



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS DE CURITIBANOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOSSISTEMAS AGRÍCOLAS E
NATURAIS

Juliana Aparecida Teixeira Stanck Bireahls

Isolados de *Trichoderma* na inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos

Curitibanos

2023

Juliana Aparecida Teixeira Stanck Bireahls

Isolados de *Trichoderma* na inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais (PPGEAN) da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profa. Adriana Terumi Itako, Dra.
Coorientador: Prof. João Batista Tolentino Júnior, Dr.

Curitiba

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Bireahls, Juliana Aparecida Teixeira Stanck

Isolados de Trichoderma na inibição do crescimento de
fungos fitopatogênicos / Juliana Aparecida Teixeira Stanck
Bireahls ; orientadora, Adriana Terumi Itako,
coorientador, João Batista Tolentino Júnior, 2023.

74 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Campus Curitibanos, Programa de Pós-Graduação em
Ecossistemas Agrícolas e Naturais, Curitibanos, 2023.

Inclui referências.

1. Ecossistemas Agrícolas e Naturais. 2. Controle biológico.
3. Antagonismo. 4. Fungos fitopatogênicos. I. Itako, Adriana
Terumi. II. Tolentino Júnior, João Batista. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Ecossistemas Agrícolas e Naturais. IV. Título.

Juliana Aparecida Teixeira Stanck Bireahls

Isolados de *Trichoderma* na inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 15 de fevereiro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Elis Borcioni, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Leosane Cristina Bosco, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Profa. Adriana Terumi Itako, Dra.

Orientadora

Curitibanos, 2023.

Dedico a Deus.

Aos meus queridos pais José Stanck e Loiraci Sutil Teixeira Stanck,
pela educação e por sempre serem meu apoio em todos os momentos.

Amo vocês, incondicionalmente!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, pela constante proteção durante toda essa caminhada e força para vencer as dificuldades da vida.

Aos meus amados pais José Stanck e Loiraci Sutil Teixeira Stanck por todo amor, apoio, orações e compreensão que tiveram comigo durante todos esses anos, fazendo com que eu não desistisse e acreditasse que no final tudo valeria a pena. Vocês são minha fonte de inspiração e exemplo a ser seguido. Ao meu irmão Juliano Teixeira Stanck por sempre se fazer presente em minha vida e me incentivar a nunca desistir dos meus sonhos.

Ao meu esposo Luciano Bireahls, por todo apoio, carinho e palavra amiga e por sempre querer o meu melhor e, pacientemente, entender a minha ausência em determinados momentos. Aos meus familiares por todo o apoio recebido.

Aos meus queridos amigos que estiveram comigo durante toda a Pós-graduação, àquelas pessoas especiais que surgiram durante a trajetória, saibam que cada um de vocês foi essencial para me manter firme nessa caminhada. Em especial ao Tarcísio Francisco de Camargo pela amizade e companheirismo em todos os momentos.

A UFSC Campus de Curitibanos, pela oportunidade de realização do curso de Pós-graduação. Aos professores do PPGEAN, que mesmo diante da pandemia do COVID - 19 sempre deram o melhor de si, tornando-se verdadeiros mestres. Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Adriana Terumi Itako por me orientar durante a Pós-graduação e ao meu coorientador Prof. Dr. João Batista Tolentino Júnior, pela ajuda nas análises estatísticas, e também pelo apoio durante essa caminhada.

À UNIEDU (Programa de Bolsas Universitárias de Santa Catarina), pela concessão da bolsa de mestrado que possibilitou a realização desta pesquisa.

Enfim, a todos que de uma forma ou outra torceram e contribuíram nesta importante e inesquecível etapa da minha vida.

Muito obrigada!

Tudo posso naquele que me fortalece, Cristo.

Filipenses: 4:13

RESUMO

Embora a utilização de fungicidas sintéticos sejam predominantes no controle de fungos fitopatogênicos, os mesmos apresentam potencial efeito tóxico à saúde humana e ao meio ambiente. Nesse sentido, o controle biológico tem sido empregado como alternativa para reduzir os prejuízos causados por fungos fitopatogênicos em plantas. Diante disso, fungos do gênero *Trichoderma* estão sendo estudados com objetivo de futura aplicação para controlar doenças de plantas, sendo visto como uma ferramenta no controle destas com maior eficiência e menor risco de contaminação ambiental. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de isolados de *Trichoderma* spp. como potenciais antagonistas sobre os fitopatógenos *Cylindrocladium candelabrum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria* spp., e *Fusarium* spp. em condições *in vitro*. Foram analisados quatro isolados de *Trichoderma* spp. (SC1152, SC1198, SC1264 e SC1275) coletados no município de Brunópolis, SC e um fungo comercial, *Trichoderma harzianum*. Os testes realizados foram: contagem de conídios dos isolados de *Trichoderma* spp. em câmara de Neubauer, teste de pareamento de culturas *in vitro* e teste de metabólitos voláteis e metabólitos não voláteis. As avaliações foram realizadas diariamente e com os dados de crescimento foi calculada a Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM) e o Índice de Velocidade do Crescimento Micelial (IVCM) os quais foram convertidos em porcentagem de inibição e porcentagem de redução da velocidade do crescimento do fitopatógeno. No teste de pareamento de culturas *in vitro*, para os fungos *C. candelabrum* e *Alternaria* spp. o isolado SC1275 foi o que apresentou maior eficiência na inibição do crescimento micelial. Para o fungo *B. cinerea* o melhor isolado foi SC1264 e, para *Fusarium* spp. o isolado SC1152 foi o que apresentou maior eficiência do controle micelial. Para o teste de metabólitos voláteis, o isolado SC1275 foi o que apresentou maior inibição para os fungos *C. candelabrum*, *B. cinerea* e *Alternaria* spp. Para o fungo *Fusarium* spp. o melhor isolado foi SC1152. Para o teste de metabólitos não voláteis, o *T. harzianum* foi o responsável por apresentar inibição significativa do crescimento micelial e redução da velocidade do crescimento micelial dos fitopatógenos estudados. Com isso, os resultados encontrados neste trabalho estimulam, além da realização dos ensaios laboratoriais, a continuação de mais estudos desses isolados futuramente à campo, a fim de verificar sua eficiência no controle *in vivo* de doenças em plantas.

Palavras-chave: Controle biológico; antagonismo; fungos fitopatogênicos.

ABSTRACT

Although the use of synthetic fungicides is predominant in the control of phytopathogenic fungi, they have a potential toxic effect on human health and the environment. In this sense, biological control has been used as an alternative to reduce damage caused by phytopathogenic fungi in plants. In view of this, fungi of the genus *Trichoderma* are being studied with the aim of future application to control plant diseases, being seen as a tool in their control with greater efficiency and lower risk of environmental contamination. Thus, the objective of the present work was to evaluate the effect of *Trichoderma* spp. as potential antagonists against phytopathogens *Cylindrocladium candelabrum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria* spp., and *Fusarium* spp. under *in vitro* conditions. Four isolates of *Trichoderma* spp. (SC1152, SC1198, SC1264 and SC1275) collected in the municipality of Brunópolis, SC and a commercial fungus, *Trichoderma harzianum*. The tests carried out were conidia count of *Trichoderma* spp. in Neubauer chamber, *in vitro* culture pairing test and volatile metabolites and non-volatile metabolites test. The evaluations were performed daily and with the growth data, the Area Under the Mycelial Growth Curve (AUCM) and the Mycelial Growth Speed Index (IVCM) were calculated, which were converted into percentage of inhibition and percentage of reduction in the speed of growth. phytopathogen growth. In the *in vitro* culture pairing test, for *C. candelabrum* and *Alternaria* spp. isolate SC1275 was the one that showed the greatest efficiency in inhibiting mycelial growth. For the fungus *B. cinerea* the best isolate was SC1264 and for *Fusarium* spp. isolate SC1152 was the one that presented the highest efficiency of mycelial control. For the volatile metabolites test, the isolate SC1275 showed the greatest inhibition for the fungi *C. candelabrum*, *B. cinerea* and *Alternaria* spp. For the fungus *Fusarium* spp. the best isolate was SC1152. For the test of non-volatile metabolites, *T. harzianum* was responsible for showing significant inhibition of mycelial growth and reduction of mycelial growth velocity of the phytopathogens studied. Thus, the results found in this work encourage, in addition to carrying out laboratory tests, the continuation of further studies of these isolates in the future in the field, in order to verify their efficiency in the *in vivo* control of plant diseases.

Keywords: Biological control; antagonism; phytopathogenic fungi.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sintomas do fungo <i>Cylindrocladium candelabrum</i> em eucalipto.	20
Figura 2 – Sintomas da podridão da espiga por <i>Fusarium</i> spp. encontrados na cultura do milho.	21
Figura 3 – Sintomas de mancha de <i>Alternaria</i> encontrados na cultura do girassol. ...	23
Figura 4 – Sintomas de podridão cinzenta de <i>Botrytis cinerea</i> encontrados em videira.	25
Figura 5 – Ciclo de vida assexuada do fungo <i>Trichoderma</i>	27
Figura 6 – Câmara de Neubauer utilizada para contagem de conídios de <i>Trichoderma</i> spp.	34
Figura 7 – Esquema do experimento de pareamento de fungos fitopatogênicos.	35
Figura 8 – Esquema de avaliação do crescimento micelial dos fitopatógenos e dos antagonistas estudados.	36
Figura 9 – Diagrama do experimento de inibição do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos expostos aos compostos orgânicos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp.	38
Figura 10 – Esquema das medições dos diâmetros verticais e horizontais do crescimento micelial do fungo fitopatogênico.	38
Figura 11 – Frascos com filtrados dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. utilizados para o teste.	40
Figura 12 – Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em meio de cultura BDA utilizados nos experimentos.	42
Figura 13 – Fungos fitopatogênicos em meio de cultura BDA.	42
Figura 14 – Imagens capturadas dos isolados em Câmara de Neubauer para contagem dos conídios obtidos.	44
Figura 15 – Fotografia do fungo <i>Cylindrocladium candelabrum</i> em placa de Petri com meio BDA pareado com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. após 16 dias de incubação.	47
Figura 16 – Fotografia do fungo <i>Botrytis cinerea</i> em placa de Petri com meio BDA pareado com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. após 5 dias de incubação.	47
Figura 17 – Fotografia do fungo <i>Alternaria</i> spp. em placa de Petri com meio BDA pareado com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. após 14 dias de incubação.	48
Figura 18 – Fotografia do fungo <i>Fusarium</i> spp. em placa de Petri com meio BDA pareado com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. após 9 dias de incubação.	48
Figura 19 – Colônias de <i>Cylindrocladium candelabrum</i> após exposição aos metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. após 13 dias de incubação.	52

Figura 20 – Colônias de <i>Botrytis cinerea</i> após exposição aos metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. após 5 dias de incubação.....	53
Figura 21 – Colônias de <i>Alternaria</i> spp. após exposição aos metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. após 6 dias de incubação.....	54
Figura 22 – Colônias de <i>Fusarium</i> spp. após exposição aos metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. após 5 dias de incubação.....	55
Figura 23 – Fotografia do fungo <i>C. candelabrum</i> em placa de Petri com meio BDA após exposição aos metabólitos não voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. após 19 dias de incubação.....	58
Figura 24 – Fotografia do fungo <i>Botrytis cinerea</i> em placa de Petri com meio BDA após exposição aos metabólitos não voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. após 6 dias de incubação.....	58
Figura 25 – Fotografia do fungo <i>Alternaria</i> spp. em placa de Petri com meio BDA após exposição aos metabólitos não voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. após 9 dias de incubação.....	59
Figura 26 – Fotografia do fungo <i>Fusarium</i> spp. em placa de Petri com meio BDA após exposição aos metabólitos não voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. após 6 dias de incubação.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. com informações sobre sua localização e códigos de identificação em laboratório.	33
Tabela 2 – Número total de conídios/mL diluídos a 10^6 após sete dias de incubação (Temperatura: $25 \pm 2^\circ\text{C}$) e fotoperíodo de 12 horas), obtidos da esporulação de isolados do fungo <i>Trichoderma</i> spp.	44
Tabela 3 – Percentual de inibição da Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial obtidos pelo pareamento em placa de <i>Trichoderma</i> spp. contra os fungos <i>C. candelabrum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Alternaria</i> spp., e <i>Fusarium</i> spp.	46
Tabela 4 – Redução da Velocidade de Crescimento Micelial (%) obtidos pelo pareamento em placa de <i>Trichoderma</i> spp. contra os fungos <i>C. candelabrum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Alternaria</i> spp., e <i>Fusarium</i> spp.	50
Tabela 5 – Percentual de inibição da Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial de <i>C. candelabrum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Alternaria</i> spp. e <i>Fusarium</i> spp., submetidos a efeito de metabólitos voláteis produzidos <i>in vitro</i> por isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	51
Tabela 6 – Redução da Velocidade de Crescimento Micelial obtidos pelo efeito de metabólitos voláteis produzidos <i>in vitro</i> por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. contra os fungos <i>C. candelabrum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Alternaria</i> spp. e <i>Fusarium</i> spp.	56
Tabela 7 – Percentual de inibição da Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial de <i>C. candelabrum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Alternaria</i> spp. e <i>Fusarium</i> spp., submetidos a efeito de metabólitos não voláteis de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	57
Tabela 8 – Redução da Velocidade de Crescimento micelial obtidos pelo a efeito de metabólitos não voláteis de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. contra os fungos <i>C. candelabrum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Alternaria</i> spp. e <i>Fusarium</i> spp.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACCM	Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
BOD	Biochemical Oxygen Demand (Demanda Bioquímica de Oxigênio)
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
IVCM	Índice de Velocidade do Crescimento Micelial
MCCR/SC	Micoteca do Centro de Ciências Rurais
mL	Mililitro
PIC	Percentual de Inibição do Crescimento
R	Software estatístico
SC	Santa Catarina
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UNIEDU	Programa de Bolsas Universitárias de Santa Catarina
µL	Microlitro – unidade de volume equivalente à milionésima parte de um litro
µg/mL	Micrograma por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS	17
1.1.1 Objetivo geral	17
1.1.2 Objetivos específicos	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 IMPORTÂNCIA DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS	18
2.1.1 <i>Cylindrocladium candelabrum</i> Viégas.....	19
2.1.2 <i>Fusarium</i> spp.....	21
2.1.3 <i>Alternaria</i> spp.	22
2.1.4 <i>Botrytis cinerea</i> Pers.: Fr.....	23
2.2 CONTROLE BIOLÓGICO	25
2.3 O GÊNERO <i>TRICHODERMA</i>	26
2.3.1 Características do gênero <i>Trichoderma</i>.....	26
2.3.2 Mecanismos de ação de <i>Trichoderma</i> spp. no biocontrole.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. E DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	33
3.2 REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. E DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	33
3.3 CONTAGEM DE CONÍDIOS EM CAMARA DE NEUBAUER.....	34
3.4 TESTE DE PAREAMENTO DE CULTURAS <i>IN VITRO</i>	35
3.5 TESTE DE AVALIAÇÃO DO EFEITO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS	37
3.6 TESTE DE AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>TRICHODERMA</i> SPP. E DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	41
4.2 CONTAGEM DE CONÍDIOS EM CÂMARA DE NEUBAUER.....	43
4.3 TESTE DE PAREAMENTO DE CULTURAS <i>IN VITRO</i>	45
4.4 TESTE DE AVALIAÇÃO DO EFEITO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS	51
4.5 TESTE DE AVALIAÇÃO DOS METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS	57
5 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

O modelo dominante de controle de doenças ainda é desempenhado por meio da aplicação de produtos químicos, tanto na área agrícola quanto na área florestal. Isso vem acumulando inúmeros problemas ambientais, econômicos e sociais. No Brasil, de acordo com os dados sobre comercialização de defensivos agrícolas publicados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente – IBAMA, relatam que no período entre 2010 e 2020, o número de produtos químicos comercializados teve um aumento de 78,3%, correspondendo a quase o triplo do que cresceu a área cultivada no país que foi de 27,6% (IBAMA, 2022).

A degradação do meio ambiente acarreta consequências a longo prazo e seus efeitos podem ser irreversíveis (BOHNER *et al.*, 2013). A aplicação de agrotóxicos pode contaminar os sistemas hídricos e o solo, acarretando numa degradação ambiental com prejuízos à saúde e significativas modificações nos ecossistemas (VEIGA *et al.* 2006).

De acordo com Bomfim *et al.* (2013), os fungos fitopatogênicos na presença de estresses bióticos e abióticos, tornam-se patogênicos e ocasionam doenças em plantas através de modificações em seu metabolismo celular.

Apesar da conhecida efetividade dos fungicidas sintéticos no combate a doenças, os mesmos apresentam potencial efetivo tóxico e tem, notavelmente, desencadeado vários problemas à saúde humana e ao meio ambiente (CARVALHO *et al.*, 2011a; CARVALHO *et al.*, 2011b). Em razão disso, os centros de pesquisa relacionados ao tema procuram realizar o controle das doenças evitando a utilização de agrotóxicos, empenhando-se em utilizar tratamentos baseados no manejo integrado como, por exemplo, a aplicabilidade de medidas silviculturais, a seleção de genótipos resistentes e, principalmente, o controle biológico, com a seleção de agentes com potencial antagonista ao patógeno sem ocasionar danos ao hospedeiro (SILVA *et al.*, 2013).

No Brasil, a aplicação de agentes biológicos tem aumentado nos últimos 40 anos, pois vários centros de pesquisa e universidades têm investido em programas voltados ao controle biológico (PARRA, 2019). A maioria dos representantes fúngicos utilizados no controle biológico pertencem ao gênero *Trichoderma* (MEDEIROS; SILVA; PASCHOLATI, 2018; MORANDI e BETTIOL, 2009).

O êxito da utilização de espécies de *Trichoderma* no controle biológico é devido a sua alta capacidade de reprodução, eficiência no uso de nutrientes, capacidade de sobreviver em condições desfavoráveis, habilidade de modificar a rizosfera, ser intensamente agressivo a fungos fitopatogênicos, estimular o crescimento das plantas e acionar seus mecanismos de defesa (BENÍTEZ *et al.*, 2004). Além disso, os fungos do gênero *Trichoderma* (teleomorfo *Hypocrea*) constituem fontes de enzimas degradadoras de parede de outros fungos, são também, importantes produtores de antibióticos e parasitas de fungos fitopatogênicos (KUMAR *et al.*, 2012).

Louzada (2009) ressalta que os fungos desse gênero apresentam grandes possibilidades de aplicabilidade, tanto no biocontrole de patógenos foliares, quanto patógenos radiculares. Tais características são essenciais para o êxito desses organismos como agentes de biocontrole (LORITO *et al.*, 1993).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo do trabalho foi avaliar em condições *in vitro* o efeito de isolados de *Trichoderma* spp. da região de Santa Catarina, como potenciais antagonistas sobre os fungos fitopatogênicos *Cylindrocladium candelabrum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria* spp. e *Fusarium* spp.

1.1.2 Objetivos específicos

- Verificar a ação antagônica de isolados de *Trichoderma* spp. sobre *C. candelabrum*, *B. cinerea*, *Alternaria* spp. e *Fusarium* spp. através de pareamento direto *in vitro*;
- Avaliar a inibição micelial de *C. candelabrum*, *B. cinerea*, *Alternaria* spp. e *Fusarium* spp. após exposição aos metabólitos voláteis e não voláteis de *Trichoderma* spp.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 IMPORTÂNCIA DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

No Brasil e no mundo agentes fitopatogênicos como: bactérias, fungos, oomicetos, vírus e nematóides são responsáveis por perdas expressivas na agricultura. Os fungos fitopatogênicos, em meio a esses agentes causadores de doenças em plantas se sobressaem por ocasionarem o maior impacto econômico, provocando maiores perdas econômicas (BRUM *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2019).

Os agentes causadores de origem fúngica, secretam toxinas, enzimas e fitorreguladores para a remoção de nutrientes da célula para seu próprio consumo e crescimento e, com a retirada dos mesmos, que seriam consumidos pelo próprio hospedeiro, pode ser satisfatório para levar a planta a apresentar os sintomas de colonização por fungos (CALIGIORNE *et al.*, 2010).

Os fungos fitopatogênicos possuem características que o diferenciam de outros seres vivos, como: absorção de nutrientes, talo eucariótico, heterotrofismo e formação de esporos, e entre as classificações, todos pertencem ao reino Fungi. O mesmo ressalta ainda que, na natureza os fungos ocupam lugar de destaque entre os agentes causadores de doenças em plantas, e, esses atacam plantas cultivadas, o que tem como consequência a redução da produtividade (MASSOLA JÚNIOR, 2018). Cerca de 70 a 80% das doenças causadas em plantas existentes são provocadas por estes seres (PEREIRA e SOARES, 2012).

De acordo com Messing e Brodeur (2018), o somatório de problemas ocasionados por plantas invasoras, pragas e doenças gera uma perda de produção anual de 40% e ainda que sejam empregados mais de 3 bilhões de toneladas de agrotóxicos na tentativa de diminuir esses problemas em todo o mundo, a perda na produção continua aumentando.

