



**Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Fitopatologia  
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia**

**Compatibilidade de *Trichoderma* spp. com agrotóxicos e inibição  
de patógenos do solo por cepas comerciais e não comerciais**

**AMANDA SILVA BOTELHO**

**Brasília – DF**

**2022**

**AMANDA SILVA BOTELHO**

**Compatibilidade de *Trichoderma* spp. com agrotóxicos e inibição de patógenos do solo por cepas comerciais e não comerciais**

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia

**Orientadora**

Dr<sup>a</sup>. Sueli Corrêa Marques de Mello

**BRASÍLIA  
DISTRITO FEDERAL - BRASIL**

**2022**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

Botelho, Amanda Silva

Compatibilidade de *Trichoderma* spp. com agrotóxicos e inibição de patógenos do solo por cepas comerciais e não comerciais

Brasília, 2022. Número de páginas: 90

Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília - DF.

1. Fitopatologia – Controle Biológico de Doenças

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT

II. Compatibilidade de *Trichoderma* spp. com agrotóxicos e inibição micelial de patógenos do solo por cepas comerciais e não comerciais.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais, Maria Aparecida e José Carlos, por tanto amor, incentivo e suporte incondicional, e que, juntamente ao Luís Henrique, Leonora e Bernardo formam o meu lar!

Aos demais familiares e amigos por estarem sempre torcendo pelas minhas conquistas.

À Dra. Sueli Mello, pela orientação, ensinamentos e dedicação para realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia: Ana Beatriz, Lincon, Leonardo e Ana Luiza, por toda ajuda e amizade.

À Caterynne e Ellen, pela amizade e companhia.

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela infraestrutura e materiais de pesquisa disponibilizados.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da Dr<sup>a</sup> Sueli Corrêa Marques de Mello, com apoio institucional e financeiro da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Bionat Soluções Biológicas

**Compatibilidade de *Trichoderma* spp. com agrotóxicos e inibição de patógenos do solo por cepas comerciais e não comerciais**

**AMANDA SILVA BOTELHO**

DISSERTAÇÃO APROVADA em 23 / 02 / 2022 por:

---

Dr. Eudes de Arruda Carvalho (Examinador Externo)

---

Prof. Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum (Examinador Interno)

---

Profa. Dra. Orientadora Sueli Corrêa Marques de Mello (Presidente)

---

Profa. Dra. Thais Ribeiro Santiago (Suplente)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL  
BRASIL

2022

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	9
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	11
<b>RESUMO GERAL</b> .....	13
<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	14
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	15
<b>OBJETIVOS</b> .....	18
Objetivo geral.....	18
Objetivos específicos.....	18
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
<i>Trichoderma</i> como agente de biocontrole.....	19
<i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i> como patógenos de plantas.....	21
<i>Trichoderma</i> spp. na supressão de <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i> .....	24
Compatibilidade de <i>Trichoderma</i> com agrotóxicos .....	26
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	29
<b>CAPÍTULO 1. Inibição micelial de <i>Macrophomina phaseolina</i>, <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>, <i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i> por cepas comerciais de <i>Trichoderma</i> utilizadas no Brasil</b> .....	35
<b>Resumo</b> .....	35
<b>Introdução</b> .....	35
<b>Material e Métodos</b> .....	37
Origem e preservação das cepas.....	37
Avaliação do antagonismo das cepas comerciais de <i>Trichoderma</i> contra <i>M. phaseolina</i> , <i>S.</i> <i>sclerotiorum</i> , <i>R. solani</i> e <i>S. rolfsii</i> por meio do pareamento de culturas .....	38
Avaliação da inibição do crescimento micelial de <i>M. phaseolina</i> , <i>S. sclerotiorum</i> , <i>R. solani</i> e <i>S. Rolfsii</i> , expostos aos compostos orgânicos voláteis de cepas comerciais de <i>Trichoderma</i>	38

<b>Resultados</b> .....	39
Avaliação do antagonismo das cepas comerciais de <i>Trichoderma</i> contra <i>M. phaseolina</i> , <i>S. sclerotiorum</i> , <i>R. solani</i> e <i>S. rolfsii</i> por meio do pareamento de culturas .....	39
Avaliação da inibição do crescimento micelial de <i>M. phaseolina</i> , <i>S. sclerotiorum</i> , <i>R. solani</i> e <i>S. rolfsii</i> expostos aos compostos orgânicos voláteis de cepas comerciais de <i>Trichoderma</i> .	42
<b>Discussão</b> .....	45
<b>Conclusão</b> .....	48
<b>Referências</b> .....	48
<b>CAPÍTULO 2. Efeito de cepas não comerciais de <i>Trichoderma</i> no crescimento micelial de <i>Macrophomina phaseolina</i>, <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>, <i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i></b> .....	52
<b>Resumo</b> .....	52
<b>Introdução</b> .....	52
<b>Material e Métodos</b> .....	53
Origem e preservação das cepas utilizados .....	53
Inibição do crescimento micelial de <i>M. phaseolina</i> , <i>S. sclerotiorum</i> , <i>R. solani</i> e <i>S. rolfsii</i> pelas cepas de <i>Trichoderma</i> em culturas pareadas .....	54
Inibição do crescimento micelial de <i>M. phaseolina</i> , <i>S. sclerotiorum</i> , <i>R. solani</i> e <i>S. rolfsii</i> expostos a compostos orgânicos voláteis de cepas de <i>Trichoderma</i> .....	55
Inibição do crescimento micelial de <i>M. phaseolina</i> , <i>S. sclerotiorum</i> , <i>R. solani</i> e <i>S. rolfsii</i> sob exposição a filtrados de colônia de <i>Trichoderma</i> .....	56
<b>Resultados</b> .....	56
Inibição do crescimento micelial de <i>M. phaseolina</i> , <i>S. sclerotiorum</i> , <i>R. solani</i> e <i>S. rolfsii</i> por linhagens de <i>Trichoderma</i> , pelo método de pareamento de culturas .....	56
Inibição do crescimento micelial de <i>M. phaseolina</i> , <i>S. sclerotiorum</i> , <i>R. solani</i> e <i>S. rolfsii</i> expostos aos compostos orgânicos voláteis de cepas de <i>Trichoderma</i> .....	60
Avaliação da inibição do crescimento micelial de <i>M. phaseolina</i> , <i>S. sclerotiorum</i> , <i>R. solani</i> e <i>S. rolfsii</i> expostos aos filtrados culturas de <i>Trichoderma</i> spp. ....	61
<b>Discussão</b> .....	62

<b>Conclusão</b> .....	67
<b>Referências</b> .....	68
<b>CAPÍTULO 3. Compatibilidade de cepas de <i>Trichoderma</i> com agrotóxicos</b> .....	72
<b>Resumo</b> .....	72
<b>Introdução</b> .....	72
<b>Material e Métodos</b> .....	73
Cepas de <i>Trichoderma</i> utilizadas .....	73
Agrotóxicos utilizados.....	74
Crescimento micelial de <i>Trichoderma</i> spp. em meio de cultura suplementado com os agrotóxicos .....	74
Germinação de conídios de <i>Trichoderma</i> spp. cultivados em presença de agrotóxicos .....	76
Efeito do tratamento de sementes agrotóxicos no crescimento micelial de <i>Trichoderma</i> spp.	77
<b>Resultados</b> .....	78
Crescimento micelial de <i>Trichoderma</i> spp. em meio de cultura suplementado com agrotóxicos.....	78
Germinação de conídios de <i>Trichoderma</i> spp. expostos às caldas de agrotóxicos .....	80
Efeito do tratamento de sementes com agrotóxicos no crescimento micelial de <i>Trichoderma</i> spp. ....	83
<b>Discussão</b> .....	84
<b>Conclusão</b> .....	86
<b>Referências</b> .....	87
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	90



## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 1. Inibição micelial de *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* por cepas comerciais de *Trichoderma* utilizadas no Brasil**

<b>Tabela 1:</b> Cepas comerciais de <i>Trichoderma</i> utilizadas nos ensaios e patógenos alvos.....	37
<b>Tabela 2:</b> Inibição do crescimento micelial de <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i> por cepas comerciais de <i>Trichoderma</i> , em cultivo pareado.....	39
<b>Tabela 3:</b> Número de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i> aos 15 e 20 dias de incubação, respectivamente, nas culturas pareadas com <i>Trichoderma</i> spp.....	42
<b>Tabela 4:</b> Inibição do crescimento micelial de <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i> em exposição aos compostos orgânicos voláteis das cepas comerciais de <i>Trichoderma</i> .....	43

### **CAPÍTULO 2. Efeito de cepas não comerciais de *Trichoderma* no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii***

<b>Tabela 1:</b> Origem das cepas de <i>Trichoderma</i> utilizadas.....	54
<b>Tabela 2:</b> Inibição micelial de <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i> por cepas não comerciais de <i>Trichoderma</i> , no cultivo pareado.....	57
<b>Tabela 3:</b> Número de escleródios produzidos por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i> após 15 dias cultivados em pareamento com <i>Trichoderma</i> spp.....	60
<b>Tabela 4:</b> Inibição micelial de <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i> por compostos orgânicos voláteis (COVs) de <i>Trichoderma</i> .....	61
<b>Tabela 5:</b> Inibição micelial de <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Rhizoctonia solani</i> por filtrados de cultura de <i>Trichoderma</i> spp.....	62

