

**Filtrados de *Trichoderma harzianum* e *Ganoderma lucidum* no controle da pinta-preta
(*Alternaria linariae*) do tomateiro**

Lisanna Evelyn da Silva^{1*}, Robson Marcelo Di Piero²

¹Acadêmica do curso de Agronomia; Centro de Ciências Agrárias; Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, Caixa postal 476, CEP 88034-000, Florianópolis, SC, Brasil;

²Eng. Agrônomo, Mestre e Doutor em Fitopatologia (ESALQ/USP), Professor Associado no Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, Caixa postal 476, CEP 88034-000, Florianópolis, SC, Brasil;

*Autor correspondente – lisannaevelyn@gmail.com

Resumo

O objetivo deste trabalho foi testar o efeito dos filtrados de crescimento de *Trichoderma harzianum* e *Ganoderma lucidum* no controle da pinta-preta do tomateiro. Os experimentos *in vitro* foram realizados através do teste do pareamento confrontando o patógeno *Alternaria linariae* com os possíveis antagonistas: *T. harzianum* e *G. lucidum*. O teste foi realizado duas vezes e com 4 repetições por tratamento. Para os experimentos *in vivo* com plantas foram utilizados os tratamentos: testemunha não tratada (SI); filtrado de *Trichoderma* pulverizado nas folhas (FCTP) ou aplicado no solo (FCTS); filtrado de *Ganoderma* pulverizado nas folhas (FCGP) ou aplicado no solo (FCGS), foram 5 repetições por tratamento. Para o experimento com folhas destacadas foram utilizados os tratamentos: água; filtrado de *Trichoderma* e filtrado de *Ganoderma* pulverizados com 6 repetições por tratamento. Plantas e folhas destacadas foram inoculadas com *A. linariae* 2 dias e 3 horas após a aplicação dos produtos, respectivamente. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. *T. harzianum* e *G. lucidum* inibiram o crescimento micelial de *A. linariae* em cerca de 50% e 15%, respectivamente. Os filtrados microbianos não promoveram diferenças significativas na severidade da doença em relação à testemunha, exceto o filtrado de *Trichoderma* em folhas destacadas que resultou em maior severidade. Verificou-se que os fungos

apresentam antagonismo ao patógeno *in vitro*, mas seus filtrados não demonstraram controle sobre a doença *in vivo*.

Palavras-chave: tomate, pinta-preta, filtrados, *Trichoderma harzianum*, *Ganoderma lucidum*.

Filtrates of *Trichoderma harzianum* and *Ganoderma lucidum* in the control of early blight (*Alternaria linariae*) on tomato

Abstract

This work aimed to test the effects of growing filtrates of *Trichoderma harzianum* and *Ganoderma lucidum* on tomato black spot control. A pairing assay between *Alternaria linariae* and two possible antagonists: *T. harzianum* and *G. lucidum* was conducted. The tests were performed twice and with four replicates for each one. *In vivo*, following treatments were used: untreated control (SI); *Trichoderma* filtrate pulverized on the leaves (FCTP) or applied on soil (FCTS); *Ganoderma* filtrate pulverized on the leaves (FCGP) or applied on soil (FCGS). Five replicates were used to each treatment. Detached leaf assay was used under the following treatments: water; *Trichoderma* filtrate and *Ganoderma* filtrate, pulverized with 6 replicates per treatment. All assays were carried out in completely randomized design. *T. harzianum* and *G. lucidum* inhibited about 50% and 15% of mycelial growth of *A. linariae*, respectively. No statistical differences were not found for both treatments on disease control, except for *Trichoderma* filtrate on detached leaves, promoting even more severity. It was found that both fungi showed *in vitro* antagonism to against the pathogen, but their filtrates didn't reduced the disease.

Keywords: tomato, early blight, filtrates, *Trichoderma harzianum*, *Ganoderma lucidum*.

1. Introdução

O tomate (*Solanum lycopersicum*) é originário das regiões Andinas da América do Sul e pertence à família Solanaceae. É uma planta herbácea, perene, de porte arbustivo, podendo seu hábito de crescimento ser determinado ou indeterminado. Trata-se de uma das hortaliças mais produzidas no mundo, destacando-se no cenário consumidor devido ao seu sabor, tanto *in natura*

quanto processado (ÁVILA et al.; CARILLO et al., 2019). Os frutos de tomate são ricos em vitaminas, minerais, aminoácidos essenciais, açúcares e fibras dietéticas (NAIKA, 2006).

Segundo dados da FAO (Food and Agriculture Organization), em 2020 a produção mundial de tomate foi de cerca de 186 milhões de toneladas por ano, em uma área cultivada de aproximadamente 5 milhões de hectares. Os principais países produtores são China, Índia, Estados Unidos e Turquia, estes que compreendem cerca de 50% da produção mundial (CONAB, 2019).

O Brasil é o nono maior produtor da cultura, correspondendo a 2,5% da produção mundial (CONAB, 2019). De acordo com dados da FAO, em 2020 foram produzidas no país 3,7 milhões de toneladas, em uma área de 51,9 mil hectares e com um rendimento de aproximadamente 72,2 toneladas por hectare. Os principais estados produtores são Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Paraná e Santa Catarina. Em Santa Catarina o cultivo de tomate é destinado ao consumo *in natura*, sendo que a maior parte da área comercial se encontra nas microrregiões de Joaçaba, Florianópolis e Serrana (BARROS; BOTEON, 2020).

O tomate pode ser acometido por diversas doenças, sendo que já foram relatadas mais de uma centena delas afetando a cultura (LOPES; REIS, 2011). A ocorrência dessas doenças pode resultar em grandes perdas aos produtores quando o manejo não é feito de maneira correta, isso porque a cultura é suscetível a elas em toda sua fase fenológica, tanto em cultivos a campo quanto em ambiente protegido (RODRIGUES et al., 2013; SILVA et al., 2021).

Dentre as principais doenças, pode-se destacar a pinta-preta, causada pelo fungo *Alternaria* sp., sendo esta uma das doenças mais importantes da cultura devido a sua ocorrência em todas as regiões de cultivo e ao seu alto potencial destrutivo (RODRIGUES et al., 2013; LOPES et al, 2005; KIMATI, 2011). O gênero *Alternaria* pertence ao Reino Fungi, filo Ascomycota, classe Dothideomycetes, ordem Pleosporales e família Pleosporaceae (SAHARAN; MEHTA; MEENA, 2016). Os sintomas da doença podem ocorrer em toda a parte aérea das plantas, porém manchas circulares com coloração marrom-escura nas folhas mais velhas são mais abundantes, estas que podem ou não serem delimitadas por um halo amarelo (LOPES et al, 2005; KIMATI, 2011). À medida que as lesões crescem, na área necrótica formam-se os anéis concêntricos que são característicos da doença (LOPES et al, 2005).

O patógeno é favorecido em condições de alta umidade e temperaturas entre 25 e 30°C, quando seu controle não é feito adequadamente pode ocorrer uma severa destruição foliar, o que compromete a quantidade e qualidade dos frutos. Seus conídios permanecem viáveis em restos

culturais por um longo período, facilitando assim, a disseminação do patógeno, que ocorre pelo vento, insetos, sementes, trabalhadores e implementos agrícolas (KIMATI, 2011).