Embora o amplo volume de informações já acumuladas, nosso verdadeiro conhecimento sobre a diversidade, extensão e função da pedobiota ainda é principiante, sobretudo em se abordando da região tropical que protege, cerca de 50% de todas as espécies do planeta (MOREIRA *et al.*, 2008).

Dentre todos os organismos que detêm o solo como habitat principal, se torna necessário fazer referência e destacar os microrganismos como o grupo primordial, justamente pela importância das atividades que os mesmos

desempenham para o desenvolvimento sustentável dos ecossistemas (MOREIRA; CAMPOS, 2013).

Os fungos produzem um grande número de metabólitos pertencentes a diferentes grupos químicos, e atualmente, as fitotoxinas produzidas por esses fitopatógenos estão sendo estudadas em larga escala como fonte de metabólitos biologicamente ativos para descoberta de novos mecanismos de ação (CIMMINO *et al.*, 2015). Os testes *in vitro* permitem que importantes mecanismos de ação como hiperparasitismo e antibiose sejam constatados (LIU *et al.*, 2019; LOUZADA *et al.*, 2009).

Portanto, a busca por alternativas de controle de fitopatógenos começa a aumentar, através da necessidade de diminuir os impactos da utilização excessiva de agrotóxicos e avanços em estudos voltados ao controle biológico (MESSING e BRODEUR, 2018).

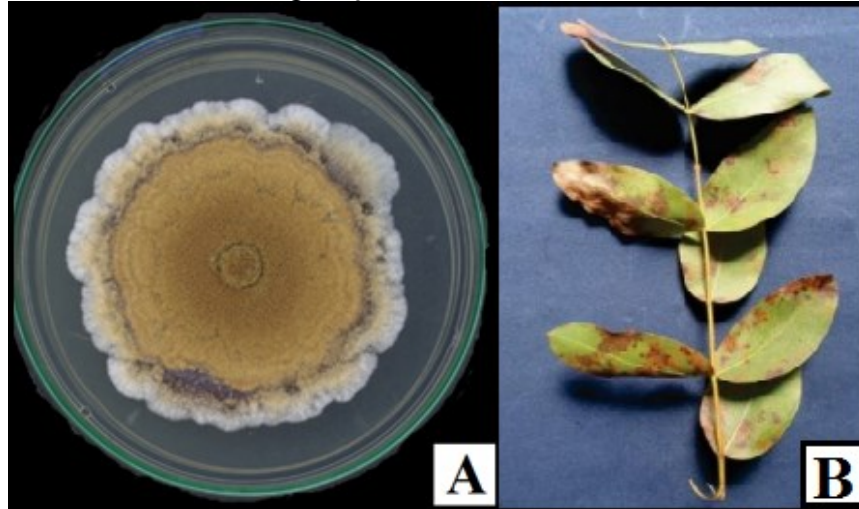
2.1.1 *Cylindrocladium candelabrum* Viégas

O gênero *Cylindrocladium* é pertencente à família Nectriaceae, ordem Hypocreales, classe Pyrenomycetes e divisão Ascomycota (CROUS *et al.*, 1999). Distribui-se da Amazônia até os estados do Sul do Brasil, e já foi constatado seu aparecimento em mais de 15 espécies de eucalipto. As mais suscetíveis ao ataque são: *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus cloeziana* e *Eucalyptus grandis* (SANTOS e JÚNIOR, 2001).

Espécies desse gênero são relatadas como parasitas de várias espécies de Pinus e eucalipto ocasionando problemas em regiões tropicais e subtropicais (APARECIDO e FINATTI, 2012). É conhecido como um dos principais responsáveis por doenças em viveiros, e um dos principais causadores de doenças em mudas de eucalipto (MACIEL *et al.*, 2012).

Os sintomas da doença causada por esse fungo iniciam no ápice ou bordas do limbo foliar e, aumentam em direção a nervura principal das folhas. As manchas são consideradas de grande dimensão, apresentando coloração que varia de marrom claro a marrom arroxeadado. Geralmente as folhas lesionadas caem, podendo afetar grande proporção das copas das árvores. Os brotos não são atingidos, o que permite a recuperação da planta quando em condições ambientais desfavoráveis a doença (SANTOS e JÚNIOR, 2001) (Figura 1).

Figura 1 – Sintomas do fungo *Cylindrocladium candelabrum* em eucalipto.



Legenda: (A) Isolado de *Cylindrocladium candelabrum* em meio BDA; (B) Mancha foliar em *Eucalyptus benthamii* causada pelo ataque do fungo.

Fonte: (A) Autora, 2023; (B) Soares *et al.*, 2017.

De acordo com Santos e Júnior (2001), o tombamento de mudas de eucalipto pode ser causado por inúmeros fungos, dentre eles pelo patógeno de solo *C. candelabrum* que compromete o processo germinativo das sementes, destruindo-as (pré-emergência), e nas plantas recém-emergidas acabam acometendo os tecidos tenros e suculentos (pós-emergência), no qual pode ocasionar prejuízos que se refletem na diminuição do número de mudas formadas.

A doença normalmente ocorre em reboleiras, principalmente em canteiros novos, semeados a lanço, já para a produção de mudas em mesa de tubetes, a doença tende a ocorrer dispersamente, pois a distância que separa as mudas de um recipiente para o outro, dificulta a propagação do patógeno (KRUGNER e AUER, 2005).

Segundo Alfenas *et al.* (2009), a ocorrência desta doença tem sido associada com temperaturas em torno de 26°C e umidade relativa superior a 80%. Deste modo, quando as condições estão favoráveis ao desenvolvimento de *Cylindrocladium candelabrum*, torna-se necessário a utilização de fungicidas (FERREIRA *et al.*, 2006).

No Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), consta para as culturas de *Pinus* e Eucalipto, produtos químicos com ingredientes ativos como ciproconazol, difenoconazol, flutriafol e metconazol (triazol) + fipronil (pirazol) + azoxistrobina (estrobilurina) + acibenzolar-S-metílico (benzotiadiazol) + glifosato-sal de amônio (glicina substituída) + glufosinato – sal de amônio (hooalanina substituída) e mancozebe (alquilenobis - diitiocarbamato) para eucalipto, e glifosato-

sal de amônio (glicina substituída) + piraclostrobina (estrobilurina) para *Pinus* (AGROFIT, 2023).

O uso de antagonistas biológicos como *Trichoderma* spp. tem proporcionado bons resultados no controle da mancha-foliar de *Cylindrocladium* em eucalipto, segundo Carvalho Filho *et al.* (2008), os isolados de *Trichoderma* spp. reduziram o desenvolvimento *in vitro* de *Cylindrocladium scoparium*, mostrando que o uso do biocontrole pode ser uma importante alternativa no controle de doenças de plantas no setor florestal.

2.1.2 *Fusarium* spp.

O gênero *Fusarium* pertence ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales e família Nectriaceae (PEREIRA; SOARES, 2012; MASSOLA JÚNIOR, 2018). Esse gênero contempla algumas das espécies de fungos mais fundamentais economicamente, devido à grande gama de hospedeiros e aos danos na agricultura, e também de danos indiretos, pela habilidade de algumas espécies produzir mitotoxinas (MICHIELSE e REP, 2009; WOLUSHUK e SHIM, 2013).

O *Fusarium* spp. é um fungo considerado como principal responsável por ocasionar perdas significativas no campo e em pós-colheita, devido a murcha vascular e podridão de rizomas (CARRASCO, 2016; MOREIRA *et al.*, 2016).

No Brasil, o fungo *Fusarium moniliforme* [sin. *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg] é o principal fungo patogênico associado a sementes de milho (*Zea mays*) (Figura 2), que causa deterioração de sementes, podridão radicular, do colo e da espiga e morte de plântulas (REIS e CASA, 1996; CASA *et al.*, 1997; WHITE, 1999).

Figura 2 – Sintomas da podridão da espiga por *Fusarium* spp. encontrados na cultura do milho.



Legenda: (A) Isolado de *Fusarium* spp. em meio BDA; (B) Podridão da espiga por *Fusarium* spp.
Fonte: (A) Autora, 2023; (B) Fernando Tavares Fernandes, 2014 - Embrapa Milho e Sorgo.

Fungos pertencentes a este gênero possuem inúmeras características ecológicas, podendo ser saprofiticos, patógenos de plantas, animais e humanos, produtores de micotoxinas e até agentes de biocontrole. São habitantes naturais do solo e estão vastamente distribuídos em diversas regiões do mundo, sendo frequentemente encontrados em associações subterrâneas e aéreas com plantas (SUMMERELL *et al.*, 2010).

Várias espécies de *Fusarium* são conhecidas por produzirem micotoxinas nocivas a humanos e animais, além de fabricarem metabólitos secundários que alteram a produção de hormônios nas plantas (O'DONNELL e CIGELNIK, 1997; ALEXANDER *et al.*, 2011). Nesse sentido, *Fusarium graminearum* e *Fusarium oxysporum* foram listados entre os dez patógenos econômica e cientificamente mais importantes (DEAN *et al.*, 2012).

As culturas fúngicas de *Fusarium* spp. são caracterizadas pelo rápido crescimento da colônia, apresentando micélio aveludado e cottonoso, opacos ou levemente brilhantes e a pigmentação do micélio pode variar de cor rosa, púrpura, cinza ou amarela (GUARRO e GENÉ, 1992; HOOG *et al.*, 2000).

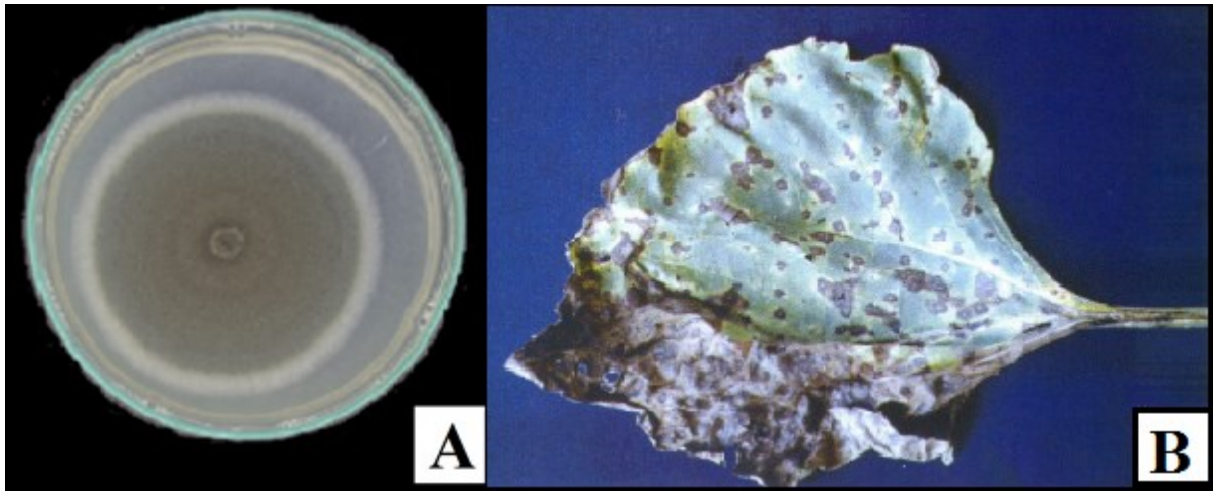
Para esse patógeno, a temperatura ótima de crescimento micelial encontra-se em torno de 25°C em luz contínua, já a esporulação ocorre a 30°C no escuro (SINGH *et al.*, 2017). Áreas com alta incidência luminosa, alto teor de matéria orgânica no solo e umidade excessiva favorecem a população de *Fusarium* spp. agravando a doença (POLETTI, 2008).

2.1.3 *Alternaria* spp.

Espécies do gênero *Alternaria*, causadora da doença conhecida como “pinta”, pertencem ao grupo dos Ascomicetos e são responsáveis por aproximadamente 30% de danos nas plantas em áreas cultivadas (VASCONCELOS *et al.*, 2014).

Segundo Leite (1997), os sintomas típicos nas folhas são pequenas lesões necróticas com cerca de 3 a 5 mm de diâmetro, de coloração da castanha à negra, de formato arredondado a angular, com halo clorótico (Figura 3).

Figura 3 – Sintomas de mancha de *Alternaria* encontrados na cultura do girassol.



Legenda: (A) Isolado de *Alternaria* spp. em meio BDA; (B e C) Manchas foliares de *Alternaria* encontradas em girassol.

Fonte: (A) Autora, 2023; (B) Leite, 1997 – Embrapa.

De maneira geral, as diferenças sintomatológicas entre as espécies do gênero *Alternaria* não são observadas, mas estas podem ser diferenciadas através da morfologia dos conídios e, no caso específico do gênero *Alternaria*, que ocorre em diversos hospedeiros, as características morfológicas mais importantes para a caracterização e a consequente identificação das espécies são as dimensões dos conídios e dos bicos dos conídios que cada uma apresenta (RODRIGUES *et al.*, 2010; ALHUSSAEN, 2012; VASCONCELOS *et al.*, 2014).

Os fungos do gênero *Alternaria* sobrevivem no intervalo entre plantios, em restos de cultura contaminados e hospedeiros intermediários, além de sobreviver em equipamentos agrícolas. Além destas formas de sobrevivência, existe a possibilidade do patógeno manter-se viável no solo na forma de micélio, esporos ou clamidósporos. A ampla esporulação do fungo acontece na faixa de 14 a 26°C, com umidade relativa de 100% durante 24 horas, sendo os conídios altamente resistentes a baixos níveis de umidade (TÖFOLI; DOMINGUES; FERRARI, 2015).

2.1.4 *Botrytis cinerea* Pers.: Fr

Popularmente conhecido como 'mofo-cinzento', o fungo *Botrytis cinerea* – Pers. [teleomorfo: *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel], é um patógeno facultativo que vive saprotificamente no solo, podendo permanecer dormente por longos períodos na forma de escleródios (KRUGNER e AUER, 2005). Sua

disseminação ocorre principalmente em decorrência do transporte de conídios de ar ou insetos (FURTADO *et al.*, 2000).

O fungo é pertencente ao gênero *Botrytis*, filo Ascomycota e família Sclerotiniaceae. Além disso, apresenta alta adaptabilidade, podendo ser encontrado em diferentes regiões geográficas de acordo com a natureza de seu hospedeiro (GRABKE, 2014; JIN *et al.*, 2017).

De acordo com Morandi (2001), a doença causada por este fitopatógeno afeta todos os estágios do desenvolvimento vegetal, causando enormes prejuízos na produção de oleráceas, ornamentais, florestais e frutíferas. Apresenta uma maior incidência em sistemas protegidos, mas também pode alcançar níveis consideráveis em campo aberto e câmaras de armazenamento, ocasionando enormes prejuízos qualitativos e quantitativos.

Segundo Jarvis (1989), o patógeno *B. cinerea* é um fungo necrótico que inicialmente se estabelece e se multiplica em tecidos vegetais mortos, posteriormente colonizando os tecidos vivos adjacentes. O mesmo pode penetrar no tecido através de ferimentos ocasionados durante o manejo e/ou colheita (BRAUN; SUTTON, 1988), ou pela ação direta do apressório, mediada pela secreção de enzimas degradadoras da parede celular, como por exemplo, as poli-galacturonase e cutinases (RHA *et al.*, 2006; CHOQUER *et al.*, 2007).

A cultura da videira é largamente afetada pelo fungo *B. cinerea*, onde na fase de maturação, o fungo afeta a baga através da epiderme ou por ferimentos, colonizando todo o cacho. Nas uvas brancas, ocasiona manchas marrons e nas tintas, manchas vermelhas. Durante a época seca, as bagas afetadas secam e mumificam-se, e nos períodos de alta umidade, as bagas infectadas racham-se e um mofo cinzento forma-se sobre a superfície (BUENO *et al.*, 2022) (Figura 4).

Figura 4 – Sintomas de podridão cinzenta de *Botrytis cinerea* encontrados em videira.



Legenda: (A) Isolado de *Botrytis cinerea* em meio BDA; (B) Sintoma de podridão cinzenta em cacho de uva.

Fonte: (A) Autora, 2023; (B) Eliane Aparecida Benato Rodrigues da Silva - Instituto Agronômico (IAC), 2022 – Boletim Técnico Doenças e pragas em videiras.

No Brasil, a doença tem sido observada principalmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul. Algumas condições são consideradas favoráveis ao desenvolvimento de *B. cinerea*, como: i) condições precárias de higiene; ii) temperaturas entre 10 e 25°C; iii) elevada umidade e baixa luminosidade e iv) manejo inadequado (ALFENAS *et al.*, 2004).

2.2 CONTROLE BIOLÓGICO

As doenças de plantas são as grandes responsáveis por perdas econômicas significativas às culturas e, com o objetivo de diminuir os danos o homem realiza o controle através de diversos métodos, sendo eles químicos, físicos e biológicos (BETTIOL, 1991; MEYER *et al.*, 2019).

De acordo com Bettiol (1991), o controle biológico também denominado de biocontrole de microrganismos nada mais é que um microrganismo sendo controlado através da ação de outro microrganismo.

A introdução dessa técnica no manejo de doenças em plantas vem sendo estudada e aplicada, como objetivo principal de reduzir a utilização de produtos químicos, reduzindo seus efeitos colaterais e danosos ao ambiente, bem como a redução de custos na produção das culturas e beneficiando a saúde do homem e dos animais (JÚNIOR; SANTOS; AUER, 2000).

Microrganismos benéficos relacionados ao desenvolvimento de plantas são comumente encontrados na natureza e apresentam ampla diversidade, compreendendo rizobactérias, bactérias habitantes de filoplano, fungos micorrízicos e outros (LUCON, 2009). Tal diversidade microbiana pode ser explorada pelo

homem quanto técnica de promoção de crescimento das plantas de interesse, uma vez que podem proporcionar capacidade de melhorar a germinação de sementes, o crescimento e a produção de plantas, tornando-se uma alternativa sustentável pesquisada e aplicada tanto em culturas de interesse agrícolas quanto florestais (LUCON, 2009; MACHADO *et al.*, 2015).

Nessa perspectiva, inúmeros fungos têm sido vastamente estudados para verificar seu potencial como controladores biológicos de doenças em plantas, sobretudo aquelas que possuem fungos como agente etiológico. Um grupo de fungos amplamente estudado e com resultados positivos no que se refere à diminuição da incidência de fitopatógenos pertence ao gênero *Trichoderma*, que pode ser encontrado em diversos tipos de solo (MARKOVICH; KONONOVA, 2015; SARAVANAKUMAR *et al.*, 2016).

No Brasil, o fungo *Trichoderma* é um dos principais agentes de controle biológico utilizados, devido a sua boa adaptação às condições ambientais do país e pela grande variabilidade e especificidade de controle a determinados patossistemas (FARIAS, 2019).

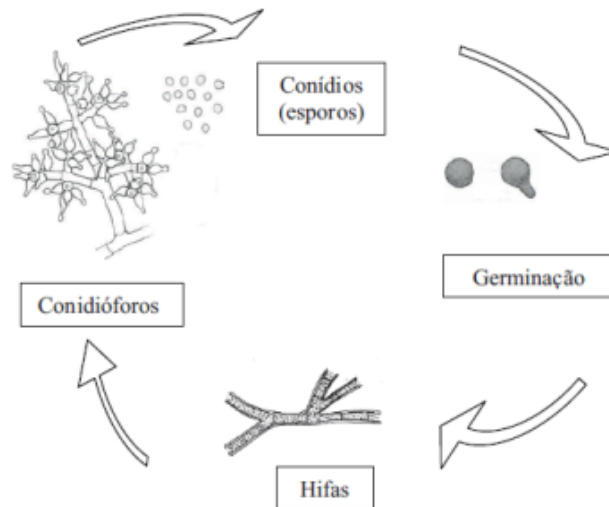
2.3 O GÊNERO *TRICHODERMA*

2.3.1 Características do gênero *Trichoderma*

Entre os organismos antagônicos utilizados no controle de patógenos destaca-se o fungo do gênero *Trichoderma*, uma vez que apresentam amplitude de ação no antagonismo a fungos e bactérias (MENEZES *et al.*, 2007). *Trichoderma* spp. são fungos imperfeitos, pertencentes à Subdivisão Deuteromycotina, ordem Hifomicetes e família Moniliaceae e possuem muitas espécies que são geneticamente distintas, podendo ser encontrados no mundo todo e em praticamente todos os solos (MELO, 1991), e se manifesta como um grupo de fungos filamentosos podendo habitar também climas frios, além de serem atóxicos ao homem e aos animais. (ETHUR *et al.*, 2006).

Os deuteromicetos são caracterizados pela produção de conídios formados a partir de células conidiógenas, contidas ou não em estruturas especializadas, ou por fragmentação do talo micelial (KRUGER e BACCHI, 1995) (Figura 5).

Figura 5 – Ciclo de vida assexuada do fungo *Trichoderma*.



Fonte: Machado *et al.* (2012).