### **CAPÍTULO 3. Compatibilidade de cepas de *Trichoderma* com agrotóxicos**

<b>Tabela 1:</b> Nome comercial, classe e grupo químico dos agrotóxicos testados.....	74
<b>Tabela 2:</b> Dosagens dos agrotóxicos para incorporação ao meio de cultivo das cepas de <i>Trichoderma</i> .....	75
<b>Tabela 3:</b> Dosagem dos agrotóxicos utilizadas para compor as caldas utilizadas nos testes de compatibilidade com <i>Trichoderma</i> .....	77
<b>Tabela 4:</b> Produtos químicos utilizados para o tratamento de sementes de soja e dosagens utilizadas.....	77
<b>Tabela 5:</b> Inibição do crescimento micelial das cepas <i>T. afroharzianum</i> CEN287, <i>T. koningiopsis</i>	

CEN1513, *T. afroharzianum* CEN281 e *T. azevedoi* CEN1242 em BDA suplementado com diferentes agrotóxicos, na menor dose recomendada para aplicação terrestre.....79

**Tabela 6:** Inibição do crescimento micelial das cepas *T. afroharzianum* CEN287, *T. koningiopsis* CEN1513, *T. afroharzianum* CEN281 e *T. azevedoi* CEN1242 em BDA suplementado com diferentes agrotóxicos, na maior dose recomendada para aplicação terrestre.....80

**Tabela 7:** Porcentagem de germinação de conídios das cepas *T. afroharzianum* CEN287, *T. koningiopsis* CEN1513, *T. afroharzianum* CEN281 e *T. azevedoi* CEN1242 após imersão em calda de produtos químicos, na menor dose recomendada para aplicação terrestre.....81

**Tabela 8:** Porcentagem de germinação de conídios das cepas *T. afroharzianum* CEN287, *T. koningiopsis* CEN1513, *T. afroharzianum* CEN281 e *T. azevedoi* CEN1242 após imersão em calda de produtos químicos, na maior dose recomendada para aplicação aérea.....82

## LISTA DE FIGURAS

### **CAPÍTULO 1. Inibição micelial de *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* por cepas comerciais de *Trichoderma* utilizadas no Brasil**

**Figura 1:** Culturas pareadas de *Trichoderma* spp. e *Macrophomina phaseolina*, aos quatro dias de crescimento. A: IBLF 006, B: URM 5911, C: CPQBA040-11DRM09, D: CCT 7589, E: T22, F: Esalq 1306, G: UFT 201, H: BV10, I: Controle (*M. phaseolina* CEN1628). ..... 41

**Figura 2:** Culturas pareadas de *Trichoderma* spp. e *Rhizoctonia solani*, aos cinco dias de crescimento. A: IBLF 006, B: URM 5911, C: CPQBA040-11DRM09, D: CCT 7589, E: T22, F: Esalq 1306, G: UFT 201, H: BV10, I: Controle (*R. solani* CEN1627)..... 41

**Figura 3:** Culturas pareadas de *Trichoderma* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum* aos cinco dias de idade. A: IBLF 006, B: URM 5911, C: CPQBA040-11DRM09, D: CCT 7589, E: T22, F: Esalq 1306, G: UFT 201, H: BV10, I: Controle (*S. sclerotiorum* CEN1147). ..... 41

**Figura 4:** Culturas pareadas de *Trichoderma* spp. e *Sclerotium rolfsii* aos seis dias de idade. A: IBLF 006, B: URM 5911, C: CPQBA040-11DRM09, D: CCT 7589, E: T22, F: Esalq 1306, G: UFT 201, H: BV10, I: Controle (*S. rolfsii* CEN216). ..... 42

**Figura 5:** Colônias de *Macrophomina phaseolina* aos três dias de idade, expostas aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. A: IBLF 006, B: URM 5911, C: CPQBA040-11DRM09, D: CCT 7589, E: T22, F: Esalq 1306, G: UFT 201, H: BV10, I: Controle (*M. phaseolina* CEN1628)..... 44

**Figura 6:** Colônias de *Sclerotinia sclerotiorum* aos três dias de idade, expostas aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. A: IBLF 006, B: URM 5911, C: CPQBA 040-11DRM 09, D: CCT 7589, E: T22, F: Esalq 1306, G: UFT 201, H: BV10, I: Controle (*S. sclerotiorum* CEN1147)..... 44

**Figura 7:** Colônias de *Rhizoctonia solani* aos quatro dias de idade, expostas aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. A: IBLF 006, B: URM 5911, C: CPQBA040-11DRM09, D: CCT 7589, E: T22, F: Esalq 1306, G: UFT 201, H: BV10, I: Controle (*R. solani* CEN1627).45

**Figura 8:** Colônias de *Sclerotium rolfsii* aos quatro dias de idade, com exposição aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. A: IBLF 006, B: URM 5911, C: CPQBA040-11DRM09, D: CCT 7589, E: T22, F: Esalq 1306, G: UFT 201, H: BV10, I: Controle (*S. rolfsii* CEN216). 45

### **CAPÍTULO 2. Efeito de cepas não comerciais de *Trichoderma* no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii***

**Figura 1:** Culturas pareadas de *Trichoderma* spp. e *Macrophomina phaseolina* aos cinco dias de crescimento. A: CEN1277, B: CEN287, C: CEN288, D: CEN1546, E: CEN1513, F: CEN281, G: CEN1242, H: CEN1559, I: Controle (*M. phaseolina* CEN1628).....58

**Figura 2:** Culturas pareadas de *Trichoderma* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum* aos cinco dias de cultivo. A: CEN1277, B: CEN287, C: CEN288, D: CEN1546, E: CEN1513, F: CEN281, G: CEN1242, H: CEN1559, I: Controle (*S. sclerotiorum* CEN1147).....58

**Figura 3:** Culturas pareadas de *Trichoderma* spp. e *Rhizoctonia solani* após cinco dias de cultivo. A: CEN1277, B: CEN287, C: CEN288, D: CEN1546, E: CEN1513, F: CEN281, G: CEN1242, H: CEN1559, I: Controle (*R. solani* CEN1627).....59

**Figura 4:** Pareamento de culturas entre *Trichoderma* spp. e *Sclerotium rolfsii* após cinco dias de crescimento. A: CEN1277, B: CEN287, C: CEN288, D: CEN1546, E: CEN1513, F: CEN281, G: CEN1242, H: CEN1559, I: Controle (*S. rolfsii* CEN216).....59

## RESUMO GERAL

BOTELHO, Amanda Silva. **Compatibilidade de *Trichoderma* spp. com agrotóxicos e inibição de patógenos do solo por cepas comerciais e não comerciais.** 2022. Número de páginas 90 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

O fungo *Trichoderma* é um dos principais agentes de controle biológico de doenças fúngicas. Seu uso tem como vantagens o baixo impacto ambiental, a redução da seleção de microrganismos resistentes, sua permanência na rizosfera da planta por um período e a capacidade de colonizar estruturas de sobrevivência. Além disso, é reconhecido pela sua capacidade de atuar por diferentes mecanismos de ação, como competição, micoparasitismo, antibiose, promoção de crescimento e indução de resistência. Tais características torna *Trichoderma* um importante aliado no manejo de doenças, especialmente as ocasionadas por fungos habitantes do solo, como *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. Esses patógenos infectam uma diversidade de culturas, além de sobreviverem no solo em forma de estruturas de sobrevivência. Existem, disponíveis no mercado, alguns biofungicidas recomendados para o controle desses patógenos, exceto *S. rolfsii*. O controle biológico pelo uso de *Trichoderma* pode ser combinado com outras estratégias de manejo dessas doenças de solo, incluindo o controle químico. Testes de compatibilidade devem ser realizados para garantir que os produtos químicos utilizados nas culturas de interesse não afetem o fungo agente de biocontrole. O objetivo do presente estudo foi comparar cepas comerciais de *Trichoderma* quanto à capacidade de inibição micelial de *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *S. rolfsii*, por meio de testes de pareamento de culturas e da exposição aos compostos orgânicos voláteis do antagonista (atmosfera compartilhada). Também avaliou-se a supressão dos mesmos fitopatógenos por cepas não comerciais, utilizando as mesmas metodologias de cultivos pareados e exposição aos compostos orgânicos voláteis e filtrados autoclavados de *Trichoderma* spp. Por fim, realizaram-se testes de compatibilidade entre cepas de *Trichoderma* e agrotóxicos. Todas as cepas comerciais inibiram o crescimento dos patógenos, sendo que *T. harzianum* CCT 7589 incluiu-se entre as que apresentaram as maiores porcentagens de inibição, em ambos os experimentos conduzidos. Todas as cepas não comerciais de *Trichoderma* inibiram o crescimento dos patógenos testados no cultivo pareado e na atmosfera compartilhada, com destaque para *T. asperelloides* CEN1277 e CEN1559. Os tratamentos com filtrados autoclavados de *T. afroharzianum* CEN287 *T. afroharzianum* e *T. rifaii* CEN288 apresentaram as maiores porcentagens de inibição de *S. sclerotiorum*, 75,6 e 79,2 %, respectivamente. Já *M. phaseolina* e *R. solani* não foram inibidos por nenhum dos tratamentos, nesses testes, e *S. rolfsii* apresentou resultados inconsistentes entre as repetições dos experimentos. Os resultados de compatibilidade com agrotóxicos variaram entre as cepas, doses e metodologias utilizadas. O inseticida Fipronil foi o único que apresentou compatibilidade em todos os casos. Os fungicidas Picoxistrobina/Tebuconazol/Mancozeb, Metconazol, Fenpropimorfe/Cilco-hexanona e Bixafem/Protioconazol/Trifloxistrobina demonstraram ser incompatíveis com as quatro cepas testadas. O fungicida Fludioxonil e os inseticidas Clorantprilprole e Imidacloprido/Tiodicarbe, recomendados para o tratamento de sementes, não afetaram o crescimento micelial de *Trichoderma* spp.