Para o controle da doença deve ser adotado um conjunto de medidas preventivas, sendo elas: tratamento de sementes com fungicidas; práticas culturais e pulverizações foliares com fungicidas (KIMATI, 2011). Sabe-se que o uso intensivo de agrotóxicos tem promovido diversos problemas ambientais e na saúde humana, além de provocar desequilíbrio biológico, eliminação de microrganismos benéficos, redução da biodiversidade e favorecer também a seleção de isolados do patógeno resistentes aos produtos (BETTIOL, 2009). Nesse contexto, esses fatores têm levado a uma busca por métodos alternativos às práticas tradicionais de controle da pinta-preta do tomateiro.

Diante dos problemas expostos no manejo de doenças em plantas, o controle biológico destaca-se como uma alternativa viável e mais sustentável. Nesse sentido, podem ser introduzidos nos meios de produção agentes de controle biológico, denominados também de microrganismos antagonistas aos patógenos. Além disso, nos últimos anos o seu uso passou a integrar o manejo de doenças de plantas de forma mais ampla (BETTIOL, 2009; AMORIM; REZENDE; FILHO, 2018).

Por definição, o controle biológico de doenças de plantas é a destruição total ou parcial de populações de patógenos por outros organismos que são frequentemente encontrados na natureza (AGRIOS, 2004), simplificando, seria o uso de um microrganismo não patogênico em plantas, para o controle de um patogênico. Os mecanismos de interação antagonista são: antibiose, indução de resistência, competição, parasitismo, predação e promoção de crescimento, sendo que frequentemente os microrganismos antagonistas agem por mais de um mecanismo, garantindo assim, uma maior estabilidade de controle e amplo espectro de ação (AMORIM; REZENDE; FILHO, 2018).

Em 1950 foi publicado o primeiro artigo científico com a temática controle biológico, nele filtrados da cultura de *Trichoderma* sp. foram utilizados para a inativação do vírus do mosaico comum do fumo (FORSTER, 1950; BETTIOL, 2009). Trata-se do agente de controle biológico mais estudado e utilizado no Brasil e também em outros países da América Latina (BETTIOL, 2009). O gênero *Trichoderma* pertence ao Reino Fungi, filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales e família Hypocreaceae (MEYER; MAZARO; SILVA, 2019; CHAVERRI; SAMUELS, 2002).

O antagonismo do gênero *Trichoderma* perante os fitopatógenos se dá através dos mecanismos de parasitismo, antibiose, competição, promoção de crescimento vegetal e indução de defesas na planta. As espécies *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum* e *T. virens* possuem uma

ampla distribuição no solo, capacidade de parasitar fungos patogênicos, além de poder estabelecer relações benéficas na rizosfera, sendo por esses motivos amplamente utilizadas no controle biológico de fitopatógenos ou na promoção de crescimento vegetal (MEYER; MAZARO; SILVA, 2019).

O gênero *Ganoderma* pertence ao Reino Fungi, filo Basidiomycota, classe Agaricomycetes, ordem Polyporales e família Ganodermataceae. São caracterizados como macrofungos e a maioria das espécies desse gênero se encontra distribuída em regiões tropicais. A espécie *Ganoderma lucidum* tem seu uso farmacêutico bastante difundido, isso porque apresenta inúmeras aplicações terapêuticas além de atividade antimicrobiana. Seu corpo de frutificação e micélio possuem polissacarídeos, triterpenos e mais de 200 metabólitos secundários, demonstrando a potencialidade desse microrganismo como antagonico (SHARMA et al., 2019).

Alguns estudos vêm sendo realizados para estudar o potencial dessa espécie como um indutor de resistência vegetal, agindo assim, como um agente de controle de doenças em plantas. Já foi relatado que os seus extratos possuem atividade contra fungos patogênicos (BAIG; SHAHID; ALI, 2015) e que pode ser um indutor de resistência através do estímulo da via do jasmonato (SHARMA et al., 2019).

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo testar o efeito dos filtrados obtidos a partir do crescimento *in vitro* de *Trichoderma harzianum* e *Ganoderma lucidum* no controle da pinta-preta (*Alternaria linariae*) do tomateiro.

2. Materiais e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia (LABFITOP) e em casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia, no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em Florianópolis/SC. A condução das atividades ocorreu entre os meses de outubro de 2021 e fevereiro de 2022.

2.1 Obtenção de *Alternaria linariae*

O isolado de *Alternaria linariae* UCBV 180, foi fornecido pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). O patógeno que estava conservado em método de Castellani sob refrigeração, foi repicado para placas de Petri contendo meio de cultura V8CaCO₃ ágar (200 mL de extrato de tomate, 3 g de CaCO₃, 20 g de ágar e 800 mL de água destilada), estas que foram cultivadas em câmara de crescimento durante 7 dias a 25 °C com 12 h de fotoperíodo.

Para a esporulação do patógeno foi necessário colocá-lo sob estresse: decorridos 7 dias de cultivo, as placas de Petri foram abertas e água destilada foi acrescida sobre o micélio do fungo, que posteriormente foi raspado e retirado com auxílio de um pincel. Após esse procedimento, as placas foram colocadas abertas sob lâmpada ultravioleta com fotoperíodo de 12 horas, durante um período de 1 a 2 dias.

Para obter a suspensão de esporos, as placas foram inundadas com água destilada e a massa micelial foi raspada. Posteriormente, a suspensão de esporos foi coletada e filtrada em uma camada tripla de gaze a fim de remover fragmentos de micélio. O número de conídios foi determinado utilizando câmara de Neubauer e a concentração de inóculo foi ajustada para 2×10^3 conídios.mL⁻¹.

2.2 Obtenção de *Trichoderma harzianum* e *Ganoderma lucidum*

O isolado de *Trichoderma harzianum* utilizado foi o IBLF 006, obtido do produto comercial ECOTRICH®, um fungicida microbiológico em formulação pó molhável (WP). Já o isolado de *Ganoderma lucidum* utilizado foi o CC339ST da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN).

Para a obtenção do *Trichoderma harzianum*, o produto comercial foi adicionado ao centro de placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), as quais foram cultivadas em câmara de crescimento durante 5 a 7 dias a 25 °C com 12 h de fotoperíodo. Discos miceliais de *Ganoderma lucidum* mantidos em placas de Petri sob refrigeração, foram transferidos para novas placas também contendo meio de cultura BDA, e cultivados em câmara de crescimento por 10 dias a 25 °C com 12 h de fotoperíodo.

2.3 Obtenção dos filtrados de crescimento

Dez discos miceliais de *Trichoderma harzianum* previamente cultivados em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) por 5-7 dias, foram transferidos para frascos erlenmeyer contendo 200 mL de meio de cultura batata-dextrose (BD), alocados em mesa agitadora a 120 rpm e aproximadamente 26°C por 3 dias. Foi utilizado procedimento semelhante para a obtenção do filtrado de *Ganoderma lucidum*, diferindo apenas no tempo de incubação em mesa agitadora que nesse caso foi de 10 dias.

Após esse período de incubação, o conteúdo de cada erlenmeyer foi vertido em uma camada tripla de gaze e colocado em microtubos de 50 mL, os quais foram conservados sob refrigeração.

