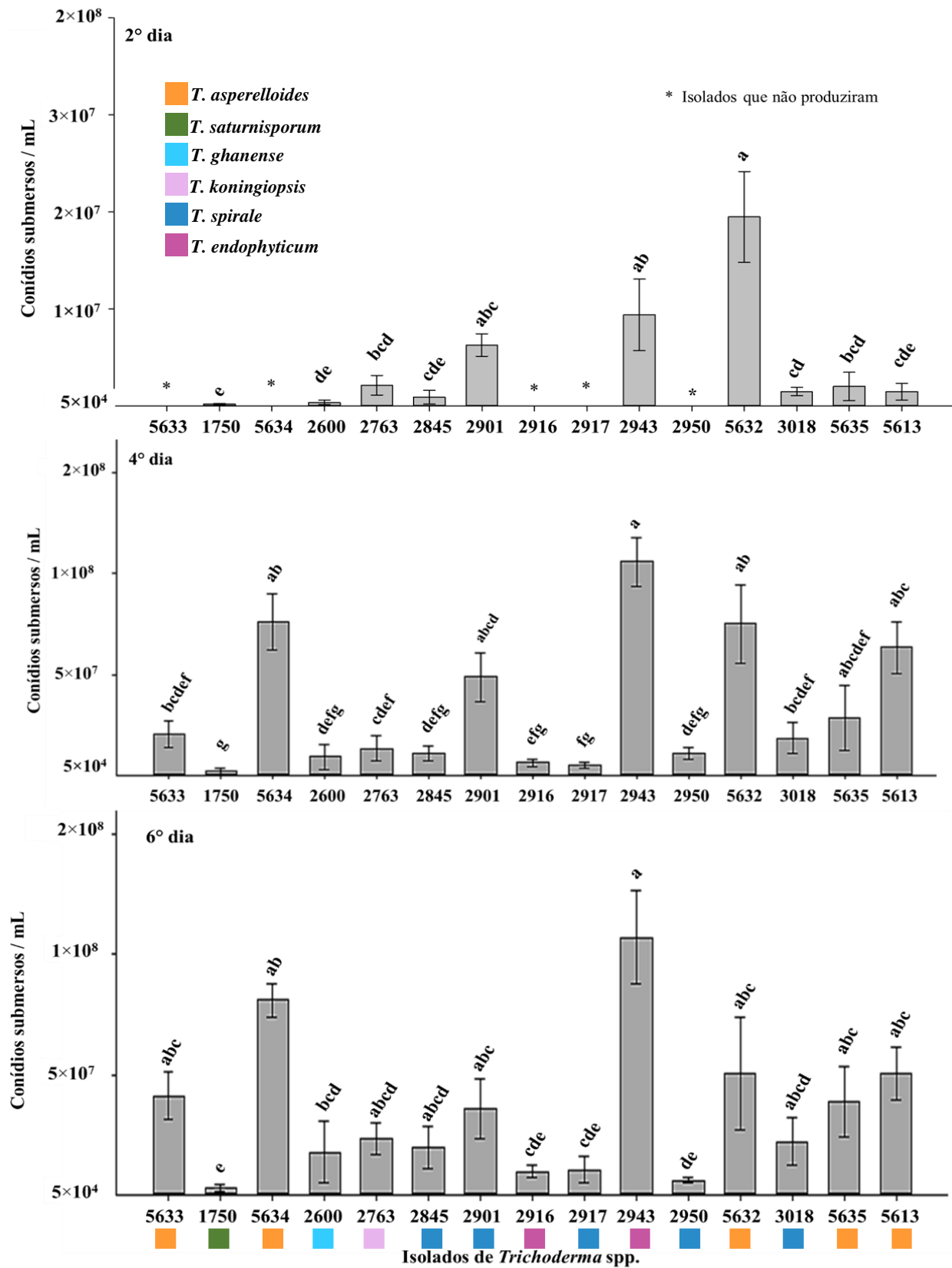


Figura 8 – Produção de conídios submersos de *Trichoderma* após 2, 4 e 6 dias de fermentação submersa utilizando o meio LPCM1, a 250 rpm e uma temperatura de 28°C. (Barras seguidas por letras iguais, não se diferem significativamente pelo Teste de Tukey a 5% de significância).

A produção de conídios submersos variou significativamente entre os isolados de *Trichoderma* em cada dia de cultivo ($P < 0,001$) variando de 0 a $1,1 \times 10^8$ conídios submersos/mL. No segundo dia de fermentação o isolado ESALQ-5632 se destacou produzindo $1,8 \times 10^7$ conídios submersos/mL, porém não diferiu estatisticamente dos isolados ESALQ-2943 ($9,4 \times 10^6$ conídios submersos/mL) e do ESALQ-2901 ($6,3 \times 10^6$ conídios submersos/mL). Os cinco isolados que aparecem com asterisco na Figura 8 produziram quantidades inferiores a 5×10^4 ou até mesmo não produziram conídios submersos, como foi observado nos isolados ESALQ-2917 (*T. spirale*) e ESALQ-2916 (*T. endophyticum*). Somente o ESALQ-5632 (*T. asperelloides*) e o ESALQ-2943 (*T. endophyticum*) produziram 10^7 conídios submersos/mL, os demais isolados apresentaram produções inferiores a 1×10^7 conídios submersos/mL. No quarto dia de fermentação, a produção de conídios submersos também se diferiu estatisticamente entre os isolados ($P < 0,001$) e todos produziram acima de 5×10^4 conídios submersos/mL. Assim como observado para o segundo dia, o isolado ESALQ-2943 (*T. endophyticum*) se destacou e foi o único que atingiu uma concentração de 1×10^8 conídios/mL, representando um incremento de produção de cinco vezes em relação ao segundo dia. No entanto, a produção deste isolado não diferiu estatisticamente dos isolados ESALQ-5634 ($7,6 \times 10^7$), ESALQ-2901 ($4,8 \times 10^7$), ESALQ-5632 ($7,5 \times 10^7$), ESALQ-5635 ($2,8 \times 10^7$) e ESALQ-5613 ($6,3 \times 10^7$). De todos os isolados analisados, quatro não chegaram um expoente de produção de 10^7 conídios submersos/mL no 4º dia, sendo eles ESALQ-1750 (*T. saturnisporum*), ESALQ-2600 (*T. ghanense*), ESALQ-2916 (*T. endophyticum*) e ESALQ-2917 (*T. spirale*).

No sexto dia de fermentação a produtividade diferiu estatisticamente entre os isolados ($P < 0,001$) mas para maioria deles não foi observado um incremento em relação ao quarto dia de cultivo. O isolado mais produtivo, ESALQ-2943 manteve a concentração obtida no segundo dia de 1×10^8 conídios/mL, porém não se diferiu estatisticamente dos isolados ESALQ-5633 (4×10^7 conídios/mL), ESALQ-5634 (8×10^7 conídios/mL), ESALQ-2763 ($2,3 \times 10^7$ conídios/mL), ESALQ-2845 ($1,9 \times 10^7$ conídios/mL), ESALQ-2901 ($3,6 \times 10^7$ conídios/mL), ESALQ-5632 (5×10^7 conídios/mL), ESALQ-3018 ($2,2 \times 10^7$ conídios/mL), ESALQ-5635 ($3,8 \times 10^7$ conídios/mL) e ESALQ-5613 (5×10^7 conídios/mL).

Os resultados demonstram que para a maioria dos isolados não há necessidade de conduzir a produção de conídios submersos até o sexto dia uma vez que o incremento de produção entre o dia 4 e 6 foi nulo, baixo ou negativo. O isolado mais produtivo foi o ESALQ-2943 pertencente a espécie *T. endophyticum* e o menos produtivo para conídios

submersos foi o ESALQ-1750, sendo o único da espécie *T. saturnisporum*. O isolado ESALQ-2916, também da espécie *T. endophytichum*, apresentou baixa produção de conídios submersos, sugerindo que a produção é isolado-dependente e não espécie-dependente.

4.3 Fermentação para produção de enzimas quitinolíticas

Inicialmente, foi realizado um ensaio preliminar com três meios de cultura utilizando o ESALQ-5632 (*T. asperelloides*), devido a sua produção de enzimas quitinolíticas comprovadas em um estudo anterior no laboratório de Patologia e Controle Microbiano. Como pôde ser observado na figura 9, o meio de cultura **Sabouraud modificado** se destacou e, portanto, foi o escolhido para dar continuidade nos experimentos que objetivaram a produção de enzimas pelo gênero *Trichoderma*.

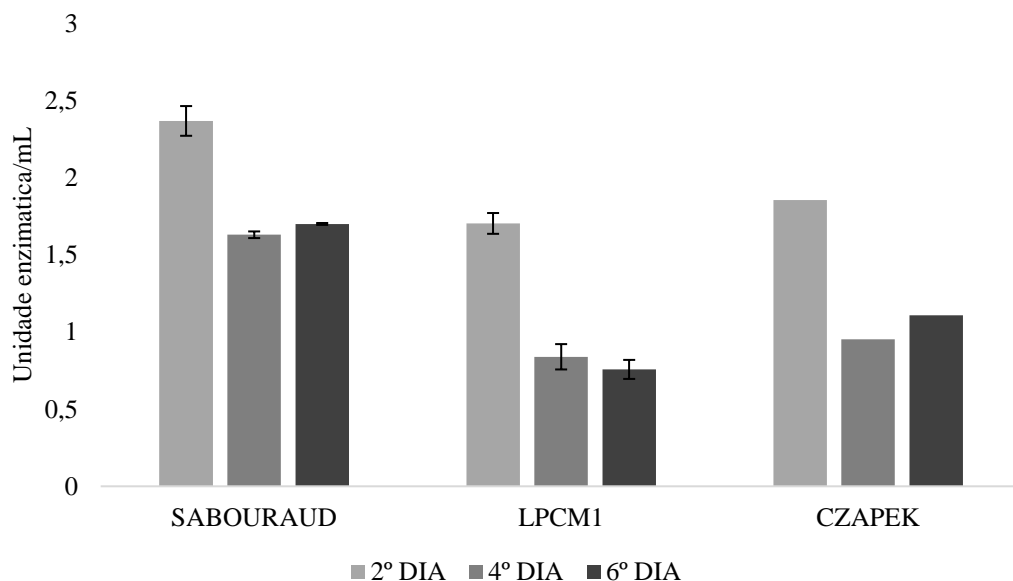


Figura 9 – Produção de enzimas quitinolíticas de *Trichoderma* ao longo dos dias 2º, 4º e 6º de fermentação submersa a 250 rpm e uma temperatura de 28°C, em três meios de cultura modificados (Sabouraud, LPCM1 e Czapek) com um pH de 5,5.

Ainda neste sentido, surgiu o interesse em aumentar a produção de quitinases, já que uma atividade máxima de 2,4 U/mL foi considerada baixa. Para isso, foi realizado um segundo pré-teste, onde a quitina de casca de caranguejo (*practical grade SIGMA®*) foi utilizada bruta, ou seja, sem a realização do protocolo para transformação em quitina coloidal.

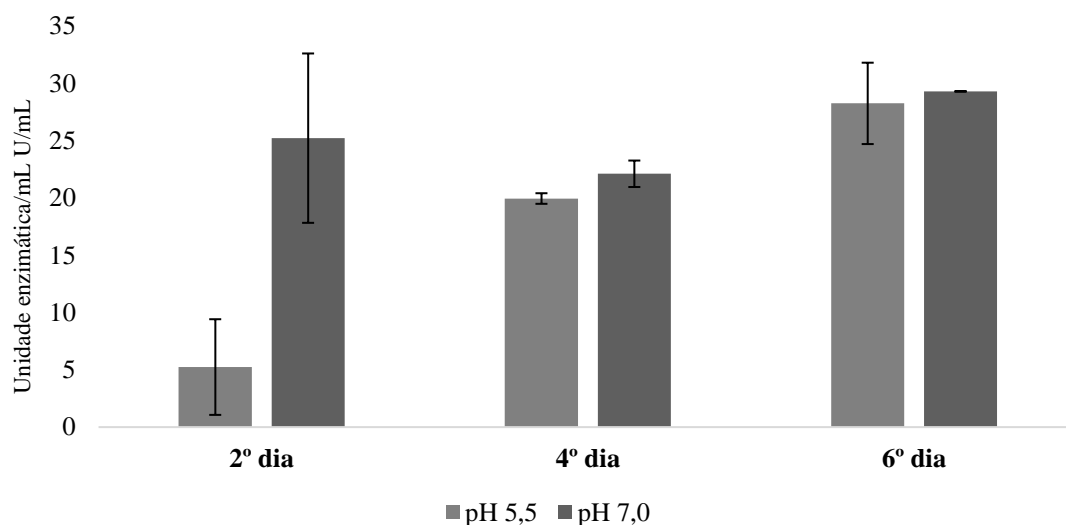


Figura 10 – Produção de enzimas quitinolíticas de *Trichoderma* ao longo dos dias 2º, 4º e 6º de fermentação submersa a 250 rpm e uma temperatura de 28°C, sob dois pHs utilizando o meio Sabouraud modificado com quitina de casca de caranguejo (*practical grade* - SIGMA®) bruta.

A produtividade de enzimas quitinolíticas foi influenciada pelo pH do meio e pelo dia de cultivo, chegando a quase 30 U/mL com o pH 7,0 no 6º dia (Figura 10). Dessa forma, a quitina de casca de caranguejo bruta foi selecionada para compor o meio de Sabouraud modificado. Após essa descoberta promissora, iniciou-se a etapa de fermentação submersa com os quinze isolados de *Trichoderma* spp. utilizando o meio Sabouraud modificado (Figura 11).