Palavras-chave: controle biológico, biofungicida, fungos antagonistas

---

Orientadora – Sueli Corrêa Marques de Mello

## GENERAL ABSTRACT

*Trichoderma* spp. have been the most common biological control agents of fungal diseases. The advantages of its use are the reduction of the environmental impact, the reduction of the selection of resistant microorganisms, its permanence in the rhizosphere of plants for a period and the ability to colonize resistance structures. In addition, they are recognized for its ability to act through different mechanisms of action, such as competition, mycoparasitism, antibiosis, growth promotion and resistance induction. Such characteristics make *Trichoderma* a potential ally in the management of soil-borne diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, and *Sclerotium rolfsii*. These pathogens infect a variety of crops, in addition to surviving in the soil through resistance structures. There are biopesticides available in the market for the control of all them, except against *S. rolfsii*. The use of biological control by *Trichoderma* may be adopted together with other strategies, including chemical control. Compatibility tests must be carried out to ensure that chemicals pesticides used for the management of such diseases and crop of interest do not affect the biocontrol agent fungus. The aim of the present study was to compare commercial strains of *Trichoderma* regarding the mycelial inhibition capacity of *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *R. solani*, and *S. rolfsii* through cultures pairing and exposure to volatile organic compounds emitted by the antagonists. Also, to evaluate the suppression of the same phytopathogens by non-commercial strains, through cultures pairig, exposure to volatile organic compounds and autoclaved filtrates of *Trichoderma* spp. Finally, compatibility tests between *Trichoderma* strains and recommended pesticides for crops of soybean were carry out. All commercial strains showed inhibition of pathogen growth, and *T. harzianum* CCT 7589 presented the highest percentages of inhibition in both experiments. All non-commercial *Trichoderma* strains inhibited the growth of the tested pathogens in the paired culture and in shared atmosphere, especially *T. asperelloides* CEN1277 and CEN1559. The autoclaved filtrates of *T. afroharzianum* CEN287 and *T. rifaii* CEN288 showed the highest percentages of inhibition of *S. sclerotiorum*. On the other hand, *M. phaseolina* and *R. solani* were not inhibited by any of the treatments and *S. rolfsii* presented inconsistent between results obtained in differents experiments. The results of compatibility with chemical pesticides varied among the strains, doses and methodologies used. In general, the lowest doses affected less the growth and germination of *Trichoderma* spp. The Fipronil insecticide was the only one that showed compatibility in all cases. The fungicides Picoxistrobin/Tebuconazole/Mancozeb, Metconazole, Fenpropimorph/Cyclohexanone e Bixafen/Prothioconazole/Trifloxystrobin proved to be incompatible with the four tested strains. The fungicide Fludioxonil and the inseticides Chlorantraniliprole e Imidacloprid/Thiodicarb recommended for seed treatment, did not affect the growth of *Trichoderma* spp.

**Keywords:** biocontrol, biofungicides, antagonistic fungi

---

Master's advisor – Sueli Corrêa Marques de Mello

## INTRODUÇÃO GERAL

A busca por potenciais agentes de biocontrole tem se intensificado nos últimos anos, devido à grande preocupação com os impactos causados pelo uso recorrente de agrotóxicos. Fungos do gênero *Trichoderma* são os principais agentes de controle biológico de doenças fúngicas e vêm sendo estudados há décadas. Algumas espécies desse gênero já são utilizadas como princípios ativos em formulações comerciais (Bettiol et al., 2019). Apesar de apresentarem baixa toxicidade e periculosidade, os produtos biológicos são regidos pela Lei nº 7.802/89 (Brasil, 1989), a Lei de Agrotóxicos e Afins. Atualmente, existem 38 produtos à base de *Trichoderma* spp. disponíveis no mercado nacional (AGROFIT, 2022) e recomendados para diversos patógenos de plantas.

Entre os fatores que fazem de *Trichoderma* um bom agente de biocontrole citam-se a elevada capacidade de se estabelecer na rizosfera da planta, a atuação por diferentes mecanismos e a capacidade de colonizar estruturas de sobrevivência, como escleródios (Haddad et al., 2017; Monte et al., 2019). Assim, tais características o tornam um importante aliado no manejo de doenças ocasionadas por patógenos que habitam o solo, entre os quais, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*.

*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid é um fungo ascomiceto, que tem como característica marcante a produção de microescleródios em substratos vegetais e em meios artificiais, conferindo um aspecto enegrecido das colônias (Kaur et al., 2012). Esse fungo pode, sob condições favoráveis, causar tombamento de plântulas no início do ciclo das culturas, apodrecimento de raízes, bem como lesões caulinares, a partir das quais atinge as partes reprodutivas, em plantas mais velhas (Chitarra, 2014; Pandey et al., 2020).

O patógeno *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary (1884) é também um ascomiceto; é reconhecido principalmente pelo micélio branco cotonoso e pela formação dos escleródios, que são grandes e pretos. Esses escleródios podem germinar formando hifas vegetativas, durante a fase assexuada, e podem formar os apotécios - corpo de frutificação da fase sexuada - que liberam milhares de esporos no ambiente (Le Torneau, 1979).

*Rhizoctonia solani* Kühn é um basidiomiceto, que tem como principal característica morfológica as ramificações de hifas formando um ângulo reto com a hifa de origem (Cia & Salgado, 1997). Esse patógeno é um dos principais agentes do *damping off* ou tombamento de plântulas, causando redução do estande. O fungo permanece no solo durante anos, em forma de escleródios (Bedendo, 2018).

Já o basidiomiceto *S. rolfsii* Sacc produz micélio branco e abundante e forma escleródios de formato arredondados e coloração marrom (Paparú et al., 2020). É um patógeno polífago, que causa podridão nas raízes e caules de plantas. Com o progresso da infecção, podem ser visualizados o micélio branco e inúmeros escleródios (Sun et al., 2019).

Todos esses patógenos citados infectam grande diversidade de plantas e resistem às condições adversas através de escleródios ou microescleródios. Além disso, são capazes de colonizar restos culturais. Tais atributos tornam o manejo das doenças complexo, pois práticas culturais como a rotação de culturas e o plantio direto podem ser ineficientes quando adotadas isoladamente. Além disso, o uso de fungicidas químicos no controle de patógenos habitantes do solo pode ter baixa eficiência, principalmente pela dificuldade em afetar a germinação dos escleródios (David et al., 2018; Michereff et al., 2005).

Vários estudos vêm demonstrando a capacidade de *Trichoderma* spp. na inibição do crescimento micelial, bem como a formação e germinação de escleródios desses patógenos (Iqbal e Mukhtar, 2020; Silva et al., 2020), podendo atuar por diferentes mecanismos de ação (Kushwaha et al., 2018; Melo e Faull, 2000; Mendonza et al., 2015). No Brasil, existem produtos registrados disponíveis para o controle de *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum* e *R. solani* (AGROFIT, 2022).

A fim de aumentar a eficiência do controle de doenças, o controle biológico por *Trichoderma* pode ser utilizado associado com o controle químico (Dilbo et al., 2015). Para isso, a toxicidade dos fungicidas químicos ao *Trichoderma* precisa ser verificada. É importante também levar em conta que produtos químicos utilizados para o controle de organismos não-alvo do *Trichoderma*, como outros patógenos, insetos praga e plantas daninhas, também podem ser tóxicos ao agente de biocontrole (Dhanya et al., 2016; Santoro et al., 2014). Portanto, estudos sobre compatibilidade de *Trichoderma* com produtos químicos adotados na cultura de interesse são necessários.

A Coleção de Agentes de Controle Biológico de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) contém mais de 1500 isolados de *Trichoderma*. Alguns desses vêm sendo estudados quanto à habilidade de controlar diferentes fitopatógenos e podem revelar elevado potencial no controle de patógenos habitantes do solo. Além disso, o mercado brasileiro de biofungicidas conta com mais de 30 produtos à base de *Trichoderma* (AGROFIT, 2022) e há uma escassez na literatura sobre a eficiência comparativa dos agentes de biocontrole envolvidos. Assim, o objetivo desse trabalho é avaliar cepas de *Trichoderma*, pertencentes à Coleção, na inibição micelial, *in vitro*, de *R. solani*, *M. phaseolina*,



*S. sclerotiorum* e *S. rolfii*, e fazer um estudo comparativo entre oito principais cepas comerciais, utilizando esses mesmos patógenos. Por fim, testar compatibilidade de quatro cepas de *Trichoderma*, também pertencentes à Coleção, com produtos químicos.

## OBJETIVOS

### Objetivo geral

Comparar o potencial de cepas comerciais de *Trichoderma* disponíveis no mercado nacional, por meio de ensaios *in vitro*, em termos de supressão dos patógenos *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* e selecionar cepas não comerciais com base na capacidade para inibir o crescimento dos mesmos patógenos. Além disso, avaliar a compatibilidade com agrotóxicos com cepas não comerciais.

### Objetivos específicos

- Avaliar o potencial de cepas comerciais de *Trichoderma* quanto à inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *S. rolfsii* pelo método do pareamento de culturas.
- Avaliar a inibição micelial de *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *S. rolfsii* por compostos voláteis emitidos por cepas comerciais de *Trichoderma*.
- Verificar a capacidade de cepas não comerciais de *Trichoderma* quanto à inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *S. rolfsii* pelo método do pareamento de culturas.
- Avaliar a inibição micelial de *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *S. rolfsii* por compostos voláteis emitidos por cepas comerciais de *Trichoderma*.
- Avaliar a inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *S. rolfsii* por filtrados de cepas não comerciais de *Trichoderma*.
- Verificar o efeito de produtos químicos incorporados ao meio de cultura no crescimento micelial de *Trichoderma* spp.
- Determinar a capacidade germinativa dos conídios de *Trichoderma* spp. após exposição produtos químicos.
- Verificar o efeito do tratamento de sementes com produtos químicos no crescimento micelial de *Trichoderma* spp.