Sendo assim, foram obtidos o Filtrado de Crescimento de *Trichoderma harzianum* (FCT) e o Filtrado de Crescimento de *Ganoderma lucidum* (FCG).

2.4 Obtenção das plantas de tomate

Em bandejas de isopor com 128 células contendo substrato Carolina Soil, foram semeadas sementes de tomate da cultivar Kada (Grupo Santa Cruz). Depois de 14 dias, quando as plântulas já haviam emitido as primeiras folhas verdadeiras, foram transplantadas duas mudas para vasos de 2 L contendo Latossolo Vermelho. As plantas de tomate foram mantidas em casa de vegetação, irrigadas diariamente e adubadas duas vezes com solução nutritiva Dripsol®.

2.5 Antagonismo entre *Trichoderma harzianum* e *Ganoderma lucidum* contra *Alternaria linariae* no teste de pareamento

Para avaliar o potencial de antagonismo entre *Trichoderma harzianum* e *Ganoderma lucidum* contra *Alternaria linariae* foi utilizada a técnica de pareamento de culturas, descrita por Mariano (1993). Para isso, foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA discos miceliais de 0,5 cm de diâmetro de cada antagonista e do fitopatógeno *Alternaria linariae*. Os discos foram colocados em lados opostos a 2,5 cm da borda da placa. Já para as testemunhas, foi transferido para uma das bordas das placas, um disco micelial referido a cada antagonista ou do fitopatógeno, ficando isolado mas em posição semelhante às placas pareadas. As placas foram vedadas com papel filme e incubadas em câmara de crescimento a 25 °C com 12 h de fotoperíodo.

Após 5, 7, 10, 12, 14 dias, foi realizada a avaliação da porcentagem de inibição de crescimento do fitopatógeno pelos antagonistas, conforme fórmula descrita por Singh et al., 2002:

$$I = (C-T/C) \times 100$$

onde, I = inibição (%), C = diâmetro da colônia de *A. linariae* na placa de controle e T = diâmetro da colônia de *A. linariae* na placa contendo antagonista.

O teste do pareamento foi conduzido duas vezes, sendo que em cada uma foram realizadas 4 repetições por tratamento em delineamento inteiramente casualizado.

2.6 Efeitos dos filtrados de crescimento na severidade da pinta-preta em plantas de tomateiro

O experimento foi realizado quando as plantas possuíam 4 a 5 folhas verdadeiras, sendo submetidas aos seguintes tratamentos: Testemunha não tratada (SI); Filtrado de Crescimento de *Trichoderma* Pulverizado (FCTP); Filtrado de Crescimento de *Trichoderma* Aplicado no Solo (FCTS); Filtrado de Crescimento de *Ganoderma* Pulverizado (FCGP) e Filtrado de Crescimento de *Ganoderma* Aplicado no Solo (FCGS). Os tratamentos com filtrados de crescimento estavam na concentração 40% (40% filtrado e 60% água destilada). A pulverização ocorreu em toda parte aérea das plantas até o ponto de escoamento (± 8 mL), enquanto que a aplicação no solo foi feita próxima a base do caule.

Decorridas 48 horas, as plantas foram inoculadas com uma pulverização de suspensão de esporos de *A. linariae* contendo 2×10^3 conídios.mL⁻¹ e mantidas em câmara úmida durante 24 horas. As avaliações foram realizadas 1, 3, 6, 8 e 10 dias após a inoculação do fitopatógeno. A severidade da doença foi avaliada na 3ª e 4ª folha de cada planta, atribuindo-se uma nota para a severidade observada visualmente, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Notas atribuídas de acordo com a severidade da doença observada visualmente.

Notas	Severidade da doença (%)
0	0
1	entre 1 e 5
2	entre 5 e 15
3	entre 15 e 25
4	entre 25 e 50
5	> 50
6	≅100 (folha morta)

Fonte: Autor.

Foram utilizadas 5 repetições por tratamento, sendo uma repetição constituída por um vaso contendo duas plantas, em delineamento inteiramente casualizado.

2.7 Efeitos dos filtrados de crescimento na severidade da pinta-preta em folhas destacadas de tomateiro

Foi utilizada a metodologia de folha destacada descrita por Peever et al. 1999, com adaptações. Foram utilizadas folhas de tomate destacadas de plantas com 5 folhas verdadeiras, cultivadas em casa de vegetação. Depois de destacadas com auxílio de uma tesoura desinfestada, as folhas foram levadas ao laboratório, onde foram acondicionadas em caixas de plástico PET previamente submetidas à assepsia com álcool 70%, e que continham duas folhas de papel-filtro umedecido com água destilada. No pecíolo das folhas foi colocado uma porção de algodão também umedecida com água destilada.

Os tratamentos utilizados foram: Água destilada (testemunha), Filtrado de Crescimento de *Trichoderma* e Filtrado de Crescimento de *Ganoderma*, sendo as folhas pulverizadas até o ponto de escorrimento. Após 3 horas, as folhas foram inoculadas com uma pulverização de suspensão de esporos contendo 2×10^3 conídios.mL⁻¹, as caixas foram vedadas com papel filme e mantidas em

câmara de crescimento durante 4 dias a 25 ± 1 °C com 12 h de fotoperíodo. As avaliações foram realizadas 2, 3 e 4 dias após a inoculação com o fitopatógeno, a avaliação da severidade foi realizada visualmente atribuindo notas, conforme Tabela 1.

Foram utilizadas 6 repetições por tratamento em delineamento inteiramente casualizado.

2.9 Análises estatísticas

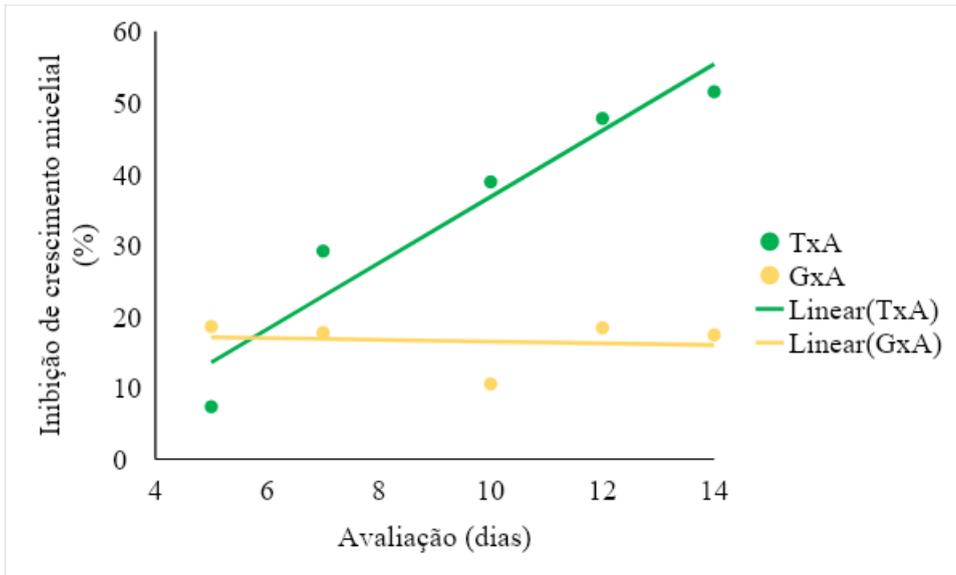
Foi utilizado o programa LibreOffice® versão 7.2 para realização dos cálculos de média, desvio padrão e análise de regressão, e o programa Sisvar® versão 5.6 para as análises de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1 Antagonismo entre *Trichoderma harzianum* e *Ganoderma lucidum* contra *Alternaria linariae* no teste de pareamento

Os fungos *Trichoderma harzianum* e *Ganoderma lucidum* reduziram o crescimento micelial de *Alternaria linariae* no teste do pareamento de culturas. *T. harzianum* inibiu significativamente o crescimento micelial do patógeno, em cerca de 50%, enquanto que o confronto com *G. lucidum* resultou em uma menor inibição, de aproximadamente 15%, como demonstra a Figura 1.