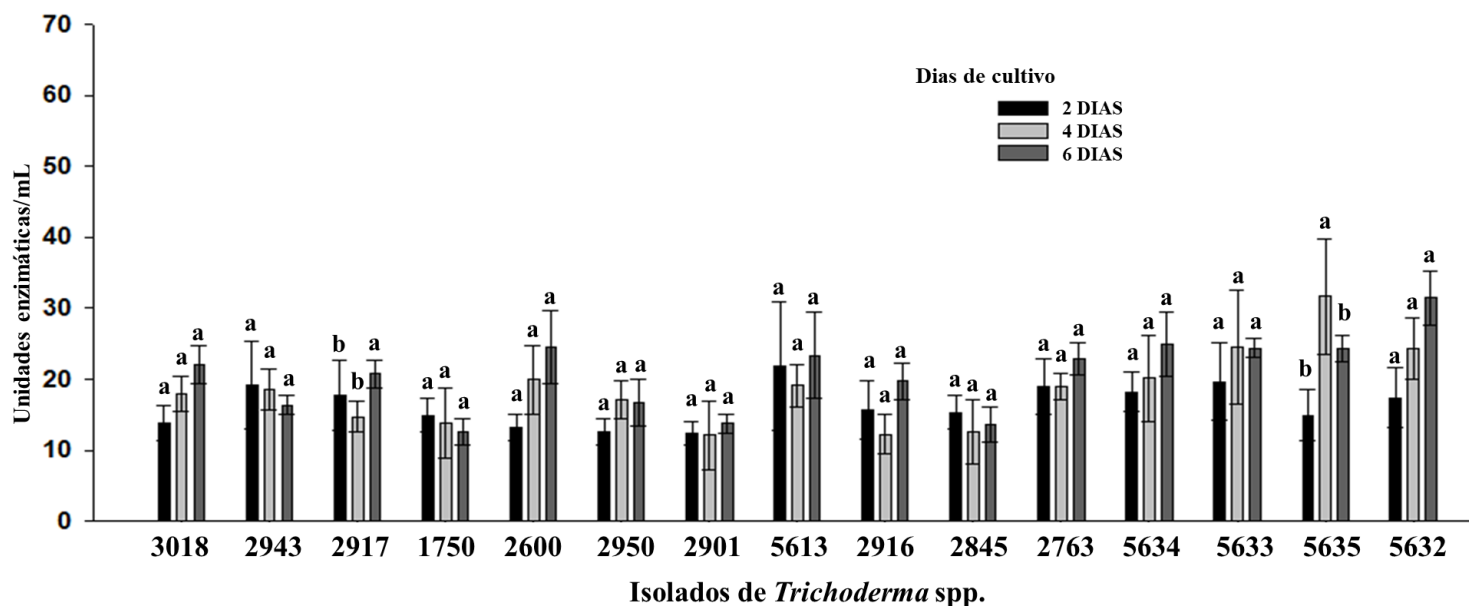


Figura 11 – Produção de enzimas quitinolíticas de *Trichoderma* ao longo dos dias 2º, 4º e 6º de fermentação submersa utilizando o meio Sabouraud modificado (LACEY, 2012) pH 7,0, a 250 rpm e temperatura de 28°C. (Barras seguidas por letras iguais, não se diferem significativamente pelo Teste de Tukey a 5% de significância comparando a produção ao longo do tempo entre isolados).

A produção de enzimas quitinolíticas variou significativamente entre os dias de cultivo para os isolados ESALQ-5635 (*T. asperelloides*) e ESALQ-2917 (*T. spirale*) ($P < 0.001$) (Figura 11). Para os demais isolados não houve diferença estatística na produção entre os dias de cultivo. Com base nos resultados foi possível determinar que de todos os isolados do gênero *Trichoderma*, 60% alcançaram maior produtividade no 6° dia. Para o restante dos isolados, a produção obtida no 4° dia foi maior ou igual aos outros dias e somente os isolados ESALQ-2943 (*T. endophyticum*), ESALQ-1750 (*T. saturnisporum*), ESALQ-2845 (*T. spirale*) apresentaram maior produção no 2° dia, mas sem diferença estatística com os dias 4 e 6.

A análise de Scott Knott resultou no agrupamento dos isolados em dois grupos distintos em função da produção de enzimas quitinolíticas no 6° dia de cultivo. É possível observar que oito isolados se destacaram (ESALQ-5632, ESALQ-5634, ESALQ-5633, ESALQ-2600, ESALQ-5635, ESALQ-2763, ESALQ-3018 e ESALQ-2917), sendo metade deles pertencente a espécie *T. asperelloides*. Os isolados ESALQ-5632 e ESALQ-5635 da espécie *T. asperelloides* alcançaram produtividades de 30 U/mL, sendo os maiores valores obtidos neste experimento. Os isolados das espécies *T. ghanense* e *T. koningiopsis* também ficaram no grupo dos isolados mais produtivos. Por outro lado, isolados da espécie *T. endophyticum* e o único isolado de *T. saturnisporum*, ficaram no grupo de isolados menos produtivos.

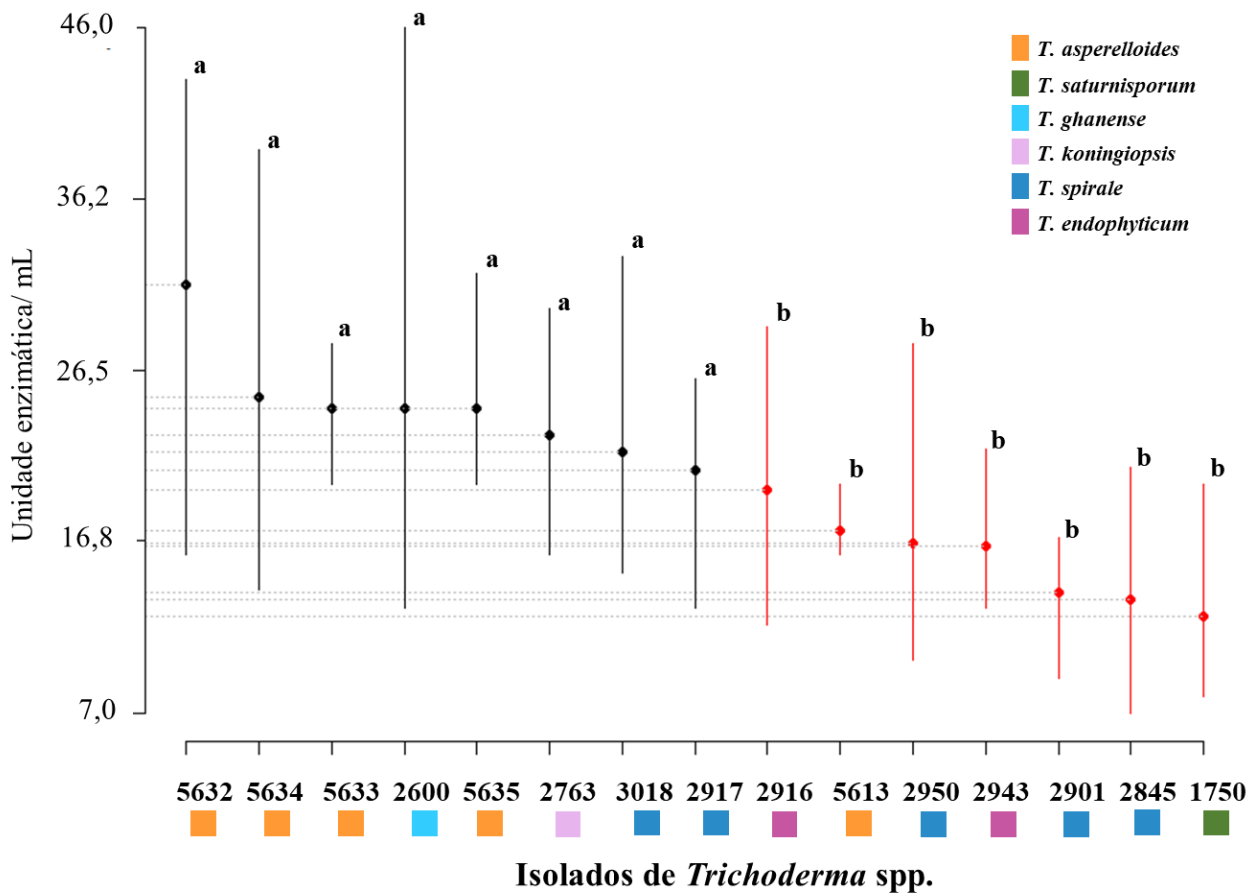


Figura 12 – Análise de agrupamento de Scott Knott para os dados de produção de enzimas quitinolíticas no 6º dia.

4.4 Fermentação para produção de enzimas proteolíticas

Esse ensaio foi conduzido por seis dias e objetivou avaliar o potencial de produção de enzimas proteolíticas de diferentes isolados de *Trichoderma* spp., sob as mesmas condições de cultivo que as enzimas quitinolíticas (Figura 13).

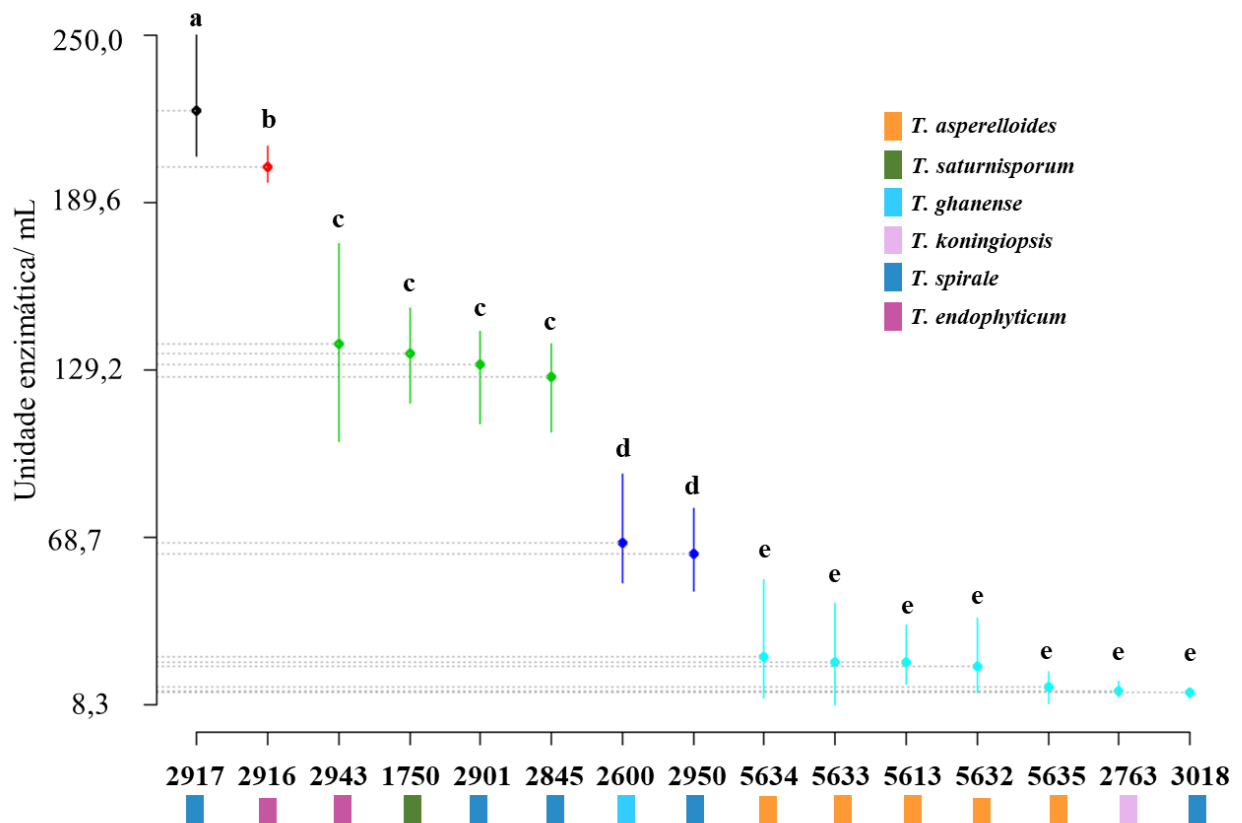


Figura 13 – Análise de agrupamento de Scott Knott para os dados de produção de enzimas proteolíticas no 6º dia.

As enzimas proteolíticas foram quantificadas como um dado complementar e, os isolados que mais produziram foram o ESALQ-2917 (*T. spirale*) e ESALQ-2916 (*T. endophyticum*), totalizando mais de 200 U/mL. Já os isolados ESALQ-2943 (*T. endophyticum*), ESALQ-1750 (*T. saturnisporum*), ESALQ-2901 (*T. spirale*) e ESALQ-2845 (*T. spirale*) foram superiores a 100 U/mL.

A Figura 13 apresenta os agrupamentos Scott Knott, formando 5 grupos estatisticamente distintos. Analogamente, todos os isolados identificados como *T. asperelloides* não apresentaram altos valores na atividade proteolítica, sendo eles ESALQ-5634, ESALQ-5633, ESALQ-5635, ESALQ-5632 e ESALQ-5613. Diferente do que foi observado para os dados de produção de enzimas quitinolíticas, os isolados das espécies *T. endophyticum* e o da espécie *T. saturnisporum* ficaram no grupo dos isolados mais produtivos. Semelhantemente, o ESALQ-3018 (*T. spirale*) e o ESALQ-2763 (*T. koningiopsis*) não se sobressaíram na produção de proteases, isso porque sua produtividade ficou abaixo de 50 unidade enzimática/mL.

4.5 Bioensaio com *Chrysodeixis includens*

4.5.1 Conídios submersos

Lagartas de terceiro instar de *C. includens* foram pulverizadas com suspensões de conídios submersos de quinze isolados de *Trichoderma* spp. na concentração de 1×10^6 /mL. A sobrevivência das lagartas foi afetada pela pulverização dos conídios ($\chi^2 = 41.3$, $df = 15$, $p < 0.001$) embora não tenha diferido estatisticamente do tratamento controle (Figura 14). As lagartas apresentaram valores de sobrevivência entre 86,7% e 48,3%, sendo que o menor valor foi observado para o *T. spirale* isolado ESALQ-2917, com um tempo letal mediano (TL₅₀) de 10 dias. A sobrevivência das lagartas pulverizadas com o isolado ESALQ-2917 foi significativamente menor do que das lagartas pulverizadas com os isolados ESALQ-1750 (*T. saturnisporum*) e ESALQ-2950 (*T. spirale*). Neste sentido, o isolado que após pulverizado resultou em maior sobrevivência das lagartas, foi o *T. saturnisporum* ESALQ-1750 com 86,7%. Nenhuma lagarta apresentou sinais de esporulação de *Trichoderma* após morta.

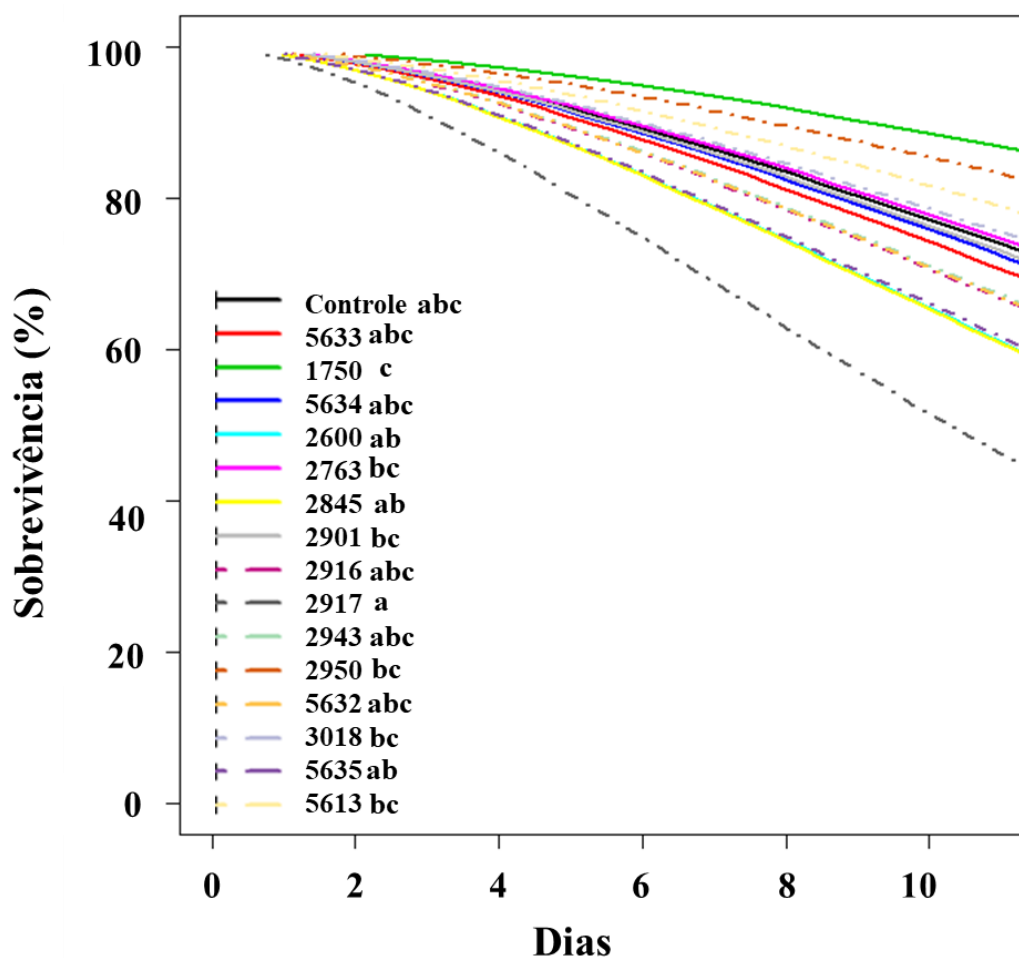


Figura 14 – Sobrevivência de *Chrysodeixis includens* de 3º instar ao longo de 10 dias após aplicação de conídios submersos de *Trichoderma* spp. em uma concentração de 1×10^6 conídios/mL.