## REVISÃO DE LITERATURA

### *Trichoderma* como agente de biocontrole

O setor agrícola tem passado por mudanças nos últimos anos, em que se tem buscado prevenir ou mitigar os efeitos negativos do uso de agrotóxicos à saúde de consumidores e trabalhadores rurais, bem como ao meio ambiente. Além disso, a seleção de organismos resistentes, tão comum na utilização de produtos químicos, também pode ser evitada com a redução da aplicação dos agrotóxicos. O controle biológico de doenças desponta-se como importante ferramenta para o manejo integrado de doenças (MID), possibilitando reduzir a necessidade de aplicações dos fungicidas sintéticos, ou mesmo eliminando-as em alguns casos (Bettiol & Ghini, 2003). Entre as vantagens do uso do controle biológico, menciona-se a possibilidade de integração deste com agrotóxicos, como forma de retardar a ocorrência de resistência pela quebra da pressão por um único modo de ação (Ons et al., 2020).

Segundo Cook & Baker (1983), controle biológico é “a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem”. Outros conceitos menos abrangentes o definem como “controle de um organismo por outro organismo”, ou controle de um patógeno por um microrganismo antagonista (Bettiol et al, 2019).

O mercado de produtos biológicos tem avançado recentemente no Brasil. Segundo o Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA), foram registrados 92 produtos de controle biológico em 2021, totalizando mais de 500 biopesticidas colocados à disposição dos agricultores (MAPA, 2022). Dentre esses produtos registrados para o controle de doenças de plantas, dois grupos de microrganismos lideram como ingredientes ativos: as bactérias do gênero *Bacillus*, eficientes no controle de algumas espécies de fungos, bactérias e nematoides em diferentes culturas e fungos do gênero *Trichoderma* (AGROFIT, 2021), que também atuam contra diferentes microrganismos.

*Trichoderma*, além de ser recomendado para o controle de nematoides, é o principal agente de biocontrole de doenças fúngicas e está na composição da maioria dos produtos biológicos registrados no MAPA. Embora as confusões taxonômicas, até o momento constam 38 produtos tendo como princípios ativos cinco espécies: *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. koningiopsis*, *T. afroharzianum* e *T. stromaticum* (AGROFIT, 2021).

*Trichoderma harzianum* está presente na maioria dos produtos formulados (AGROFIT, 2022), porém, um estudo recente sugeriu uma revisão taxonomia do complexo Harzianum e

constatou que de quatro cepas utilizadas em produtos biológicos, nenhuma foi caracterizada como *T. harzianum stricto sensu*. Inclusive a cepa *T. harzianum* T22, mundialmente utilizada, foi reclassificada como *T. afroharzianum* (Chaverri et al., 2015). Esses autores relataram que, a partir de uma amostragem de 200 isolados oriundos de diferentes regiões e substratos, a espécie *T. harzianum stricto sensu* foi encontrada. Com isso, é possível que a identificação de *Trichoderma* presente nos produtos biológicos brasileiros esteja incorreta e necessite de uma nova classificação.

O gênero *Trichoderma*, descrito por Person em 1794 (Teleomorfo: *Hypocrea*), pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Ordem Hypocreales, Família Hypocreaceae (Kirk, 2012). Espécies desse fungo formam conidióforos ramificados a partir de um eixo central, que normalmente se agrupam, formando pústulas. Na extremidade dos conidióforos estão as células conidiogênicas do tipo fíalide, que darão origem a conídios unicelulares, globosos ou elipsoidais, de coloração verde, muitas vezes produzidos em abundância. Os conídios são responsáveis pelo aspecto típico de colônias de *Trichoderma* spp. na maioria dos meios de cultura (Jaklitsch, 2006).

*Trichoderma* spp. pode ser encontrado em regiões de clima tropical e temperado; são comumente habitantes de solo, decompositores de madeira e colonizadores de raízes ou endofíticos; com certa frequência, são também encontrados parasitando outros fungos (Abreu & Pfenning, 2019). Além de apresentarem capacidade micoparasita, muitas das espécies estabelecem relações benéficas com as plantas (Rubio et al., 2014; Chagas et al., 2017) e tais características tornaram o gênero uma importante fonte para a pesquisa em busca de novas tecnologias para serem aplicadas à agricultura.

Os primeiros estudos de *Trichoderma* como agente de controle biológico foram realizados na década de 1930 e investigaram o antagonismo ao fungo *R. solani* e outros patógenos de solo (Weindling & Fawcett, 1936). Desde então, inúmeros estudos vêm sendo feitos, demonstrando a capacidade de espécies de *Trichoderma* controlarem diversos patógenos, por diferentes mecanismos de ação. Estes ocorrem a partir de interações diretas como a competição por espaço e nutrientes, micoparasitismo e antibiose, este último consistindo na produção de metabólitos secundários com propriedade antibiótica. Interações indiretas também podem ser observadas, como a indução de resistência e a promoção de crescimento das plantas (Machado et al., 2012; Mello et al., 2020).

Competição é um dos mecanismos mais clássicos do controle biológico (Machado et al., 2012). A presença de *Trichoderma* em diferentes climas e substratos demonstra a versatilidade deste fungo, capaz de competir com outros microrganismos por espaço, água, luz, nutrientes e

fontes de carbono e oxigênio (Monte et al., 2019). Além disso, para ser um bom agente de biocontrole, *Trichoderma* deve sobreviver na rizosfera da planta, suprimindo seus mecanismos de defesa e sobressaindo em relação ao patógeno (Monte et al, 2019). Muitos dos produtos comerciais à base de *Trichoderma* disponíveis mundialmente têm a competição como um dos modos de ação (Bettioli et al, 2019).

Já o micoparasitismo ocorre quando o antagonista reconhece estímulos químicos liberados pelo patógeno suscetível. A partir desse reconhecimento, as hifas do antagonista crescem em direção ao patógeno, envolvendo-o. Desta forma, 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). A penetração pode ser mediada pela liberação, pelo antagonista, de enzimas que degradam a parede celular dos patógenos.

A produção de metabólitos secundários por *Trichoderma* spp., mecanismo de ação conhecido como antibiose, depende da capacidade do agente de biocontrole produzir certos compostos, voláteis ou não voláteis, tóxicos a outros patógenos. Tais compostos são originados de rotas secundárias do metabolismo do antagonista e alguns exemplos são os peptaibols, terpenóides, pironas e policetídeos (Ramada et al., 2019).

*Trichoderma* spp. também é capaz de induzir a expressão de genes relacionados a defesa das plantas e promover crescimento, apesar da presença do patógeno. Rubio et al. (2014) demonstrou que *T. parareesei* foi capaz de melhorar a defesa de tomateiro contra *Botrytis cinerea*, além de favorecer o desenvolvimento das raízes e promoção do crescimento sob estresse salino.

Além dessa versatilidade de *Trichoderma*, outro fator que o faz importante agente de controle biológico, principalmente contra patógenos habitantes de solo, é sua capacidade de se estabelecer no solo e atacar diretamente as estruturas de sobrevivência, como escleródios e microescleródios, diferentemente dos fungicidas químicos. Assim, *Trichoderma* pode ser um grande aliado no manejo de doenças causadas por patógenos como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina*, entre outros.

### ***Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* como patógenos de plantas**

Patógenos habitantes de solo causam doenças radiculares responsáveis por grandes perdas em diversas culturas e podem sobreviver por vários anos por meio de estruturas de sobrevivência, mesmo na ausência de plantas hospedeiras (Michereff et al., 2005). Dentre os principais patógenos

radiculares, encontram-se *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*.

O fungo *M. phaseolina* (Tassi) Goid pertence ao filo Ascomycota, classe Dothideomycetes, ordem Botryosphaerales, família Botryosphaeriaceae (Mycobank, 2022). Possui hifas septadas, inicialmente hialinas tornando-se amarronzadas ou pretas posteriormente. Produz microescleródios castanhos escuros a pretos, de formato irregular (Kaur et al., 2012; Pandey et al., 2020). Alguns isolados formam picnídios escuros, globosos ou achatados, inicialmente abaixo da superfície do hospedeiro; estes emergem e rompem-se com a maturidade, liberando os conídios hialinos, de formato ovóide (Kaur et al., 2012).

*Macrophomina phaseolina* possui atividade saprofítica e pode sobreviver por anos no solo em forma de microescleródios, os quais germinam sob condição favorável, com temperatura entre 28 e 35 °C (Kaur et al, 2012). Esse fungo é altamente polífago, causando doença em diferentes espécies cultivadas, tais como soja, milho, sorgo e algodão (Su et al., 2001); é um dos agentes etiológicos do “*damping off*”, reduzindo a população de plantas no início do ciclo das culturas. Além disso, o patógeno causa a podridão cinzenta, caracterizada por apodrecimento em raízes e caules no restante do ciclo das culturas (Chitarra, 2014; Pandey et al., 2020). A disseminação da doença ocorre principalmente pela presença de microescleródios na área cultivada e através de sementes infectadas; a baixa umidade favorece o desenvolvimento de epidemias da doença (Kaur et al, 2012).