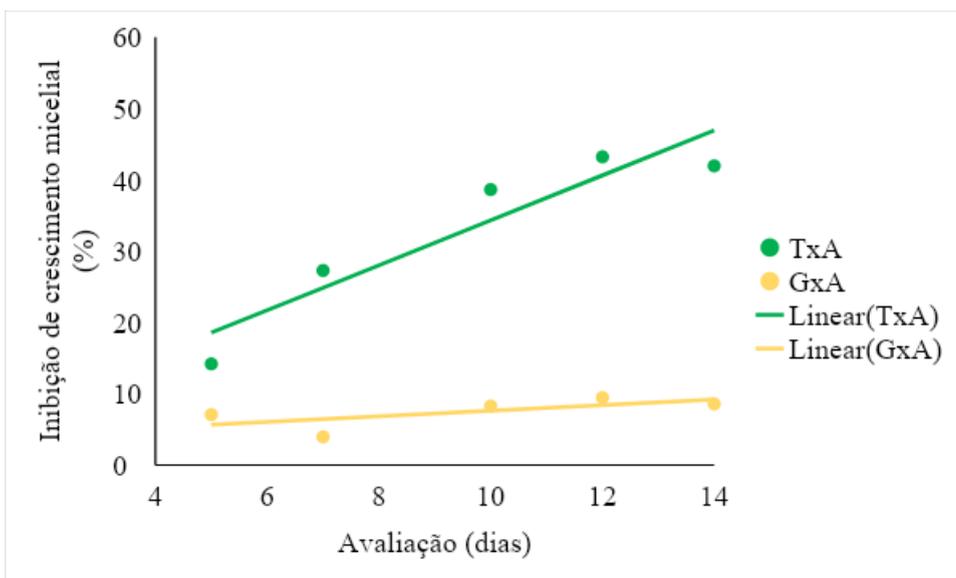
Figura 1. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Alternaria linariae* pareada em placa contendo antagonista, *Trichoderma harzianum* x *Alternaria linariae* (TxA) ou *Ganoderma lucidum* x *Alternaria linariae* (GxA) ao longo do tempo.



Fonte: Autor.

No segundo experimento, novamente, *T. harzianum* apresentou maior inibição de crescimento de *A. linariae* quando comparado ao *G. lucidum*, porém ambos obtiveram menores porcentagens de inibição, cerca de 42 e 8%, respectivamente (Figura 2).

Figura 2. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Alternaria linariae* pareada em placa contendo antagonista, *Trichoderma harzianum* x *Alternaria linariae* (TxA) ou *Ganoderma lucidum* x *Alternaria linariae* (GxA) ao longo do tempo.

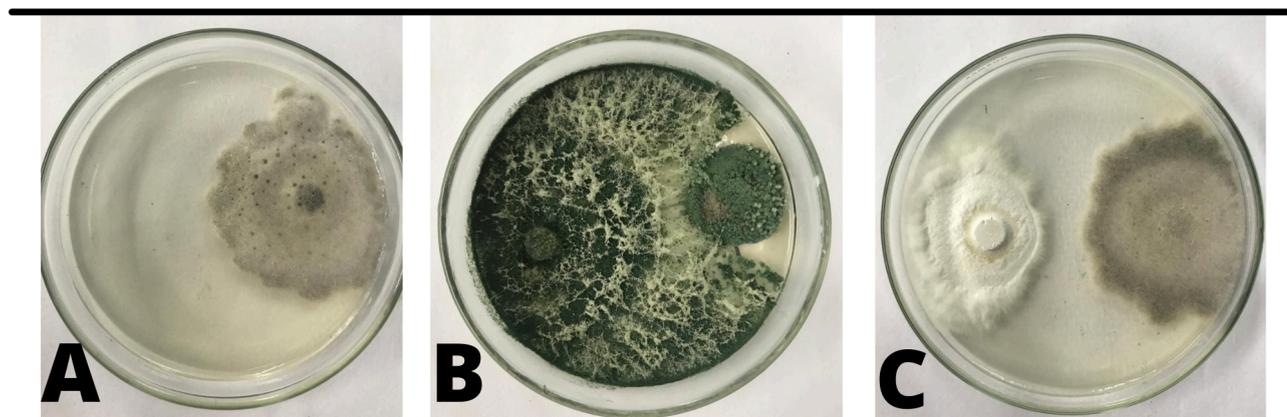


Fonte: Autor.

Em ambos experimentos, *T. harzianum* apresentou uma curva logarítmica de aumento da inibição ao longo do tempo, com picos nos valores 51% na avaliação após 14 dias, no primeiro experimento e 43% de inibição do patógeno na avaliação após 12 dias, no segundo experimento. Enquanto *G. lucidum* apresentou uma inibição linear, com picos nos valores 18% na avaliação após 5 e 12 dias e 9,5% na avaliação após 12 dias, no primeiro e segundo experimento, respectivamente.

Na figura 3, pode-se observar o crescimento micelial dos fungos no último dia de avaliação, sendo que no pareamento *T. harzianum* e *A. linariae*, o patógeno foi inibido mais fortemente se comparado com a testemunha e o pareamento *G. lucidum* e *A. linariae*. Além disso, *T. harzianum* já se encontrava parasitando *A. linariae*, com seu desenvolvimento sobre a colônia do fitopatógeno.

Figura 3. Crescimento micelial dos fungos no último dia de avaliação, sendo A: *Alternaria linariae* (testemunha); B: pareamento de *Trichoderma harzianum* x *Alternaria linariae* e C: pareamento de *Ganoderma lucidum* x *Alternaria linariae*.