Ao longo do progresso dos bioensaios realizados com *C. includens*, notou-se que a mortalidade do controle foi alta nas duas repetições no tempo. Portanto, foi realizado um ensaio teste com uma concentração maior de conídios submersos em outra espécie de lagarta, *S. frugiperda*.

4.5.2 Fermentado filtrado contendo enzimas e metabólitos

A sobrevivência das lagartas de *C. includens* de 3° instar foi afetada pela pulverização do filtrado fermentado contendo enzimas e metabólitos ($\chi^2 = 99.7$, $df = 15$, $p < 0.001$), variando de 53,5 a 5,0% (Figura 15). Diferente do que foi observado com a aplicação dos conídios submersos, a sobrevida de lagartas pulverizadas com filtrado dos isolados ESALQ-5633 (*T. asperelloides*), ESALQ-1750 (*T. saturnisporum*), ESALQ-5634 (*T. asperelloides*), ESALQ-2763, ESALQ-2901 (*T. spirale*), ESALQ-2917 (*T. spirale*), ESALQ-2943 (*T. endophyticum*), ESALQ-5632 (*T. asperelloides*), ESALQ-3018 (*T. spirale*), ESALQ-5635 (*T. asperelloides*) e ESALQ-5613 (*T. asperelloides*) se diferiram estatisticamente do controle. Os isolados que após pulverizados resultaram em menores sobrevivências das lagartas até o 10° dia foram ESALQ-2917 (*T. spirale*) com 15,0%, ESALQ-2943 (*T. endophyticum*) com 8,4%, ESALQ-1750 (*T. saturnisporum*) com 8,4% e o ESALQ-5633 (*T. asperelloides*) com 5,1%, todos com TL_{50} de 8 dias. Por outro lado, os isolados que resultaram em maior sobrevida das lagartas e não se diferiram do tratamento controle foram ESALQ-2950 (*T. spirale*) com 53,3%, ESALQ-2600 (*T. ghanense*) com 38,3%, ESALQ-2845 (*T. spirale*) com 43,3% e o ESALQ-2916 (*T. endophyticum*) com 36,7%.

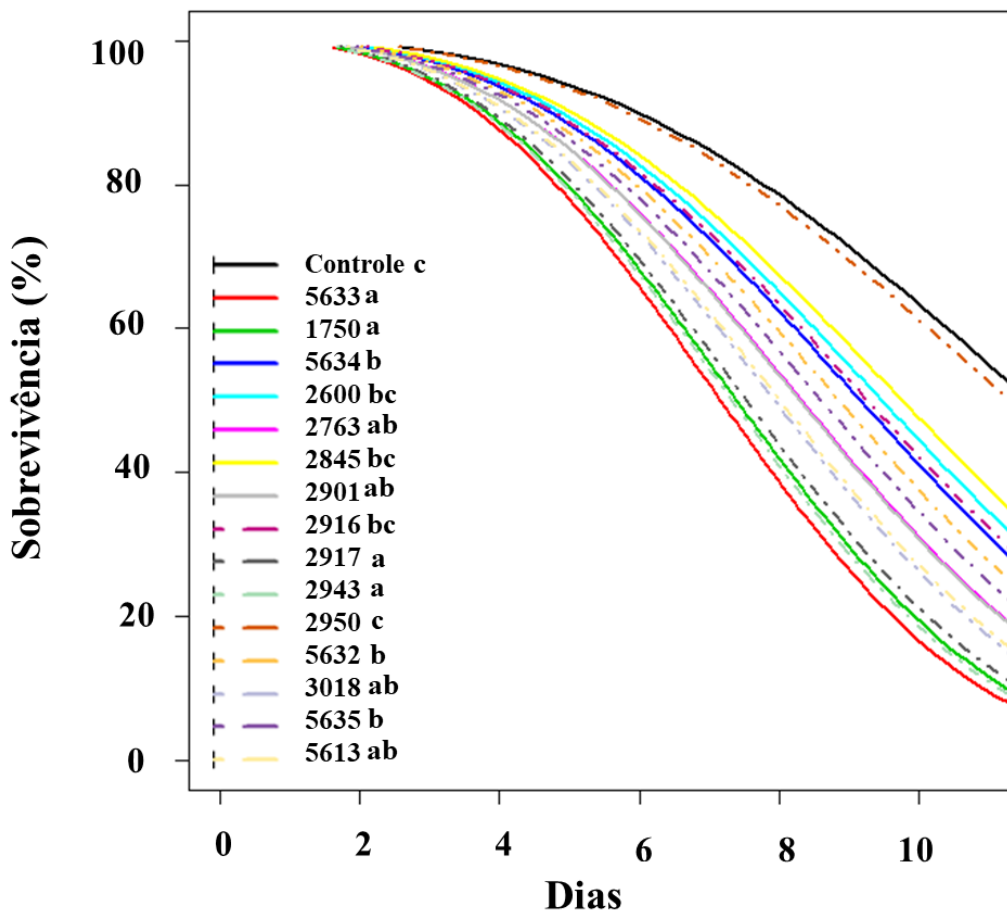


Figura 15 – Sobrevivência de *Chrysodeixis includens* de 3º instar ao longo de 10 dias após aplicação do fermentado filtrado contendo enzimas e metabólitos de *Trichoderma* spp.

Esse ensaio demonstrou que o fermentado, contendo enzimas e metabólitos, foi promissor na mortalidade de *C. includens*. Esse dado é interessante, já que todos eles pertencem a diferentes espécies do gênero *Trichoderma*.

A Figura 16 evidencia o aspecto de como as lagartas de *C. includens* morreram após a aplicação do fermentado. Era notório com o decorrer dos dias antecedentes à morte, que a lagarta não conseguia mais se alimentar e recorrentemente demonstrava sinais de necrose em alguma parte do tegumento. Este aspecto não foi observado para lagartas pulverizadas com conídios submersos.



Figura 16 – Lagarta de *Chrysodeixis includens* morta após o tratamento com o filtrado fermentado ESALQ-2917 (*Trichoderma spirale*).

4.6 Bioensaio com *Spodoptera frugiperda*

4.6.1 Conídios submersos

Com o objetivo de avaliar o potencial inseticida dos quinze isolados de *Trichoderma* spp foi realizado um bioensaio com lagartas de 3° instar de *S. frugiperda* pulverizadas com suspensões de conídios submersos na concentração de 1×10^7 /mL. A sobrevivência das lagartas foi afetada por conídios submersos de *Trichoderma* ($\chi^2 = 25.8$, $df = 15$, $p = 0.04$). Os únicos isolados que diferiram estatisticamente entre si foram ESALQ-2600 (*T. ghanense*) e ESALQ-5613 (*T. asperelloides*), que resultaram em uma sobrevivência das lagartas de 93,7 e 56,2% respectivamente, sendo este último o isolado mais promissor (Figura 17). Os demais isolados não diferiram estatisticamente entre si em relação ao tempo de sobrevivência das lagartas assim como não diferiram do tratamento controle. Os resultados indicam para um baixo potencial de mortalidade de *S. frugiperda* pelos conídios submersos de *Trichoderma* spp. mesmo em uma concentração maior em relação a aplicada em *C. includens*, de 1×10^7 conídios/mL. Nenhuma lagarta apresentou sinais de esporulação de *Trichoderma* após morta.

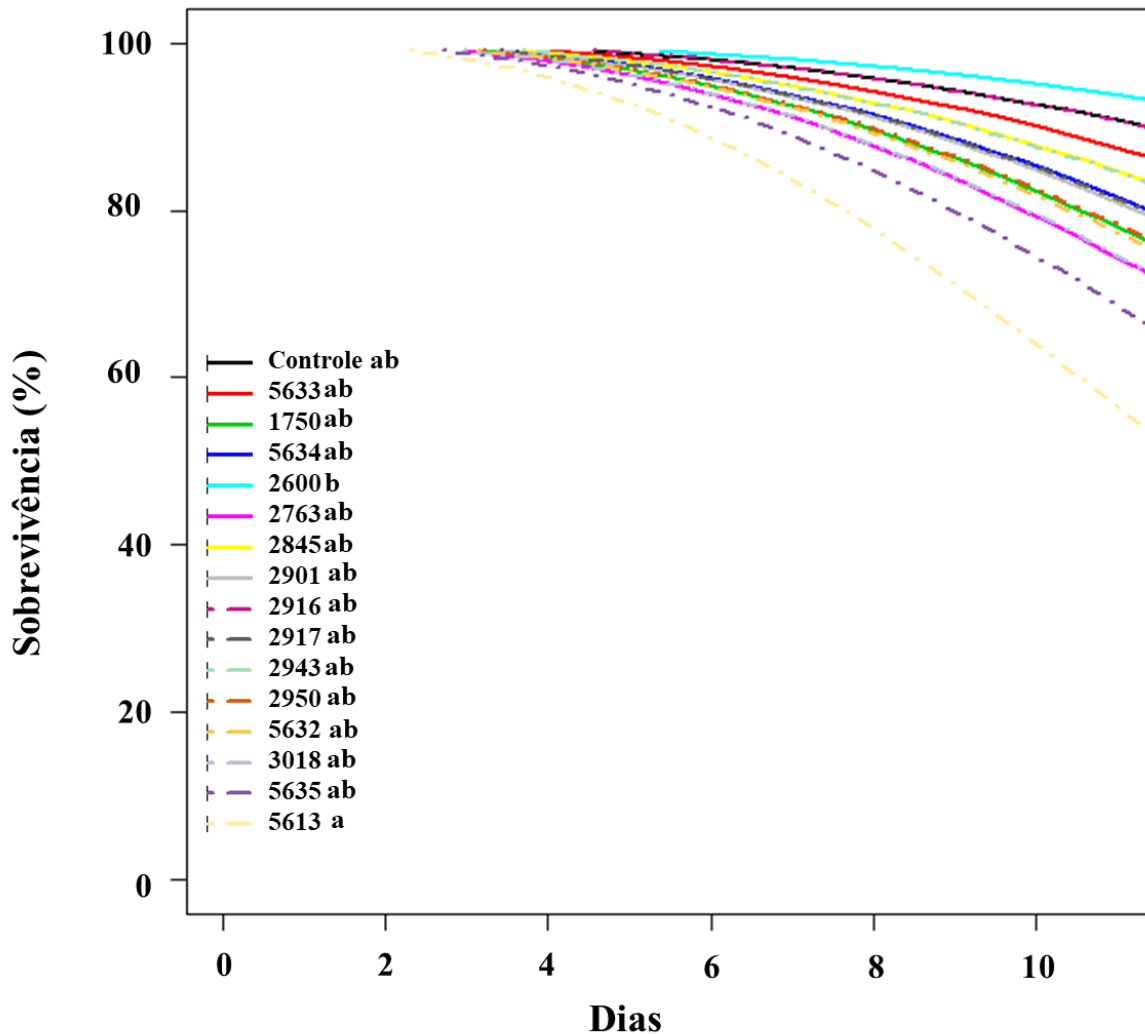


Figura 17 – Sobrevivência de *Spodoptera frugiperda* de 3º instar ao longo de 10 dias após aplicação de conídios submersos de *Trichoderma* spp. em uma concentração de 1×10^7 conídios/mL.

4.6.2 Fermentado filtrado contendo enzimas e metabólitos

A sobrevivência das lagartas de *S. frugiperda* de 3º instar foi afetada pela pulverização do filtrado fermentado contendo enzimas e metabólitos ($\chi^2 = 45.7$, $df = 15$, $p < 0.001$), variando de 90,6 a 46,8% (Figura 18). Assim como observado para *C. includens*, a pulverização dos filtrados foi mais promissora na mortalidade das lagartas do que a pulverização dos conídios submersos.

Lagartas pulverizadas com o filtrado do isolado ESALQ-2763 (*T. koningiopsis*) apresentaram menores valores de sobrevivência (46,8%) e TL_{50} de 10 dias, mas sem diferença estatística do tempo de sobrevivência obtido para os isolados ESALQ-1750 (*T. saturnisporum*), ESALQ-5634 (*T. asperelloides*), ESALQ-2901 (*T. spirale*), ESALQ-2916 (*T. endophyticum*), ESALQ-2943 (*T. endophyticum*), ESALQ-2950 (*T. spirale*), ESALQ-5632 (*T. asperelloides*),

ESALQ-3018 (*T. spirale*), ESALQ-5635 (*T. asperelloides*) e ESALQ-5613 (*T. asperelloides*). Os isolados ESALQ-3018 e ESALQ-2763 foram os únicos que diferiram estatisticamente do controle. Já os isolados ESALQ-5633 (*T. asperelloides*) e ESALQ-2600 (*T. ghanense*) resultaram em um percentual de sobrevivência das lagartas de 85%.