Já o fungo *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary (1884) pertence ao filo Ascomycota, classe Leotiomycetes, ordem Helotiales e família Sclerotinaceae (Mycobank, 2022); caracteriza-se por hifas hialinas, septadas, ramificadas e multinucleadas que formam o micélio branco cotonoso responsável pelo nome da doença “mofo-branco”. Esse patógeno infecta diversas culturas (Bolton et al., 2006) e formam os escleródios, globosos e melanizados. Estes, ao germinarem, podem formar hifas vegetativas (germinação miceliogênica) na fase sexuada, ou os corpos de frutificação, denominados apotécios, onde são produzidos os esporos sexuais (Le Torneau, 1979)

*Sclerotinia sclerotiorum* já foi relatado infectando centenas espécies de plantas, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas (Boland & Hall, 1994). Os sintomas mais comuns causados por esse patógeno são descritos como lesões encharcadas em folhas e hastes, lesões escuras nos caules e, posteriormente, surgem os sinais do patógeno em forma de micélio branco cotonoso e desenvolvimento dos escleródios sobre as lesões (Bolton et al., 2006).

A disseminação da doença ocorre pelo uso de material propagativo infectado, pela

presença de escleródios no lote de sementes e revolvimento do solo com acúmulo dos escleródios; temperaturas entre 11 e 20 °C favorecem o progresso da doença (Almeida et al., 1997). Epidemias mais severas da doença ocorrem quando há germinação carpogênica, pois cada apotécio é capaz de liberar milhares de esporos, os quais são disseminados pelo ar (Wu et al., 2007).

*Rhizoctonia solani* Kühn, cujo teleomorfo é *Thanatephorus cucumeris*, é um fungo do filo Basidiomycota, do sub-filo Agaricomycota, descrito originalmente por Kühn (1858), após ser isolado em plantas de batateira. A espécie caracteriza-se morfológicamente pelas hifas septadas, multinucleadas, hialinas inicialmente, tornando-se marrons com o tempo. As ramificações das hifas formam ângulos retos com a hifa de origem e há presença de um septo no ponto de ramificação (Ajayi-oyetunde & Bradley, 2018; Cia & Salgado, 1997). Além disso, *R. solani* apresenta micélio estéril, não produzindo esporos e não forma grampos de conexão (Ogoshi, 1987).

Além de caracteres morfológicos, fisiológicos, patogênicos e genômicos, a classificação de *R. solani* é baseada no comportamento da anastomose de hifas (Anderson, 1982; Ogoshi, 1987). A espécie é dividida em grupos de anastomose (AG – *Anastomoses Group*), ou seja, grupos de indivíduos com compatibilidade de hifas, de modo que a fusão das hifas (anastomose) seja possível.

O patógeno ataca uma grande diversidade de plantas hospedeiras com importância agrônômica e é mundialmente distribuído. Há inúmeros relatos de *R. solani* em culturas anuais, como arroz, soja e algodão, entre outras, em culturas perenes, como fruteiras, e em hortaliças, por exemplo em tomate e batata (González-Garcia, 2006). Dentro dos AGs, a gama de hospedeiros pode ser limitada a algumas culturas e os isolados podem restringir-se a certos ambientes (Ogoshi, 1996). Existem 14 AGs descritos mundialmente, entre os quais, AG-1, AG-2, AG-3, AG-4 e AG-7, já relatados no Brasil em diferentes culturas (David et al., 2018).

O tombamento de plântulas (*damping off*) tem *R. solani* como um dos agentes etiológicos e pode afetar diferentes culturas, principalmente durante a fase inicial, impedindo a germinação das sementes (tombamento de pré-emergência), ou pode causar lesões de cor marrom-avermelhado na raiz, colo e folhas primárias das plântulas, que podem evoluir para necrose e morte da plântula (Chitarra, 2014).

*Rhizoctonia solani* pode sobreviver na matéria orgânica do solo, sendo esta a principal fonte de inóculo primário da doença, que também pode ser originária de sementes infectadas. Trata-se de um patógeno necrotrófico amplamente distribuído, capaz de sobreviver por longos

períodos no solo em forma de estruturas sem sobrevivência, os escleródios (David et al., 2018).

*Sclerotium rolfsii* Sacc, teleomofa *Arthelia rolfsii* (Curzi) C. C. Tu & Kimbr, é um basidiomiceto, do sub-filo Agaricomycotina. (Mycobank, 2022). Esse fungo produz hifas multinucleadas, que formam micélio branco, abundante e grampos de conexão podem ser observados (Sun et al., 2019). Produz também escleródios de coloração marrom claro à escuro, e de formato irregular (Paparou et al., 2020). Na fase sexual, formam a basídia, onde são produzidos os basidiósporos, porém essa fase dificilmente é observada (Pandey et al., 2005).

Os sintomas ocasionados podem ser lesões encharcadas ou lesões necróticas na região do colo da planta, seguidas do desenvolvimento de micélio aéreo branco na base da planta e na superfície do solo, bem como a formação de escleródios (Paul et al., 2017; Sun et al., 2019). *Sclerotium rolfsii* é também um dos agentes do *damping off* em pré e pós-emergência, devido a infecção de sementes. Plantas sintomáticas normalmente são visualizadas em reboleiras (Bedendo, 2018). Trata-se de um patógeno polífago, que prevalece em regiões com temperaturas mais elevadas, podendo sobreviver por anos no solo por meio dos escleródios (Punja, 1985).

O controle das doenças causadas por patógenos habitantes do solo é um desafio para os agricultores, visto que todos possuem uma ampla gama de hospedeiros, limitando as opções de culturas de interesse que não sejam suscetíveis. O controle químico de fungos habitantes de solo tem baixa eficiência, e no caso dos fitopatógenos citados, a capacidade de controle é ainda inferior devido à dificuldade dos fungicidas em reduzir a viabilidade dos escleródios (David et al., 2018; Michereff et al., 2005). Além disso, o uso contínuo de moléculas químicas pode levar à resistência dos patógenos (Mao et al., 2018). Assim, o uso de produtos biológicos, tendo *Trichoderma* como princípio ativo, constitui alternativa promissora no manejo integrado dessas doenças, pois, além do baixo impacto ambiental, esses produtos, em tese, proporcionam controle mais duradouro, já que o agente de biocontrole permanece ativo na rizosfera por algum tempo.

### ***Trichoderma* spp. na supressão de *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii***

A demanda por produtos biológicos no Brasil vem crescendo expressivamente nos últimos anos. Entre os agentes de biocontrole mais comuns, incluem-se os fungos do gênero *Trichoderma*, hoje considerado importante aliado no manejo de patógenos habitantes do solo. Esses fungos atuam por diferentes mecanismos de ação, quais sejam: competição, micoparasitismo, antibiose, promoção de crescimento e indução de resistência de plantas. Além disso, sobrevivem no solo por



certo período de tempo e são capazes de reduzir a viabilidade de estruturas de sobrevivência dos patógenos (Monte et al., 2019; Ojaghian et al., 2019)

Sridharan et al. (2020) avaliaram a influência de compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por *Trichoderma longibrachiatum* no crescimento de *M. phaseolina*. Foi realizado cultivo pareado e o método das placas invertidas, que proporciona uma atmosfera fechada e compartilhada entre antagonista e patógeno. O antagonista foi capaz de reduzir o crescimento micelial do patógeno por ambos métodos. Outro estudo foi feito por Sridharan et al. (2021), que observou efeito inibidor de metabólitos não voláteis de *T. longibrachiatum* sobre o crescimento de *M. phaseolina* em torno de 20 %, quando cultivado em meio enriquecido com extratos brutos do antagonista.

Iqbal & Mukhtar (2020) demonstraram que diferentes espécies de *Trichoderma* testadas foram capazes de inibir o crescimento micelial e a produção de microescleródios por *M. phaseolina*, no cultivo pareado. Mendonza et al. (2015) avaliaram, em ensaios *in vitro*, o antagonismo entre espécies de *Trichoderma* e *M. phaseolina*. Os autores observaram três mecanismos principais: competição, tendo em vista a interrupção do crescimento do fungo pelo antagonista e a formação de uma barreira na região de contato; antibiose, caracterizada pela inibição do crescimento do patógeno mesmo sem contato entre os micélios; e micoparasitismo, caracterizado por enrolamento das hifas de *M. phaseolina* e formação de estruturas semelhantes a apressórios, que auxiliam na penetração das células do hospedeiro pelo *Trichoderma*.

O mecanismo de antibiose sobre *S. sclerotiorum* também vem sendo amplamente demonstrado com diferentes espécies de *Trichoderma*. Silva et al. (2020) utilizaram o método de placas invertidas, tendo observado que compostos orgânicos voláteis de *T. azevedoi* atingiram as maiores porcentagens de redução do crescimento de *S. sclerotiorum*. Já Zhang et al. (2016) detectaram atividade antifúngica de compostos não voláteis ao cultivar esse patógeno em meio suplementado com filtrado de cultura de *T. harzianum*. Também a inibição da germinação miceliogênica e carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* por compostos voláteis e não voláteis de *Trichoderma* spp. tem sido demonstrada (Ojaghian et al., 2019; Sumida et al., 2018). A germinação de escleródios do patógenos foi reduzida após submersão destes em suspensão de esporos e microescleródios de cepas de *T. asperellum* (URM 5811) e *T. harzianum* (T22) (Macena et al., 2020).

Abdullah et al. (2008) descreveram o micoparasitismo de *T. harzianum* contra *S. sclerotiorum* como reconhecimento, modificações nas hifas com a formação de *pegs* de

penetração sobre o fitopatógeno e evidências da produção de enzimas líticas, uma vez que as hifas do antagonista foram capazes de degradar a parede celular do fungo hospedeiro.

O antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *R. solani* foi atribuído a diferentes mecanismos de ação, como no trabalho conduzido por Melo e Faull (2000) em que *T. harzianum* parasitou *R. solani*, inibindo seu crescimento e mostraram redução de até 82,3 % do crescimento micelial do patógeno com extratos obtidos de *T. koningii*. Mayo et al. (2015) relataram promoção de crescimento e indução de genes de resistência em plantas de feijão coinoculadas com *R. solani* e *T. harzianum*.