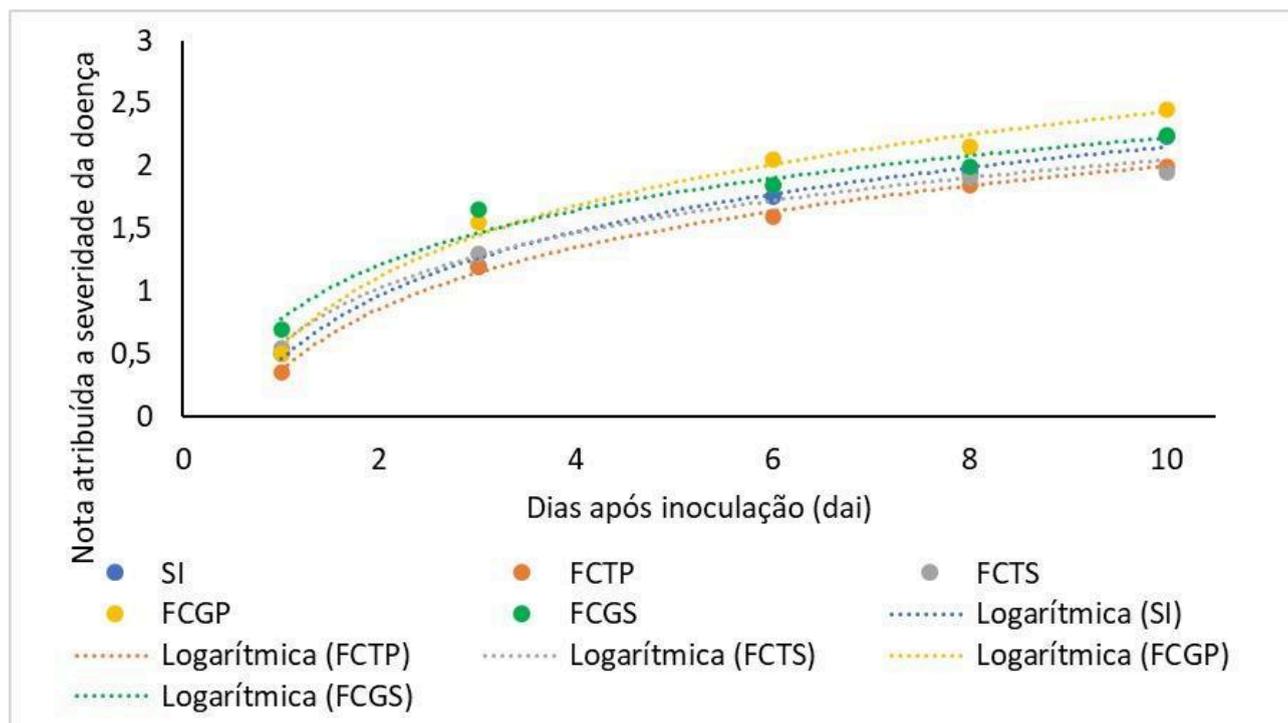
Fonte: Autor.

3.2 Efeitos dos filtrados de crescimento na severidade da pinta-preta em plantas de tomateiro

Os filtrados de crescimento de *Trichoderma harzianum* e *Ganoderma lucidum* não apresentaram efeitos sobre a severidade da pinta-preta em plantas de tomateiro, independente da forma de aplicação. Em ambos os tratamentos, a nota atribuída a severidade da doença apresentou

uma curva logarítmica de aumento (Figura 4), semelhante ao controle com somente inoculação do patógeno.

Figura 4. Notas atribuídas a severidade da pinta-preta (*Alternaria linariae*) em plantas de tomateiro submetidas a diferentes tratamentos: testemunha não tratada (SI), filtrado de crescimento de *Trichoderma harzianum* pulverizado (FCTP); filtrado de crescimento de *Trichoderma harzianum* aplicado no solo (FCTS); filtrado de crescimento de *Ganoderma lucidum* pulverizado (FCGP) e filtrado de crescimento de *Ganoderma lucidum* aplicado no solo (FCGS).



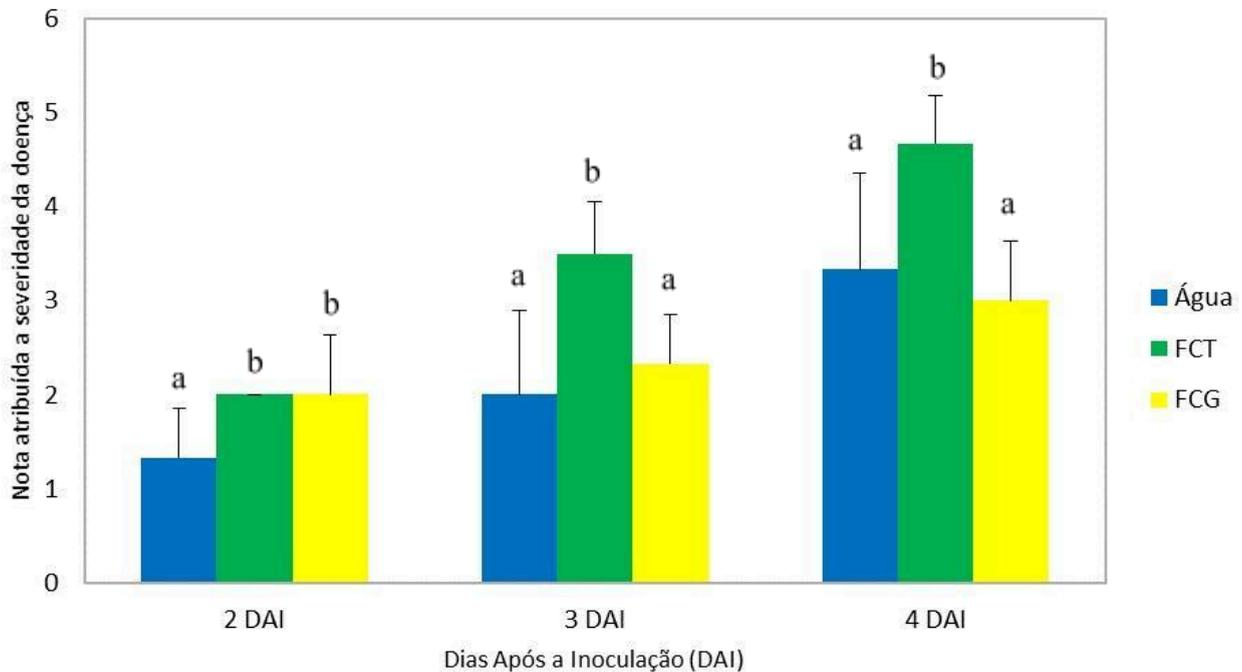
Fonte: Autor.

3.3 Efeitos dos filtrados de crescimento na severidade da pinta-preta em folhas destacadas de tomateiro

Os filtrados de crescimento de *Trichoderma harzianum* e *Ganoderma lucidum* também não apresentaram efeitos sobre a severidade da pinta-preta em folhas destacadas de tomateiro.

Conforme demonstra a Figura 5, aos 2 dias após a inoculação (DAI), os filtrados não apresentaram diferenças entre si, mas obtiveram uma maior nota atribuída à severidade da doença, em relação à testemunha. Já nos 3 e 4 DAI, o filtrado de crescimento de *G. lucidum* não apresentou diferença estatística quando comparado à testemunha, enquanto que o filtrado de crescimento de *T. harzianum* obteve as maiores notas nesses tempos de avaliação.

Figura 5. Notas atribuídas a severidade da pinta-preta (*Alternaria linariae*) em folhas destacadas de tomateiro submetidas a diferentes tratamentos: água destilada (testemunha), filtrado de crescimento de *Trichoderma harzianum* e filtrado de crescimento de *Ganoderma lucidum*. Médias seguidas da mesma letra, dentro do mesmo tempo de avaliação, não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).



Fonte: Autor.