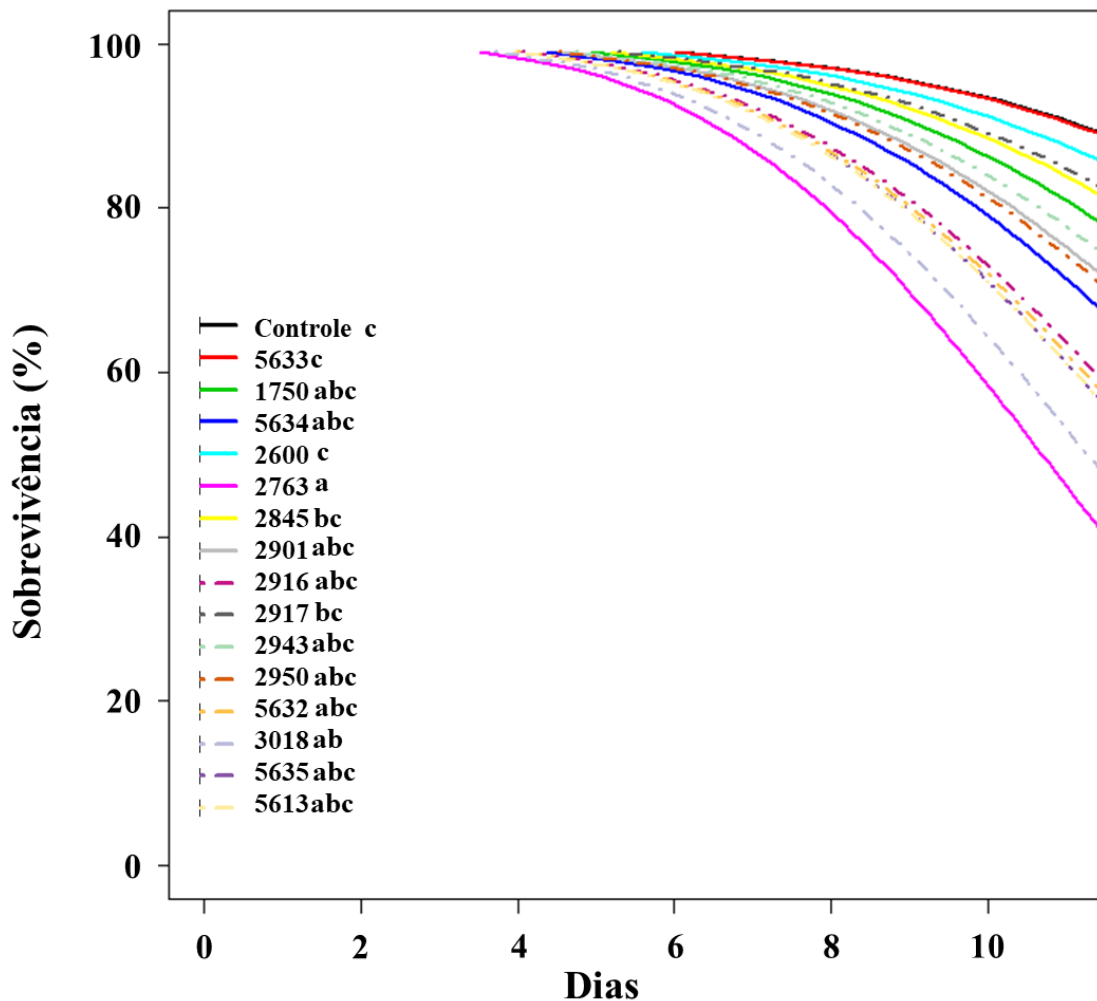


Figura 18 – Sobrevivência de *Spodoptera frugiperda* de 3º instar ao longo de 10 dias após aplicação do fermentado filtrado contendo enzimas e metabólitos de *Trichoderma* spp.

A Tabela 9 facilita a compreensão dos resultados obtidos dos bioensaios e das fermentações enzimáticas. Contrário ao esperado, os isolados que mais produziram enzimas não são, necessariamente, os que causaram maior mortalidade nas pragas estudadas. Este fato indica que outros fatores como presença de metabólitos ou outros tipos de enzimas podem estar envolvidos na mortalidade observada dos insetos.

Por outro lado, para alguns tratamentos é possível fazer uma correlação de mortalidade, isso porque quando se desconta o valor do controle no percentual de mortalidade total nota-se que o tratamento em questão pode ter um perfil enzimático ou metabólito de interesse. Isso é visto para os isolados ESALQ-3018, ESALQ-5613, ESALQ-2763, ESALQ-5635 e ESALQ-5632 que possuem percentual parecidos para ambas as pragas. Esse fato é significativo já que as lagartas são de gêneros diferentes e, com um estudo mais complexo há possibilidade de desvendar qual é ou quais são as moléculas responsáveis.

Tabela 9 – Resumo da mortalidade (%) nos bioensaios realizados com *Trichoderma* spp. sobre *Chrysodeixis includens* e *Spodoptera frugiperda* em comparação com a média das atividades enzimáticas em U/mL do 6° dia de fermentação.

ISOLADOS	Unidade enzimática (U/mL)				Mortalidade em porcentagem			
	QUITINASES		PROTEASES		<i>C. includens</i>		<i>S. frugiperda</i>	
	6° DIA DE FERMENTAÇÃO		6° DIA DE FERMENTAÇÃO		CONTROLE (43,3)	E	CONTROLE (9,3)	B
3018	22,0	AB	13,0	D	78,3	ABC	43,7	AB
2943	16,4	AB	138,7	B	91,7	AB	21,8	AB
2917	20,8	AB	222,4	A	85,0	ABC	15,6	B
1750	12,6	B	135,2	B	91,7	AB	18,7	AB
2600	24,5	AB	66,7	C	61,6	CDE	12,5	AB
2950	16,7	AB	62,8	C	46,6	DE	25,0	AB
2901	13,8	B	131,0	B	78,3	ABC	25,0	AB
5613	24,9	AB	23,7	D	79,9	ABC	37,5	AB
2916	19,7	AB	202,4	A	63,3	CDE	34,3	AB
2845	13,6	B	126,8	B	56,6	CDE	15,6	AB
2763	23,0	AB	13,2	D	76,6	ABCD	53,1	A
5634	24,9	AB	25,5	D	66,6	BCDE	28,1	AB
5633	24,4	AB	23,9	D	94,9	A	9,3	B
5635	24,3	AB	14,9	D	73,3	ABC	40,6	AB
5632	31,5	A	22,4	D	69,9	ABCDE	37,5	AB

*Barras seguidas por letras iguais, não se diferem significativamente pelo Teste de Tukey a 5% de significância comparando a mortalidade total dos bioensaios com *C. includens* e *S. frugiperda*.

4.7 Bioensaio com *Euschistus heros*

Neste ensaio foi avaliado o potencial do filtrado fermentado produzidas por cinco isolados de *Trichoderma* spp. em combinação com conídios aéreos do fungo entomopatogênico *C. fumosorosea* no controle de uma praga com tegumento mais esclerotizado, o percevejo-marrom, *E. heros*. A hipótese avaliada seria de que as enzimas presentes no filtrado fermentado poderiam ocasionar orifícios no tegumento do inseto, o que por sua vez, facilitaria a atuação do fungo entomopatógeno verdadeiro. Os isolados de *Trichoderma* foram selecionados com base nos resultados obtidos com *C. includens*. Os outros tratamentos, conídios submersos e fermentado contendo enzimas de *Trichoderma*, foram também aplicados isoladamente (Figura 19).

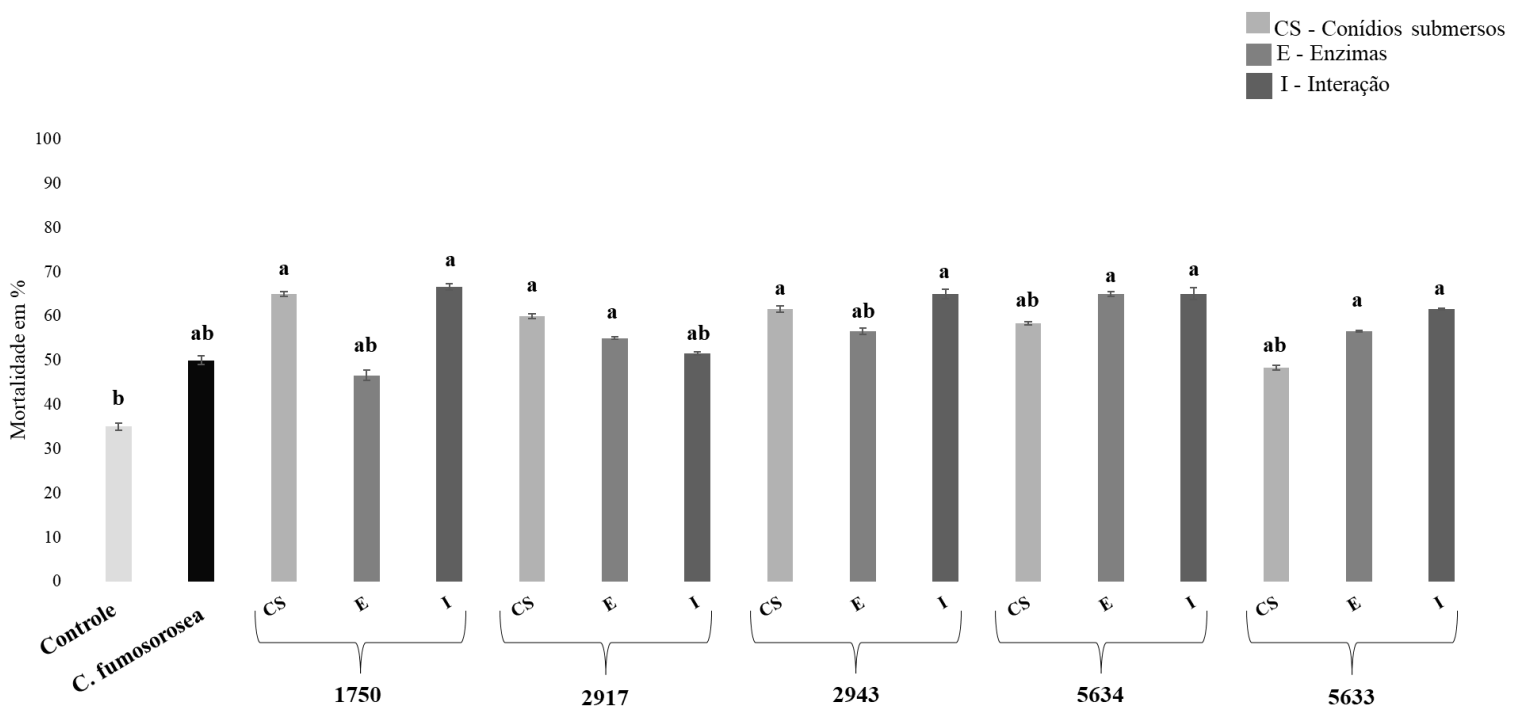


Figura 19 – Mortalidade total de *Euschistus heros* ao longo de 10 dias após aplicação dos tratamentos propostos. (Letras iguais não diferem significativamente entre si, pelo Teste de Tukey 5%, realizado para cada tratamento isoladamente). **Controle:** 2 mL de água destilada com tween 80® 0,05%; ***C. fumosorosea*:** 2mL de 5×10^6 conídios aéreos/mL; **CS:** conídios submersos de *Trichoderma* (2mL de 1×10^7); **E:** Filtrado fermentado contendo enzimas e metabólitos (1 mL do fermentado e 1 mL de água destilada com tween 80® 0,05%); **I:** conídios aéreos de *C. fumosorosea* (1mL de 5×10^6) aplicado em conjunto com filtrado fermentado contendo enzimas e metabólitos (1 mL).

A mortalidade de adultos do percevejo-marrom variou entre os isolados ($F = 2.07$, $df = 16$, $p = 0.016$) em um percentual de 46,6 a 66,6%. De forma geral, os isolados que apresentaram maiores mortalidades foram os ESALQ-2943 (*T. endophyticum*), ESALQ-2917 (*T. asperelloides*) e o ESALQ-5634 (*T. asperelloides*), resultando em um percentual superior

a 50% de mortalidade para os três tratamentos (CS, S e E) (Figura 19). Exceto para o tratamento ESALQ-2917 (*T. spirale*), para os demais isolados, observamos uma tendência de maior mortalidade nos tratamentos onde foi aplicado conídios aéreos de *C. fumosorosea* em conjunto com o fermentado contendo enzimas e metabólitos de *Trichoderma*, resultando em uma diferença estatística em relação ao controle.

Esse ensaio demonstrou o potencial das enzimas do gênero *Trichoderma* spp. na mortalidade de *E. heros*. Isso pode ser observado nos tratamentos ESALQ-2917 (*T. spirale*), ESALQ-2943 (*T. endophyticum*), ESALQ-5634 (*T. asperelloides*) e ESALQ-5633 (*T. asperelloides*) que se destacaram mesmo quando o fermentado contendo enzimas foi aplicado isoladamente, obtendo um percentual superior a 50% de mortalidade.

Sob outra perspectiva, esse bioensaio permitiu comprovar que o fermentado de *Trichoderma* não afeta a viabilidade de *C. fumosorosea* e que pode, inclusive, gerar um efeito aditivo no controle da praga em questão. Essa interação foi observada para o isolado ESALQ-1750 (*T. saturnisporum*) que atingiu um percentual de 66,6% contra 50% de *C. fumosorosea* isoladamente, para o ESALQ-5633 (*T. asperelloides*) com 61,6% e ESALQ-2943 (*T. endophyticum*) que chegou a 65% de mortalidade.

Entretanto, para os isolados ESALQ-2917 (*T. spirale*) e ESALQ-5634 (*T. asperelloides*) a aplicação isolada de enzimas foi melhor ou igual ao tratamento de interação, demonstrando que não ocorreu um efeito aditivo neste caso. De modo geral, essa descoberta abre caminhos para estudos futuros, já que as enzimas podem facilitar a entrada de um fungo entomopatígeno verdadeiro no inseto praga.

Surpreendentemente, os conídios submersos de *Trichoderma* exibiram efeito contra *E. heros*, em destaque os tratamentos ESALQ-1750 (*T. saturnisporum*), ESALQ-2917 e ESALQ-2943 (*T. endophyticum*) com mais de 60% de mortalidade, porém nenhum inseto apresentou sinais de esporulação de *Trichoderma*. A Tabela 10 resume os resultados obtidos no experimento com *E. heros*.

Tabela 10 – Resumo da mortalidade (%) de *Euschistus heros* por isolados de *Trichoderma* spp. e tratamento avaliado.

Tratamentos*	Mortalidade (%)		Análise**	QUITINASES	PROTEASES
	Controle				
ENZIMAS	1750	46,6	AB	12,6	135,2
	2917	55,0	A	20,8	222,4
	2943	56,6	AB	16,4	138,7
	5634	65,0	A	24,9	25,5
	5633	56,6	A	24,4	23,9
	1750	66,6	A	12,6	135,2
INTERAÇÃO	2917	51,6	AB	20,8	222,4
	2943	65,0	A	16,4	138,7
	5634	65,0	A	24,9	25,5
	5633	61,6	A	24,4	23,9
	1750	65,0	A	-	-
CONÍDIOS SUBMERSOS	2917	60,0	A	-	-
	2943	61,6	A	-	-
	5634	58,3	AB	-	-
	5633	48,3	AB	-	-
	<i>Cordyceps fumosorosea</i>	50,0	AB	-	-

*Tratamento Enzimas foi utilizado o caldo fermentado contendo enzimas e metabólitos; Tratamento Interação foi realizada a junção de enzimas de *Trichoderma* e conídios aéreos de *Cordyceps fumosorosea*; Tratamento utilizado-se conídios submersos dos 5 isolados de *Trichoderma*; Somente conídios aéreos de *C. fumosorosea* isoladamente. **Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem significativamente entre si, pelo Teste de Tukey 5%.