Kushwaha et al. (2018) avaliaram o antagonismo de três espécies de *Trichoderma* contra *S. rolfsii*. No pareamento de culturas, *T. virens*, *T. viride* e *T. harzianum* reduziram em mais de 50% o crescimento micelial do patógeno. No sistema de placas invertidas, os compostos orgânicos voláteis de *T. viride* e *T. virens* foram melhores inibidores do crescimento de *S. rolfsii* do que *T. harzianum*. Já no experimento utilizando filtrados dos antagonistas, os compostos não voláteis de *T. harzianum* foram os que causaram a maior supressão do patógeno. Rabinal & Bhat (2020) estudaram a expressão gênica de *T. koningii* durante a interação com *S. rolfsii* em cultivo pareado e encontraram transcritos relacionados à biossíntese de metabólitos secundários e ao micoparasitismo, tais como enzimas hidrolíticas e proteases.

Alguns produtos à base de *Trichoderma* para o controle das doenças causadas por *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum* e *R. Solani* são encontrados no mercado brasileiro. Porém, não há produtos indicados para uso contra *S. rolfsii* (AGROFIT, 2022). Todos esses patógenos são igualmente nocivos às culturas, possuem ampla gama de hospedeiros e capacidade de sobrevivência no solo em forma de estruturas de sobrevivência. Logo, *Trichoderma* spp. pode ser um grande aliado no manejo integrado das doenças causadas por esses fungos habitantes do solo.

### **Compatibilidade de *Trichoderma* com agrotóxicos**

O controle biológico, dentro do manejo integrado de doenças, deve ser usado em associação com outras estratégias de controle, entre as quais o controle químico (Bergamin Filho & Amorim, 2011). *Trichoderma* é o principal agente fúngico de controle de doenças e para que produtos biológicos que o contenham como base sejam adotados nesse tipo de manejo, é necessário garantir que outros produtos aplicados durante o ciclo da cultura, como agrotóxicos, não afetem o desempenho do fungo antagonista. Para isso, são feitos estudos de compatibilidade de *Trichoderma* com diferentes produtos comerciais e dosagens. Se bem adequada, essa tática

pode trazer efeito sinérgico, garantindo um maior controle de doenças do que aplicados individualmente (Dilbo et al., 2015)

Silva et al. (2018) testaram conídios de isolados de *T. asperellum* e *T. asperelloides* após exposição ao fungicida azoxistrobina, pertencente ao grupo químico estrobilurina, em diferentes concentrações, tendo observado redução na porcentagem de germinação, atingindo 0 % na maior dose adotada. Entretanto, nesse mesmo estudo foi observado que a pulverização com azoxistrobina, mesmo em maiores doses, não interferiu na capacidade de um isolado de *T. asperellum* parasitar micélio e escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotinia minor*.

Widmer (2019) avaliou a capacidade de crescimento de colônias de isolados de *T. asperellum* em meio suplementado com fungicidas em diferentes doses. O fungicida boscalida não afetou o crescimento das colônias em nenhuma das dosagens, enquanto azoxistrobina e clorotalonil, apesar da variação da resposta entre isolados, apresentaram inibição do desenvolvimento das colônias, a qual foi crescente com o aumento das doses.

Outro isolado de *T. asperellum* foi cultivado em meio suplementado com fungicidas de diferentes classes químicas (Maheswary et al., 2020), e como no estudo citado anteriormente, esse isolado também teve crescimento micelial inibido na presença de azoxistrobina. Vários outros fungicidas, como captan, tebuconazol, propiconazol e carbedazim também alcançaram altas porcentagens de inibição de *T. asperellum* em todas as doses utilizadas. Já os fungicidas mancozeb e matalaxyl não afetaram o crescimento do fungo.

Saxena et al. (2014) testaram a compatibilidade de *T. harzianum* com diferentes fungicidas, sendo esta positiva com o mancozeb, até na maior dose adotada. Já no estudo de Boat et al. (2018), esse mesmo fungicida inibiu completamente o crescimento micelial de *T. asperellum* em todas as doses estudadas.

Tecnologias como a fusão de protoplastos vêm sendo desenvolvidas com intuito de obter linhagens de *Trichoderma* que unam características de interesse, dentre elas, a compatibilidade com produtos químicos. Hirpara & Gajera (2018) estudaram a fusão de protoplasto entre uma cepa de *Trichoderma virens* NBAlI, capaz de micoparasitar *Sclerotium rolfii*, e *T. koningii* MTCC 796, cepa tolerante à fungicidas. Foram obtidos 19 fusantes com diferentes graus de tolerância aos fungicidas mancozeb, tiram, tebuconazol e carbendazim. Um deles se destacou pelo antagonismo a *S. rolfii*, associado a um alto grau de tolerância aos produtos químicos.

Apesar da tendência de um agente de controle biológico fúngico apresentar sensibilidade à fungicidas, produtos químicos com outros alvos biológicos adotados na cultura de interesse,

como os herbicidas e inseticidas, também precisam ser testados em combinação com o agente de biocontrole. Santoro et al. (2014) demonstraram que alguns herbicidas de uso comuns nas lavouras brasileiras, como o atrazina, glifosato, diuron, 2,4-D e clomazone, não afetaram a germinação de esporos de *T. atroviride*. Porém, esporos expostos aos herbicidas carfentrazone-etílica e sulfentrazone tiveram a germinação inibida consideravelmente.

No estudo de Dhanya et al. (2016) um isolado de *T. viride* foi avaliado quanto à compatibilidade com inseticidas, dentre eles o imidacloprid, flubendiamida e acefato, não tendo sido afetado. Já frente ao inseticida fipronil, houve 25% de inibição do crescimento micelial, quando comparado à testemunha.

De forma geral, o que se observa é que a compatibilidade entre *Trichoderma* e produtos químicos decresce à medida que se aumenta a concentração destes produtos (Widmer et al., 2019). O gênero *Trichoderma* é muito diverso, e os resultados comentados acima mostram que além de uma variação entre espécies, é possível que as respostas se diferenciem também entre isolados de mesma espécie, logo, é importante testar a compatibilidade de cada potencial agente de controle biológico individualmente.

## REFERÊNCIAS

ABDULLAH MT, ALI NY, SULEMAN P (2008) Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. Crop Protection, 27:1354-1359.

ABREU LM, PFENNING LH (2019). O Gênero *Trichoderma* In: MEYER, M.C.; MAZARO, S.M.; SILVA, J.C. *Trichoderma: uso na agricultura*. 1ed. Brasília, DF: Embrapa.

AGROFIT. Disponível em: [https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 01 de fevereiro de 2022.

ALMEIDA AMR, FERREIRA LP, YORINORI JT, SILVA JEV, HENNING AA (1997). Doenças da soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A., REZENDE, J.A.M. (eds.) Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres.

AJAYI-OYETUNDE OO, BRADLEY CA (2018). *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. Plant Pathology, 67(1):3-17.

ANDERSON NA (1982). The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. Annual Review of Pathology 20:329-347.

BEDENDO IP (2018) Podridões de raiz e colo. In: AMORIM L, BERGAMIN FILHO A, REZENDE JAM. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. Ouro Fino: Agronômica Ceres.

BERGAMIN FILHO A, AMORIM L (2018) In: AMORIM L, BERGAMIN FILHO A, REZENDE JAM. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. Ouro Fino: Agronômica Ceres.

BETTIOL W, PINTO ZV, SILVA JC, FORNER C, FARIA MR, PACIFICO MG, COSTA LSA (2019). Produtos comerciais à base de *Trichoderma* In: MEYER MC, MAZARO SM, SILVA JC. *Trichoderma: uso na agricultura*. 1 ed. Brasília, DF: Embrapa.

BETTIOL W, GHINI R (2003). Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: Campanhola, C. & Bettiol, W. (Eds.) Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. p. 79-95.

BOAT MAB, IACOMI B, SAMEZA ML, BOYOM FF (2018). Fungicide Tolerance and Effect of Environmental Conditions on Growth of *Trichoderma* spp. with Antagonistic Activity Against *Sclerotinia sclerotiorum* Causing White Mold of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). International Journal of Innovative Approaches in Agricultural Research, 2(3)226-243.

BOLAND GJ, HALL R (1994) Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*, Canadian Journal of Plant Pathology, 16:2, 93-108.

BOLTON MD, THOMMA BPHJ, NELSON B (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. Molecular Plant Pathology, 7(1):1-6.

BRASIL. Lei no 7.802, de 12 de julho de 1989. Dispõe sobre agrotóxicos, seus componentes e afins. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 12 jul. 1989, Seção 1, 11459-11460.

CIA E, SALGADO CL (1997). Doenças do algodoeiro. In: KIMATI H, AMORIM L, BERGAMIN FILHO A, CAMARGO LEA, REZENDE JAM. Manual de Fitopatologia Volume 2: doenças das plantas cultivadas. 4 ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres.

CHAGAS LFB, CHAGAS JUNIOR AF, SOARES LP, FIDELIS RR (2017). *Trichoderma* na promoção do crescimento vegetal. Revista de Agricultura Neotropical, 4(3) 97-102.

CHAVERRI P, BRANCO-ROCHA F, JAKLITSCH W, GAZIS R, DEGENKOLB T, SAMUELS GJ (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. Mycologia 107: 558-590.

CHITARRA LG (2014). Identificação e controle das principais doenças do algodoeiro. 3. ed. Campina Grande: Embrapa Algodão.