Trichoderma é um gênero de fungo filamentososo, cosmopolita que possui utilidades biotecnológicas, em virtude das suas características em colonizar diversos tipos de substratos em diversas condições ambientais e também por ter capacidade em secretar uma grande variedade de enzimas hidrolíticas como por exemplos as glucanases, proteases, celulares e quinases e outras, e por produzir metabólitos secundários como terpenos e pironas (MUKHERJEE *et al.*, 2013). Além disso, são fungos fáceis de serem isolados e mantidos em meios de culturas, onde produzem rapidamente ampla quantidade de conídios verdes ou brancos a partir de células conidiogênicas que se estabelecem nas extremidades dos conidióforos (SIDDIQUEE *et al.*, 2011).

Os conidióforos exibem formato cônico ou piramidal, ramificados e comumente formados em anéis sazonais, produzindo zonas concêntricas. Já os conídios, apresentam formatos ovoides, subgloboso, elipsoide ou elíptico-cilíndrico, com parede lisa, rugosa ou estriada, variando de acordo com a espécie (GAMS; BISSET, 1998).

As fiálides apresentam formatos que podem variar de ampuliforme a lageniforme, na maioria das vezes com centro dilatado e ápice afunilado, dispostas em verticilos terminais nas ramificações do conidióforo (GAMS; BISSET, 1998). Os clamidósporos são os esporos assexuais que estão presentes na maioria das espécies, em posição terminal nas hifas (MELO, 1991; HOWELL, 2003).

Trichoderma podem produzir diferentes pigmentos de coloração amarelo-esverdeado a avermelhado e são grandes produtores de metabólitos secundários, alguns dos quais possui extrema importância clínica e biotecnológica (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010; MUKHERJEE *et al.*, 2013). São produtores de importantes enzimas na degradação e lise da parede celular de fungos patogênicos, tais como exoglucanases e endoglucanases, celobiase e quitinase (BOMFIM *et al.*, 2010).

Em 1929, pela primeira vez Alexander Fleming descreveu a penicilina sintetizada a partir de metabólitos do fungo *Penicillium notatum*, com potencial de combate a doenças infecciosas causadas por bactérias (PINTO *et al.*, 2002). Hormônios e esteróides para crescimento vegetal são originários de metabólitos do *Penicillium chrysogenum* (ABREU; RODOVIDA; PHAMPHILE, 2015). Do mesmo modo, a ciclosporina, substância isolada a partir de fungos de solo (*Tolypocladium inflatum* e *Cylindrocarpon lucidum*) na década de 70, é utilizada em pessoas submetidas a transplantes, o que revolucionou a clínica (PINTO *et al.*, 2002).

Ademais, o resveratrol, uma fitoalexina produzida pela cultura da videira em resposta de defesa ao fungo *Botrytis cinerea*, tem sido largamente estudada acerca dos seus efeitos benéficos contra doenças cardiovasculares e o tratamento de algumas neoplasias (KOBAYASHI, 2000).

Outras substâncias produzidas a partir de metabólitos secundários de fungos com diferentes atividades farmacológicas são: ciclosporinas, ergometrina e aspercilina, um antagonista de doenças gastrointestinais e do sistema nervoso central e mevinolina um agente redutor de colesterol (PINTO *et al.*, 2002; MORO *et al.*, 2007).

Já foi observado o desenvolvimento de inúmeras espécies em resíduos de culturas entre 5 e 25°C de temperatura. A maioria das linhagens de *Trichoderma* não tolera o estresse hídrico, portanto há o interesse na obtenção de isolados resistentes às condições secas (KREDICS *et al.*, 2003).

De acordo com Samuels (2006), o *Trichoderma* é comumente um gênero de fungo de solo de vida livre, integralmente presente neste ambiente, em todas as zonas climáticas. Contudo algumas espécies podem ser cosmopolitas (ex., *T. harzianum*) ou restritas na sua distribuição geográfica (ex., *T. viride*).

Trichoderma apresenta diversas finalidades, como a produção de enzimas para as indústrias. Além disso, tal agente pode colaborar com a agricultura em inúmeros aspectos fundamentais, como elevar a eficiência na utilização de

nitrogênio, promover o desenvolvimento das plantas, bem como a produtividade e aliviar os impactos dos estresses salinos (MEYER *et al.*, 2019).

A estimulação do mecanismo de defesa da planta acontece quando fungos *Trichoderma* colonizam raízes induzindo alterações no metabolismo, fazendo com que a planta acumule substâncias antimicrobianas, promovendo resistência a uma grande variedade de microorganismos patogênicos (BROTAMAM; GUPTA; VITERBO, 2010).

O grupo *Trichoderma* está entre os microrganismos mais resistentes aos produtos químicos naturais e sintetizados pelo homem e às toxinas (HARMAN *et al.*, 2004). Possuem a capacidade de degradar compostos orgânicos e inorgânicos, como os pesticidas e hidrocarbonetos (BOMFIM *et al.*, 2010). Pode, também, proteger e colonizar o sistema radicular proporcionando a solubilização de nutrientes para as plantas (BOMFIM *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Além disso, este fungo pode proporcionar benefícios no desenvolvimento e rendimento da cultura devido à produção de substâncias promotoras de crescimento e melhoria na nutrição das plantas, em decorrência da solubilização de fósforo (OLIVEIRA *et al.*, 2012) e síntese de ácido indol acético (OLIVEIRA *et al.*, 2012; CHAGAS *et al.*, 2017).

Existem algumas espécies de *Trichoderma* que estão vastamente sendo utilizadas como controle biológico eficaz e várias cepas estão sendo comercialmente registradas na proteção de plantas, dentre estas espécies as mais utilizadas são *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. virens*, *T. hamatum*, *T. asperellum*, *T. asperelloides* e *T. gamsii* (LORITO *et al.*, 2010).

No biocontrole de fungos fitopatogênicos, cerca de 90% dos fungos utilizados como antagonistas são pertencentes aos diferentes tipos de isolados do gênero *Trichoderma* (KUNIEDA-ALONSO; ALFENAS; MAFFIA, 2005). A Coleção de Agentes de Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEM) possui mais de 1500 isolados de *Trichoderma* e, alguns desses vêm sendo pesquisados quanto à habilidade de controlar diferentes fitopatógenos e podem manifestar alto potencial no controle de patógenos habitantes de solo (BOTELHO, 2022). Além do mais, existem mais de 30 produtos à base de *Trichoderma* no mercado brasileiro de biofungicidas (AGROFIT, 2022).

Bioprodutos comerciais à base de *Trichoderma* vem sendo amplamente aplicados em várias áreas do país, pois atuam no controle principalmente de doenças causadas por fungos de solo, como *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Phytophthora*, *Phythium*, *Armillaria* e *Roselinia*. Alguns desses produtos também são indicados para o controle de patógenos responsáveis por doenças ou lesões em folhas, caules, ramos, flores e frutos de diversas espécies, em sua grande maioria agrícolas (MORANDI e BETTIOL, 2009).

No Brasil, *T. asperellum*, *T. harzianum* e *T. stromaticum* são as espécies registradas como biofungicidas e *T. koningiopsis* como nematicida. Os produtos à base *Trichoderma* são empregados em várias culturas de interesse econômico como soja, milho, algodão, feijão, citros, morango, hortaliças, cana-de-açúcar, tabaco, café, ornamentais, frutíferas e espécies florestais (AGROFIT, 2022).

Em 2014, havia 177 fungicidas à base de *Trichoderma* comercialmente disponíveis no mundo, que continham principalmente *Trichoderma asperellum*. *T. hamatum*, *T. harzianum* e *T. viride* como ingredientes ativos recomendados somente para tratamentos de sementes e solos (WOO *et al.*, 2014). No Brasil, em 2019 existiam 27 produtos registrados compostos por *Trichoderma* sp. dos quais 19 possuíam células de *T. harzianum* como ingrediente ativo (BRASIL, 2020). No Brasil, existem atualmente 34 produtos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Alimentar (MAPA) formulados com *Trichoderma* como ingredientes ativos, sendo que os mesmos são baseados em quatro espécies: *T. asperellum*, *T. koningiopsis*, *T. harzianum* e *T. stromaticum* (BRASIL, 2021).

Segundo Juliatti e Jaccoud-Filho (2022), seis dos 34 produtos registrados no Brasil são formulados com uma ou duas estirpes de *Trichoderma* e *Bacillus amyloliquefaciens*. Deste modo, é importante que seja realizado o isolamento e a seleção de novos bioagentes para o desenvolvimento e a disponibilidade de novos produtos e formulação no mercado, permitindo o aumento da oferta e estímulo da geração de demanda (BETTIOL; SILVA; CASTRO, 2019).

2.3.2 Mecanismos de ação de *Trichoderma* spp. no biocontrole

As espécies de fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* vem constituindo uma das mais utilizadas no controle de fitopatógenos por meio do controle biológico, por serem naturalmente encontradas e cultivadas, apresentarem

acelerado crescimento e não serem patogênicos para as plantas nem para o ser humano (MACHADO *et al.*, 2012).

Além disso, os mecanismos de *Trichoderma* no controle biológico de fitopatógenos são variados, sendo capazes de inibir os fungos fitopatogênicos por parasitismo, hiperparasitismo e micoparasitismo (HARMAN, 2000; MELO, 1998; STADNIK e BETTIOL, 2000), competição (BENITEZ *et al.*, 2004; HARMAN, 2000), antibiose (STADNIK e BETTIOL, 2000), indução de resistência (HWANG e BENSON, 2002) e promoção de crescimento que promove o enraizamento das estacas, pois libera substâncias que são assimiladas pelas raízes das plantas (MELO, 1998; CARVALHO FILHO *et al.*, 2008; HARMAN *et al.*, 2004; LUCON, 2009).

Um dos mecanismos mais clássicos do controle biológico é a competição (MACHADO *et al.*, 2012). *Trichoderma* presente em diferentes substratos e climas comprova a versatilidade deste fungo, capaz de competir com outros microrganismos por água, nutrientes, espaço, fontes de carbono e oxigênio (MONTE *et al.*, 2019). Segundo Bettiol *et al.* (2019), muitos dos produtos comerciais à base de *Trichoderma* disponíveis mundialmente possuem a competição como um dos mecanismos de ação.

O micoparasitismo acontece quando o antagonista identifica estímulos químicos liberados pelo patógeno suscetível. Em seguida, as hifas do antagonista crescem em direção ao patógeno, envolvendo-o e, diante disso, o agente de biocontrole penetra as hifas do hospedeiro e degrada suas células através de enzimas, conseqüentemente levando este à morte (MELLO *et al.*, 2020).

No mecanismo de ação chamado de antibiose, ocorre a produção de metabólitos secundários por *Trichoderma* spp., que depende da capacidade do agente de biocontrole produzir certos compostos, voláteis ou não voláteis, tóxicos a outros patógenos. Tais compostos são originários de rotas secundárias do metabolismo do antagonista, como por exemplo, os terpenóides, peptaibols, pironas e policetídeos (RAMADA *et al.*, 2019).

Além disso, *Trichoderma* spp. também tem a capacidade de induzir a expressão de genes relacionados a defesa das plantas e promover crescimento, apesar da presença do patógeno (BOTELHO, 2022). Rubio *et al.* (2014), verificaram que *T. parareesei* foi capaz de melhorar a defesa de tomateiro contra *B. cinerea*,

além de beneficiar o desenvolvimento das raízes e promover o crescimento sob estresse salino.

De acordo com Stadnik e Bettioli (2000), o parasitismo indica uma relação nutricional entre dois seres vivos em que um dos componentes da relação, o parasita, possui todo ou parte de seu alimento às custas do outro componente, o hospedeiro.

Trichoderma possui também característica hiperparasita, no qual pode identificar e localizar hifas de fungos suscetíveis, crescendo em sua direção, em resposta a estímulos químicos produzidos pela hifa hospedeira, formar estruturas semelhantes a apressórios e enrolar-se fortemente em toda a sua extensão para, então, penetrar e digerir a hifa (MELO, 1998).

Além disso, os metabólitos gerados a partir da interação entre planta e *Trichoderma* spp. também atuam sobre a estrutura radicular das plantas, aumentando o comprimento da raiz lateral e primária que resulta na eficácia da absorção de nutrientes pela planta (NUR *et al.*, 2020).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Fitopatologia, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus de Curitibanos, em Curitibanos, SC no período de fevereiro a maio de 2022.

3.1. OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE *TRICHODERMA* SPP. E DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Os isolados de *Trichoderma* spp. estavam armazenados pelo método de Castellani (FIGUEIREDO, 1967), na micoteca do laboratório de Fitopatologia. Esses isolados foram obtidos de solo de pastagem, floresta e cultivo de soja no município de Brunópolis, SC em 2017 (MEDRADO, 2019), sob números identificadores de quatro dígitos MCCR/SC0000 (Tabela 1).

Tabela 1 – Isolados de *Trichoderma* spp. com informações sobre sua localização e códigos de identificação em laboratório.

Isolados	Origem (Cidade/UF)	Nome científico	Coordenadas UTM
MCCR/SC1146 (Comercial)	São Paulo/SP	<i>Trichoderma harzianum</i>	-
MCCR/SC1152	Brunópolis/SC	<i>Trichoderma</i> spp.	E 516511 / N 6986702
MCCR/SC1198	Brunópolis/SC	<i>Trichoderma</i> spp.	E 516906 / N 6986446
MCCR/SC1264	Brunópolis/SC	<i>Trichoderma</i> spp.	E 517695 / N 6985933
MCCR/SC1275	Brunópolis/SC	<i>Trichoderma</i> spp.	E 517793 / N 6985870

Fonte: Medrado (2019).

Legenda: Coordenadas baseadas em latitude e longitude. Coordenadas para *T. harzianum* não são mostradas uma vez que sua localização não está descrita na etiqueta do produto. Todos os isolados listados acima foram utilizados no teste de controle biológico.

Os fungos fitopatogênicos *C. candelabrum*, *B. cinerea*, *Alternaria* spp., e *Fusarium* spp. foram obtidos da micoteca do laboratório de Fitopatologia, e estavam armazenados pelo método de Castellani (ALFENAS; MAFIA, 2007), identificados e fechados hermeticamente com tampas de borracha.

3.2 REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS DE *TRICHODERMA* SPP. E DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Para este ensaio foram utilizados cinco isolados de *Trichoderma* spp. (Tabela 1), conforme estudo realizado por Medrado (2019) e que permanecem armazenados em frascos de penicilina pelo método de Castellani em condições

ambientais. Posteriormente, foram repicados em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) com antibiótico (estreptomicina e penicilina) 500 mg L⁻¹ e Tween 20[®] a 0,5% colocando-se um disco de micélio (5 mm de diâmetro) no centro das placas de Petri contendo de 15 a 20 mL de meio de cultura BDA acrescido de antibiótico penicilina (1µL de antibiótico para cada 1 mL de meio).

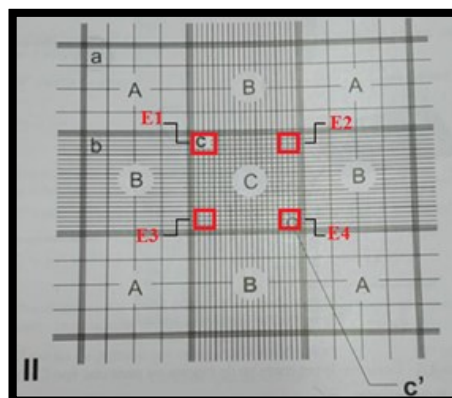
As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas em câmara de crescimento a temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. (GRAF JUNIOR, 2021).

3.3 CONTAGEM DE CONÍDIOS EM CAMARA DE NEUBAUER

Com o objetivo de verificar a produção de conídios, foi realizada a contagem dos mesmos produzidos pelos cinco isolados de *Trichoderma* spp. testados. Em cada placa de Petri foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada. A superfície da colônia foi raspada com auxílio de uma alça de Drigalski de vidro, separando os conídios do fungo do meio de cultura, e em seguida, a solução de esporos foi filtrada em gaze (ALFENAS; ZAUZA; MAFIA, 2007).

Posteriormente, com o auxílio de uma pipeta de plástico, foi coletada 1 mL e observado a contagem em câmara de Neubauer – hemacitômetro (Figura 6) (KOIKE; LUCON, 2003; MUNIZ *et al.*, 2018) acoplado ao microscópio óptico (Olympus[®], modelo CX22), junto ao software Future Winjoe[®], sendo avaliada uma lâmina por placa (COSTA e CARVALHO *et al.*, 2011).

Figura 6 – Câmara de Neubauer utilizada para contagem de conídios de *Trichoderma* spp.



Fonte: Autora, 2023.

Legenda: Câmara de Neubauer, com ênfase nos quadrantes (área dentro dos subcompartimentos vermelhos – E1, E2, E3 e E4) utilizados para contagem de conídios de *Trichoderma* spp.

Em seguida, as imagens adquiridas foram avaliadas no software GIMP versão 2.10.14, sendo marcados os conídios, e após, quantificados e tabelados utilizando o pacote EImage do software R. Na contagem, foi considerado o quadrante C' da câmara de Neubauer (ALFENAS; ZAUZA; MAFIA, 2007). Os resultados foram expressos como quantidade de conídios por mililitro (conídios/mL).

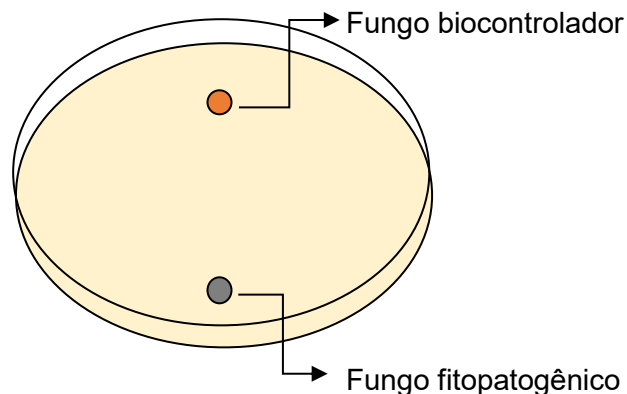
Após calculada a média dos conídios nos 4 quadrantes escolhidos (em destaque vermelho na Figura 6), foram realizados os cálculos necessários para obter o número de conídios por mL a partir da fórmula proposta por Zauza; Alfenas e Mafia (2007):

$$N^{\circ} \text{ médio de conídios em } c' \times 4,0 \times 10^6 = \text{conídios/mL} \quad (1)$$

3.4 TESTE DE PAREAMENTO DE CULTURAS *IN VITRO*

A atividade antagônica dos isolados de *Trichoderma* spp. foi avaliada pelo método de culturas pareadas, conforme descrito por Mello *et al.* (2007). Discos de ágar contendo micélio dos fungos *C. candelabrum*, *B. cinerea*, *Alternaria* spp., e *Fusarium* spp. e dos cinco isolados de *Trichoderma* spp. foram retirados de colônias e depositados, em extremidades opostas a 1 cm da borda das placas de Petri contendo meio BDA solidificado (Figura 7). Ambos os fungos foram inoculados no mesmo dia.

Figura 7 – Esquema do experimento de pareamento de fungos fitopatogênicos.



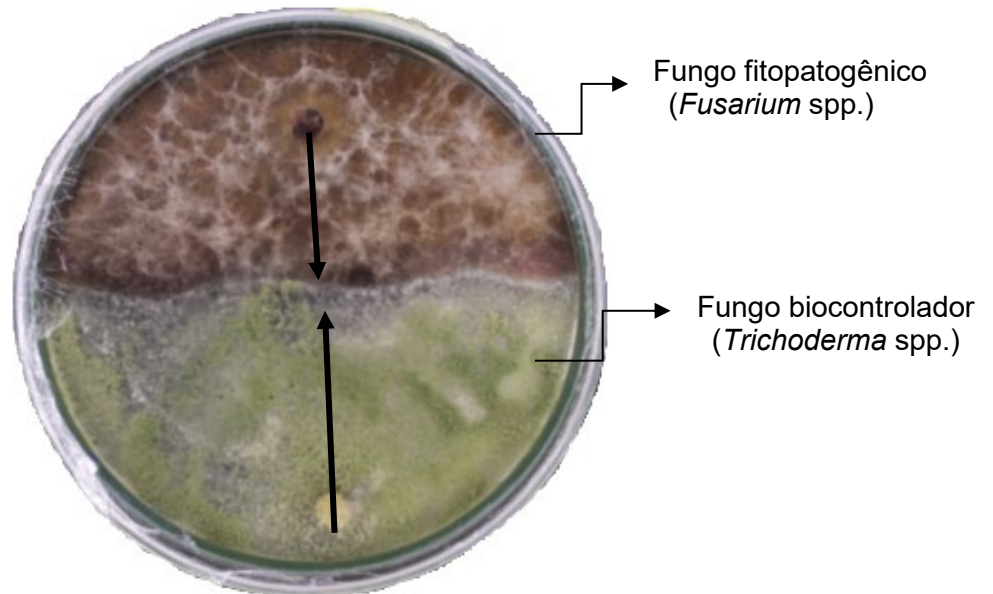
Fonte: Autora, 2023 – Microsoft Paint.