5. DISCUSSÃO

O potencial de *Trichoderma* spp. no controle de doenças fúngicas de plantas é conhecido no setor agrícola há muitos anos. Essa realidade somada a intensa busca por novas estratégias sustentáveis foi o propósito desse estudo (MANIVEL; RAJKUMAR, 2018), que objetivou entender o potencial inseticida do gênero *Trichoderma* contra as pragas *C. includens*, *S. frugiperda* e *E. heros*.

Os quinze isolados fúngicos de *Trichoderma* selecionados foram molecularmente identificados como pertencentes a 6 espécies, todas já relatadas no país, segundo o GBIF (*Global Biodiversity Information Facility*). As espécies *T. asperelloides* e *T. spirale*, estão em maior número neste trabalho, com cinco isolados identificados para cada, sendo que ambas já possuem inúmeros estudos que evidenciam seu potencial, no sistema agrícola (LUCON et al., 2009; SERRANO et al., 2023; SUMIDA et al., 2018; RIBEIRO et al., 2023). Ainda neste contexto, dois isolados foram identificados como *T. endophyticum*, sendo que essa espécie possui um produto registrado no MAPA e dispõe de diversos estudos no Brasil (BARROS et al., 2019; dos SANTOS et al., 2022). Já a espécie *T. koningiopsis*, também possui um produto registrado no MAPA e é relatada no país desde 1984 (GBIF), sendo a única espécie a possuir trabalhos que evidenciem seu potencial inseticida dentre as outras identificadas ao longo desse estudo (FANTINEL et al., 2018; ISAIAS et al., 2014; MEJÍA et al., 2021; RAZINGER et al., 2014). As duas últimas espécies, *T. saturnisporum* e *T. ghanense*, são menos conhecidas no Brasil e não foram encontrados trabalhos que corroborem seu potencial agrícola (PAULINO; FÉLIX; LANDELL, 2020; SANTOS, 2010).

Conídios submersos e enzimas de *Trichoderma* estudados nesse trabalho, possuem grande potencial no setor agrícola, gerando inovação, portanto foram selecionados e avaliados quanto a sua produção sob fermentação líquida (de ALMEIDA, 2020). Quando comparamos essas avaliações, entre os isolados fúngicos, notou-se que o ESALQ-2943 (*T. endophyticum*) se destacou tanto na produção de conídios submersos (10^8 /mL) quanto na produção de proteases (138,6 U/mL). Outro bom isolado (ESALQ-5634) para produção de conídios submersos (8×10^7 conídios/mL), pertence a espécie *T. asperelloides* e não demonstrou grande produção para as enzimas analisadas. Interessantemente, o ESALQ-1750 (*T. saturnisporum*) que apresentou reduzida produção de conídios submersos, foi um dos isolados que mais produziu proteases (135,0 U/mL). Já o isolado ESALQ-5635 (*T. asperelloides*), que demonstrou resultados relevantes para quitinases, foi mediano na produção de conídios

submersos ($3,8 \times 10^7$ /mL), além de ter obtido valores baixos na produção de proteases, chegando no máximo a 14,9 U/mL.

Esse estudo comparou, quantitativamente, a produção de conídios submersos dos quinze isolados de *Trichoderma* spp. e, foi observado que isolado ESALQ-2943 (*T. endophyticum*) chegou a concentrações de 10^8 conídios/mL. Trabalhos conduzidos anteriormente no laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos demonstraram que os rendimentos de conídios submersos de *Trichoderma* spp. são incrementados usando meio LPCM1. As adaptações no meio foram a razão C:N (10:1), sendo determinante para os isolados de *Trichoderma* spp. atingirem uma concentração igual ou superior a 1×10^7 conídios/mL. Entretanto, há trabalhos com relatos superiores, como por exemplo *T. harzianum* com uma produção de $9,7 \times 10^8$ conídios/mL em um meio com relação C:N 50:1, o que pode ser uma alteração viável a ser testada quando objetiva-se somente a alta produção de conídios submersos (KOBORI et al., 2015). Outra mudança, que poderia promover um aumento significativo dos valores observados para conídios submersos neste trabalho, é acidificação do meio de cultura, já que as fermentações foram conduzidas no pH 5,5 (de REZENDE et al., 2020).

De modo geral, esse ensaio ao longo do tempo objetivou compreender as diferenças de produção entre os isolados fúngicos de *Trichoderma* spp, sob as mesmas condições de fermentação submersa. Evidentemente, cada espécie tem suas particularidades, porém isso não caracteriza igualdade entre isolados da mesma espécie. Como por exemplo o ESALQ-2943 e ESALQ-2916, ambos pertencentes a espécie *T. endophyticum*, demonstram um potencial diferente na produção de conídios submersos, isso provavelmente decorre devido as suas características genéticas.

Ao longo desse trabalho, analisamos 20 trabalhos que visam a utilização tópica de conídios aéreos de *Trichoderma* contra insetos praga (Tabela 3), em contraste foi testado nesse estudo a aplicação de conídios submersos, sendo mais incomum. Foi observado diferentes performances dos isolados de *Trichoderma* em relação as três pragas agrícolas escolhidas, quando aplicado conídios submersos. Para *C. includens* o isolado destaque foi ESALQ-2917 (*T. spirale*), causando mortalidade de 51,67%, o que foi satisfatório considerando a baixa concentração usada de 10^6 conídios/mL, com a presença das enzimas e metabólitos do meio fermentado. No bioensaio com *S. frugiperda* foi utilizado uma concentração de 10^7 conídios submersos/mL, após centrifugação para descarte do sobrenadante, para eliminação das enzimas e metabólitos produzidos pelo fungo. O isolado

mais efetivo para *S. frugiperda* foi o ESALQ-5613 (*T. asperelloides*), chegando em um percentual de 43,7% de mortalidade e não se diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, sugerindo um potencial reduzido dos conídios submersos para *S. frugiperda*. Após a análise dos resultados, é possível presumir que a concentração de conídios submersos pode ter sido baixa, já que um trabalho com *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Tenebrionidae) demonstrou mortalidade de 100% após a aplicação de 7×10^8 conídios submersos/mL de *T. harzianum* (SHAKERI; FOSTER, 2007).

Ao comparar esses resultados aos poucos trabalhos que visam o controle de lagartas por conídios submersos de fungos, nota-se que nossos melhores isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram maiores virulências. No estudo com conídios submersos de *Beauveria bassiana*, em uma concentração de 10^8 /mL, atingiu mortalidade de somente 50% para a praga *Heliothis virescens* (Fabricius, 1777) (Lepidoptera: Noctuidae) (HOLDER et al., 2007) e um outro com conídios aéreos em uma concentração de 10^7 alcançou somente 26% para *C. includens* (GALDINO et al., 2020). Na literatura não foi encontrado nenhum trabalho que demonstre resultados de conídios submersos de fungos para essas duas pragas *C. includens* e *S. frugiperda*, no entanto em 2022 foi demonstrado o potencial de conídios aéreos de *Trichoderma* para *S. frugiperda* (AFANDHI et al., 2022). Sendo que, um estudo com conídios aéreos de *T. asperellum* contra larvas de anofelinos, surpreendentemente, demonstrou que após a interação houve fixação do esporo com posterior formação de apressório, secreção de enzimas para degradação da cutícula e germinação de esporos no interior das larvas mortas (GHOSH; PODDER; MUKHERJEE, 2021).

Para a praga de tegumento mais esclerotizado, *E. heros*, os resultados obtidos com os conídios submersos foram promissores, alcançando um percentual de mortalidade igual ou superior a 60% para os tratamentos ESALQ-1750 (*T. saturnisporum*), ESALQ-2917 (*T. spirale*) e ESALQ-2943 (*T. endophyticum*). Esses resultados são bem relevantes quando comparados ao resultado obtido após a aplicação de dois mililitros de 5×10^6 conídios aéreos do fungo entomopatogênico *C. fumosorosea* (ESALQ-1296), que alcançou o percentual de 50% de mortalidade ou, até mesmo em comparação a blastosporos (1×10^6 blastosporos/mL) desse mesmo isolado, contra essa mesma praga, chegando em um percentual de $\cong 42\%$ de mortalidade (CORRÊA, 2020).

De forma semelhante, estudos revelaram o potencial de conídios submersos de *Trichoderma*, dois deles para hemípteros, sendo um contra o pulgão do algodoeiro e o outro

para cigarrinha amrasca, em uma concentração de 10^8 UFC/mL (NAWAZ et al., 2020). Já o terceiro para a larva-da-farinha (*T. molitor*), em uma concentração de 7×10^8 conídios submersos/mL (SHAKERI; FOSTER, 2007). Sendo assim, os resultados apresentados foram satisfatórios contra as três pragas escolhidas, podendo promover resultados mais promissores em outras concentrações, até determinar uma dose letal, já que a literatura ainda não dispõe de muitos trabalhos neste sentido para conídios submersos de *Trichoderma* spp.

Adicionalmente, objetivou-se entender o potencial de produção e efetividade inseticida de enzimas do gênero *Trichoderma*. Neste sentido, os isolados que alcançaram maior atividade quitinolítica foram ESALQ-5632 e ESALQ-5635 (*T. asperelloides*), chegando a 30 U/mL, em contrapartida o ESALQ-2917 (*T. spirale*) e o ESALQ-2916 (*T. endophyticum*) se sobressaíram na atividade proteolítica, chegando a 200 U/mL. A variação dos dados entre os quinze isolados utilizados neste estudo é comum, existem inúmeros trabalhos que demonstram esse fato, por exemplo Sandhya et al. (2004) obtiveram uma atividade quitinolítica de 14,7 U/mL para uma cepa de *T. harzianum* enquanto Asad et al. (2015) alcançaram um pico de 117 U/ mL para *T. harzianum* e de 173 U/mL para *T. asperellum* sob as mesmas condições. Isso corrobora que cada isolado fúngico possui suas características particulares, ou seja, a produção de enzimas vai depender de fator genético e das condições de fermentação. Além é claro, que essa diferença entre as espécies, precisa ser estudada de forma particular quanto ao protocolo de quantificação, pois podem apresentar condições de pH, temperatura de reação e estabilidade diferentes (EKUNDAYO; EKUNDAYO; BAMIDELE, 2016).

Outro fator pertinente foi a utilização da quitina de casca de caranguejo (*practical grade* - SIGMA®) bruta neste ensaio, sem o processo de transformação em quitina coloidal. Essa estratégia foi contrária ao relatado em trabalhos encontrados na literatura, já que esse processo de transformação em quitina coloidal está ligado a alta indução enzimática, graças a sua solubilidade. Entretanto, o fato do gênero *Trichoderma* ser altamente generalista e saprofítico foi o que consolidou a ideia de utilizar a quitina bruta neste estudo (LERTSUTTHIWONG et al., 2002; NAMPOOTHIRI et al., 2004). Diversos trabalhos relatam a produção de enzimas por *Trichoderma* spp, contudo comparar esses resultados é complexo, pois há inúmeras formas de se quantificar essas macromoléculas, como por exemplo ppm (partes por milhão), cm^2 , mg/mL, $\mu\text{g/mL}$, kDa (Quilodalton) e U/mL (BINOD et al., 2007; BERINI et al., 2016; GHOSH; PODDER; MUKHERJEE, 2021; MUKHERJEE;

GHOSH, 2023; SHAKERI; FOSTER, 2007; SILVEIRA et al., 2021; VIJAYAKUMAR; ALAGAR; MADANAGOPAL, 2016).

Contrário ao esperado, os isolados que se destacaram na produção de enzimas não foram, necessariamente, os melhores tratamentos no controle de *C. includens* e *S. frugiperda* nos ensaios onde aplicou-se o fermentado filtrado. Isso porque, o melhor tratamento para controle de *C. includens* foi o ESALQ-5633 (*T. asperelloides*) com 94,9%, porém ele não apresentou alta atividade de enzimas igual aos outros tratamentos, que também obtiveram um alto percentual de mortalidade, como o ESALQ-2943 (*T. endophyticum*) com 91,6%, ESALQ-2917 (*T. spirale*) com 85,0% e o ESALQ-1750 (*T. saturnisporum*) com 91,6%, este último conhecido pela produção de metabólitos secundários (MENG; WANG; CHENG, 2017).

Os isolados que causaram menor sobrevivência de *S. frugiperda* foram ESALQ-2763 (*T. koningiopsis*), ESALQ-3018 (*T. spirale*) e ESALQ-5635 (*T. asperelloides*), porém não apresentaram uma alta atividade enzimática no processo de fermentação. O ESALQ-3018 (*T. spirale*) chegou a um percentual de mortalidade de 43,7% para *S. frugiperda*, descontando o controle esse valor fica em 34,4%, o que é muito similar ao que foi observado para a praga *C. includens* (35,0%) neste mesmo tratamento. Isso demonstra que esse isolado possui enzimas e metabólitos que funcionam para diferentes gêneros de lagartas, validando-o como possível efeito de controle.

A capacidade inseticida dessas macromoléculas ainda pode ser empregada em diferentes estádios larvais, já que na troca da cutícula o inseto fica vulnerável. Um trabalho com *Helicoverpa armígera* expõe que a aplicação tópica de quitinases e proteases de *T. harzianum* ao longo do desenvolvimento larval induziu 50% de mortalidade até a fase de pupa, além de gerar insetos adultos anormais (BINOD et al., 2007). Essa estratégia pode gerar resultados, ainda mais satisfatórios, na mortalidade de *E. heros* ao longo do desenvolvimento, visto que para os insetos adultos os tratamentos ESALQ-2917, ESALQ-2943, ESALQ-5634 e ESALQ-5633 chegaram em um percentual de mortalidade igual ou superior a 50% quando aplicou-se o fermentado contendo enzimas. Se vincularmos esse resultado com o potencial de produção de proteases desses isolados, é provável que exista uma correlação e, portanto, uma ação bioinseticida de *Trichoderma* mais eficaz sob o tegumento de *E. heros*.

A mortalidade obtida nos tratamentos enzimáticos não foi superior aos tratamentos de conídios submersos de *Trichoderma* spp. para a praga *E. heros*, como era o esperado.

Pode-se presumir que esse resultado transcorreu devido a presença de enzimas produzidas pelos conídios e, conseqüentemente assumir que esses conídios produzem maior concentração de enzimas com capacidades inseticidas (SANTI et al., 2010). Ainda nesse sentido, existem relatos comprovando que o tegumento do próprio inseto alvo pode ser o mais indicado para produção de enzimas, principalmente quando o objetivo for a especificidade na mortalidade (AGUIAR et al., 2020).

Esse cenário já é conhecido, pois a protease do tipo Pr1 é descrita no processo de infecção do hospedeiro pelo fungo entomopatogênico *Metarhizium* spp. (Sorokn, 1879) (Hypocreales: Clavicipitaceae), sendo essencial durante todo esse processo (GOETTEL et al., 1989; BIDOCHKA et al., 2005). Esse tipo de enzima já é relatada para o gênero *Trichoderma* e discutida em alguns trabalhos, que denotam seu importante papel na adesão à cutícula do hospedeiro (GHOSH; PODDER; MUKHERJEE, 2021; MUKHERJEE; GHOSH, 2023). Esse fato sugere que esse possa ser o mecanismo utilizado por conídios submersos de *Trichoderma*, que garantiu um percentual de até 65% de mortalidade para *E. heros*.