4. Discussão

A pinta-preta é uma das principais doenças da cultura do tomate, seu agente causal, *Alternaria* sp. possui uma enorme agressividade, a qual acaba gerando toneladas de perdas na produção todos os anos. Os fungos do gênero *Alternaria* produzem cerca de 70 micotoxinas, dentre elas algumas são química e termicamente estáveis, além disso, possuem capacidade de sobrevivência em tecidos vegetais vivos ou mortos e seus conídios apresentam viabilidade por longos períodos em restos culturais. Esse conjunto de fatores acarreta em uma doença de difícil controle nos sistemas produtivos do tomateiro. Nesse contexto, seria interessante o desenvolvimento de biofungicidas, visando substituir o emprego de produtos químicos, uma das

medidas mais utilizadas para o controle da doença (KIMATI, 2011; TOMER; REDDY; DIWIVEDI, 2020).

Uma alternativa aos métodos convencionais de controle da pinta-preta, é o uso de agentes de biocontrole, através de suspensão de esporos ou de filtrados de crescimento *in vitro*, visando a obtenção de metabólitos secundários com atividade antibiótica. Segundo Meyer, Mazaro e Silva (2019), dos produtos de controle biológico à base de *Trichoderma* disponíveis no mercado, a espécie *Trichoderma harzianum* é a mais comercializada, estando presente em aproximadamente 38% dos produtos comerciais. Isso advém de sua combinação de modos de ação sobre os fitopatógenos e/ou promoção de crescimento das plantas. No caso do isolado IBLF 006, obtido do produto comercial ECOTRICH®, seu modo de ação se dá através de competição, parasitismo e antibiose.

A antibiose do gênero *Trichoderma* se dá através da produção de metabólitos secundários, sendo que sua atividade antifúngica já é conhecida frente a patógenos como *Botrytis*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Phytophthora* e *Pythium*. Os motivos do sucesso do antagonismo desse gênero são: competição com os fitopatógenos por nutrientes; produção de metabólitos secundários e a produção de enzimas capazes de hidrolisar a parede celular de seu hospedeiro. Entretanto, estudos verificando a eficiência de biocontrole de um determinado metabólito sobre uma doença em condições de campo ainda são escassos (MEYER; MAZARO; SILVA, 2019).

Dentre os principais metabólitos secundários produzidos pelo gênero *Trichoderma*, pode-se destacar as quinonas, pironas, terpenóides, esteróides, gliotoxinas, gliovirinas e os peptídeos antibióticos, sendo que todos estes apresentam atividade antimicrobiana e alguns ainda podem ser indutores benéficos às plantas. Outro gênero com alta produção de metabólitos secundários é o *Ganoderma*, este basidiomiceto produz esteróides, triterpenóides, e cerca de mais 200 outros metabólitos. Esses compostos são de interesse medicinal, visto que possuem ação antiinflamatória, antibacteriana e antifúngica, são usados principalmente na medicina humana e animal devido ao seu potencial terapêutico (SHARMA et al., 2019).

A partir disso, o uso dos fungos *Trichoderma harzianum* e *Ganoderma lucidum* e seus filtrados nesse estudo, buscava a obtenção de inibição de *Alternaria linariae* e controle da doença da pinta-preta do tomateiro, isso através dos mecanismos de antagonismo e produção de metabólitos secundários acima citados.

Os mecanismos de competição, parasitismo e antibiose foram observados neste estudo, visto que *T. harzianum* inibiu em cerca de 50% o crescimento micelial de *Alternaria linariae* nos experimentos *in vitro* com pareamento das culturas, além disso, foi observado visualmente o parasitismo sobre o patógeno nas placas pareadas. Resultados semelhantes foram encontrados nos experimentos realizados por Bokhari e Perveen (2012), *T. harzianum* inibiu o crescimento micelial de *Fusarium solani* em cerca de 51%. Já Mahmoud et al. (2021) relataram que *T. harzianum* apresentou alta capacidade antagônica contra *A. cerealis* já no quinto dia de incubação, enquanto que Nozaki et al. (2018) demonstrou que esse mesmo antagonista foi capaz de inibir em 66% o crescimento de *A. solani*.

Outro fungo com atividade antimicrobiana constatada na literatura é o *Ganoderma lucidum*, pesquisas já verificaram que seus compostos antibacterianos são capazes de inibir tanto bactérias gram negativas quanto positivas, além disso, existem estudos demonstrando que extratos do seu corpo de frutificação foram capazes de inibir o crescimento de fungos como *Botrytis cinerea*, *Physalospora piricola* e *Fusarium oxysporum* (SHARMA et al., 2019). De acordo com Baig, Shahid e Ali (2015), extratos de diferentes isolados de *G. lucidum* foram capazes de suprimir a biomassa fúngica de *Alternaria* sp. em até 46%. Neste estudo, foram encontrados valores de inibição do crescimento micelial de *A. linariae* por *G. lucidum* muito menores, aproximadamente 15%, quando comparado a outros trabalhos. No entanto, foi utilizado o fungo diretamente como antagonista no teste do pareamento e não seus extratos como nesses outros trabalhos.

Os fitopatógenos pertencentes ao gênero *Alternaria* possuem alta agressividade e se enquadram na categoria dos necrotróficos, os quais utilizam tecidos mortos como fonte de nutrientes, sendo assim, esses patógenos matam seu hospedeiro antes de invadi-lo, isso ocorre através de uma importante atividade de enzimas e toxinas (AMORIM; REZENDE; FILHO, 2018). Esses fatores atrelado com a susceptibilidade do tomate a pinta-preta em toda sua fase fenológica, a ocorrência da doença em todas as regiões de cultivo, e a capacidade do fungo de sobreviver em restos culturais por um longo período ou como infecção latente em sementes, resulta em uma doença de difícil controle na cultura (KIMATI, 2018; LOPES et al, 2005; HABIB et al., 2021).

Além disso, segundo estudos, a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) é o melhor critério quando se visa a determinação e comparação da severidade da pinta-preta (BESSADAT et al., 2014). Neste trabalho a severidade da doença foi avaliada de forma diferente, através de uma escala de notas, atribuídas a partir da severidade observada visualmente, caso tivesse sido utilizada outra metodologia de avaliação, os filtrados de crescimento de *Trichoderma*

harzianum e *Ganoderma lucidum* poderiam ter apresentado outros efeitos sobre a doença quando comparados com a testemunha.

Adss et al. (2021), demonstraram que uma suspensão de esporos de *T. harzianum* quando utilizada com outros indutores de resistência, se mostrou eficiente na proteção de tomates contra *A. solani*, reduzindo significativamente a severidade da doença. Segundo Fontenelle et al. (2011), isolados de *Trichoderma* spp. conferiram promoção de crescimento em mudas de tomate, além de proteção de até 95,94% contra *Xanthomonas euvesicatoria* e de até 95,23% contra *A. solani*, com valores variando de acordo com o isolado de *Trichoderma* utilizado.

No trabalho de Zhang et al. (2019), o polissacarídeo de *G. lucidum* apresentou controle sobre a murcha de *Fusarium* do algodoeiro tanto aplicado por irrigação do solo quanto por pulverização na parte aérea ou no tratamento de sementes, sendo que o controle da doença aumentava de acordo com o aumento da dose do polissacarídeo. A aplicação por irrigação do solo foi a que apresentou as melhores taxas de controle da doença.