Como testemunha, foi utilizado placas de Petri contendo apenas um disco de micélio do patógeno no centro da placa com ausência de qualquer antagonista, onde cada placa de Petri foi considerada uma repetição. Em seguida, as placas foram

vedadas e acondicionadas em câmara de crescimento à temperatura constante de 25°C e fotoperíodo de 12 horas (CARVALHO *et al.*, 2011). Os experimentos foram realizados com cinco repetições e as avaliações iniciaram após 24 horas da instalação do experimento.

O crescimento micelial do fitopatógeno e do antagonista foram medidos com o auxílio de uma régua milimetrada, a partir de uma reta iniciando do centro de cada disco de cultura em direção ao meio da placa (Figura 8). As medidas foram realizadas, até que o tratamento controle atingisse 90% do diâmetro da placa.

Figura 8 – Esquema de avaliação do crescimento micelial dos fitopatógenos e dos antagonistas estudados.



Fonte: Autora, 2023 – Microsoft Paint.

Dessa forma, com os dados obtidos referente ao crescimento das colônias fúngicas, foram calculados a Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM) e o Índice de Velocidade do Crescimento Micelial (IVCM).

A avaliação da AACCM foi obtida através da fórmula (2) adaptada de Shaner e Finney (1977):

$$\text{AACCM} = \sum \left(\frac{y_{i+1} + y_i}{2} \right) \cdot (t_{i+1} - t_i) \quad (2)$$

Para o IVCM, o cálculo foi realizado de acordo com a fórmula proposta por Maguire (1962) e adaptada por Oliveira (1992) através da fórmula (3):

$$\text{IVCM} = \frac{\sum \frac{(y_{i+1} - y_i)}{(t_{i+1} - t_i)}}{(n-1)} \quad (3)$$

Para ambas as equações, y_i e y_{i+1} são os valores médios do diâmetro da colônia observados em duas avaliações consecutivas; t_{i+1} e t_i são os períodos das avaliações e n é o número de avaliações. Tanto a AACCM quanto o IVCM, foram convertidos em porcentagem de inibição e porcentagem de redução do crescimento.

Com os dados de AACCM e IVCM, foi calculado a Porcentagem de Inibição do Crescimento Micelial (PIC) por meio da fórmula (4) proposta por Menten *et al.* (1976):

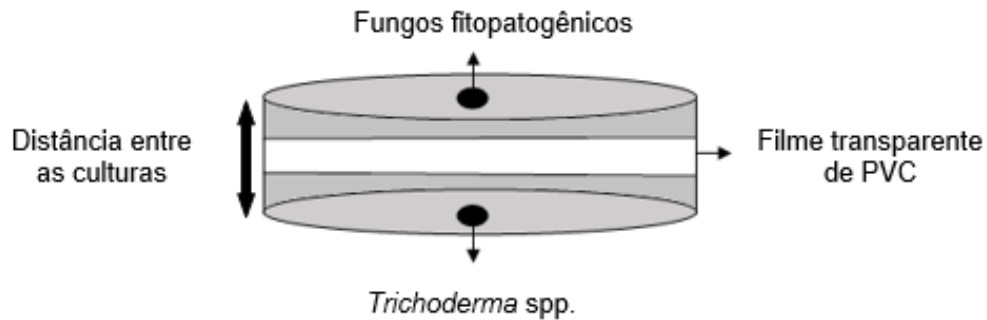
$$\text{PIC} = \frac{\text{média da testemunha} - \text{média do tratamento}}{\text{média da testemunha}} \cdot 100 \quad (4)$$

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) e composto por seis tratamentos (cinco isolados de *Trichoderma* spp. e uma testemunha com ausência do antagonista) e cinco repetições, sendo que cada repetição foi composta por uma placa de Petri. A análise de variância foi realizada no Software R para avaliar se houve diferença entre os tratamentos e realizado ainda o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.5 TESTE DE AVALIAÇÃO DO EFEITO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS

Conforme descrito por Bharat *et al.* (1980), o método consistiu em posicionar fundos de placas de Petri umas sobre as outras, após ter vertido 20 mL de meio BDA solidificado em cada uma delas. Na extremidade inferior, cada uma das placas recebeu um disco de BDA (5 mm de diâmetro) colonizado por *Trichoderma* spp. Após 24 horas, placas de tamanho correspondente contendo BDA receberam ao centro, um disco de BDA (5 mm de diâmetro) colonizado pelo patógeno. Em seguida, as placas contendo antagonista e patógeno foram sobrepostas formando uma atmosfera compartilhada. A distância entre as culturas foi de 28,6 mm, aproximadamente (Figura 9).

Figura 9 – Diagrama do experimento de inibição do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos expostos aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp.

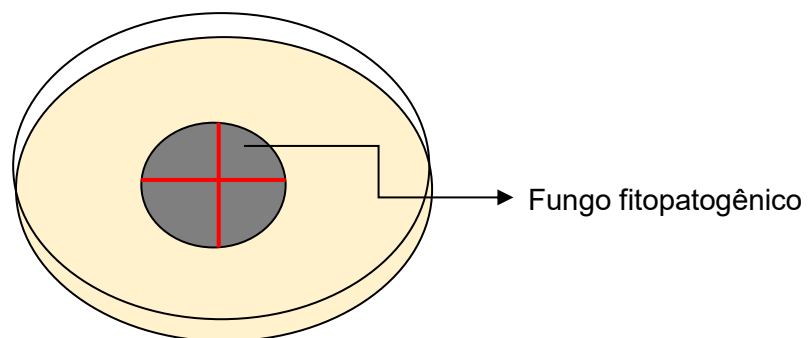


Fonte: Autora, 2023 – Microsoft Paint.

O conjunto de placas foi vedado lateralmente de maneira que as placas contendo o patógeno ficassem na posição superior. A testemunha foi representada por placas contendo os fungos patogênicos, mas sem o antagonista na parte inferior. Posteriormente, os conjuntos foram incubados em câmara de crescimento em temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações referentes ao efeito de metabólitos voláteis no crescimento do patógeno nas placas contendo o patógeno e *Trichoderma* spp., foram iniciadas após 24 horas da instalação do experimento, utilizando-se uma régua graduada, realizando as medições dos diâmetros verticais e horizontais da colônia do fungo fitopatogênico (Figura 10).

Figura 10 – Esquema das medições dos diâmetros verticais e horizontais do crescimento micelial do fungo fitopatogênico.



Fonte: Autora, 2023 – Microsoft Paint.

Com os dados obtidos referentes ao crescimento dos fungos, foram calculados a Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM) e o Índice de Velocidade do Crescimento Micelial, por meio das fórmulas 2 e 3, citadas no item 3.4.

Através dos dados de AACCM e IVCM, foi possível determinar a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), por meio da fórmula (4) proposta por Menten *et al.* (1976) já mencionada acima, os quais foram convertidos em porcentagem de inibição e porcentagem de redução da velocidade do crescimento do fitopatógeno.

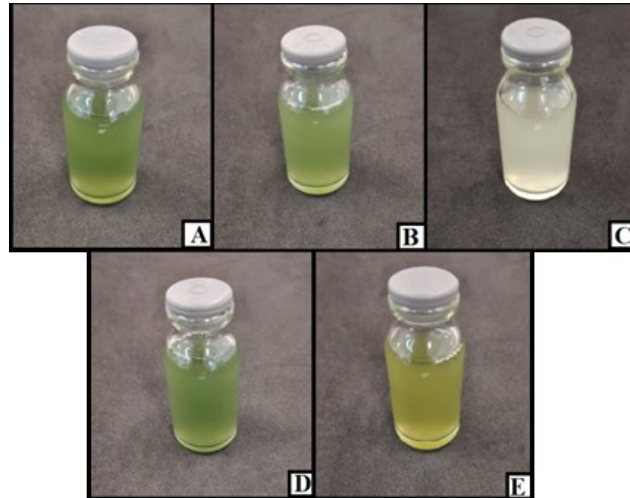
O delineamento foi inteiramente casualizado contendo cinco repetições por tratamento mais o controle. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, empregando-se o software R.

3.6 TESTE DE AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS NÃO VOLÁTEIS

Para avaliar o potencial dos compostos não voláteis, os fungos antagonistas foram cultivados em meio BDA e após 10 dias, o micélio foram retirados através da raspagem com auxílio de uma alça de Drigalski. Em seguida, a solução de água com o micélio foram filtradas em gaze e adicionados em frascos na proporção de 30% em água e, posteriormente autoclavadas (Figura 11).

Após a solidificação do meio, foram preparadas placas de Petri com o filtrado de cada antagonista e em seguida, um disco de micélio (5 mm de diâmetro) retirado de culturas dos fitopatógenos foi alocado no centro de cada placa de Petri contendo meio BDA com o filtrado dos antagonistas. No tratamento testemunha o meio foi composto somente de BDA. As placas foram vedadas e incubadas em câmara de BOD a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas.

Figura 11 – Frascos com filtrados dos isolados de *Trichoderma* spp. utilizados para o teste.



Legenda: A) *Trichoderma harzianum* (comercial); B) MCCR/SC1152; C) MCCR/SC 1198; D) MCCR/SC 1264 e E) MCCR/SC 1275.

Fonte: Autora, 2023.

Com os resultados obtidos referentes ao crescimento dos fungos, foram calculados o Índice de Velocidade do Crescimento Micelial (IVCM) e a Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM). Após foi determinada a percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), por meio da fórmula (4) proposta por Menten *et al.* (1976) já mencionados anteriormente.

As medições do diâmetro dos discos foram realizadas diariamente e as avaliações encerraram-se quando toda a superfície do meio, nas placas testemunhas, apresentaram-se colonizadas pelos patógenos.

O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC) contendo cinco repetições por tratamento. Os dados obtidos no teste foram submetidos à análise de variância para verificação da significância e, quando significativos, foi aplicado o teste de comparação de médias pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, com auxílio do software R.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS DE *TRICHODERMA* SPP. E DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

A reativação dos cinco isolados de *Trichoderma* spp. e dos quatro fungos fitopatogênicos que estavam armazenados pelo método de Castellani, apresentaram resultados positivos, pois além de um maior tempo de armazenamento os mesmos apresentaram crescimento quando cultivados em meio de cultura BDA.

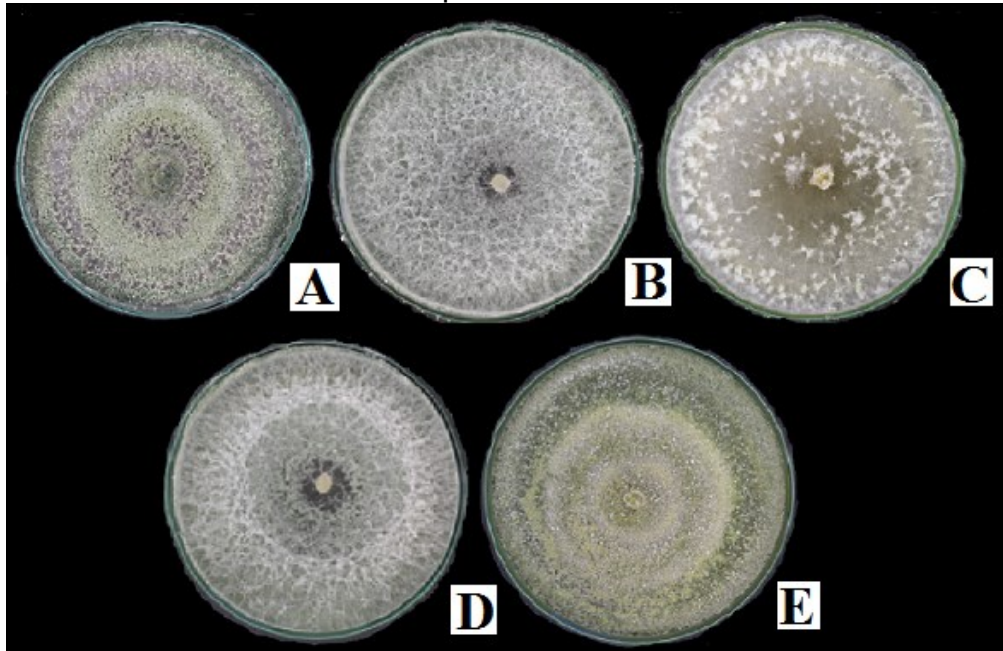
O método de Castellani é vastamente utilizado por apresentar fácil execução, baixo custo e por possuir uma significativa recuperação dos microrganismos armazenados. Além disso, essa técnica não necessita da realização de cultivos contínuos, podendo levar a contaminação, além de que muitos isolados fúngicos podem perder suas características macroscópicas, voltando a apresentá-las após a conservação em água destilada (CASTELLANI, 1963).

Pelas vantagens apresentadas pelo método de armazenamento em Castellani, essa técnica já vem sendo empregada há muitos anos apresentando eficiência. Estudos que apoiam esse método de conservação é o de Passador *et al.*, (2000), onde avaliaram 11 culturas de *Verticillium fungicola* conservadas pelo método de Castellani durante 15 anos quanto a viabilidade, patogenicidade frente a cogumelos e esporulação, concluíram que as culturas permaneceram viáveis e as características morfológicas e de patogenicidade estavam mantidas.

Em estudo realizado por Passador *et al.* (2010) avaliando a eficiência dos métodos de preservação no que se refere à manutenção da viabilidade e patogenicidade pelo método de Castellani, foram selecionadas as espécies fúngicas (*Fusarium oxysporum*, *Verticillium fungicola* e *V. dahliae*), preservadas por períodos que variaram de 6 a 34 anos notaram resultados positivos com a utilização da técnica de armazenamento de fungos fitopatogênicos. Após o período de estocagem dos isolados, os mesmos não perderam sua viabilidade e nem a patogenicidade que apresentavam antes de serem armazenados, ressaltando que essa técnica não altera o comportamento dos organismos.

Na Figura 12 constam as imagens dos isolados de *Trichoderma* spp. utilizados nos ensaios.

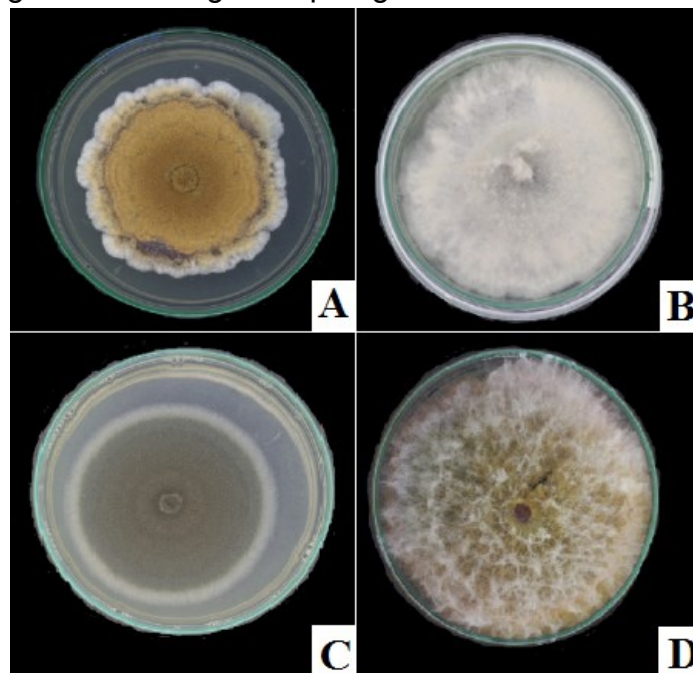
Figura 12 – Isolados de *Trichoderma* spp. em meio de cultura BDA utilizados nos experimentos.



Legenda: (A) Fungo comercial da espécie *Trichoderma harzianum* (SC1146); (B) SC1152; (C) SC1198; (D) SC1264; e (E) SC1275.
Fonte: Autora, 2023.

O mesmo foi realizado para os fungos *C. candelabrum*, *B. cinerea*, *Alternaria* spp. e *Fusarium* spp., como estão demonstrados abaixo (Figura 13).

Figura 13 – Fungos fitopatogênicos em meio de cultura BDA.



Legenda: (A) *Cylindrocladium candelabrum*, (B) *Botrytis cinerea*, (C) *Alternaria* spp. e (D) *Fusarium* spp.
Fonte: Autora, 2023.

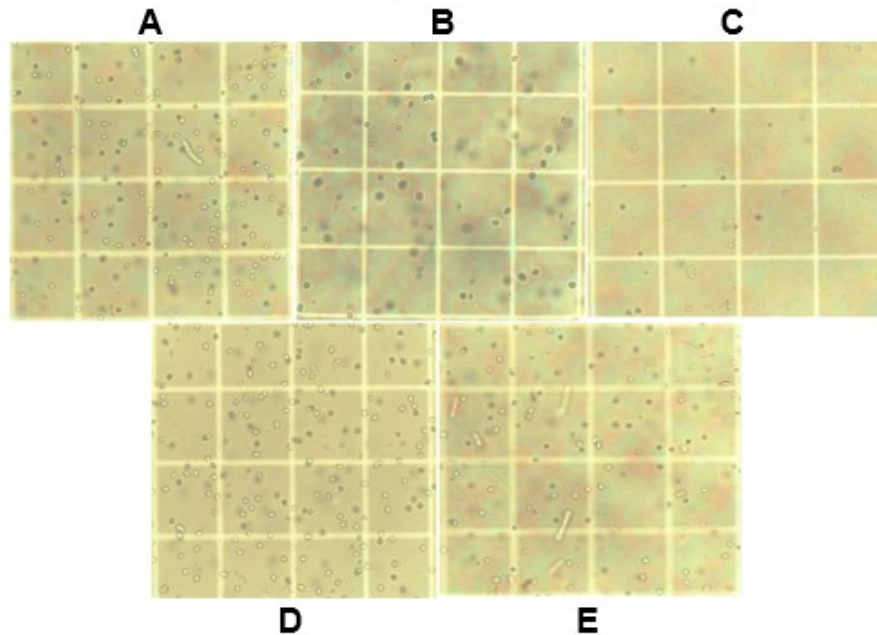
Como é possível observar acima (Figura 14 - A), o fungo *C. candelabrum* em meio de cultura BDA apresentou colônias com micélio possuindo coloração marrom bem visível no verso das placas de Petri (SILVA, 2013). Já o fungo *B. cinerea* (Figura 14 - B), em meio de cultura BDA produz colônia espessa, cotonosa e de coloração acinzentada (PAUL *et al.*, 1998). O fungo *Alternaria* spp. (Figura 14 - C) em meio de cultura BDA produz colônias com coloração acinzentada à marrom escura, com micélios com tonalidade verde oliva (PEIXOTO *et al.*, 2018). O fungo *Fusarium* spp. (Figura 14 - D) em meio de cultura BDA produz colônias com micélio aéreo abundante e coloração inicial esbranquiçada passando a amarelo-queimado, sendo semelhante às características descritas por Gerlach e Nirenberg (1982).

4.2 CONTAGEM DE CONÍDIOS EM CÂMARA DE NEUBAUER

Na figura abaixo (Figura 14), estão demonstradas as imagens capturadas dos isolados de *Trichoderma* spp. em Câmara de Neubauer para contagem dos conídios obtidos, onde é possível observar a quantidade de conídios produzidos por cada isolado no meio de cultura BDA.

Como é possível observar, o isolado SC1268 (Figura 14-D) foi o que apresentou maior número de conídios, seguido dos isolados SC1152 (Figura 14-B), *T. harzianum* (Figura 14-A), SC1275 (Figura 14-F) e o que apresentou menor número de conídios foi o isolado SC1198 (Figura 14-C). Esses resultados também podem ser observados na Tabela 2.

Figura 14 – Imagens capturadas dos isolados em Câmara de Neubauer para contagem dos conídios obtidos.



Legenda: (A) SC1146 (Comercial), (B) SC1152, (C) SC1198, (D) SC1264 e (E) SC1275.
Fonte: Autora, 2023.

Na Tabela 2 constam a quantidade de conídios produzidos por cada isolado de *Trichoderma* spp. avaliados em condições *in vitro*. Os resultados mostraram-se positivos para os isolados testados, dando destaque para o isolado SC1264, onde foi possível uma produção de $1,63 \times 10^9$ conídios/mL.

Tabela 2 – Número total de conídios/mL diluídos a 10^6 após sete dias de incubação (Temperatura: $25 \pm 2^\circ\text{C}$) e fotoperíodo de 12 horas), obtidos da esporulação de isolados do fungo *Trichoderma* spp.

Tratamentos	Conídios/mL
<i>T. harzianum</i>	$1,40 \times 10^9$
SC1152	$1,55 \times 10^9$
SC1198	$4,07 \times 10^8$
SC1264	$1,63 \times 10^9$
SC1275	$1,15 \times 10^9$

Fonte: Autora, 2023.

Quanto a produção de conídios dos demais isolados, de acordo com Stewart *et al.* (2010), o fato de não produzirem uma grande quantidade pode estar ligada à qualidade funcional do meio de cultura, mas ainda que tenham estudos voltados a fatores químicos, físicos, nutricionais e biológicos envolvidos no processo de

esporulação, não existe um conjunto de parâmetros satisfatórios e gerais aplicáveis para nenhuma espécie de fungo.