Esse interesse em enzimas de microrganismos decorre da rápida produção, viabilidade e estabilidade. Em alguns trabalhos foi realizada a purificação dessas macromoléculas após a fermentação, essa etapa garante uma maior compreensão do potencial das enzimas fúngicas desejadas. O gênero *Trichoderma* é um grande produtor de peptaibols (antibiótico), uma molécula tóxica que tem seu acesso facilitado ao inseto quando encontrada associada com enzimas. Essas toxinas peptídicas são observadas e fazem parte da entomopatogenicidade de *Metarhizium* spp., ou seja, essa complexidade tem que ser estudada mais detalhadamente, para que no futuro haja um maior entendimento das moléculas e de seus papéis inseticidas (CLARKSON; CHARNLEY, 1996; SHAKERI; FOSTER, 2007). Outras enzimas hidrolíticas podem atuar na ação de micoparasitismo de *Trichoderma*, como glucanases e proteases, bem como diferentes metabólitos secundários. Um conhecimento mais detalhado sobre a diversificação evolutiva das quitinases fúngicas e sua regulação transcricional e propriedades bioquímicas é, portanto, fundamental para elucidar ainda mais esses aspectos.

Sob outra perspectiva, a junção do fermentado filtrado de *Trichoderma* e de conídios aéreos de *C. fumosorosea* se mostrou viável, já que as enzimas e metabólitos presentes no sobrenadante de *Trichoderma* não inviabilizou a estrutura fúngica de *C. fumosorosea*. Esse teste de interação, teve como argumento que o fermentado de *Trichoderma* teria um efeito

aditivo em conjunto com *C. fumosorosea*, e isso foi constatado para dois isolados ESALQ-2943 (*T. endophyticum*) e ESALQ-1750 (*T. saturnisporum*). Isso porque o ESALQ-2943 fermentado sozinho alcançou 56,6% (AB) de mortalidade e o tratamento de interação 65% (A) de mortalidade. Já para o ESALQ-1750 (*T. saturnisporum*) foi observado que o fermentado atingiu um percentual de 46,6% (AB) de mortalidade e o tratamento de interação 66,6% (A) de mortalidade, demonstrando um possível efeito aditivo.

Esses resultados são semelhantes ao apresentado por Mejía et al. (2021), que demonstrou a viabilidade de conídios aéreos de *Beauveria bassiana* após o contato com quitinases de *T. koningiopsis*. Essa interação foi comprovada, já que o tratamento de extrato bruto de *T. koningiopsis* em conjunto com 1×10^6 conídios/mL de *B. bassiana* atingiu uma mortalidade de 94,2% contra 72% quando aplicou-se *B. bassiana* isoladamente, contra a praga *Diatraea saccharalis* (Guenée, 1862) (Lepdopetera: Pyralidae). Neste estudo a interação foi testada entre *Trichoderma* spp. e *C. fumosorosea* somente para *E. heros*, porém as outras duas pragas (*S. frugiperda* e *C. includens*) utilizadas poderiam ser mais suscetíveis a essa junção de gêneros.

Após todas essas interpretações ao longo desse trabalho, perceptivelmente há isolados de *Trichoderma* com potenciais inseticidas, que podem ser estudados de forma mais profunda, futuramente. Os isolados são o ESALQ-2917 (*T. spirale*), ESALQ-2943 (*T. endophyticum*), ESALQ-1750 (*T. saturnisporum*), ESALQ-2763 (*T. koningiopsis*) e ESALQ-5613 (*T. asperelloides*). Sendo viável avaliar uma função conjunta nas aplicações via foliar, com efeito no controle de doenças e de insetos praga.

Os resultados apresentados demonstram que diferentes estruturas fúngicas e metabólitos do gênero *Trichoderma* tem efeito inseticida. Essa elucidação somada ao fato do crescimento exponencial do controle biológico nos últimos anos, é um estímulo para estudos mais detalhados e com um potencial uso desse gênero contra os insetos pragas agrícolas no futuro.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados comprovaram que diferentes espécies de *Trichoderma* produzem enzimas, metabólitos ou estruturas como os conídios submersos, com potencial inseticida. Isso é significativo, já que os insetos prejudicam a produtividade do setor agrícola, sendo imprescindível a busca por novas técnicas de controle biológico, que viabilize o controle sustentável dentro do agroecossistema. Esse trabalho elucidou características multifuncionais do gênero *Trichoderma*. Embora o potencial deste fungo venha sendo explorado há muitos anos, ainda carece de estudos para revelar seu potencial comercial para o controle de insetos. Os resultados expostos ao longo desse trabalho abrem caminhos para estudos mais detalhados e, conseqüentemente agregar ao futuro agrícola do país.

REFERÊNCIAS

- AFANDHI, A. *et al.* Impact of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), invasion on maize and the native *Spodoptera litura* (Fabricius) in East Java, Indonesia, and evaluation of the virulence of some indigenous entomopathogenic fungus isolates for controlling the pest. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 32, n. 1, p. 1-8, 2022.
- AGUIAR, J. de P. S. de A. *et al.* Produção e caracterização de enzimas quitinolíticas produzidas pelo fungo *Trichoderma asperellum* e sua aplicação no biocontrole do carrapato *Rhipicephalus microplus* e do inseto *Aedes aegypti*. **Universidade Federal de Goiás**, 2020.
- AGROFIT. **Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 10. Abr. 2023(a).
- AGROFIT. **Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento**. Disponível em: <https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 09. Set. 2022(b).
- ALINÇ, T. *et al.* *Trichoderma harzianum* strain T22 modulates direct defense of tomato plants in response to *Nezara viridula* feeding activity. **Journal of chemical ecology**, v. 47, n. 4, p. 455-462, 2021.
- 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.
- ÁLVAREZ-GARCÍA, S. *et al.* Volatile-mediated interactions between *Trichoderma harzianum* and *Acanthoscelides obtectus*: A novel in vitro methodology to evaluate the impact of microbial volatile compounds on dry grain storage pests. **Biological Control**, v. 169, p. 104868, 2022.
- ANDRADE-BUSTAMANTE, G. *et al.* *Trichoderma harzianum* y espinosina en el control de gorgojo del trigo *Sitophilus granarius* (L. 1758). **Biotecnia**, v. 25, n. 1, p. 94-99, 2023.
- ANWAR, W. *et al.* First record of *Trichoderma longibrachiatum* as entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* in Pakistan. **Pakistan Journal of Phytopathology**, v. 28, n. 2, p. 287-294, 2016.

- ARUNTHIRUMENI, M; VEERAMMAL, V; SHIVAKUMAR, M. S. Biocontrol efficacy of mycosynthesized selenium nanoparticle using *Trichoderma* sp. on insect pest *Spodoptera litura*. **Journal of Cluster Science**, v. 33, n. 4, p. 1645-1653, 2022.
- ASAD, S. A., *et al.* "Determination of lytic enzyme activities of indigenous *Trichoderma* isolates from Pakistan." **Brazilian Journal of Microbiology**. p.1053-1064, 2015.
- ASMAWATI, L.; WIDIASTUTI, A.; SUMARDIYONO, C. Induction of reactive oxygen species by *Trichoderma* spp. against downy mildew in maize. In: **Proceeding of the 1st International Conference on Tropical Agriculture**. Springer, Cham, p. 139-146. 2017.
- ATRIZTÁN-HERNÁNDEZ, K. *et al.* *Trichoderma atroviride* from predator to prey: Role of the mitogen-activated protein kinase Tmk3 in fungal chemical defense against fungivory by *Drosophila melanogaster* larvae. **Applied and environmental microbiology**, v. 85, n. 2, p.01825-18, 2019.
- BALDONI, D. B. *et al.* Prospecção de fungos quitinolíticos e produção de quitinasas por fermentação em estado sólido. Tese de Doutorado. **Universidade Federal de Santa Maria**, 2016.
- BARRET, A. J. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. **Methods Enzymol.**, v. 244, p. 1-765, 1994.
- BARROS, J. L. A. P. P. *et al.* Efeito de *Trichoderma* spp. no controle biológico de *Rizoctonia Solani* e na promoção de crescimento de tomateiros. 2019.
- BASSO, M. V. G. *et al.* Evaluación de la capacidad antagónica de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Verticillium dahliae* en la provincia de Catamarca. **FAVE: Sección Ciencias Agrarias**, v. 20, n. 2, p. 33-44, 2021.
- BATOOL, R. *et al.* Synergistic effect of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma asperellum* to induce maize (*Zea mays* L.) defense against the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera, Crambidae) and larval immune response. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 21, p. 8215, 2020.
- BAUGH, C. L.; ESCOBAR, B. The genus *Bacillus* and genus *Trichoderma* for agricultural bio-augmentation. **Rice Farm Magazine**, v. 1, n. 4, p. 1-4, 2007.

- BEHIE, S. W.; BIDOCHKA, M. J. Nutrient transfer in plant–fungal symbioses. **Trends in plant science**, v. 19, n. 11, p. 734-740, 2014.
- BERINI, F. *et al.* Effects of *Trichoderma viride* chitinases on the peritrophic matrix of Lepidoptera. **Pest Management Science**, v. 72, n. 5, p. 980-989, 2016.
- BERNARDES, T. G.; SILVEIRA, P. M. da; MESQUITA, M. A. M. Regulador de crescimento e *Trichoderma harzianum* aplicados em sementes de feijoeiro cultivado em sucessão a culturas de cobertura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 4, p. 439-446, 2010.
- BETTIOL, W. Biopesticide use and research in Brazil. **Outlooks on Pest Management**. v. 22, n. 6, p. 280-283, 2011.
- BETTIOL, W.; SILVA, J. C.; CASTRO, M. L. M. P. Uso atual e perspectivas do *Trichoderma* no Brasil. MEYER, MC; MAZARO, SM; SILVA, JC *Trichoderma*: uso na agricultura. **Brasília: Embrapa**, p. 21-43, 2019.
- BIDOCHKA, M. J. *et al.* Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus. **Insect-fungal associations**, p. 28-49, 2005.
- BINOD, P. *et al.* Evaluation of fungal culture filtrate containing chitinase as a biocontrol agent against *Helicoverpa armigera*. **Journal of applied microbiology**, v. 103, n. 5, p. 1845-1852, 2007.
- BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, n. 11, p. 2418-2420, 1991.
- CAMPANA-FILHO, S. P. *et al.* Extração, estruturas e propriedades de α e β quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644, 2007a.
- CAI, F.; DRUZHININA, I. S. In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. **Fungal Diversity**, v. 107, n. 1, p. 1-69, 2021
- CAPINERA, J. L. Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae): EENY098/IN255, rev. 7/2000. **EDIS**, v. 2002, n. 7, 2002.

CAZY. **Carbohydrate-Active enZymes Database**. Disponível em: <<http://www.cazy.org/>>. Acesso em: 26. Jul. 2022.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A. *et al.* *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant physiology**, v. 149, n. 3, p. 1579-1592, 2009.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A. *et al.* The root endophytic fungus *Trichoderma atroviride* induces foliar herbivory resistance in maize plants. **Applied Soil Ecology**, v. 124, p. 45-53, 2018.

COPPOLA, M. *et al.* *Trichoderma harzianum* enhances tomato indirect defense against aphids. **Insect science**, v. 24, n. 6, p. 1025-1033, 2017.

COPPOLA, M. *et al.* *Trichoderma atroviride* P1 colonization of tomato plants enhances both direct and indirect defense barriers against insects. **Frontiers in physiology**, v. 10, p. 813, 2019.

CORRÊA, B. Development of drying methods and evaluation of blastospores efficacy of *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea*, and *Metarhizium rileyi* against *Euschistus heros* and *Spodoptera* spp. Dissertação de Mestrado. **Universidade de São Paulo**, 2020.

CHARNEY, J; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **J Biol Chem**, v. 171, n. 2, p. 501-505, 1947.

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

CHÁVEZ, Á. C. *et al.* Actividad in vitro de *Trichoderma asperellum* para el control biológico de fitopatógenos de suelo. **Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal**, n. 339, p. 35-43, 2022.

CHEN, Jin-Lian *et al.* Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. **Journal of Ginseng Research**, v. 40, n. 4, p. 315-324, 2016.

- CHINNAPERUMAL, K. *et al.* Bio-pesticidal effects of *Trichoderma viride* formulated titanium dioxide nanoparticle and their physiological and biochemical changes on *Helicoverpa armigera* (Hub.). **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 149, p. 26-36, 2018.
- CLARKSON, J. M.; CHARNLEY, A. K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends in microbiology**, v. 4, n. 5, p. 197-203, 1996.
- DA SILVA, J. B. T. *et al.* Antagonismo de linhagens de *Trichoderma* spp. aos fitopatógenos *Sclerotium cepivorum* Berk, *Sclerotium rolfsii* Sacc e *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2018.
- DE ALMEIDA, J. E. M. Biofábricas para produção de micopesticidas no Brasil: oportunidades de negócio e inovações. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 3, p. 2444-2557, 2020.
- DELLAPORTA, S. L., WOOD, J., HICKS, J. B. A plant DNA mini preparation: Version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, I. 4, pp. 19-21, 1983.
- DEMAIN, A. L.; FANG, A. The natural functions of secondary metabolites. **History of modern biotechnology I**, p. 1-39, 2000.
- DE REZENDE, L. C. Fermentação líquida como estratégia para a produção massal de conídios de *Trichoderma*. Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. **Universidade Federal de Lavras**, 2017. Disponível em: <<http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/13300>>. Acesso em: 08 ago. 2020.
- DE REZENDE, L. C. *et al.* Optimizing mass production of *Trichoderma asperelloides* by submerged liquid fermentation and its antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 8, p. 1-14, 2020.
- DE MOURA, I. N. B. M. *et al.* Controle biológico com *Trichoderma* sp. sobre a qualidade de sementes de *Astronium urundeuva* (M. ALLEMÃO) ENGL. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 15, n. 1, p. 1-13, 2022.
- DE OLIVEIRA, A. G. *et al.* Potential for phosphate solubilization and IAA production by *Trichoderma* spp. **Green Journal of Agroecology and Sustainable Development**, v. 7, no. 3, p. 26, 2012.