COOK RJ, BAKER KF (1983). The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. American Phytopathological Society. St. Paul, MN. 539p.

DAVID GQ, CHAVARRO-MESA E, SCHURT DA, CERESINI PC (2018). *Rhizoctonia* como fitopatógeno no agroecossistema brasileiro. In: LOPES, U.P. & MICHEREFF, S.J. Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungo. 1ed. - Recife: EDUFRPE, 208p.

DILBO C, ALEMU M, LENCHO A, HUNDUMA T (2015). Integrated Management of Garlic White Rot (*Sclerotium cepivorum* Berk) Using Some Fungicides and Antifungal *Trichoderma* Species. Plant Pathology & Microbiology, 6:251.

DHANYA MK, ANJUMOL KB, MURUGAN M, DEEPHY KB (2016). Compatibility of *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorescens* with plant protection chemicals and fertilizers in cardamom. Journal of Tropical Agriculture, 54 (2):129-135.

GONZÁLEZ GARCÍA V, PORTAL ONCO MA, RUBIO SUSAN V (2006). Review. Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia*. Spanish Journal of Agricultural Research, 4(1), 55-79.

GÖRGEN AA, LOBO JUNIOR M, CARNEIRO LC, GONTIJO GHA, PIMENTA G, SILVEIRA NETO AN (2008). Manejo integrado de *Sclerotinia sclerotiorum* na cultura da soja. Circular Técnica 81. Embrapa.

HADDAD PE, LEITE LG, LUCON CMM, HAKAKAVA R (2017). Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 52: 1140-1148.

HIRPARA DG, GAJERA HP (2018) Molecular heterozygosity and genetic exploitations of *Trichoderma* interfusants enhancing tolerance to fungicides and mycoparasitism against *Sclerotium rolfsii* Sacc. Infection, Genetics and Evolution 66:26–36.

IQBAL U, MUKHTAR T (2020). Evaluation of Biocontrol Potential of Seven Indigenous *Trichoderma* Species against Charcoal Rot Causing Fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Gesunde Pflanzen*, 72:195-202.

JAKLITSCH WM, SAMUELS GJ, DODD SL, LU BS, DRUZHININA IS (2006). *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Studies in Mycology*, v. 56, p. 135-177.

KAUR S, DHILLON GS, BRAR SK, VALLAD GE, CHAND R, CHAUHAN VB (2012). Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. *Critical Reviews in Microbiology*, 38(2):136-151.

KIRK P (2012). *Index Fungorum*. CABI Bioscience, CBS and Landcare Research. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp?strGenus=Trichoderma>, Acesso em: 07 de fevereiro de 2022.

KUSHWAHA SK, 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.

LE TOURNEAU (1979). Morphology, Cytology, and Physiology of *Sclerotinia* Species in Culture. *The American Phytopathological Society*. 69(8): 887-890.

MACHADO DFM, PARZIANELLO FR, SILVA ACF, ANTONIOLLI ZI (2012). *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. *Revista de Ciências Agrárias* 35:274-288.

MAPA. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/novos-produtos-de-baixo-impacto-para-o-controle-de-pragas-tem-registro-publicado>. Acesso em 01 de fevereiro de 2022.

MAYO S, GUTIÉRREZ S, MALMIERCA MG, LORENZANA A, CAMPELO MP, HERMOSA R, CASQUERO PA (2015). Influence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma* spp. in growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense-related genes. *Frontiers in Plant Science*, 6:685.

MELLO SCM, ECKSTEIN B, MARQUES E, CARVALHO DDC (2020). Controle de Doenças de Planta. In: FONTES EMG, VALDARES-INGLIS MC. *Controle Biológico de Pragas da Agricultura*. Brasília, DF. Embrapa.

MELO IS, FAULL JL (2000). Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. *Scientia Agricola*, 57(1).

MENDOZA JL, PÉREZ MI, PRIETO JM, VELÁSQUEZ JD, OLIVARES JG, LANGARICA HR (2015). Antibiosis of *Trichoderma* spp strains native to northeastern Mexico against the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 1093-1101.

MICHEREFF SJ, DOMINGOS EGT, ANDRADE MM (2005). Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Recife: UFRPE, 398p.

MACENA AMF, KOBORI NN, MASCARIN GM, VIDA JB, HARTMAN GL (2020). Antagonism of *Trichoderma*-based biofungicides against Brazilian and North American isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* and growth promotion of soybean. *BioControl*, 65:235–246.

MAHESHWARY NP, GANGADHARA NAIK B, AMOGHAVARSHA CHITTARAGI, MK NAIK, SATISH KM, NANDISH MS (2020). Compatibility of *Trichoderma asperellum* with fungicides. *The Pharma Innovation Journal* 2020; 9(8):136-140

MAO XW, LI JS, CHEN YL, SONG XS, DUAN YB, WANG JX, CHEN CJ, ZHOU MG, et al. (2018). Resistance risk assessment for fluazinam in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 144: 27-35.

MONTE E, BETTIOL W, HERMOSA R (2019). *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. In: MEYER MC, MAZARO SM, SILVA JC. *Trichoderma: uso na agricultura*. 1ed. Brasília, DF: Embrapa.

MYCOBANK. Disponível em: <https://www.mycobank.org/page/Simple%20names%20search>. Acesso em: 01 de fevereiro de 2022.

NAIK, SATISH KM, NANDISH MS (2020). Compatibility of *Trichoderma asperellum* with fungicides. *The Pharma Innovation Journal* 2020; 9(8):136-140

OGOSHI A (1996). The Genus *Rhizoctonia*. In: SNEH B. et al. *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Noordwijkerhout, Netherlands.

OGOSHI A (1987). Ecology and Pathogenicity of Anastomosis and Intraspecific Groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Annual Review of Pathology* 25:125-143.

OJAGHIAN S, WANG L, XIE GL, ZHANG JZ (2019). Effect of volatiles produced by *Trichoderma* spp. on expression of glutathione transferase genes in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control* 136: 1-6.

ONS L, BYLEMANS D, THEVISSSEN K, CAMMUE BPA (2020). Combining Biocontrol Agents with Chemical Fungicides for Integrated Plant Fungal Disease Control. *Microorganisms*, 8:1930.

PANDEY AK, BURLAKOTI RR, RATHORE A, NAIR RM (2020). Morphological and molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* isolated from three legume crops and evaluation of mungbean genotypes for resistance to dry root rot. *Crop Protection* 121:1-8.

PANDEY MK, SARMA BK, SINGH UP (2005). Induction of Sexual Stage and Colony Morphology of Some Isolates of *Sclerotium rolfsii* Causing Spotted Leaf Rot in Plants. *Mycobiology*, 33(1):7-11.

PAPARU P, ACUR A, KATO F, ACAM C, NAKIBUULE J, NKUBOYE A, MUSOKE S, MUKANKUSI C (2020). Morphological and Pathogenic Characterization of *Sclerotium rolfsii*,



the Causal Agent of Southern Blight Disease on Common Bean in Uganda. *Plant Disease*, 104:2130-2137.

PAUL C, HWANG E, NAM S, LEE H, LEE J, YU G, KANG Y, LEE K, et al. (2017) Phylogenetic Placement and Morphological Characterization of *Sclerotium rolfsii* (Teleomorph: *Athelia rolfsii*) Associated with Blight Disease of *Ipomoea batatas* in Korea, *Mycobiology*, 45:(3) 129-138.

PUNJA ZK (1985) The Biology, Ecology, and Control of *Sclerotium rolfsii*. *Annual of Review of Phytopathology*, 23:97-127.

RABINAL C, BHAT S (2020) Identification of Differentially Expressed Genes in *Trichoderma koningii* IABT1252 During Its Interaction with *Sclerotium rolfsii*. *Current Microbiology*, 77:396–404.

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

REIS EM, CASA RT, HOFFMANN LL (2005). Controle cultural de doenças radiculares. IN: MICHEREFF SJ, DOMINGOS EGT, ANDRADE MM (2005). *Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais*. Recife: UFRPE, 398p, 2005.

RUBIO MB, QUIJADA NM, PÉREZ E, DOMÍNGUEZ S, MONTE E, HERMOSA R (2014). Identifying Beneficial Qualities of *Trichoderma parareesei* for Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(6): 1864-1873.

SAXENA D, TEWARI AK, RAI D (2014) The in vitro Effect of Some Commonly Used Fungicides, Insecticides and Herbicides for Their Compatibility with *Trichoderma harzianum* PBT23. *World Applied Sciences Journal* 31 (4): 444-448.

SANTORO PH, CAVAGUCHI SA, ALEXANDRE TM, ZORZETTI J, NEVES PMOJ (2014). In vitro Sensitivity of Antagonistic *Trichoderma atroviride* to Herbicides. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(2)238-243.

SILVA MAF, MOURA KE, MOURA KE, SALOMÃO D, PATRICIO FRA (2018). Compatibility of *Trichoderma* isolates with pesticides used in lettuce crop. *Summa Phytopathologica*, v.44, n.2, p.137-142.

SILVA LR, VALADARES-INGLIS MC, MORAES MCB, MAGALHÃES DM, SIFUENTES DN, MARTINS I, MELLO SCM (2020). Morphological and protein alterations in *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary after exposure to volatile organic compounds of *Trichoderma* spp. *Biological Control*. 147:1-7.

SRIDHARAN AP, SUGITA T, KARTHIKEYAN G, UTHANDI S. (2020) Comprehensive profiling of the VOCs of *Trichoderma longibrachiatum* EF5 while interacting with *Sclerotium rolfsii* and *Macrophomina phaseolina*. *Microbiological Research*, 236:126436.