De acordo com Harman (2004), alguns isolados aumentam a superfície total do sistema radicular das plantas, além de permitir melhor o acesso aos elementos minerais. Altomare *et al.*, (1999), afirmam também que os isolados de *Trichoderma* spp. têm a capacidade de solubilizar e tornar disponível para a planta elementos como cobre, ferro, zinco, fósforo e zinco presentes no solo, podendo melhorar os mecanismos de absorção, e também, aumentar a eficiência da planta na utilização de nutrientes importantes, como o nitrogênio.

4.3 TESTE DE PAREAMENTO DE CULTURAS *IN VITRO*

Os resultados referente ao teste de pareamento constam na Tabela 3 e conforme os dados, para todos os isolados, o tratamento testemunha obteve o maior diâmetro final da colônia, diferenciando-se estatisticamente dos demais onde houve pareamento com os isolados de *Trichoderma* confirmando a possível produção de metabólitos tóxicos voláteis pelos mesmos. Entretanto, o nível de controle variou, dependendo do isolado e de sua adaptação às condições bióticas e abióticas específicas, dentro e entre espécies.

Durante o teste, todos os isolados de *Trichoderma* spp. foram capazes de inibir o crescimento dos fungos fitopatogênicos, pois foi possível observar a formação de um halo de inibição que prejudicou o crescimento micelial do fitopatógeno causado pelo antagonista.

Tabela 3 – Percentual de inibição da Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial obtidos pelo pareamento em placa de *Trichoderma* spp. contra os fungos *C. candelabrum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria* spp., e *Fusarium* spp.

Percentual de inibição de Crescimento Micelial (PIC %)				
Tratamentos	<i>Cylindrocladium candelabrum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.
Testemunha	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a
<i>T. harzianum</i>	40,1b	28,6b	48,8b	30,4b
SC1152	48,6c	27,6b	43,1b	59,3c
SC1198	43,2b	5,0a	44,8b	31,7b
SC1264	49,8c	38,1c	52,4b	34,5b
SC1275	52,5c	24,9b	54,0b	32,4b
CV (%)	4,73	7,43	14,29	16,50

Médias na coluna seguida de mesma letra não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

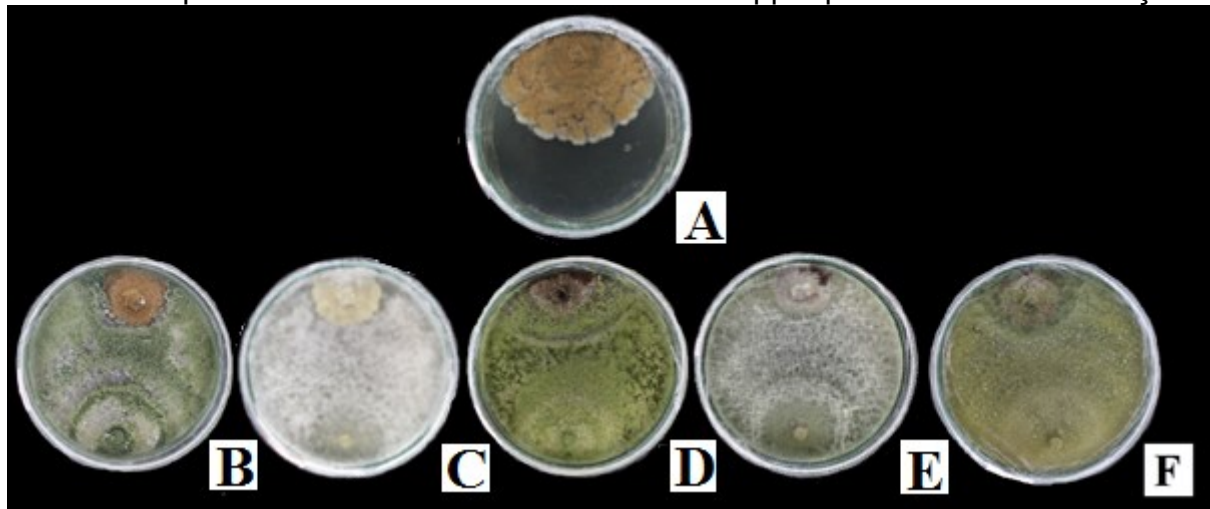
CV – Coeficiente de variação.

Fonte: Autora, 2023.

De acordo com Druzhinina *et al.* (2018), em estudos ecofisiológicos realizados foi demonstrado que todas as espécies de *Trichoderma* são capazes de parasitar fungos fitopatogênicos e oomicetos, em maior ou menor escala. No entanto, entre os isolados de *Trichoderma* spp. houve diferença de resposta ao antagonismo com os fungos *C. candelabrum*, *B. cinerea*, *Alternaria* spp. e *Fusarium* spp. Como pode ser observado na Tabela 2, alguns isolados de *Trichoderma* spp. podem apresentar maior potencial de inibição de um fitopatógeno e podem ser ineficientes para outros, como é o caso do isolado SC1275 que foi eficiente para *C. candelabrum*, *Alternaria* spp., e *Fusarium* spp. porém foi ineficiente para *B. cinerea*, no qual apresentou menor eficiência que o *T. harzianum*. O que possivelmente explica essas diferenças observadas no desempenho dos isolados é o fato de que os mecanismos de ação são características de cepas específicas.

No teste de pareamento (Tabela 2, Figura 15) para o fungo *C. candelabrum*, os isolados SC1275 e SC1264 inibiu em 52,5% e 49,8%, respectivamente o crescimento micelial do patógeno, e os isolados SC1152, SC1198 e *T. harzianum* foram responsáveis por 48,6%, 43,2% e 40,1%, respectivamente, apresentando menor controle micelial.

Figura 15 – Fotografia do fungo *Cylindrocladium candelabrum* em placa de Petri com meio BDA pareado com isolados de *Trichoderma* spp. após 16 dias de incubação.

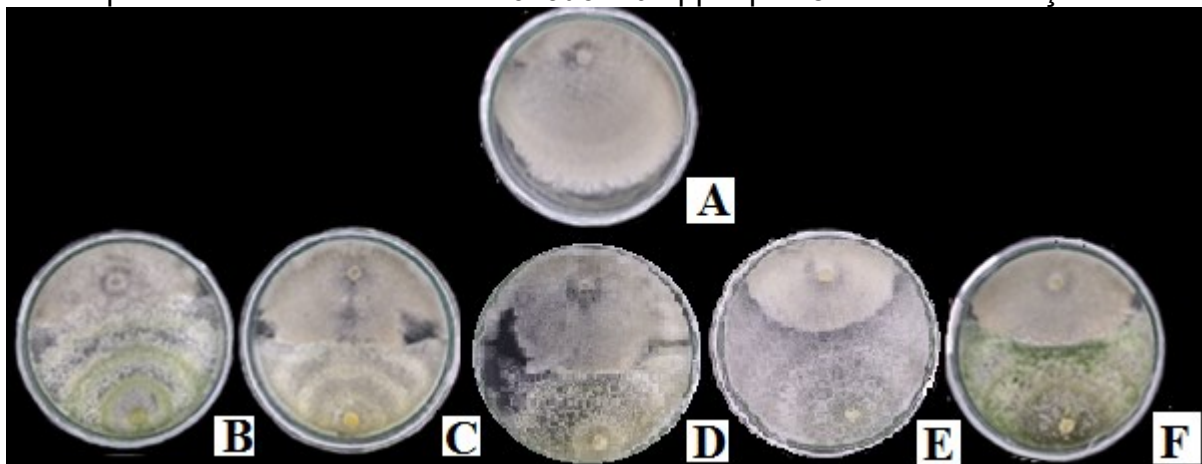


Legenda: (A) Testemunha com o fungo *Cylindrocladium candelabrum*; (B) Fungo comercial da espécie *Trichoderma harzianum* (SC1146); (C) SC1152; (D) SC1198; (E) SC1264 e (F) SC1275.

Fonte: Autora, 2023.

Para o fungo *B. cinerea* no teste de pareamento (Tabela 2, Figura 16), os isolados SC1264 e *T. harzianum* inibiram em 38,1% e 28,6%, respectivamente o crescimento micelial do patógeno, e os isolados SC1152, SC1275 e SC1198 foram responsáveis por 27,6%, 24,9% e 5,0%, respectivamente.

Figura 16 – Fotografia do fungo *Botrytis cinerea* em placa de Petri com meio BDA pareado com isolados de *Trichoderma* spp. após 5 dias de incubação.

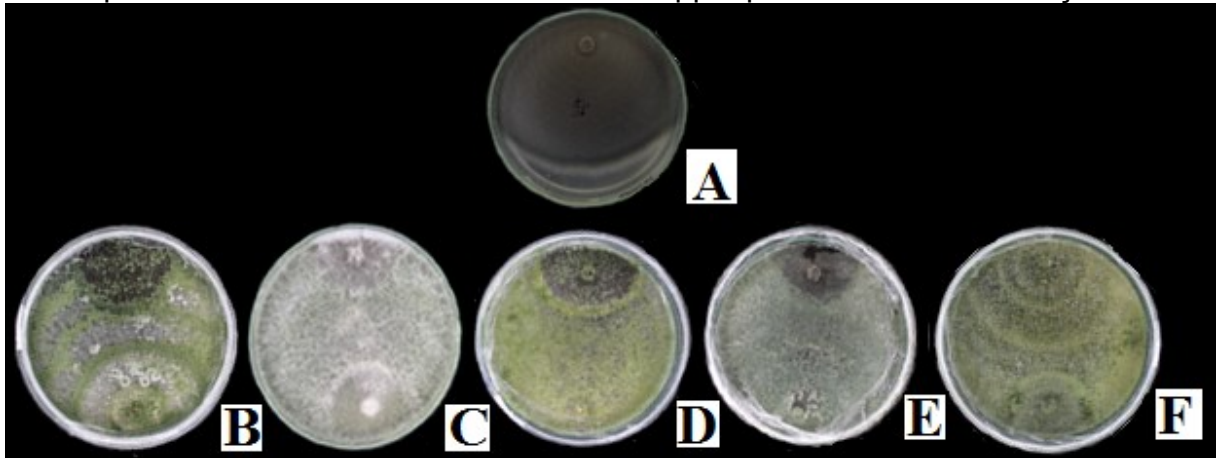


Legenda: (A) Testemunha; (B) Fungo comercial da espécie *Trichoderma harzianum* (SC1146); (C) SC1152; (D) SC1198; (E) SC1264 e (F) SC1275.

Fonte: Autora, 2023.

Os isolados que apresentaram maior inibição do crescimento micelial de *Alternaria* spp. (Tabela 2, Figura 17) foram SC1275 e SC1264, apresentando 54,0% e 52,4% de inibição. Os demais isolados, apresentaram menor porcentagem de inibição, sendo eles: *T. harzianum* (48,8%), SC1198 (44,8%) e SC1152 (43,1%).

Figura 17 – Fotografia do fungo *Alternaria* spp. em placa de Petri com meio BDA pareado com isolados de *Trichoderma* spp. após 14 dias de incubação.



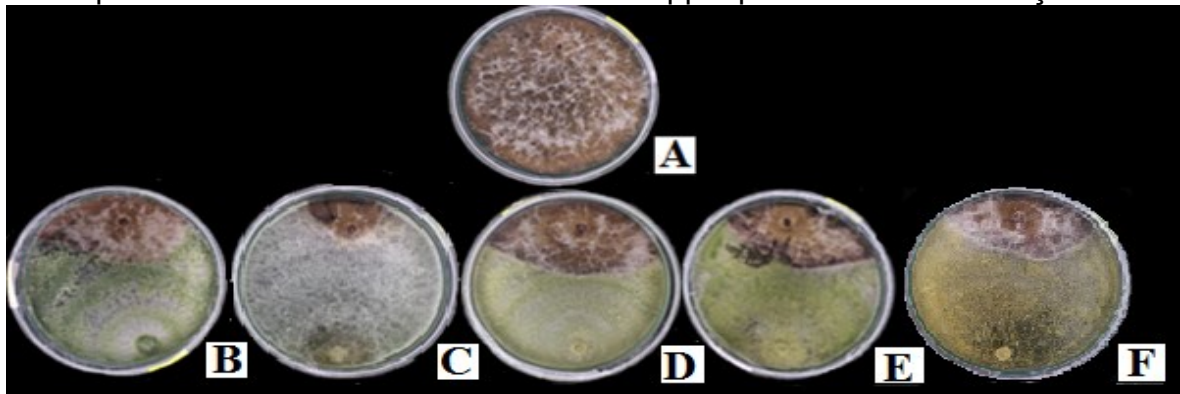
Legenda: (A) Testemunha; (B) Fungo comercial da espécie *Trichoderma harzianum* (SC1146); (C) SC1152; (D) SC1198; (E) SC1264 e (F) SC1275.

Fonte: Autora, 2023.

Resultados semelhantes foram obtidos por Nozaki *et al.* (2018), em um estudo de pareamento *in vitro* realizado contra o fungo *Alternaria* spp., onde os isolados de *Trichoderma* spp. usados foram coletados dos solos da região de Toledo – PR. Os isolados que apresentaram maiores porcentagens de inibição foram: *T. longibrachiatum*: 100%; *T. harzianum*: 68,33% e *T. virens*, com 68,06%.

Em contato com o fitopatógeno *Fusarium* spp., os isolados de *Trichoderma* spp. também apresentaram maior crescimento micelial (Tabela 2, Figura 18), sendo os isolados SC1152 e SC1264 foram os que mais inibiram o crescimento micelial do patógeno, controlando 59,3% e 34,5%, respectivamente. Os isolados que apresentaram menor controle micelial, foram SC1275, SC1198 e *T. harzianum*, apresentando 32,4%, 31,7% e 30,4%.

Figura 18 – Fotografia do fungo *Fusarium* spp. em placa de Petri com meio BDA pareado com isolados de *Trichoderma* spp. após 9 dias de incubação.



Legenda: (A) Testemunha; (B) Fungo comercial da espécie *Trichoderma harzianum* (SC1146); (C) SC1152; (D) SC1198; (E) SC1264 e (F) SC1275.

Fonte: Autora, 2023.

Carvalho *et al.* (2011) em estudo avaliando *in vitro* o controle de *F. oxysporum* observaram que três isolados de *T. harzianum* após o contato com as colônias de *F. oxysporum*, invadiram totalmente a colônia do fitopatógeno. Esses isolados chegaram a produzir esporos sobre as colônias, evidenciando o potencial de algumas espécies de *Trichoderma* no antagonismo deste fitopatógeno.

De acordo com Bosah *et al.* (2010), o teste de cultura pareada apresenta grande importância na área de controle biológico de fitopatógenos, uma vez que o alto desempenho neste teste indica que o isolado avaliado é eficaz quanto a capacidade para a rápida colonização das estruturas do patógeno, expandindo o potencial do isolado para desempenhar o hiperparasitismo e sobretudo, competição por espaço e nutrientes.

No teste de pareamento, foi possível ressaltar que alguns isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram maior agressividade que outros, crescendo por cima do patógeno e ocupando 100% da placa de Petri, como foi o caso de algumas repetições dos isolados de *Trichoderma* spp. De acordo com Chagas *et al.*, (2016), o rápido crescimento dos isolados de *Trichoderma* spp. em relação aos fitopatógenos *C. candelabrum*, *B. cinerea*, *Alternaria* spp., e *Fusarium* spp. pode indicar que estes isolados podem ser altamente competitivos por espaço e nutrientes em meio de cultura BDA.

Os mecanismos de ação para o controle de fungos fitopatogênicos conhecidos em espécies de *Trichoderma* são o micoparasitismo, antibiose e competição. De maneira geral, quanto mais mecanismos distintos o isolado proporciona, melhor seu potencial de controlar o fitopatógeno (MONTE; BETTIOL; HERMOSA, 2019).

Na Tabela 4, estão demonstradas a porcentagem da redução da velocidade de crescimento micelial obtidos pelo pareamento de culturas *in vitro* por isolados de *Trichoderma* spp. Para *C. candelabrum* e *Alternaria* spp. o isolado SC1275 apresentou maior redução quando comparados aos demais isolados apresentando 80,5% e 81,3% de redução, respectivamente. Para *B. cinerea* o isolado SC1264, apresentou 66,8% de redução e para *Fusarium* spp., o isolado SC1152 apresentou 82,0% de redução da velocidade de crescimento micelial.

Tabela 4 – Redução da Velocidade de Crescimento Micelial (%) obtidos pelo pareamento em placa de *Trichoderma* spp. contra os fungos *C. candelabrum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria* spp., e *Fusarium* spp.

Redução da Velocidade de Crescimento Micelial (%)				
Tratamentos	<i>Cylindrocladium candelabrum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.
Testemunha	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a
<i>T. harzianum</i>	69,0b	43,2c	78,6b	59,0b
SC1152	78,6c	57,7d	76,3b	82,0c
SC1198	73,0b	29,0b	72,5b	58,9b
SC1264	78,3c	66,8d	79,7b	68,7b
SC1275	80,5c	44,9c	81,3b	62,6b
CV (%)	9,80	10,94	15,17	21,55

Médias na coluna seguida de mesma letra não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

CV – Coeficiente de variação.

Fonte: Autora, 2023.

Diante dos resultados alcançados nos testes de antagonismo em cultura pareada, pôde-se observar que os isolados de *Trichoderma* spp. (SC1275, *T. harzianum* e SC1152) foram os mais eficientes antagonistas para os fitopatógenos avaliados no presente estudo. O menor potencial antagonista apresentado pelos demais isolados (SC1264 e SC1198) pode ser em virtude de uma maior competição pelos nutrientes do meio, ou uma menor produção de enzimas protease e cisteína produzidas pelas espécies de *Trichoderma* spp. que suspendem a capacidade enzimática dos fitopatógenos (BOMFIM *et al.*, 2010).

O alto potencial antagonista de alguns isolados de *Trichoderma* spp. apresentado no presente trabalho pode ser atribuído dois mecanismos de ação pertencente ao gênero *Trichoderma*, o micoparasitismo e a competição (MELO, 1998), sendo a competição considerado um dos mais antigos mecanismos de biocontrole existentes (HARMAN, 2000).

Segundo Melo (1996), a competição é um mecanismo baseado na interação entre dois ou mais organismos, interessados em uma mesma ação, onde os mesmos competem entre si em busca de obter nutrientes do meio, espaço, luz, oxigênio, fatores de crescimento, entre outros. Nesse mecanismo de controle, *Trichoderma* parasita de forma direta as estruturas do fitopatógeno, por penetração e colonização das hifas (MEDEIROS; SILVA; PASCHOLATI, 2018).

Portanto, os isolados de *Trichoderma* spp. demonstraram-se eficientes na utilização como controle biológico de fitopatógenos que frequentemente atacam diversas culturas, nos testes de antagonismo *in vitro* em cultivo pareado. Porém, somente a realização do teste de pareamento de culturas não demonstra a importância da antibiose e de outros mecanismos de ação envolvidos no controle dos fitopatógenos em condições *in vitro*, por isso torna-se necessário a realização de outros testes, sendo eles: teste de metabólitos voláteis e teste de metabólitos não voláteis.

4.4 TESTE DE AVALIAÇÃO DO EFEITO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS

Os resultados observados em relação ao efeito de metabólitos voláteis constam na Tabela 5. Os isolados de *Trichoderma* apresentaram diferentes respostas em relação a inibição do crescimento do patógeno. Em relação ao percentual de inibição do crescimento micelial, todos os isolados testados diferiram estatisticamente da testemunha, evidenciando que de alguma maneira todos apresentaram uma produção de metabólitos capazes de inibir o crescimento micelial. Provavelmente, isso ocorre pelo fato de fungo do gênero *Trichoderma* produzirem metabólitos extracelulares difusíveis que inibem o crescimento de patógenos (MICHEREFF *et al.*, 1993).

Tabela 5 – Percentual de inibição da Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial de *C. candelabrum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria* spp. e *Fusarium* spp., submetidos a efeito de metabólitos voláteis produzidos *in vitro* por isolados de *Trichoderma* spp.