- DOS SANTOS, R. *et al.* Evaluation of the effect and dosage of *Trichoderma endophyticum* on the growth and productivity of soybean (*Glycine max*) cultivation. **Brazilian Journal of Development**, p. 59168-59188, 2022.
- DUO-CHUAN, L. Review of fungal chitinases. **Mycopathologia**, v. 161, n. 6, p. 345-360, 2006.
- DRUZHININA, I. S. *et al.* *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature reviews microbiology**, v. 9, n. 10, p. 749-759, 2011.
- EKUNDAYO E. A.; EKUNDAYO F. O.; BAMIDELE F. Production, partial purification and optimization of a chitinase produced from *Trichoderma viride*, an isolate of maize cob. **Mycosphere**. p. 786-793, 2016.
- EL-HASAN, A.; BUCHENAUER, H. Actions of 6-pentyl-alpha-pyrone in controlling seedling blight incited by *Fusarium moniliforme* and inducing defence responses in maize. **Journal of phytopathology**, v. 157, n. 11-12, p. 697-707, 2009.
- EL-MASSRY, S. A. A.; SHOKRY, H. G; HEGAB, M. E. M. Efficiency of *Trichoderma harzianum* and some organic acids on the cotton bollworms, *Earias insulana* and *Pectinophora gossypiella*. **Journal of Plant Protection and Pathology**, v. 7, n. 2, p. 143-148, 2016.
- EVIDENTE, A. *et al.* Citrantifidiene and citrantifidiol: bioactive metabolites produced by *Trichoderma citrinoviride* with potential antifeedant activity toward aphids. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 10, p. 3569-3573, 2008.
- FANTINEL, V. S. *et al.* Biocontrole in vitro de *Colletotrichum siamense* utilizando *Trichoderma* spp. e *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki. **Revista Ciência Agrícola**, v. 16, n. 3, p. 43-50, 2018.
- FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. Manaus: **Norma Editora**, v. 1, p. 251, 2016.
- FIPKE, G. M.; PAZINI, J. B.; ETHUR, L. Z. Antagonismo de isolados de *Trichoderma* spp. ao *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes temperaturas. **Magistra**, v. 27, n. 1, p. 23-32, 2017.

- FONTES, E. M. G.; INGLIS, M. C. V. Controle biológico de pragas da agricultura. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 2020.
- GACESA, P.; HUBBLE, J. Tecnología de las enzimas. **Acribia**, 1990.
- GAD, H. A.; AL-ANANY, M. S.; ABDELGALEIL, S. AM. Enhancement the efficacy of spinosad for the control *Sitophilus oryzae* by combined application with diatomaceous earth and *Trichoderma harzianum*. **Journal of Stored Products Research**, v. 88, p. 101663, 2020.
- GALDINO, J. S. et al. Susceptibility of *Alabama argillacea* and *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to *Beauveria bassiana* associated with kaolin. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, p. 1023-1029, 2020.
- GANASSI, S. et al. Effect of *Fusarium*, *Paecilomyces* and *Trichoderma* formulations against aphid *Schizaphis graminum*. **Mycopathologia**, v. 151, n. 3, p. 131-138, 2001.
- GEETHA, I. et al. Oviposition response of the mosquito, *Culex quinquefasciatus* to the secondary metabolite (s) of the fungus, *Trichoderma viride*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 223-226, 2003.
- GODOY, C. B.; ÁVILA, C. J.; ARCE, CCM. Controle biológico de percevejos fitófagos da soja na região de Dourados, MS. Embrapa Agropecuária Oeste. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, 2007.
- GOETTEL, M. S. et al. Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. **Microbiology**, v. 135, n. 8, p. 2233-2239, 1989.
- GOERGEN, G. et al. First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. **PLoS one**, v. 11, n. 10, p. e0165632, 2016.
- GOMES, E. V. et al. The Cerato-Platanin protein Epl-1 from *Trichoderma harzianum* is involved in mycoparasitism, plant resistance induction and self-cell wall protection. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2015.

- GORTARI, M. C.; HOURS, R. A. Biotechnological processes for chitin recovery out of crustacean waste: a mini-review. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 14-14, 2013.
- GOYCOOLEA, F.; AGULLÓ, E.; MATO, R. Fuentes y Procesos de Obtención en Quitina y Quitosano. **Pontificia Universidad Católica del Perú**. Pastor A. Ed, 2004.
- GUO, Y. *et al.* *Trichoderma* species differ in their volatile profiles and in antagonism toward ectomycorrhiza *Laccaria bicolor*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 891, 2019.
- GBIF. **Global Biodiversity Information Facility**. Disponível em: https://www.gbif.org/occurrence/search?taxon_key=7602713> Acesso em: 22 jan. 2023.
- GHISALBERTI, E. L.; SIVASITHAMPARAM, K. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 23, n. 11, p. 1011-1020, 1991.
- GHOSH, S. K; PAL, S. Entomopathogenic potential of *Trichoderma longibrachiatum* and its comparative evaluation with malathion against the insect pest *Leucinodes orbonalis*. **Environmental monitoring and assessment**, v. 188, n. 1, p. 1-7, 2016.
- GHOSH, S. K; PODDER, D; MUKHERJEE, A. An insight of anopheline larvicidal mechanism of *Trichoderma asperellum* (TaspSKGN2). **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2021.
- GRIMES, R. *et al.* Potencial biológico de *Trichoderma* spp. em fungos fitopatogênicos em condições in vitro. **Universidade Federal de Santa Catarina**, 2019.
- GUPTA, R. *et al.* An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 60, n. 4, p. 381-395, 2002.
- HAMID, R. *et al.* Chitinases: an update. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 5, n. 1, p. 21, 2013.
- HARTLEY, B. S. Proteolytic enzymes. **Annual review of biochemistry**, v. 29, p. 45-72, 1960.

- HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzinum* 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. *et al.* Changing models for commercialization and implementation of biocontrol in the developing and the developed world. **Plant Disease**, v. 94, n. 8, p. 928-939, 2010.
- HARMAN, G. E. *Trichoderma*—not just for biocontrol anymore. **Phytoparasitica**, v. 39, n. 2, p. 103-108, 2011.
- HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical journal**, v. 293, n. 3, p. 781-788, 1993.
- HEPBURN, H. R. Structure of the integument. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Volume, v. 3, p. 1-58, 1985.
- HEPBURN, H. R. *Insect integument*. **Elsevier Scientific Publishing Co.**, 1976.
- HOFFMANN C. C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S. MOSCARDI, F. S. Soybeans: integrated management of insects and other arthropod pests. p. 859. **Brasília: Embrapa Soja**, 2012.
- HOLDER, D. J. *et al.* Surface characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Microbiology**, v. 153, n. 10, p. 3448-3457, 2007.
- HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant disease**, v. 87, n. 1, p. 4-10, 2003.
- HURMANN, E. M. S.; POZZOBOM, T. M. H.; MARTINS, C. V. B. Antimicrobial activity of *Trichoderma viride* and *Trichoderma stromaticum*. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**. v. 3, n. 2, p. 575-591, 2020.

- ICHINOHE, M. *et al.* On the soy bean nematode, *Heterodera glycines* n. sp., from Japan. **Oyo-Dobutsugaku-Zasshi**, v. 17, 1952.
- ISAIAS, C. O. *et al.* Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, v. 40, p. 34-41, 2014.
- JACKSON, M. A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 180-187, 1997.
- JAFARBEIGI, F. *et al.* Induced tomato resistance against *Bemisia tabaci* triggered by salicylic acid, β -Aminobutyric Acid, and *Trichoderma*. **Neotropical Entomology**, v. 49, n. 3, p. 456-467, 2020.
- JARONSKI, S. T.; MASCARIN, G. M. Mass production of fungal entomopathogens. **Microbial control of insect and mite pests**, p. 141-155, 2017.
- JASSIM, H. K.; FOSTER, H. A.; FAIRHURST, C. P. Biological control of Dutch elm disease: larvicidal activity of *Trichoderma harzianum*, *T. polysporum* and *Scytalidium lignicola* in *Scolytus scolytus* and *S. multistriatus* reared in artificial culture. **Annals of applied biology**, v. 117, n. 1, p. 187-196, 1990.
- JUNG, W. J.; PARK, R. D. Bioproduction of chitooligosaccharides: present and perspectives. **Marine drugs**, v. 12, n. 11, p. 5328-5356, 2014.
- JUNGES, E. *et al.* *Trichoderma* spp. na produção de mudas de espécies florestais. **Floresta e Ambiente**, v. 23, n. 2, p. 237-244, 2016.
- JUNIOR, A. F. C. *et al.* Bioprospecção de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum cliviae* e *C. truncatum*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 14, n. 4, 2016.
- KAUSHIK, N. *et al.* Chemical composition of an aphid antifeedant extract from an endophytic fungus, *Trichoderma* sp. EFI671. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 420, 2020.
- KESWANI, C. *et al.* Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 2, p. 533-544, 2014.

- KIRIGA, A. W. *et al.* Effect of *Trichoderma* spp. and *Purpureocillium lilacinum* on *Meloidogyne javanica* in commercial pineapple production in Kenya. **Biological Control**, v. 119, p. 27-32, 2018.
- KOBAYASI, Y. The genus *Cordyceps* and its allies. **Report of The Tokyo Bunrika Daigaku Section B**, v. 5, n. 84, p. 53-260, 1941.
- KOBORI, N. N. *et al.* Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. **Fungal biology**, v. 119, n. 4, p. 179-190, 2015.
- KOTTB, M. R. *et al.* Bioactivity of *Trichoderma* (6-Pentyl α -pyrone) against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). Egyptian Academic. **Journal of Biological Sciences. A, Entomology**, v. 10, n. 3, p. 29-34, 2017.
- KUMAR S. *et al.* MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Mol Biol Evol.** 35(6):1547–1549, 2018.
- KURITA, K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 203-226, 2006.
- KUWAYAMA, Shigeru. Die Psylliden Japans. I. Transações da Sapporo Natural History Society , v. 2, p. 149-189, 1908.
- KRAEMER, A. P. *et al.* Avaliação do potencial de isolados de *Trichoderma* spp. no biocontrole de doenças da soja e no tratamento de sementes. **Instituto Federal Goiano**, 2022.
- KRAMER, K. J.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 27, n. 11, p. 887-900, 1997.
- LACEY, L. A. (Ed.). Manual of techniques in invertebrate pathology. **Academic Press**, p. 252, 2012.
- LAIB, D. E. *et al.* The anti-acetylcholinesterase, insecticidal and antifungal activities of the entophytic fungus sp. isolated from L. against L. and Pers.: Fr. Acta **Scientifica Naturalis**, v. 7, n. 1, p. 112-125, 2020.

- LEI, Y. *et al.* Unraveling the mode of action of *Cordyceps fumosorosea*: Potential biocontrol agent against *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **Insects**, v. 12, n. 2, p. 179, 2021.
- LERTSUTTHIWONG, P; HOW, N C.; CHANDRKRACHANG, S.; STEVENS, W. F. Effect of Chemical Treatment on the Characteristics of Shrimp Chitosan. **Journal of Metals, Materials and Minerals**. v. 12 n. 1 p. 11-18, 2002.
- LEWIS, J. A.; PAPAIVIZAS, G. C. Production of chlamydospores and conidia by *Trichoderma* spp. in liquid and solid growth media. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 15, n. 3, p. 351-357, 1983.
- LOHMANN, G, T. *et al.* Ação antagonística de *Trichoderma* spp. no crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Biológica Catarinense**, v. 9, n. 1, p. 25-35, 2022.
- LÓPEZ-VALENZUELA, B. *et al.* Microorganismos del género *Trichoderma* spp. productores de fitohormonas y antagonistas de fitopatógenos. **Bioagro**, v. 34, n. 2, p. 163-172, 2022.
- LUCON, C. M. M. *et al.* Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 225-232, 2009.
- MANDARINO, J. M. G. Origem e história da soja no Brasil. **EMBRAPA**, 2017.
- MANIVEL, S. B.; RAJKUMAR, G. S. Mycopesticides: fungal based pesticides for sustainable agriculture. In: Fungi and their Role in Sustainable Development: **Current Perspectives**. Springer, Singapore, p. 183-203, 2018.
- MANZANILLA-LOPEZ, R. H.; EVANS, K.; BRIDGE, J. Plant diseases caused by nematodes. **Nematology advances and perspectives**, v. 2, p. 637-716, 2004.
- MAPA, HIERARQUIZAÇÃO DE PRAGAS DE MAIOR RISCO FITOSSANITÁRIO DO BRASIL. Disponível em: <<http://www.abrasem.com.br/wp-content/uploads/2021/06/Nota-Tecnica-Hierarquizacao-de-pragas-de-maior-risco-fitossanitario.pdf>> Acesso em: 13 jul. 2022.

- MASCARIN, G. M. *et al.* Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of invertebrate pathology**, v. 165, p. 46-53, 2019a.
- MASCARIN, G. M. *et al.* Produção industrial de *Trichoderma*. **Trichoderma**, p. 255, 2019b.
- MASTOURI, F.; HARMAN, G. E. Beneficial microorganism *Trichoderma harzianum* induces tolerance to multiple environmental and physiological stresses during germination in seeds and seedlings. In: ISMPMI. **XIV Congress, Quebec, Canada**. 2009.
- MASTOURI, F.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G. E. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. **Phytopathology**, v. 100, n. 11, p. 1213-1221, 2010.
- MAYO-PRIETO, S. *et al.* Antifungal activity and bean growth promotion of *Trichoderma* strains isolated from seed vs soil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 158, n. 4, p. 817-828, 2020.
- MEDINA-CANALES, M. G. *et al.* A. Identification and molecular characterization of new Mexican isolates of *Pochonia chlamydosporia* for the management of *Meloidogyne* spp. **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, n. 1, p. 1-21, 2014.
- MEJÍA, C. *et al.* Use of *Trichoderma koningiopsis* chitinase to enhance the insecticidal activity of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 61, n. 9, p. 814-824, 2021.
- MELO, I. S. de. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. **Controle biológico de doenças de plantas**, v. 15, 1991.
- MENEZES, K. S. *et al.* Avaliação da viabilidade de *Trichoderma* spp. e produção de enzimas proteolíticas em resíduos agroindustriais. **Universidade do Estado do Amazonas**, 2021.
- MENG J.; WANG B.; CHENG W. Study on secondary metabolites of *Trichoderma saturnisporum*. **China Marine Medicine**, v. 36, no. 6, p. 27-31, 2017.
- MERZENDORFER, H; ZIMOCH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 24, p. 4393-4412, 2003.

- MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; DA SILVA, J. C. *Trichoderma*: uso na agricultura. **Embrapa Soja-Livro científico** (Alice), 2019.
- MITCHELL, Everett Royal *et al.* Life history of *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of the Georgia Entomological Society**, v. 2, n. 2, 1967.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MOHAMED, G. S.; TAHA, E. Potency of Entomopathogenic Fungi, *Trichoderma album* Preuss in Controlling, *Rhizopertha dominica* F. (Coleoptera: Bostrichidae) under Laboratory Conditions. **Journal of Plant Protection and Pathology**, v. 8, n. 11, p. 571-576, 2017.
- MØLLER, I. M. SWEETLOVE, L. J., ROS signalling–specificity is required. **Trends in plant science**, 15(7), p.370-374, 2010.
- MORA, M. A. E.; CASTILHO, A. M. C.; FRAGA, M. E. Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, 2018.
- MORAES, R. O. Estudo da produção de *Trichoderma stromaticum* em fermentação em substrato sólido. Tese de Doutorado. **Universidade de São Paulo**, 2004.
- MOSCARDI, F. *et al.* Artrópodes que atacam folhas de soja. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-pragas**, v. 4, pág. 859, 2012.
- MUKHAMMADIEV, R. *et al.* Chitinase production by *Trichoderma viride* in submerged state fermentation. In: IOP Conference Series: **Earth and Environmental Science**., 2020.
- MUKHERJEE, P. K. *et al.* Mycoparasitism as a mechanism of *Trichoderma*-mediated suppression of plant diseases. **Fungal Biology Reviews**, v. 39, p. 15-33, 2022.
- MUKHERJEE, A.; GHOSH, S. K. An eco-friendly approach of biocontrol of aphid (*Aphis gossypii* Glover) by *Trichoderma harzianum*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 195, n. 1, p. 1-15, 2023.