Além disso, estudos com o oídio da soja demonstraram que o filtrado de crescimento micelial de *G. lucidum* apresenta potencial de controle da doença. Caracterizando-se também como um potencial indutor de resistência na cultura e também fungicida, pois reduz a severidade da doença em plantas de soja (CRUZ et al., 2019).

Segundo El-Katatny e Emam (2012), o filtrado de crescimento de *T. harzianum* inibiu a germinação de esporos de patógenos causadores de podridões pós-colheita de tomate, isso em decorrência da liberação de metabólitos no filtrado, também resultou em deformações no micélio de *Alternaria* sp. Além disso, este mesmo trabalho discutiu sobre as concentrações de filtrados capazes de inibir a germinação de esporos desses patógenos pós-colheita, no caso de 4 isolados de *Alternaria*, concentrações acima de 50% inibiram completamente a germinação dos conídios. A concentração de filtrado utilizada também gerou resultados distintos com relação a incidência dessas doenças, a concentração de 50% reduziu a incidência de *Alternaria* sp. em 20%, enquanto que a 100%, ou seja, sem diluição, o filtrado reduziu a incidência em cerca de 60%.

Resultados semelhantes foram encontrados por Abdel-Ghany e Bakri (2019), onde o aumento da concentração do filtrado de *T. harzianum* inibiu gradualmente o crescimento micelial da colônia de *A. solani*, sendo que na maior concentração (70%) houve uma inibição de 51% do crescimento do patógeno.

Neste trabalho, os filtrados de crescimento de *T. harzianum* e *G. lucidum* podem ter sido utilizados em uma concentração muito baixa (40%), não proporcionando então, resultados satisfatórios de controle da pinta-preta do tomateiro.

Os meios de cultura fornecem a base para a nutrição de microrganismos cultivados *in vitro*, o meio BD é muito rico em nutrientes e estimula o desenvolvimento vegetativo de fungos (SCHULTZ, AUER; SANTOS, 2012). Nesse contexto, o meio BD utilizado neste estudo para obtenção dos filtrados de crescimento de *T. harzianum* e *G. lucidum* pode ter causado um estímulo ao patógeno *A. linariae*, principalmente no experimento com folhas destacadas. O fungo *T. harzianum* foi incubado por menos tempo que *G. lucidum* para obtenção dos filtrados, assim, possivelmente mais nutrientes ficaram disponíveis ao patógeno a partir do filtrado que foi aplicado pouco tempo antes da inoculação, causando estímulo e gerando uma maior severidade da doença.

5. Conclusão

Dessa forma, conclui-se que os fungos *Trichoderma harzianum* e *Ganoderma lucidum* apresentam antagonismo contra *Alternaria linariae*, visto que causaram inibição do crescimento micelial do patógeno no teste do pareamento de culturas. Entretanto, seus filtrados de crescimento não apresentaram efeitos de controle da pinta-preta do tomateiro nos ensaios *in vivo*.

6. Referências Bibliográficas

ABDEL-GHANY, T. M.; BAKRI, M. M.. Effectiveness of a Biological Agent (*Trichoderma harzianum* and its culture filtrate) and a Fungicide (methyl benzimidazole-2-ylcarbamate) on the Tomato Rotting Activity (growth, cellulolytic, and pectinolytic activities) of *Alternaria solani*. **Bioresources**, North Carolina, v. 14, n. 1, p. 1591-1602, 2019.

ADSS, I. A. et al. Effect of Abscisic Acid, Salicylic Acid, Potassium Silicate, and *Trichoderma harzianum* As Biocontrol Agent to Induce the Tomato Resistance Against Early Blight Disease Caused by *Alternaria solani*. **Alexandria Science Exchange Journal**, Alexandria, v. 42, n. 3, p. 773-788, 2021. Disponível em: <https://journals.ekb.eg/article_196416_1fb759c3a467b4b22625b89d7b5c9289.pdf>. Acesso em: 25 fev. 2022.

AMORIM, L.; REZENDE J. A. M.; FILHO A. B. **Manual de fitopatologia volume 1: princípios e conceitos** / edição de Lilian Amorim, Jorge Alberto Marques Rezende e Armando Bergamin Filho. 5. ed. Ouro Fino: Ed. Agronômica Ceres, 559 p. 2018.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology** / George Agrios. 5th ed. San Diego: Ed. Elsevier Academic Press, 948p. 2004.

ÁVILA, A. C. de. et al. **A Cultura do Tomate**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/hortalias/tomate-de-mesa/como-plantar>>. Acesso em: 19 jan. 2022.

BAIG, M. N.; SHAHID, A. A.; ALI, M. In Vitro Assessment of Extracts of the Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes) Against Different Plant Pathogenic Fungi. **International Journal Of Medicinal Mushrooms**, [S.L.], v. 17, n. 4, p. 407-411, 2015. Begell House. <http://dx.doi.org/10.1615/intjmedmushrooms.v17.i4.90>. <https://www.dl.begellhouse.com/journals/708ae68d64b17c52.5b711a741ddf87a8.36329d351ccba418.html#>

BARROS, G. S. C B. de.; BOTEON, M. **ESPECIAL TOMATE**. Piracicaba: Cepea, v. 19, n. 201, jun. 2020. Disponível em: <<https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/acessar/completo/especial-tomate-impactos-covid-19-nos-curo-e-medio-prazos.aspx>>. Acesso em: 20 jan. 2022.

BESSADAT, N. et al. AGGRESSIVENESS AND MORPHOLOGICAL VARIABILITY OF SMALL SPORE *Alternaria* SPECIES ISOLATED FROM ALGERIA. **Journal Of Experimental Biology And Agricultural Sciences**, Izatnagar, v. 2, p. 265-278, 05 maio 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Kihal-Mebrouk/publication/280445813_AGGRESSIVENESS_AND_MORPHOLOGICAL_VARIABILITY_OF_SMALL_SPORE_Alternaria_SPECIES_ISOLATED_FROM_ALGERIA/links/55b53b9908aed621de02db7a/AGGRESSIVENESS-AND-MORPHOLOGICAL-VARIABILITY-OF-SMALL-SPORE-Alternaria-SPECIES-ISOLATED-FROM-ALGERIA.pdf>. Acesso em: 24 fev. 2022.

BETTIOL, W. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas** / Editado por Wagner Bettiol e Marcelo Augusto Boechat Morandi. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 341 p. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/579954/1/livrobiocontrole.pdf>>. Acesso em: 03 fev. 2022.

BOKHARI, N. A.; PERVEEN, K. Antagonistic action of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Fusarium solani* causing root rot of tomato. **African Journal Of Microbiology Research**, South South Nigeria, v. 6, p. 7193-7197, 20 nov. 2012. Disponível em: <<https://academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text-pdf/870365E17734>>. Acesso em: 24 fev. 2022.

CARILLO, P. et al. Sensory and functional quality characterization of protected designation of origin 'Piennolo del Vesuvio' cherry tomato landraces from Campania-Italy. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 292, p. 166-175, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.056>.

CHAVERRI, P.; SAMUELS G. J. *Hypocrea lixii*, the teleomorph of *Trichoderma harzianum*. **Mycological Progress**, p. 283-286. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=5544&lvl=3&lin=f>>. Acesso em: 04 fev. 2022.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **TOMATE: Análise dos Indicadores da Produção e Comercialização no Mercado Mundial, Brasileiro e Catarinense**. Compêndio de Estudos Conab / Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: Conab, v. 1, 2019.