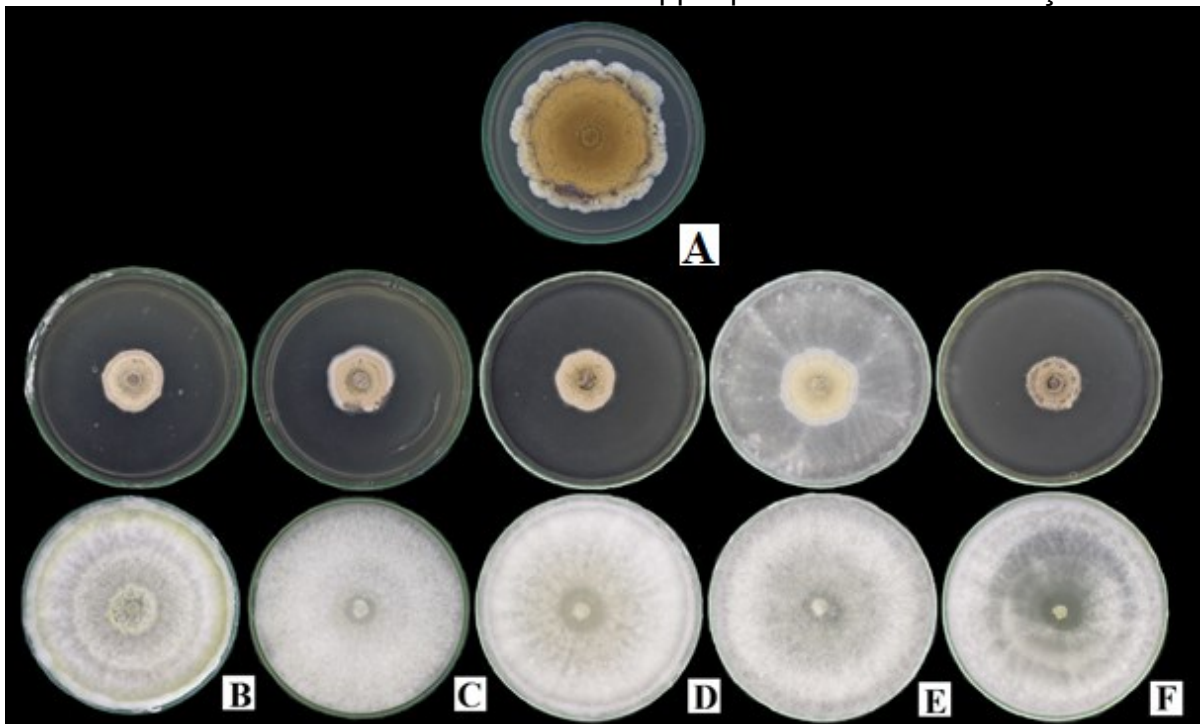
Porcentagem de inibição de Crescimento Micelial (PIC %)				
Tratamentos	<i>Cylindrocladium candelabrum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.
Testemunha	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a
<i>T. harzianum</i>	25,8c	3,88 ^a	3,75b	21,7a
SC1152	25,2c	3,44 ^a	2,90b	21,8a
SC1198	28,5c	3,77 ^a	0,42a	5,47a
SC1264	16,1b	2,75 ^a	4,38b	21,6a
SC1275	30,8c	5,16 ^a	6,09b	19,7a
CV (%)	5,66	5,06	1,35	14,87

Médias na coluna seguida de mesma letra não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. CV – Coeficiente de variação.

Fonte: Autora, 2023.

Nos ensaios conduzidos, o tratamento controle colonizou a maior parte da superfície do meio de cultura. Nos tratamentos com exposição aos metabólitos voláteis foi observada uma redução no crescimento micelial dos fitopatógenos em comparação ao tratamento controle. Os tratamentos SC1275 e SC1198, produziram efeito fungistático sobre o fitopatógeno *C. candelabrum*, apresentando 30,8% e 28,5% de inibição, respectivamente (Tabela 4, Figura 19).

Figura 19 – Colônias de *Cylindrocladium candelabrum* após exposição aos metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. após 13 dias de incubação.

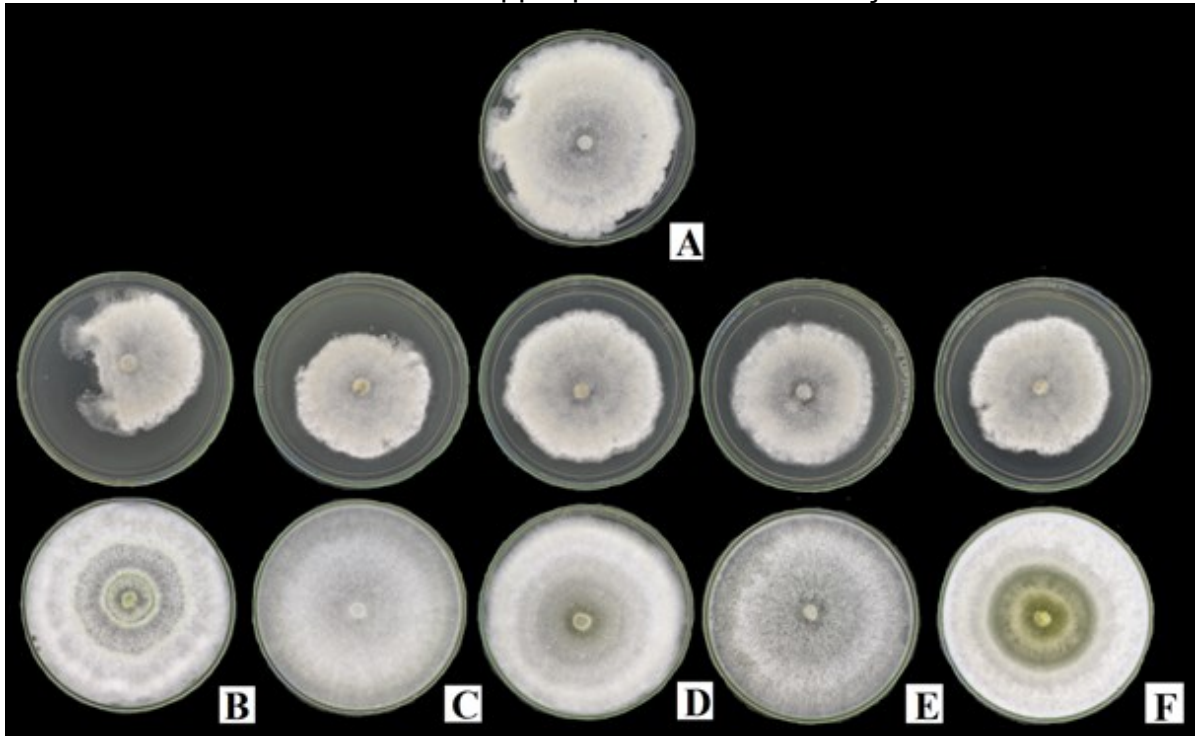


Legenda: (A) Testemunha; (B) Fungo comercial da espécie *Trichoderma harzianum* (SC1146); (C) SC1152; (D) SC1198; (E) SC1264 e (F) SC1275.

Fonte: Autora, 2023.

Em relação ao fungo *B. cinerea* não houve diferença estatística para nenhum dos isolados estudados (Tabela 4, Figura 20).

Figura 20 – Colônias de *Botrytis cinerea* após exposição aos metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. após 5 dias de incubação.

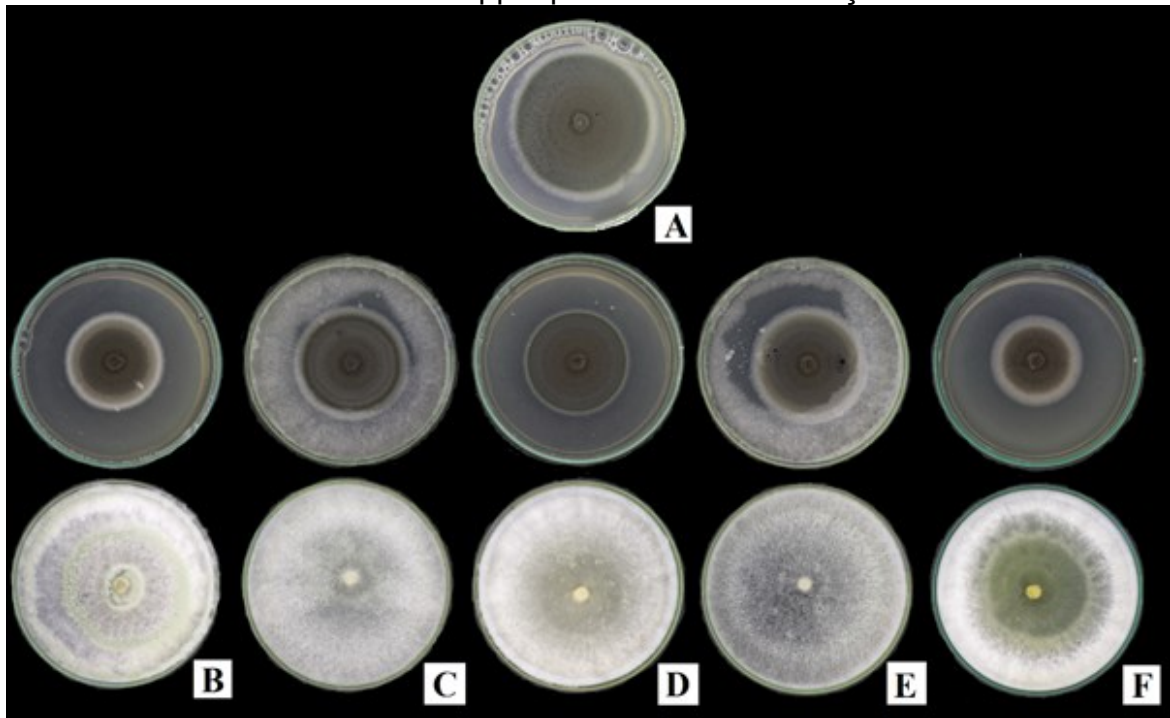


Legenda: (A) Testemunha; (B) Fungo comercial da espécie *Trichoderma harzianum* (SC1146); (C) SC1152; (D) SC1198; (E) SC1264 e (F) SC1275.

Fonte: Autora, 2023.

Os isolados que apresentaram maiores resultados de inibição do crescimento micelial de *Alternaria* spp. (Tabela 4, Figura 21) foram SC1275 e SC1264, apresentando 6,09% e 4,38% de inibição. Os demais isolados, apresentaram menor porcentagem de inibição, sendo eles: *T. harzianum* (3,75%), SC1152 (2,90%) e SC1198 (0,42%).

Figura 21 – Colônias de *Alternaria* spp. após exposição aos metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. após 6 dias de incubação.

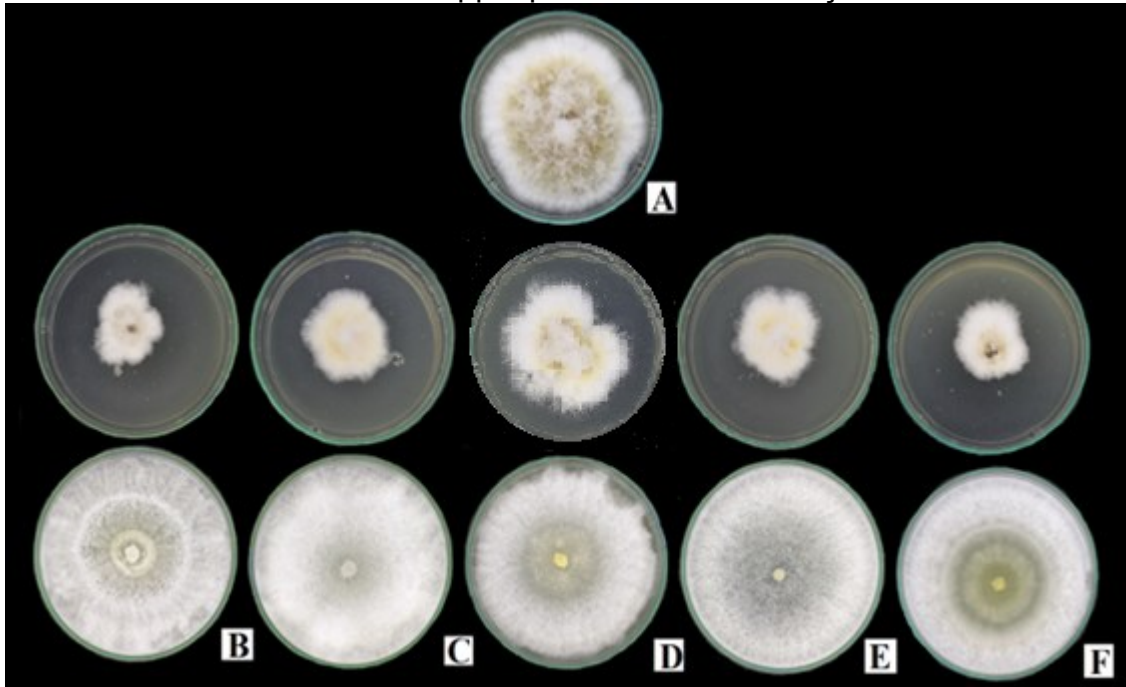


Legenda: (A) Testemunha; (B) Fungo comercial da espécie *Trichoderma harzianum* (SC1146); (C) SC1152; (D) SC1198; (E) SC1264 e (F) SC1275.

Fonte: Autora, 2023.

Em relação ao *Fusarium* spp. não foi verificado diferença estatística entre os tratamentos quando comparado com a testemunha (Tabela 4, Figura 22).

Figura 22 – Colônias de *Fusarium* spp. após exposição aos metabólitos voláteis de *Trichoderma* spp. após 5 dias de incubação.



Legenda: (A) Testemunha; (B) Fungo comercial da espécie *Trichoderma harzianum* (SC1146); (C) SC1152; (D) SC1198; (E) SC1264 e (F) SC1275.

Fonte: Autora, 2023.

No teste de metabólitos voláteis, os isolados de *Trichoderma* tiveram variação na ação antifúngica contra os patógenos estudados. Weidling (1932) foi o pioneiro em estudos provando a produção de antibióticos por *Trichoderma*, onde conseguiu identificar os antibióticos gliotoxin e viridin. Além disso, alguns autores ainda comprovaram que isolados deste gênero foram capazes de produzir metabólitos voláteis e não voláteis, com efeito inibitório sobre o crescimento de inúmeros fungos e que possam existir mais de 100 compostos voláteis com ação antibiótica (SCHUSTER e SCHMOLL, 2010). Entre estes metabólitos voláteis estão compostos como ácido harzianico, alamectinas, trichonila, peptaibol, 6-pentyl- α -pyrone, massoilactone, viridina, gliovirina, ácido heptelidico, entre outros (VEY *et al.*, 2001).

De acordo com Harman (2000) muitas espécies de *Trichoderma*, já estudadas, podem sintetizar metabólitos voláteis como antibióticos e enzimas líticas capazes de inibir e destruir propágulos de fungos fitopatogênicos. É provável que exista mais de 40 substâncias produzidas por *Trichoderma* que possuem atividade antibiótica.

Segundo Stadnik e Bettiol (2000), nos testes dos metabólitos voláteis, o mecanismo que pode explicar a redução das colônias dos fitopatógenos é a antibiose, podendo ser definida como a interação na qual um ou mais metabólitos

produzidos por um organismo possui efeito lesivo sobre outro. Dennis e Webster (1971), afirmaram que espécies de *Trichoderma* são eficientes produtoras de metabólitos voláteis em meio de cultura. Os mesmos explicam que os antibióticos voláteis agem sobre os fungos suscetíveis por meio da inibição do crescimento micelial.

Na Tabela 6, estão demonstradas a redução da velocidade de crescimento micelial obtidos pelo efeito de metabólitos voláteis *in vitro* por isolados de *Trichoderma* spp. Para todos os fungos fitopatogênicos estudados, o isolado SC1275 foi o que apresentou maior redução quando comparados aos demais isolados: *C. candelabrum* (56,5%), *B. cinerea* (18,2%), *Alternaria* spp. (36,7%) e *Fusarium* spp. (46,1%) .

Tabela 6 – Redução da Velocidade de Crescimento Micelial obtidos pelo efeito de metabólitos voláteis produzidos *in vitro* por isolados de *Trichoderma* spp. contra os fungos *C. candelabrum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria* spp. e *Fusarium* spp.

Redução da Velocidade de Crescimento Micelial (%)				
Tratamentos	<i>Cylindrocladium candelabrum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.
Testemunha	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a
<i>T. harzianum</i>	50,8b	7,74a	25,5c	41,3b
SC1152	43,9b	15,2a	23,7c	43,9b
SC1198	49,6b	7,75a	15,5b	28,5b
SC1264	36,1b	17,1a	25,8c	41,6b
SC1275	56,5b	18,2a	36,7d	46,1b
CV (%)	16,10	8,89	6,84	16,63

Médias na coluna seguida de mesma letra não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

CV – Coeficiente de variação.

Fonte: Autora, 2023.

No controle biológico, o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial é importante, visto que está relacionada à rápida colonização do substrato quando em competição com o fitopatógeno (MEDEIROS; SILVA; PASCHOLATI, 2018). Uma possível explicação para as diferenças estatísticas observadas entre os isolados de *Trichoderma* no teste de metabólitos voláteis está no fato de que os mecanismos de ação, como produção de metabólitos voláteis tóxicos, podem variar entre isolados de mesma espécie entre gêneros (CARVALHO *et al.*, 2014).

No presente trabalho, também foi possível analisar que os isolados de *Trichoderma* spp. usam de diferentes mecanismos de ação para o controle *in vitro* dos fitopatógenos estudados. Nesse sentido, Solino *et al.* (2017) assegura que

microrganismos que têm a característica de proporcionar diferentes modos de ação, por exemplo, além de parasitar estruturas de fitopatógenos produzem metabólitos de efeito fungistático ou fungicida, somam nos programas de biocontrole e podem apresentar um controle biológico *in vivo* com maior eficiência. De acordo com Vinale *et al.* (2009), o uso de metabólitos voláteis de *Trichoderma* pode tornar possível a aquisição de novos biofertilizantes e biopesticidas baseados nesses compostos, favorecendo o manejo de doenças em plantas.

4.5 TESTE DE AVALIAÇÃO DOS METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS

Os metabólitos não voláteis dos isolados de *Trichoderma* spp. não apresentaram alto potencial de inibição do crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos estudados (Tabela 7).

Tabela 7 – Percentual de inibição da Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial de *C. candelabrum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria* spp. e *Fusarium* spp., submetidos a efeito de metabólitos não voláteis de isolados de *Trichoderma* spp.

Porcentagem de inibição de Crescimento Micelial (PIC %)				
Tratamentos	<i>Cylindrocladium candelabrum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.
Testemunha	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a
<i>T. harzianum</i>	14,4c	36,0b	72,0e	45,6c
SC1152	5,77b	1,06a	46,4d	7,26b
SC1198	5,60b	0,86a	16,4b	0,37a
SC1264	4,81b	4,32a	36,8c	1,61a
SC1275	0,30 ^a	2,31a	19,1b	2,53a
CV (%)	3,96	8,22	2,83	3,26

Médias na coluna seguida de mesma letra não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

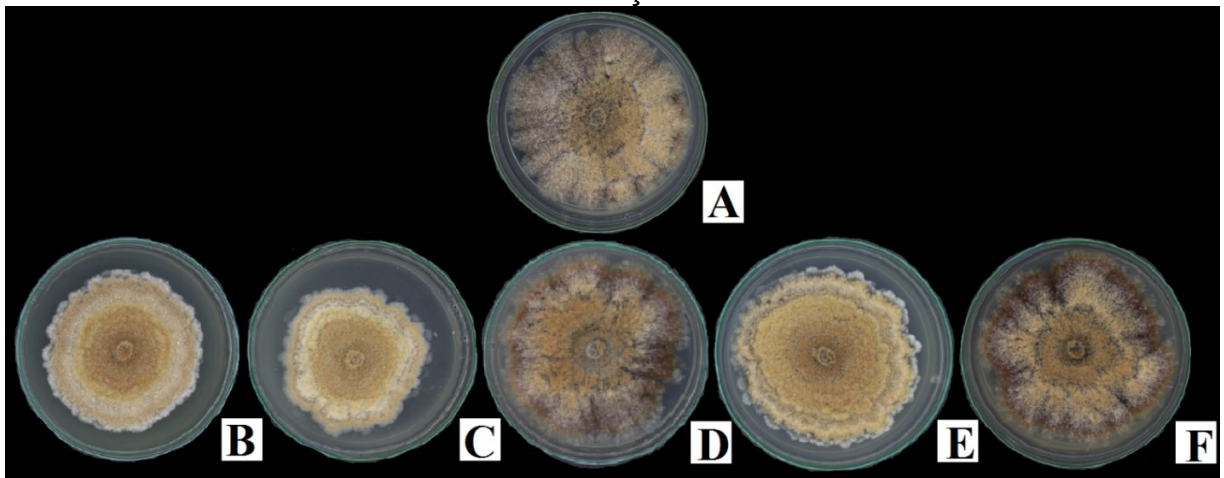
CV – Coeficiente de variação.

Fonte: Autora, 2023.

Para o teste de metabólitos não voláteis, o *T. harzianum* foi o responsável por apresentar inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos *C. candelabrum*, *B. cinerea*, *Alternaria* spp. e *Fusarium* spp., apresentando 14,4%, 36,0%, 72,0% e 45,6% de inibição.

Para o fitopatógeno *C. candelabrum*, o *T. harzianum* e o isolado SC1152, foram os que apresentaram maior inibição, com 14,4% e 5,77% de inibição, respectivamente (Tabela 7, Figura 23).

Figura 23 – Fotografia do fungo *C. candelabrum* em placa de Petri com meio BDA após exposição aos metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. após 19 dias de incubação.