- MYCOBANK. **Fungal Databases, Nomenclature & Species Banks**. Disponível em: <<https://www.mycobank.org/page/Simple%20names%20search>>. Acesso em: 04 mai. 2022.
- NAMPOOTHIRI, K. M. *et al.* Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1583-1590, 2004.
- NASUTION, L. *et al.* Effectiveness *Trichoderma* and *Beauveria bassiana* on larvae of *Oryctes rhinoceros* on palm oil plant (*Elaeis Guineensis* Jacq.) *in vitro*. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 239050, 2018.
- NAWAZ, A. *et al.* *In vivo* and *in vitro* assessment of *Trichoderma* species and *Bacillus thuringiensis* integration to mitigate insect pests of brinjal (*Solanum melongena* L.). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, n. 1, p. 1-7, 2020.
- NO, H. K.; MEYERS, S. P. Preparation and characterization of chitin and chitosan—a review. **Journal of aquatic food product technology**, v. 4, n. 2, p. 27-52, 1995.
- NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5543>>. Acesso em: 21. Out. 2022.
- OMAR, A. A. SHEREEN, M. E. Evaluation of the insecticidal activity of *Fusarium solani* and *Trichoderma harzianum* against cockroaches; *Periplaneta Americana*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 5, p. 1024-1032, 2012.
- OYELEYE, A; NORMI, Y. M. Chitinase: diversity, limitations, and trends in engineering for suitable applications. **Bioscience reports**, v. 38, n. 4, 2018.
- PARRA, J. R. P. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico, 3 ed. Piracicaba, FEALQ, p.137, 1996.
- PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. **Annual review of phytopathology**, v. 23, n. 1, p. 23-54, 1985.
- PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and microbial technology**, v. 26, n. 7, p. 473-483, 2000.

- PATIL, A. S.; PATIL, S. R.; PAIKRAO, H. M. *Trichoderma* secondary metabolites: their biochemistry and possible role in disease management. In: **Microbial-mediated induced systemic resistance in plants**. Springer, Singapore, p. 69-102, 2016.
- PAULINO, G. V. B.; FÉLIX, C. R.; LANDELL, M. F. Diversidade de fungos filamentosos associados a corais e esponjas em recifes costeiros do nordeste do Brasil. **Journal of basic microbiology**, v. 60, n. 2, p. 103-111, 2020.
- PAVLUKOVA, E. B.; BELOZERSKY, M. A.; DUNAEVSKY, Y. E. Extracellular proteolytic enzymes of filamentous fungi. **Biochemistry**. Biokhimiia, v. 63, n. 8, p. 899-928, 1998.
- PEÑALBA, J. N. Efecto de *Trichoderma harzianum* luego de una biofumigación para el biocontrol de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tomate. **Universidad Nacional de la Plata**, 2022.
- PENCOE, N. L.; MARTIN, P. B. Development and reproduction of fall armyworms on several wild grasses. **Environmental entomology**, v. 10, n. 6, p. 999-1002, 1981.
- PERSOON, C. H. Neuer Versuch einer systematischen Eintheilung der Schwämme. **Neues Magazin für die Botanik**, v. 1, p. 63-128, 1794.
- POVEDA, J.; EUGUI, D.; ABRIL-URIAS, P. Could *Trichoderma* be a plant pathogen? Successful root colonization. In: *Trichoderma*. **Springer, Singapore** p. 35-59, 2020.
- POVEDA, J. *Trichoderma* as biocontrol agent against pests: New uses for a mycoparasite. **Biological Control**, v. 159, p. 104634, 2021.
- PRAKASH, U. N. A. *et al.* Evolution, homology conservation, and identification of unique sequence signatures in GH19 family chitinases. **Journal of molecular evolution**, v. 70, n. 5, p. 466-478, 2010.
- PRAYOGO, Y.; BAYU, M. S. Y. I.; SUSANTO, G. W. A.; INDIATI, S. W. Impact of biopesticide inundation on the diversity of soybean pests and diseases. **IOP Conference Series**, 2003.
- RAHIM, S; IQBAL, M. Exploring enhanced insecticidal activity of mycelial extract of *Trichoderma harzianum* against *Diuraphis noxia* and *Tribolium castaneum*. **Sarhad Journal of Agriculture**, v. 35, n. 3, p. 757-762, 2019.

- RAO, M. B. *et al.* Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.
- RAZINGER, J. *et al.* Evaluation of insect associated and plant growth promoting fungi in the control of cabbage root flies. **Journal of economic entomology**, v. 107, n. 4, p. 1348-1354, 2014.
- REINO, J. L. *et al.* Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 1, p. 89-123, 2008.
- RESENDE, M. de L. *et al.* Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, p. 793-798, 2004.
- RIBAS, P. P. *et al.* Potencial in vitro para solubilização de fosfato por *Trichoderma* spp. Revista Brasileira de Biociências: **Brazilian Journal of Biosciences**, Porto Alegre. Vol. 14, n. 2. p. 70-75, 2016.
- RIBEIRO, A. P. M. da S. *et al.* Uso de *Trichoderma* na promoção de crescimento de mudas florestais. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 1, 2023.
- RIFAI, M. A. A revision of the genus *Trichoderma* Commonw. **Mycol. Inst., Mycol. Pap.**, v. 116, p. 56, 1969.
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in polymer science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.
- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, A. *et al.* Inhibitory activity of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma* spp. on the insect pests *Xylotrechus arvicola* (Coleoptera: Cerambycidae) and *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). **Environmental monitoring and assessment**, v. 189, n. 1, p. 1-8, 2017.
- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, A. *et al.* Effect of trichodiene production by *Trichoderma harzianum* on *Acanthoscelides obtectus*. **Journal of Stored Products Research**, v. 77, p. 231-239, 2018a.

- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, A. *et al.* Investigations of *Trichoderma* spp. and *Beauveria bassiana* as biological control agent for *Xylotrechus arvicola*, a major insect pest in Spanish vineyards. **Journal of Economic Entomology**, v. 111, n. 6, p. 2585-2591, 2018b.
- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, A. *et al.* Spores of *Trichoderma* strains sprayed over *Acanthoscelides obtectus* and *Phaseolus vulgaris* L. beans: Effects in the biology of the bean weevil. **Journal of Stored Products Research**, v. 88, p. 101666, 2020.
- RUDALL, K. M. The chitin/protein complexes of insect cuticles. In: **Advances in insect physiology**. Academic Press, p. 257-313, 1963.
- RUDALL, K. M.; KENCHINGTON, W. The chitin system. **Biological Reviews**, v. 48, n. 4, p. 597-633, 1973.
- SAITO, L. R. *et al.* Aspects of the effects of the fungus *Trichoderma* spp. in biocontrol of pathogens of agricultural crops. **Applied Research & Agrotechnology**, v. 2, n. 3, p. 203-216, 2009.
- SAMUELS, G. J. *et al.* *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. **Sydowia**, v. 51, n. 1, p. 71-88, 1999.
- SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 195-206, 2006.
- SAMUELS, G. J. *et al.* *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. **Mycologia**, v. 102, n. 4, p. 944-966, 2010.
- SAMUEL, N.; HADAVI, N. *Trichoderma*: review of biology and sistematics of de genus. **Journal of General Microbiology**, v. 100, p. 923-935, 1996.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: **Cold Spring Harbor Laboratory**, 1989.
- SANDHYA, C. *et al.* Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation. **Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms**, v. 44, n. 1, p. 49-58, 2004.

- SANTOS, P. R. Identificação de isolados de *Trichoderma* spp. utilizando marcadores do tipo RAPD e DNA barcore. Dissertação de Mestrado. **INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**, 2010.
- SANTI, L. *et al.* The entomopathogen *Metarhizium anisopliae* can modulate the secretion of lipolytic enzymes in response to different substrates including components of arthropod cuticle. **Fungal biology**, v. 114, n. 11-12, p. 911-916, 2010.
- SANTOS, E. dos. Produção e avaliação das aplicações de enzimas quitinolíticas e queratinolíticas. **Universidade Estadual Paulista “júlio de mesquita filho”**. Ciências farmacêuticas, 2011.
- SANTOS, D. V.; LIRA, V. L.; MOURA, R. M. Efeitos de metabólitos de *Trichoderma* spp. no biocontrole de *Meloidogyne enterolobii*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 16, n. 1, p. 131-142, 2019.
- SARZI, J. S. Efeito de diferentes espécies de *Trichoderma* no controle de patógenos habitantes do solo na cultura da soja. **Universidade Federal da Fronteira Sul**, 2016.
- SAHEBANI, N.; HADAVI, N. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Soil Biology & Biochemistry, Leicestershire**, v. 40, p.2016-2020, 2008.
- SEIDL, V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 36-42, 2008.
- SEIDL, V. *et al.* Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. **BMC genomics**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2009.
- SERRANO, L. *et al.* Metabolomics Analysis of *Combretum lanceolatum* Roots in the Presence of Its Endophytic Fungi. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 34, n. 2, p. 234-241, 2023.
- 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.
- SHAHIDI, F.; ABUZAYTOUN, R. Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects. **Advances in food and nutrition research**, v. 49, p. 93-137, 2005.

- SHARMA, I. P.; SHARMA, A. K. Physiological and biochemical changes in tomato cultivar PT-3 with dual inoculation of mycorrhiza and PGPR against root-knot nematode. **Symbiosis**, v. 71, n. 3, p. 175-183, 2017.
- SCHETINI, B. V. *et al.* Manejo de *Heterodera glycines* empregando enzimas hidrolíticas de *Trichoderma asperellum*. **Instituto Federal Goiano**, 2017.
- SCHÄFER, F. Setor de biológicos deve crescer até 45% na safra 2022/23. **Destaque Rural**. Disponível em: <<https://destaquerural.com.br/2022/04/28/setor-de-biologicos-deve-crescer-ate-45-na-safra-2022-23/>>. Acesso em: 20 jul. 2022.
- SHAKERI, J; FOSTER, H. A. Proteolytic activity, and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 961-968, 2007.
- SIDDIQUEE, S. Recent advancements on the role and analysis of volatile compounds (VOCs) from *Trichoderma*. In: *Biotechnology and biology of Trichoderma*. **Elsevier**. p. 139-175, 2014.
- SILVA, L. R. D. Compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. no controle de mofo-branco e promoção de crescimento em alface. **Universidade de Brasília**. 2020.
- SILVA, M. M. S. **ELEVAGRO**. Disponível em: <<https://elevagro.com/conteudos/materiais-tecnicos/2094-Trichoderma-e-sua-crise-de-identidade#>>. Acesso em: 05 mai. 2022.
- SILVEIRA, A. A. da, *et al.* Larvicidal potential of cell wall degrading enzymes from *Trichoderma asperellum* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Biotechnology Progress**, v. 37, n. 5, p. e3182, 2021.
- SUNDARAVADIVELAN, C.; PADMANABHAN, M. N. Effect of mycosynthesized silver nanoparticles from filtrate of *Trichoderma harzianum* against larvae and pupa of dengue vector *Aedes aegypti* L. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 6, p. 4624-4633, 2014.
- SUN, Y. *et al.* Extracellular protease production regulated by nitrogen and carbon sources in *Trichoderma reesei*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 122-132, 2021.

- SCHATZ, L. The development and differentiation of arthropod procuticle: Staining. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 45, n. 4, p. 678-686, 1952.
- VERMEULEN, C. A.; WESSELS, J. G. H. Chitin biosynthesis by a fungal membrane preparation: Evidence for a transient non-crystalline state of chitin. **European journal of biochemistry**, v. 158, n. 2, p. 411-415, 1986.
- VERMELHO, A. B. *et al.* Enzimas proteolíticas: Aplicações biotecnológicas. **Enzimas em biotecnologia-Produção, aplicações e mercado**, p. 273-287, 2008.
- VIJAYAKUMAR, N; ALAGAR, S; MADANAGOPAL, N. Effects of chitinase from *Trichoderma viride* on feeding, growth and biochemical parameters of the rice moth, *Corcyra cephalonica* Stainton. **J Entomol Zool Stud**, v. 4, n. 4, p. 520-523, 2016.
- VINALE, F. *et al.* *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. **The Open Mycology Journal**, v. 8, n. 1, 2014.
- 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.
- WATANABE, T. *et al.* Family 19 chitinases of *Streptomyces* species: characterization and distribution. The GenBank accession numbers for the sequences determined in this work are AB031745–AB031757 inclusive. **Microbiology**, v. 145, n. 12, p. 3353-3363, 1999.
- WIZE, M.C. ‘Die durch Pilze hervorgerufenen Krankheiten des Ru‘benru‘sselka‘fers (Cleonus), punctiventris Germ.) mit besonderer Beru‘cksichtigung neuer Arten’, Bulletin International de l’Acade´mie des **Sciences de Cracovie, Classe des Sciences Mathématique et Naturelles**, p. 713-727. 1904.
- WOO, S. L. *et al.* *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. **The Open Mycology Journal**, v. 8, n. 1, 2014.
- XIONG, H. *et al.* Does soil treated with conidial formulations of *Trichoderma* spp. attract or repel subterranean termites. **Journal of Economic Entomology**, v. 111, n. 2, p. 808-816, 2018.
- XU-PING, S. *et al.* Cloning and functional analysis of tri14 in *Trichoderma brevicompactum*. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 169-175, 2015.

- YAMAGUCHI, M. M. Seleção, produção e caracterização da enzima quitinase. Tese de Doutorado. **Universidade Estadual de Campinas**, p. 83, 2003.
- YOUSSEF, S. A.; TARTOURA, K. A.; ABDELRAOUF, G. A. Evaluation of *Trichoderma harzianum* and *Serratia proteamaculans* effect on disease suppression, stimulation of ROS-scavenging enzymes and improving tomato growth infected by *Rhizoctonia solani*. **Biological Control**, v. 100, p. 79-86, 2016.
- ZAHHRAN, Z. *et al.* Laboratory efficacy of mycoparasitic fungi (*Aspergillus tubingensis* and *Trichoderma harzianum*) against tropical bed bugs (*Cimex hemipterus*) (Hemiptera: Cimicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 4, p. 288-293, 2017.
- ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. **Biocontrol science and technology**, v. 18, n. 9, p. 865-901, 2008.
- ZHOU, Ye-Ming. *et al.* New potential strains for controlling *Spodoptera frugiperda* in China: *Cordyceps cateniannulata* and *Metarhizium rileyi*. **BioControl**, v. 65, n. 6, p. 663-672, 2020.
- ZHANG, S. *et al.* The parasitic and lethal effects of *Trichoderma longibrachiatum* against *Heterodera avenae*. **Biological Control**, v. 72, p. 1-8, 2014.