CRUZ, M. P. da; MAZARO, S. M.; BRUZAMARELLO, J.; VISMARA, E. S. de.; GHEDIN, Á. L.; POSSENTI, J.C.; VÍTOLO, F. M. D. Bioactive Compounds of *Ganoderma lucidum* Activate the Defense Mechanisms of Soybean Plants and Reduce the Severity of Powdery Mildew. **Journal Of Agricultural Science**, [S.L.], v. 11, n. 13, p. 99, 15 ago. 2019. Canadian Center of Science and Education. <http://dx.doi.org/10.5539/jas.v11n13p99>.

EL-KATATNY, M. H.; EMAM, A.S. CONTROL OF POSTHARVEST TOMATO ROT BY SPORE SUSPENSION AND ANTIFUNGAL METABOLITES OF *Trichoderma harzianum*. **Journal Of Microbiology, Biotechnology And Food Sciences**, El-Minia, v. 6, n. 1, p. 1505-1528, 2012. Disponível em: <https://www.jmbfs.org/wp-content/uploads/2012/05/El-katatny_jmbfs_0090.pdf>. Acesso em: 25 fev. 2022.

FAO. FAOSTAT: Data-crops. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 10 fev. 2022.

FONTENELLE, A.D.B.; GUZZO, S.D.; LUCON, C.M.M.; HARAKAVA, R.. Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. **Crop Protection**, [S.L.], v. 30, n. 11, p. 1492-1500, nov. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2011.07.019>.

FORSTER, R. INATIVAÇÃO DO VÍRUS DO MOSAICO COMUM DO FUMO PELO FILTRADO DE CULTURAS DE *Trichoderma* sp. **Bragantia**, Campinas, v. 10, n. 5, p. 140-148, 1950. Disponível em:

<<https://www.scielo.br/j/brag/a/PygzyLLNS8S7Q5RGDxCKLLN/?format=pdf&lang=pt>>. Acesso em: 04 fev. 2022.

HABIB, W. et al. Mycotoxin Profile and Phylogeny of Pathogenic *Alternaria* Species Isolated from Symptomatic Tomato Plants in Lebanon. **Toxins**, v. 13, n. 513, 2021. <https://doi.org/10.3390/toxins13080513>

KIMATI, H. **Manual de fitopatologia volume 2: doenças das plantas cultivadas** / edição de Lilian Amorim, Jorge Alberto Marques Rezende e Armando Bergamin Filho. 4. ed. Piracicaba: Ed. Agronômica Ceres, 704 p. 2011.

LOPES, C. A. et al. **Doenças do tomateiro** / organizadores. Carlos Alberto Lopes. Antônio Carlos de Ávila: autores. Carlos Alberto Lopes ... [et al.]. 2. ed. Brasília: Embrapa Hortaliça, 151 p. 2005.

LOPES, C. A.; REIS, A. **Doenças do tomateiro cultivado em ambiente protegido**. 2. ed. Brasília: Embrapa, 2011. 17 p. (Circular Técnica 100).

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção “in vitro” para controle microbiológico. **Revisão Anual de patologia de Planta 1**, p. 369-409. 1993.

MAHMOUD, G. A.; ABDEL-SATER, M.A.; AL-AMERY, E.; HUSSEIN, N. A. Controlling *Alternaria cerealis* MT808477 Tomato Phytopathogen by *Trichoderma harzianum* and Tracking the Plant Physiological Changes. **Plants**, [S.L.], v. 10, n. 9, p. 1846, 6 set. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants10091846>.

MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. da. **Trichoderma: uso na agricultura**. Brasília: Embrapa, 2019. 538 p.

NAIKA, S. **A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização**. Wageningen: Fundação Agromisa e Cta, 2006. 104 p. Tradução por Rob Barnhoorn. Disponível em: <<https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/64439/1319.pdf?sequence=5&isAllowed=y>>.

Acesso em: 20 jan. 2022

NOZAKI, M. H. de. et al. Controle in vitro de *Alternaria solani* por diferentes isolados de *Trichoderma* spp. **Revista Cultivando O Saber**, Cascavel, v. 11, n. 4, p. 9-16, 2018. Disponível em: <<https://cultivandosaber.fag.edu.br/index.php/cultivando/article/view/881/804>>. Acesso em: 24 fev. 2022.

PEEVER, T. L.; CANIHOS, Y.; OLSEN, L.; IBANEZ, A. LIU, Y. C.; TIMMER, L. W. Population genetic structure and host specificity of *Alternaria* spp. causing brown spot of *Minneola* tangelo and rough lemon in Florida. **Phytopathology**, v.89, p. 851-860, 1999.

RODRIGUES, H. S. de. et al. MANEJO INTEGRADO DAS PRINCIPAIS DOENÇAS DO TOMATEIRO, *Solanum lycopersicum*. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 9, n. 17, p. 1816-1833, 2013. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2013b/CIENCIAS%20AGRARIAS/MANEJO%20INTEGRADO.pdf>>. Acesso em: 31 jan. 2022.

SAHARAN, G. S.; MEHTA, N.; MEENA, P. D. *Alternaria* diseases of crucifers: biology, ecology and disease management. Singapore: **Springer**, 2016.

SCHULTZ, B.; AUER, C. G.; SANTOS, Á.F. dos. Uso do meio folha de eucalipto-ágar para esporulação de fungos isolados de *Eucalytus benthamii*. Colombo: **Embrapa**, 4 p. 2012. (Comunicado Técnico 296). Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/63785/1/CT296.pdf>>. Acesso em: 25 fev. 2022.

SHARMA, C. et al. Bioactive metabolites of *Ganoderma lucidum*: factors, mechanism and broad spectrum therapeutic potential. **Journal Of Herbal Medicine**, [S.L.], v. 17-18, p. 100268, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hermed.2019.100268>. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2210803319300144?casa_token=ZTRd_LDG2TYAAAAA:1_bAsmCWf_-aT9IBOBILmswhy6uHoknfVGz0Sh31kVENO9iSxLRQqpW0P3Vw99LCPeb2PD3h6Qw.

SILVA, C. J. et al. Host susceptibility factors render ripe tomato fruit vulnerable to fungal disease despite active immune responses. **Journal Of Experimental Botany**, [S.L.], v. 72, n. 7, p. 2696-2709, 19 jan. 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/eraa601>.

SINGH R et al. Biological control of *Fusarium wilt* disease of pigeonpea. **Plant Pathol. J**, p. 279-283. 2002.

TOMER, A.; REDDY, C. U. K.; DIWIVEDI, S. K. A Review on Early blight of Tomato menacing disease caused by *Alternaria solani*. **European Journal Of Molecular & Clinical Medicine**, Reino Unido, p. 2328-2334. jul. 2020. Disponível em: <https://ejmcm.com/article_4917_7a7c05818a38cdb7aca388c00be9479b.pdf>. Acesso em: 23 fev. 2022.

ZHANG, Z.; DIAO, H.; WANG, H.; WANG, K.; ZHAO, M. Use of *Ganoderma Lucidum* polysaccharide to control cotton fusarium wilt, and the mechanism involved. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, [S.L.], v. 158, p. 149-155, jul. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.05.003>.