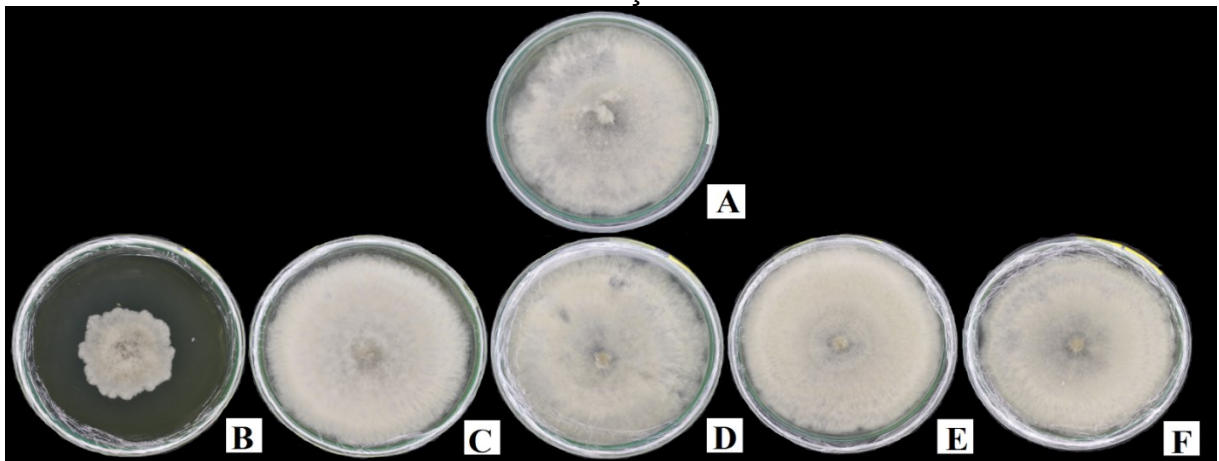


Legenda: (A) Testemunha; (B) Fungo comercial da espécie *Trichoderma harzianum* (SC1146); (C) SC1152; (D) SC1198; (E) SC1264 e (F) SC1275.

Fonte: Autora, 2023.

Em relação ao fungo *B. cinerea* somente o isolado comercial *T. harzianum* (SC1146) reduziu significativamente o fungo, apresentando 36,0% de inibição e os demais isolados não diferiram da testemunha (Tabela 6, Figura 24).

Figura 24 – Fotografia do fungo *Botrytis cinerea* em placa de Petri com meio BDA após exposição aos metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. após 6 dias de incubação.

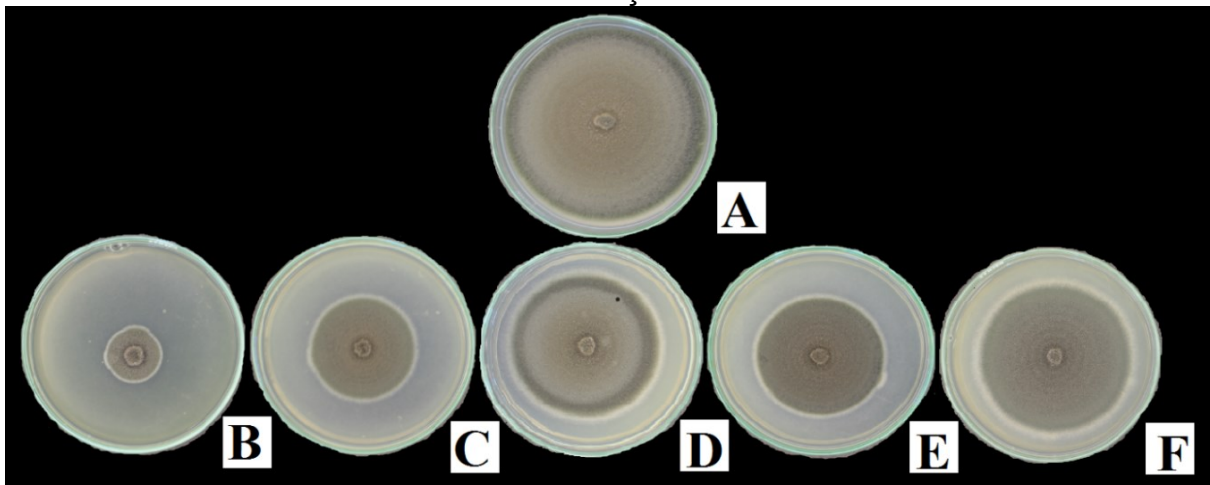


Legenda: (A) Testemunha; (B) Fungo comercial da espécie *Trichoderma harzianum* (SC1146); (C) SC1152; (D) SC1198; (E) SC1264 e (F) SC1275.

Fonte: Autora, 2023.

Para *Alternaria* spp. o *T. harzianum* (SC1146) e o isolado SC1152 inibiram em 72,0% e 46,4% e o isolado SC1198, foi o que apresentou menor porcentagem de inibição, apresentando 16,4% (Tabela 6, Figura 25).

Figura 25 – Fotografia do fungo *Alternaria* spp. em placa de Petri com meio BDA após exposição aos metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. após 9 dias de incubação.

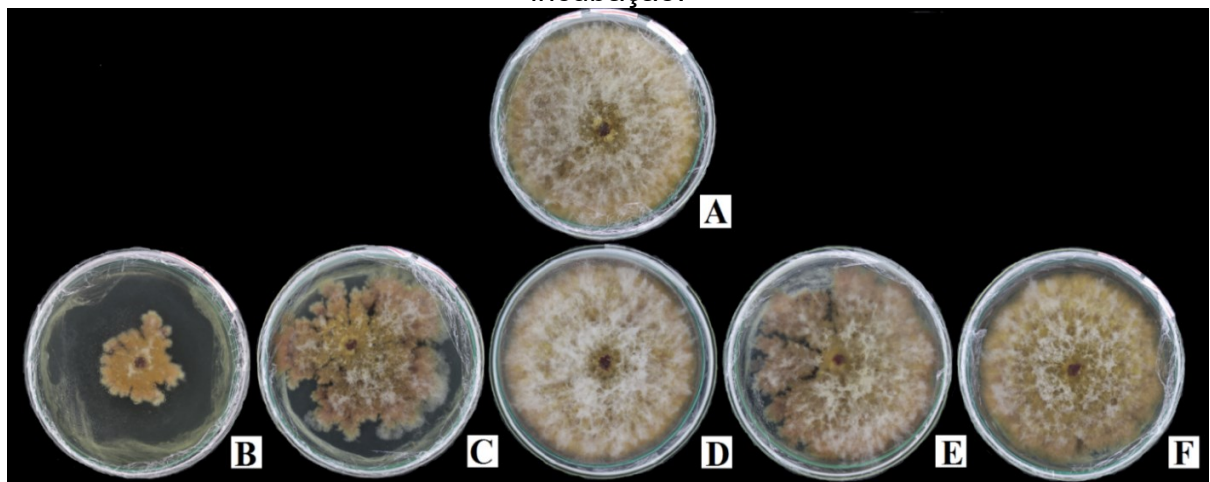


Legenda: (A) Testemunha; (B) Fungo comercial da espécie *Trichoderma harzianum* (SC1146); (C) SC1152; (D) SC1198; (E) SC1264 e (F) SC1275.

Fonte: Autora, 2023.

Para *Fusarium* spp., o *T. harzianum* foi o que apresentou maior porcentagem de inibição, apresentando 45,6% (Tabela 6, Figura 26).

Figura 26 – Fotografia do fungo *Fusarium* spp. em placa de Petri com meio BDA após exposição aos metabólitos não voláteis de *Trichoderma* spp. após 6 dias de incubação.



Legenda: (A) Testemunha; (B) Fungo comercial da espécie *Trichoderma harzianum* (SC1146); (C) SC1152; (D) SC1198; (E) SC1264 e (F) SC1275.

Fonte: Autora, 2023.

Os resultados evidenciaram que os isolados de *Trichoderma* spp. podem demonstrar maior ou menor capacidade de inibição no controle micelial de fitopatógenos. Isso dependerá da atividade de defesa que exercem, da produção de substâncias inibitórias e também da estrutura física dos mesmos (CHAGAS JUNIOR *et al.*, 2018).

Em um estudo realizado por Kushwaha *et al.* (2018), avaliando o antagonismo de três espécies de *Trichoderma* contra o fungo *Sclerotium rolfsii*, no experimento utilizando filtrados dos antagonistas, os compostos não voláteis de *T. harzianum* foram os que causaram a maior supressão do patógeno, corroborando com o resultado encontrado no presente trabalho.

Trichoderma harzianum é um agente de controle biológico usado visando a proteção contra diversos patógenos de plantas, sendo utilizado no tratamento de sementes, aplicação foliar e também aplicado diretamente no solo (MIKKOLA *et al.*, 2012). Seu principal uso é no controle de fitopatógenos do solo, que além de causar doenças também competem por recursos, produzem compostos inibitórios e secretam enzimas quinolíticas (DRUZHININA e KUBICEK, 2005).

A compreensão dos mecanismos de ação envolvidos no antagonismo de isolados de *Trichoderma* sobre fitopatógenos é importante para a seleção de agentes de biocontrole eficazes, sem esquecer que esse potencial necessita ser avaliado também em condições de campo, pois o nível de controle biológico de um patógeno pode alterar em função do agente de biocontrole utilizado e sua aptidão de adaptação às condições bióticas e abióticas (DENNIS e WEBSTER, 1971) dentro e entre espécies de *Trichoderma*.

Conforme descrito por Demirci *et al.* (2011), muitos fatores devem ser observados para escolha de um isolado objetivando sua aplicação à campo. Nessa perspectiva, os testes de produção de metabólitos voláteis possibilitam inferir sobre a termoestabilidade de tais metabólitos frente a altas temperaturas do solo em regiões tropicais. Segundo Jayaprakashvel *et al.* (2010), a autoclavagem (121°C por 15 minutos) de metabólito oriundo de um agente de biocontrole pode reduzir em 24% a sua atividade antifúngica quando comparada a não autoclavagem.

Na Tabela 8, estão demonstradas a redução na porcentagem da velocidade de crescimento micelial obtidos pelo efeito de metabólitos não voláteis *in vitro* por isolados de *Trichoderma* spp. Para todos os fungos fitopatogênicos, o *T. harzianum* apresentou maior redução da velocidade para o *B. cinerea* (16,3%), *Alternaria* spp. (77,9%) e *Fusarium* spp. (35,4%) quando comparados aos demais isolados.

Tabela 8 – Redução da Velocidade de Crescimento micelial obtidos pelo a efeito de metabólitos não voláteis de isolados de *Trichoderma* spp. contra os fungos *C. candelabrum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria* spp. e *Fusarium* spp.

Redução da Velocidade de Crescimento Micelial (%)				
Tratamentos	<i>Cylindrocladium candelabrum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.
Testemunha	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a
<i>T. harzianum</i>	26,4a	16,3b	77,9e	35,4b
SC1152	22,8a	0,80a	53,4d	0,96a
SC1198	6,76a	3,92a	19,2b	1,25a
SC1264	20,6a	0,66a	41,2c	0,90a
SC1275	15,0a	5,25a	20,5b	1,47a
CV (%)	15,61	8,62	4,21	4,34

Médias na coluna seguida de mesma letra não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. CV – Coeficiente de variação.

Fonte: Autora, 2023.

Em estudo realizado por Küçük e Kivanç (2003) que avaliaram o efeito de metabólitos voláteis e não voláteis de *Trichoderma harzianum* contra diversos fungos fitopatogênicos, verificou-se que os metabólitos não voláteis foram mais efetivos na inibição do crescimento de *Fusarium oxysporum*, *R. solanii* e *Sclerotium rolfsii* Sacc., em comparação aos voláteis. O mesmo não aconteceu no presente estudo, sendo a inibição dos compostos voláteis maiores do que a inibição dos compostos não voláteis.

Os resultados encontrados confirmam que os isolados do gênero *Trichoderma* estudados apresentam capacidade de inibição quando submetidos à competição com os fitopatógenos *Cylindrocladium candelabrum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria* spp.; e *Fusarium* spp. em condições *in vitro*. Entretanto, somente avaliações *in vitro* não são suficientes para determinar a capacidade de inibição dos isolados de *Trichoderma* spp. à campo, tornando-se necessário a realização de estudos voltados a utilização dos mesmos em condições *in vivo*.

5 CONCLUSÃO

O isolado SC1264 foi o que produziu maior quantidade de conídios, apresentando uma produção de $1,63 \times 10^9$ conídios/mL.

No teste de pareamento de culturas *in vitro*, para os fungos *C. candelabrum* e *Alternaria* spp. o isolado SC1275 foi o que apresentou maior eficiência na inibição do crescimento micelial. Para o fungo *B. cinerea* o melhor isolado foi SC1264 e, para *Fusarium* spp. o isolado SC1152 foi o que apresentou maior eficiência do controle micelial.

Para o teste de metabólitos voláteis, o isolado SC1275 foi o que apresentou maior inibição para os fungos *C. candelabrum*, *B. cinerea* e *Alternaria* spp. Para o fungo *Fusarium* spp. o melhor isolado foi SC1152.

Para o teste de metabólitos não voláteis, o *T. harzianum* foi o responsável por apresentar inibição significativa do crescimento micelial e redução da velocidade do crescimento micelial dos fitopatógenos estudados.

Com isso, os resultados encontrados neste trabalho estimulam além da realização dos ensaios laboratoriais, mais estudos desses isolados futuramente à campo, a fim de verificar sua eficiência no controle *in vivo* de doenças em plantas.

REFERÊNCIAS

- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. **Fungos de Interesse: Aplicações Biotecnológicas**. Universidade Estadual de Maringá – UEM. Revista UNINGÁ Review - vol.21, nº 1, pp.55-59, 2015.
- AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, 2022**. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 13 jan. 2022.
- AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, 2023**. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 04 fev. 2023.
- ALEXANDER, N. J. *et al.* The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. **Fungal Genetics and Biology**, [S. L.], v. 48, p. 485-495, 2011. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1087184511000041?via%3Dihub>>. Acesso em: 20 mar. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.01.003>.
- ALHUSSAEN, K.M. Morphological and physiological characterization of *Alternaria solani* isolated from tomato in Jordan Valley. **Research Journal of Biological Sciences**, Karaman, v.7, n.8, p.316-319, 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/286290551_Morphological_and_Physiological_Characterization_of_Alternaria_solani_Isolated_from_Tomato_in_Jordan_Valley> .Acesso em: 20 mar. 2022.
- ALFENAS, A. C. *et al.* **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: UFV, 2004. v1.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G. Produção, Determinação e Calibração da Concentração de Inóculo em Suspensão. In: ALFENAS, A. C.; Mafia, R. G. (Ed.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007. p. 103-116.
- ALFENAS, A. C. *et al.* **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. UFV. 2009. 500 p.
- 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. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91438/>>. Acesso em: 22 jul. 2021.
- APARECIDO, C. C.; FINATTI, D. Impacto do gênero *Cylindrocladium* para diferentes culturas. **Instituto Biológico** – Comunicado técnico. São Paulo, nº 176, 2012. Disponível em: <http://www.infobibos.com.br/Artigos/2012_2/cylindrocladium/index.htm>. Acesso em: 12 jan. 2022.
- BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de defesa da Agricultura, 1991. p. 1-3.

BETTIOL, W. Controle biológico de doenças do filoplano. In: BETTIOL, W. (Org). **Controle biológico de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, 1991b. 338p. (Documentos, 15).

BETTIOL, W.; SILVA, J. C.; CASTRO, M.L.M.P. Uso atual e perspectivas do *Trichoderma* no Brasil. IN: MEYER, M.C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J.C. **Trichoderma: uso na agricultura**. 1.ed. Brasília: Embrapa, 2019. P. 22-30.

BENÍTEZ, T. T. *et al.* Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, p. 249-260, 2004. Disponível em: <https://scielo.isciii.es/pdf/im/v7n4/Benitez.pdf>

BOHNER, T. O. L.; ARAÚJO, L. E. B.; NISHIJIMA, T. O impacto ambiental do uso de agrotóxicos no meio ambiente e na saúde dos trabalhadores rurais. **Revista eletrônica do Curso de Direito – UFSM**. ISSN 1981 – 3694. 2013.

BUENO, C. J. *et al.* Boletim Técnico Doenças e pragas em videiras. **Instituto Biológico**. n. 33 (novembro 2022)

BOMFIM, M. P. *et al.* O. Avaliação antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 1, p. 61-67, 2010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/sp/a/tXRrsX9YkZjvbbbrDnYMRXcrP/?format=pdf&lang=pt>> . Acesso em: 20 mar. 2022.

BOMFIM, A.G.J. *et al.* 2013. Fungos fitopatogênicos de **Opuntia ficus-indica** (L.) Mill. Cultivada em área de floresta tropical seca no Brasil. 2013. **Bol. Soc. Latin. Carib. Cact. Suc.** 10, n.2, mayo-agosto. pp. 27-33. Disponível em: <<file:///C:/Users/JuJuzinha/Downloads/BoletnSLCCSMay-Ago2013resolucinbaja.pdf>>. Acesso em: 22 nov. 2022.

BOSAH, O.; IGELEKE, C. A.; OMORUSI, V. I. *In vitro* microbial control of pathogenic *Sclerotium rolfsii*. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.12, n.3, p.474-476, 2010.

BOTELHO, A. S. **Compatibilidade de *Trichoderma* spp. com agrotóxicos e inibição de patógenos do solo por cepas comerciais e não comerciais**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia - Universidade de Brasília. Brasília, 2022.

BRAUN, P.G.; SUTTON, J.C. Infection cycles and population dynamics of *Botrytis cinerea* in Strawberry leaves. **Canadian of Plant Pathology**, Ottawa, v. 10, n. 2, p. 133-141, 1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2020). **Agrofit: sistemas de agrotóxicos fitossanitários**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Retrieved from https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2021). BRUM, R. B. C. S., CASTRO H. G., CARDON, C. H., PEREIRA, A. S. D. P. C. SANTOS, G. R. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre fungos

fitopatogênicos. **Magistra**, v. 26, n. 3, p. 361-371, 2014. Disponível em: <<https://www3.ufrb.edu.br/magistra/index.php/magistra/article/view/471/183>>. Acesso em: 06 já. 2022.

CALIGIORNE, R.B. *et al.* 2010. Fungos dematiáceos. **Rev Biotec Ciên e Desenvolvimento**. v. 11. p. 22-25.

CARRASCO, N.F. **Melhoramento participativo e seleção de genótipos de gengibre (*Zingiber officinale*) com resistência a Fusariose (*Fusarium oxysporum*)**. 2016. 87p. Tese (Doutora em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. 2016.

CARVALHO FILHO, M. R. *et al.* **Avaliação de isolados de *Trichoderma* no controle da mancha foliar do eucalipto *in vitro* e quanto a esporulação em dois substratos sólidos**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. 22 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 225).

CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JUNIOR, M.; SILVA, M. C. Controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, p. 36-42, 2011. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/36873/1/tpp.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2022.

CARVALHO, D. D. C. *et al.* Plant extracts to control *Alternaria alternata* in Murcott tangor fruits. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.28, n.4, p.173-178, 2011a. Disponível em: <https://sci-hub.hkvisa.net/10.1016/j.riam.2011.05.001>

CARVALHO, D. D. C. *et al.* Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.8, p.822-828, 2011b. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/pab/a/RxqNb8mYbDsqm97LQVyQKMG/?lang=en>>. Acesso em: 14 mar. 2022.

CARVALHO, D. D. C. *et al.* Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. **Tropical Plant Pathology**, New York, v. 39, p. 384-391, 2014. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/tpp/a/jWXtMTY9wJfMKL43MYpYC8G/?lang=en>>. Acesso em: 20 jul. 2022.

CASTELLANI, A. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic the fungi and some bacteria in sterile distilled water. **Mycopathologia et mycologia applicata**, v. 20, n. 12, p. 16, 1963. doi:10.1007/bf02054872 Disponível em: <<https://sci-hub.hkvisa.net/10.1007/bf02054872>>. Acesso em: 20 mar. 2021.

CASA, R.T.; CASA, R.T. ***Diplodia maydis* e *Diplodia macrospora* associados à semente de milho**. (Dissertação de Mestrado) Departamento de Fitopatologia. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa, 1997.

CIMMINO, A. *et al.* (2015). Fungal phytotoxins with potential herbicidal activity: chemical and biological characterization. **Nat Prod Rep**, 32:1629-1653.

CHAGAS, L. F. B. *et al.* (2016). Efficiency of *Trichoderma* spp. As a growth promoter of cowpea (*Vigna unguiculata*) and analysis of phosphate solubilization and indole acetic acid synthesis. **Revista Brasileira de Botânica** 38: 1-9.

CHAGAS, L. F. B.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; de CASTRO, H. G. Phosphate solubilization capacity and indole acetic acid production by *Trichoderma* strains for biomass increase on basil and mint plants. **Brazilian Journal of Agriculture – Revista de Agricultura**, v. 92, n. 2. 2017.

CHAGAS JUNIOR, A. F. *et al.* Ação de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Revista Agri-Environmental Sciences**, Palmas-TO, v. 4, n. 2, 2018.

CHOQUER, M. *et al.* *Botrytis cinerea* virulence factors: New insight into a necrotrophic and polyphageous pathogen. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, Oxford, v. 277, n. 1, p. 1-10, 2007.

CROUS, P. W., *et al.* The *Cylindrocladium candelabrum* species complex includes four distinct mating populations. **Mycologia**, vol. 91, n. 2, p.286-298, 1999. Disponível em: <<https://sci-hub.hkvisa.net/10.2307/3761374>>. Acesso em; 24 ago. 2021.

DEAN, R. *et al.* The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**. Londres, v. 13, n. 4, p. 414-430, 2012. Disponível em: <<https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>>. Acesso em: 20 mar. 2022.

DEMIRCI, E.; DANE, E.; EKEN, C. *In vitro* antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia on potato tubers against *Rhizoctonia solani*. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v. 35, p. 457-462, 2011. <http://dx.doi.org/10.3906/biy-1004-98>. Disponível em: <<https://journals.tubitak.gov.tr/biology/vol35/iss4/9>>. Acesso em: 20 mar. 2022.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, n. 1, p. 25-IN3, 1971a.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. **Transactions British Mycological Society**, Manchester, v. 57, n. 11, p. 41-48, 1971b.

DRUZHININA, I.; KUBICEK, C. P. (2005). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: From aggregate species to species clusters? **Journal of Zhejiang University. Science B**, 6(2), 100-112. DOI:<https://doi.org/10.1631/jzus.2005.B0100>

DRUZHININA, I. S. *et al.* Massive lateral transfer of genes encoding plant cell wall-degrading enzymes to the mycoparasitic fungus *Trichoderma* from its plant-associated hosts. **Plos Genetics**, v. 14, n.4, e1007322, 2018.

DUKE, S. O.; DAYAN, F. E. (2015). Discovery of new herbicide modes of action with natural phytotoxins. **Amer Chem Soc**, 1204:79-97

ETHUR, L. Z. *et al.* Sanidade de sementes e emergência de plântulas de nabo forrageiro, aveia preta e centeio submetidas a tratamentos com bioprotetor e fungicida. **Ciência e Natura**, v. 28, n. 2, p. 17-27, 2006.

FARIAS, J. R. B. Apresentação. In: **Trichoderma: uso na agricultura**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Soja. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Editores técnicos: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; da SILVA, J, C. 538 p. Brasília, DF: Embrapa, 2019.

FERREIRA, E. M. *et al.* Efficiency of systemic fungicides for control of *Cylindrocladium candelabrum* in eucalypt. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, MG, v. 31, n. 5, p. 468-475, 2006.

FURTADO, E. L. *et al.* **Doenças em viveiros de *Eucalyptus* sp: Diagnóstico e Manejo**. Votorantim / Celulose e Papel. Botucatu, SP, p. 23, 2000.

GAMS, W.; BISSET, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: HARMAN, G.; KUBICET, C. P. (Eds.). **Trichoderma and Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics**. London: Taylor e Francis, 1998. 3-34 p.

GERLACH, W.; NIRENBERG, H. **The Genus *Fusarium* – a Pictorial Atlas**. Biologische Bundesanstalt für Landund. Institut für Mikrobiologie, Berlin-Dahlem. 1982. 406p.

GRABKE, A. **Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea* from Strawberry – Molecular Mechanisms and Management**. Tese (Ciências Agrônômicas e de Cultivos comuns, Biologia comum e Patologias Farmacêuticas), Universidade de Clemson, Carolina do Sul, 2014, 106 f.

GRAF JUNIOR, A. **Uso de óleos essenciais como controle alternativo do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, 2018. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/187835>>. Acesso em: 14 mar. 2022.

GUARRO, J.; GENÉ, J. 1992. *Fusarium* infections. Criteria for the identification of the responsible species. **Mycoses**, v. 35, p. 109-114.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v. 84, n. 4, p. 377-393, 2000.

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

HERMOSA, R. *et al.* Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma*. In: GUPTA, V. K.; SCHMOLL, M.; HERRERA-ESTRELLA, A.; UPADHYAY, R. S.; DRUZHININA, I.; TUOHY, M. (Ed.). **Biotechnology and biology of *Trichoderma***. Amsterdam: Elsevier, 2014. p. 125-137.

- HWANG, J.; BENSON, D. M. Biocontrol of *Rhizoctonia* stem and root rot of Poinsettia with Burkholderia and binucleate *Rhizoctonia*. **Plant Disease**, v. 86, p. 47-53, 2002.
- 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.
- HOOG, G. S. *et al.* 2000. **Atlas of clinical fungi**. Centraalbureau Voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Vigili.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorio-s-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>>. Acesso em: 23 ago. 2022.
- JARVIS, W. R. Managing diseases in greenhouse crops. **Plant Disease**, New York, v. 73, n. 3, p. 190-194, 1989.
- JAYAPRAKASHVEL, M. *et al.* Control of sheath blight disease in rice by thermostable secondary metabolites of *Trichothecium roseum* MML003. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 126, p. 229-239, 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-009-9535-y>.
- JIN, P. *et al.* UV-C enhances resistance against gray mold decay caused by *Botrytis cinerea* in strawberry fruit. **Scientia Horticulturae**. China, p. 106-111, nov. 2017.
- JULIATTI, C.; JACCOUD-FILHO, D. S. **Trichoderma - Tecnologia e usos**. 2022. DOI10.5772/intechopen.98115, ISBN978-1-80355-355-9, 88 p.
- JÚNIOR, A. G.; SANTOS, A.F.; AUER, C.G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Floresta**, Curitiba, v. 30, n. 1/2, dez. 2000.
- KOBAYASHI, M. The boring to logs of several broadleaf trees by *Platypus quercivorus* (Murayama). **Applend Science**, v.9, p.99-103, 2000.
- KREDICS, L. *et al.* Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 37-42, 2003.
- KRUGER, T.L. E BACCHI, L.M.A. (1995) - Fungos. In: FILHO, A.B.; KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M., CAMARGO, L.E.A. - **Manual de Fitopatologia**. 3 ed. São Paulo, Agronômica Ceres, 46–95.
- KRUGNER, TL; AUER, C. G. Doenças dos eucaliptos. No: KIMATI, H.; AMORIM, EU.;REZENDE, j. UMA. M.; BERGAMIN FILHO, UMA.; CAMARGO, EU. E. UMA. (ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 319-332.
- KUMAR, K. *et al.* Isolation and characterization of *Trichoderma* spp. for antagonistic activity against root rot and foliar pathogens. **Indian Journal of Microbiology**, v.52, n.2, p.137-144, 2012.

- KÜÇÜK, C. e KIVANÇ, M. (2003) Isolation of *Trichoderma* spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological features. **Turk J of Biol** 27: 247- 253.
- KUNIEDA-ALONSO, S.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A. Sobrevivência de micélio e escleródios de *Rhizoctonia solani* tratados com *Trichoderma* spp. em restos de cultura de *Eucalyptus* sp. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 164-168, 2005.
- KUSHWAHA, S. K.; KUMAR, S.; CHAUDHARY, B. (2018). Efficacy of *Trichoderma* against *Sclerotium rolfsii* causing collar rot disease of lentil under *in vitro* conditions. **Journal of Applied and Natural Science**, 10(1): 307-312.
- LEITE, R. M. V. B.C. **Doenças do girassol**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1997. 68P. (EMBRAPA-CNPSo. Circular Técnica, 19).
- LIU, L. N.; ZHANG, J. Z.; XU, T. Histopathological studies of sclerotia of *Rhizoctonia solani* parasitized by the EGFP transformant of *Trichoderma virens*. **Letters in Applied Microbiology**, Hoboken, v.49, p.745-750, 2009.
- LORITO, M. *et al.* Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiase. **Phytopathology**, v.83, p.302-307, 1993.
- LORITO, M. *et al.* Translational research on *Trichoderma*: from ‘Omics to the field. **Annual Review of Phytopathol**, v. 48, p. 395- 417, 2010.
- LOUZADA, G. A. S., CARVALHO, D. D. C., MELLO, S. C. M., LOBO JÚNIOR, M., MARTINS, I.; BRAÚNA, L. M. Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**. v. 9, n. 3, p. 145-149. 2009.
- LUCON, C. M. M. Promoção de crescimento de plantas com uso de *Trichoderma* spp. **Comunicado Técnico – Instituto Biológico**, n. 94, 2009. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_1/trichoderma/index.htm>. Acesso em: 15 set. 2020.
- MACHADO, D. F. M. *et al.* *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.
- MACHADO, D.F.M. *et al.* *Trichoderma* spp. na emergência e crescimento de mudas de Cambará (*Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera). **Revista Árvore**, v. 39, n. 1, p. 167-176, 2015.
- MACIEL, C. G. *et al.* *Trichoderma* spp. no biocontrole de *Cylindrocladium candelabrum* em mudas de *Eucalyptus saligna*. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 36, n. 5, p. 825-832, jun. 2012.
- MARKOVICH, N. A; KONONOVA, G. L. Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in protecting plants from fungal diseases. **Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia**, v. 39, n. 4, p. 389–400, 2015.

MASSOLA JÚNIOR, N.S. Fungos Fitopatogênicos. In: BERGAMIN FILHO, A. *et al.* **Manual de Fitopatologia**. Minas Gerais: Agronômica Ceres, 2018. p. 107-141.

MEDEIROS, F. H. V.; SILVA, J. C. P.; PASCHOLATI, S. F. Controle biológico de doenças em plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia**: 5 ed., v.1. Princípios e conceitos. Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres, 2018. p. 261-274.

MELO, I. S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, p. 135-156, 1991.

MELO, I. S. ***Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas**. Revisão Anual de Patologia de Plantas, 4: 261-295.1996.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: Melo, I.S. e Azevedo, J. L. (Ed.) – **Controle Biológico**, v.1. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 1998, p. 17-60.

MELLO, S. C. M. *et al.* (2020). **Controle de Doenças de Planta**. In: FONTES, E. M. G.; VALDARES-INGLIS, M.C. Controle Biológico de Pragas da Agricultura. Brasília, DF. Embrapa.

MENEZES, M.E.L. *et al.* **Crescimento de isolados de *Trichoderma* sp. em diferentes fontes e concentrações de nitrogênio**. 2007. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br/public_eletronica/downloads/OPB1567.pdf>. Acesso em: 29 jan. 2021.

MESSING, R.; BRODEUR, J. Current challenges to the implementation of classical biological control. **BioControl**, v. 63, p. 1-9, 2018.

MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; da SILVA, J, C. ***Trichoderma*: uso na agricultura**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Soja. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.538 p. Brasília, DF: Embrapa, 2019.

MICHEREFF, S.J.; MENEZES, M.; MARIANO, R.L.R. Potencial de *Trichoderma* para o controle da antracnose do sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 392-398, 1993.

MICHIELSE, C. .; REP, M. Pathogen profile update : *Fusarium oxysporum*. **Molecular plant pathology**, v. 10, p. 311–324, 2009. Disponível em: <<https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x>>. Acesso em: 20 mar. 2022.

MIKKOLA, R. *et al.* (2012). **Peptaibols de 20 e 11 resíduos do fungo *Trichoderma longibrachiatum* são sinérgicos na formação de canais permeáveis a Na⁺/K⁺ e ação adversa em células de mamíferos**. O Jornal FEBS, 279(22), 4172-4190. DOI: <https://doi.org/10.1111/febs.12010>

MONTE, E. BETTIOL, W.; HERMOSA, R. *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. In: MEYER, M.C.; MAZARO, S.M.; SILVA, J.C.S. ***Trichoderma* uso na agricultura**. 1.ed. Brasília: Embrapa, 2019. p. 182-194.

MORO, F. *et al.* Efficacy of cyclosporine 0.05% for preventing endothelial loss in corneal transplant. **Revista Brasileira Oftalmologista**, v.66, p.321-326, 2007.

MOREIRA *et al.* **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. 2008. Editora UFLA – Campus Universitário da UFLA. 798p.

MOREIRA, F. M. S.; CAMPOS, C. R. A. 2013. Micro-organismos. p. 203-223. In: MOREIRA, F. M. S.; CARES, J. E.; ZANETTI, R.; STÜRMER, S. L. (org.). **O ecossistema solo: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal**. UFLA, v. único.

MOREIRA, S.I *et al.* Doenças do Gengibre. In: AMORIM, L *et al.* **Manual de Fitopatologia**. Ouro Fina, MG: Agronômica Ceres, 2016. p. 433-438.

MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W. (2009) - Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. *In*: BETTIOL, W; MORANDI, M.A.B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, p.07-14.

MORANDI, M.A.B. *et al.* **Controle biológico de fungos fitopatogênicos**. Informe agropecuário, Belo Horizonte, v. 30, n. 251, p. 73-82, jul./ago. 2009.

MUKHERJEE, P. K. *et al.* *Trichoderma* Research in the genome era. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, p. 105-129, 2013.

MUNIZ, P. H. P. C. *et al.* Produção de conídios em substrato sólido e colonização superficial por *Trichoderma harzianum*. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 5, n. 4, p. 40–44, 2018.

NELSON, P. E. *et al.* ***Fusarium* species, na illustrated manual for identification**. 1. ed. University Park: Pennsylvania State University Press, 1983. 193p.

NOZAKI, M.H. *et al.* Controle *in vitro* de *Alternaria solani* por diferentes isolados de *Trichoderma* spp. **Revista Cultivando o Saber**. v. 11, n. 4, p. 338 a 345, 2018.

NUR, A. Z., NOOR, A. B. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. **Annals of Agricultural Sciences**. v. 65, 2020. DOI: 10.1016/j.aogas.2020.09.003

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* Are Nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [S. L.], v. 7, n.1, p.103-116, 1997. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1055790396903760?via%3DiHub>>. Acesso em: 10 mar, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0376>.

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

PARRA, J. R. P. Controle biológico na agricultura brasileira. **Entomological Communications**, Santo Antônio de Goiás, v. 1, ec01002, 2019.

PASSADOR, M.M., COUTINHO, L.N., FIGUEIREDO, M.B. 2000. Avaliação da viabilidade, esporulação e patogenicidade de culturas de *Verticillium fungicola* conservadas pelo método de Castelani. **Arquivos do Instituto Biológico** 67: 134.

PASSADOR, M. M. *et al.* Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca "Mário Barreto Figueiredo". **Biológico**, São Paulo, [online], v. 72, n. 1, p. 5155, 2010.

PAUL, B. *et al.* Biological control of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of grapevine and elicitation of stilbene phytoalexin (resveratrol) by a soil bacterium. *Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 165, n. 1, p. 65-70, 1998. Disponível em: <<https://sci-hub.hkvisa.net/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13128.x>>. Acesso em: 17 set. 2021.

PEIXOTO, G. H. S. *et al.* Incidência e caracterização morfológica de *Alternaria alternata* e *Bipolaris bicolor* em sementes de trigo 'BRS 264'. Universidade Estadual de Goiás - UEG, Câmpus Ipameri, GO. **Colloquium Agrariae**, v. 14, n.4, Out-Dez. 2018, p. 80-87. DOI: 10.5747/ca.2018.v.14.n4.a251.

PEREIRA, O.L; SOARES, D.J. Fungos fitopatogênicos. In: ZAMBOLIM, L; JESUS JÚNIOR, W.C.de; PEREIRA, O.L. **O essencial da Fitopatologia: Agentes causais**. Viçosa, MG: UFV, 2012. p.225-308.

PINTO, A.C. *et al.* **Produtos Naturais: Atualidades, desafios e perspectivas**. Química Nova, v. 25, p.45-51, 2002.

POLETTI, I. **Nutrição, sombreamento e antagonismo biológico no controle da podridão-de-raízes da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill)**. 2008. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

RAMADA, M. H.; LOPES, F. A. C.; UHOA, C. J. (2019). **Trichoderma: metabólitos secundários**. In: MEYER, M.C.; MAZARO, S.M.; SILVA, J.C. *Trichoderma: uso na agricultura*. 1ed. Brasília, DF: Embrapa

RHA, E.; PARK, H.J.; KIM, M.O. Expression of exo-polygalacturonases in *Botrytis cinerea*. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, Oxford, v. 201, n. 1, p. 105-109, 2006.

REIS, E.M.; CASA, R.T. **Manual de identificação e controle de doenças de milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996.

RODRIGUES, T.T.M.S. *et al.* First report of *Alternaria tomatophila* and *A. grandis* causing early blight on tomato and potato in Brazil. **New Disease Reports**, Wellesbourne, v. 22, n.1, p. 28, 2010.

RUBIO, M. B. *et al.* (2014). Identifying Beneficial Qualities of *Trichoderma parareesei* for Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, 80(6): 1864-1873.

SABATO, E. O.; FERNANDES, F. T. Doenças do Milho (*Zea mays* L.). **Embrapa Milho e Sorgo**, Rodovia MG 424 km 45, 35701970, Sete Lagoas, MG. Sociedade Brasileira de Fitopatologia (SBF). 2014. Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/107246/1/Doencas-do-milho.pdf>. Acesso em: 19 dez. 2020.

SANTOS, A.F., JUNIOR, A.G.A. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle**. Paraná: EMBRAPA, jun., 2001. 20 p. (Série: Circular Técnica 45).

SARAVANAKUMAR, K. *et al.* Biodiversity of *Trichoderma* Community in the Tidal Flats and Wetland of Southeastern China. **Plos One**, v. 11, n. 12, p. 1-18, 2016.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 787-799, 2010.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, [s.l.], v. 77, n. 8, p.1051-1056, 1977. Disponível em: <https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1977Articles/Phyto67n08_1051.PDF. Acesso em: 02 fev. 2021.

SILVA, C. E.O. da. **Efeito do aumento da concentra o de dióxido de carbono do ar sobre a mancha foliar causada por *Cylindrocladium candelabrum* em mudas de *Eucalyptus urophylla***. Disserta o (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agron micas, Botucatu, 2013.

SILVA, R. N. *et al.* *Trichoderma*/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security. **Fungal biology**, v. 123, n. 8, p. 565-583, 2019.

SINGH V. K., SINGH H. B., UPADHYAY R. S. (2017). Role of fusaric acid in the development of ‘Fusarium wilt’ symptoms in tomato: Physiological, biochemical and proteomic perspectives. **Plant Physiol. Biochem.** 118, 320–332. 10.1016/j.plaphy.2017.06.028

STADNIK, M. J.; BETTIOL, W. Controle biológico de o deos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Controle biológico**: v.3. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. p. 95-112.

STEWART, R.K.; ROOYEN, C. V.; DICKSON, K. **What is the impact of microfinance on poor people?** A systematic review of evidence from sub-Saharan Africa (Protocol). 2010. Iscn: 978-1-907345-04-3.

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

SIDDIQUEE, S. *et al.* Characterization of Malaysian *Trichoderma* isolates using random amplified microsatellites (RAMS). **Molecular Biology Reports**, published online, v. 39, p. 715- 722, 2011.

SILVA, H. S. A. *et al.* **Microrganismos endofíticos**: potencial de uso como agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006. 25p. (Embrapa Meio Ambiente. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 17).

SILVA, F. B. *et al.* Isolamento e seleção de *Trichoderma* spp. antagonistas à *Pestalotiopsis clavispora*, patógeno da noqueira-precã. **Revista Brasileira de Agroecologia**. [S. l.], v. 8, n. 3, p. 109-118, jul. 2013.

SOARES, I. D. *et al.* Fungos associados à mancha foliar em *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage na região sul do Brasil. **BIOFIX Scientific Journal**, v. 2 n. 2 p. 32-37, 2017. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/164349/1/2017-CelsoA-Biofix-Fungos.pdf>>. Acesso em: 26 set. 2022.

SOUZA, A. R. C. D. *et al.* (2017). Selection, isolation, and identification of fungi for bioherbicide production. **Braz J Microbiol**, 48:101-108.

SUMMERELL, B. A. *et al.* Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. **Fungal Diversity**. Chiang Mai, v. 44, n. 1. p. 3-13, 2010. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13225-010-0060-2>. Acesso em: 26 mai. 2022. DOI: 10.1007/S13225-010-0060-2.

TÖFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J.; FERRARI, J. T. *Alternaria* spp. em oleráceas: sintomas, etiologia, manejo e fungicidas. **Biológico**, v. 77, n. 1, p. 21-34, 2015. (Divulgação técnica).

VASCONCELOS, C. V.; SILVA, D. C.; CARVALHO, D. D. C. Ocorrência de *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl. em tubérculos de batata, no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 44, n. 2, p. 219-222, abr./jun. 2014.

VEIGA, M. M. *et al.* Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Caderno de Saúde Pública**. vol.22 n°.11 Rio de Janeiro, p. 2391- 2399, Nov/2006.

VEY, A.; HOAGLAND, R. E.; BUTT, T. M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: *Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential*. BUTT, T.; JACKSON, C.; MAGAN, N. L. **Bristol: CAB International**, 2001. P. 311-346.

WHITE, D.G. **Compendium of corn diseases**. Third Edition St. Paul: The American Phytopathological Society, 1999.

WOLOSHUK, C. P.; SHIM, W. Aflatoxins, fumonisins, and trichothecenes: a convergence of knowledge. **Microbiology reviews**, v. 37, p. 94–109, 2013. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12009>

WOO, S. L. *et al.* Produtos à base de *Trichoderma* e seu uso generalizado na agricultura. **O Jornal de Micologia Aberta**. 2014; 8:271- 126.