- SRIDHARAN AP, SUGITA T, KARTHIKEYAN G, NAKKEERAN S, UTHANDI S. (2021) Metabolites of *Trichoderma longibrachiatum* EF5 inhibits soil borne pathogen, *Macrophomina phaseolina* by triggering amino sugar metabolism. *Microbial Pathogenesis*, 150:104714
- SU G, SUH S, SCHNEIDER RW, RUSSIN JS (2001). Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology* 91:120-126.
- SUMIDA CH, DANIEL JFS, ARAUJO APCS, PEITL DC, ABREU LM, DEKKER RFH & CANTERI MG (2018) *Trichoderma asperelloides* antagonism to nine *Sclerotinia sclerotiorum* strains and biological control of white mold disease in soybean plants, *Biocontrol Science and Technology*, 28(2):142-156.
- SUN S, SUN F, DENG D, ZHU X, DUAN C, ZHU Z (2020). First report of southern blight of mung bean caused by *Sclerotium rolfsii* in China. *Crop Protection*, 130:105055.
- WEINDLING R, FAWCETT HS (1936). Experiments in the Control of *Rhizoctonia* Damping-off of Citrus Seedlings. *Journal of Agricultural Science*, 10(1):1-16.
- WIDMER T (2019) Compatibility of *Trichoderma asperellum* isolates to selected soil fungicides. *Crop Protection* 120:91–96.
- WU BM, PENG YL, QIN QM, SUBBARAO KV (2007). Incubation of excised apothecia enhances ascus maturation of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia*, 99: 33-41.
- ZHANG F, GE H, ZHANG FAN, GUO N, WANG Y, CHEN L, JI X, LI C (2016). Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Plant Physiology and Biochemistry* 100:64-74.

## CAPÍTULO 1

### **Inibição micelial de *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfii* por cepas comerciais de *Trichoderma* utilizadas no Brasil**

#### **Resumo**

*Trichoderma* é o principal fungo agente de controle biológico de doenças de plantas comercializado no Brasil. Até o momento, existem 38 produtos registrados, tendo cinco espécies como princípio ativo: *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. koningiopsis*, *T. afroharzianum* e *T. stromaticum*. Um produto biológico pode ser aplicado em todas as culturas, e sua recomendação é feita com base no alvo biológico, e, no caso de *Trichoderma*, esses alvos são em grande maioria patógenos habitantes do solo. *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfii* são patógenos desse grupo, que afetam diversas culturas, sobrevivendo no solo em forma de estruturas de sobrevivência. Existem biopesticidas à base de *Trichoderma* para uso contra esses patógenos citados, exceto *S. rolfii*. Estudos comparando cepas comerciais de *Trichoderma* frente a patógenos de plantas são escassos na literatura, assim, é difícil concluir sobre o desempenho deles. O objetivo desse estudo foi comparar o potencial antagônico de oito das principais cepas comerciais de *Trichoderma* utilizadas em lavouras brasileiras, através de experimentos *in vitro*. Para isso, foi avaliada a capacidade de inibição do crescimento micelial dos patógenos, pelo pareamento de culturas e pela exposição aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma*, utilizando o método da atmosfera compartilhada. Todas as cepas foram capazes de inibir, em diferentes proporções, o crescimento dos fitopatógenos, em ambos os experimentos. Porém, a cepa *T. harzianum* CCT 7589 esteve entre as que apresentaram as maiores porcentagens de inibição do crescimento, em ambos os testes, cultivo pareado e atmosfera compartilhada.

#### **Introdução**

*Trichoderma* é um fungo cosmopolita de vida livre no solo, que pode ser encontrado colonizando madeiras em decomposição e, principalmente, na rizosfera e no rizoplano, como também colonizando endofiticamente os tecidos vegetais (Abreu e Pfenning, 2019). Esse gênero é reconhecido pela alta capacidade de parasitar fitopatógenos, mas também pela multiplicidade de mecanismos de ação: competição, antibiose, promoção de crescimento e indução de resistência de plantas (Machado et al., 2012).

No Brasil, o controle biológico de doenças de plantas é ainda recente. Houve relato de pelo menos um biofungicida colocado disponível em 1987 (Bettiol, et al., 2019). Porém, o primeiro

registro ocorreu na primeira década deste século. Atualmente, *Trichoderma* spp. é o principal fungo para uso contra fitopatógenos, em todo o mundo. Apesar do grande número de espécies hoje reconhecidas dentro do gênero, apenas quatro espécies do fungo compõem 32 produtos com registro no país, quais sejam *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. afroharzianum*, *T. stromaticum* e *T. koningiopsis* (AGROFIT, 2022), predominando *T. harzianum*. Entretanto, estudos de Chaverri et al. (2015) apontam para a necessidade de uma revisão da identificação de algumas dessas espécies.

Diferentemente dos agrotóxicos, cujos registros são por cultura, produtos biológicos, em geral, são registrados para alvos biológicos. No caso de *Trichoderma*, a maioria desses alvos são patógenos radiculares. Existe uma diversidade de formulações no mercado, nas quais os conídios são a base dos formulados, sendo estes apresentados como granulados dispersíveis, pós-molháveis, concentrados emulsionáveis e suspensões concentradas (Bettiol, et al., 2019). Tais produtos podem ser utilizados em todas as culturas e em qualquer das estratégias de uso, como tratamento de sementes, suplementação do solo, ou por meio de pulverizações das partes aéreas (AGROFIT, 2022).

*Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* são patógenos de plantas que habitam o solo. Esses patógenos são responsáveis por grandes perdas agrícolas. Podem infectar sementes, comprometendo a germinação e o vigor de plântulas e, desta forma, causar baixa densidade de plantas no início do desenvolvimento da cultura; nas fases vegetativas mais avançadas, provocam lesões em raízes e partes aéreas (Lopes e Michereff, 2018). Além do mais, produzem estruturas de sobrevivência, como escleródios e microescleródios, o que lhes garante a sobrevivência no solo por vários anos, fato que dificulta o controle das doenças (Michereff, 2005).

Estudos comparando cepas comerciais de *Trichoderma* são escassos, e os encontrados na literatura tratam de promoção de crescimento de plantas (Barroso et al., 2014; Ferreira et al., 2021, Oliveira et al., 2018). Todavia, existem dúvidas por parte de pesquisadores, assistentes técnicos e agricultores, sobre a eficiência das diferentes cepas comerciais utilizadas no Brasil, frente aos patógenos colocados em questão. Em uma análise inicial, é possível observar nas bulas dos produtos, que nenhuma das oito cepas mais conhecidas tem recomendação conjunta para todos os patógenos citados anteriormente. A maioria possui em comum a recomendação para *S. sclerotiorum* e *R. solani*. Dois desses produtos são recomendados para uso contra *M. phaseolina*, e, curiosamente, nenhuma dessas cepas possui especificação técnica com relação

ao fungo *S. rolfii*. *Macrophomina phaseolina* e *S. rolfii* eram considerados patógenos secundários no cultivo de grãos, o que explicaria a escassez de produtos que os tenham como alvo, porém, ambos vêm adquirindo importância nos últimos anos (Almeida et al., 2014; Grigolli, 2015).

O presente estudo tem como objetivo comparar o potencial antagônico de oito das principais cepas de *Trichoderma* utilizadas no país contra os patógenos de solo mencionados, adotando os métodos de pareamento de culturas e de exposição aos compostos orgânicos voláteis produzidos pelas mesmas cepas comerciais.

## Material e Métodos

### Origem e preservação das cepas

Foram utilizadas oito cepas de *Trichoderma* isoladas de produtos comerciais registrados no MAPA (Tabela 1). A partir de culturas puras obtidas, foi realizado o cultivo monospórico de cada cepa e o material foi preservado para uso nos ensaios. Os patógenos [*Macrophomina phaseolina* CEN1628, *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147, *Rhizoctonia solani* CEN1627 e *Sclerotium rolfii* CEN216] foram recuperados de subamostras mantidas em Coleção, na Embrapa. Cada experimento foi conduzido duas vezes para confirmação dos dados.

**Tabela 1:** Cepas comerciais de *Trichoderma*\* utilizadas nos ensaios e patógenos alvos.

Cepa	Patógenos Alvo
IBLF 006 ( <i>T. harzianum</i> )	<i>S. sclerotiorum</i> , <i>M. phaseolina</i> , <i>R. solani</i>
URM 5911 ( <i>T. asperellum</i> )	<i>S. sclerotiorum</i> , <i>R. solani</i> , <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>phaseoli</i>
CPQBA 040-11DRM 09 ( <i>T. harzianum</i> )	<i>R. solani</i> , <i>S. sclerotiorum</i>
CCT 7589 ( <i>T. harzianum</i> )	<i>R. solani</i> , <i>S. sclerotiorum</i>
T22 ( <i>T. harzianum</i> )	<i>M. phaseolina</i> , <i>S. sclerotiorum</i> , <i>Pratylenchus</i> <i>brachyurus</i> , <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
ESALQ-1306 ( <i>T. harzianum</i> )	<i>R. solani</i> , <i>S. Sclerotiorum</i> , <i>F. solani</i> f. sp. <i>phaseoli</i> , <i>Thielaviopsis paradoxa</i> , <i>Pratylenchus zeae</i>
UFT 201 ( <i>T. asperellum</i> )	**
BV10 ( <i>T. asperellum</i> )	<i>R. solani</i> , <i>S. sclerotiorum</i> , <i>P. brachyurus</i> , <i>F. oxysporum</i>

\*Informação de espécie contida no rótulo do produto; \*\*Recomendado para promoção de crescimento de plantas.

### **Avaliação do antagonismo das cepas comerciais de *Trichoderma* contra *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *S. rolfsii* por meio do pareamento de culturas**

Foram realizados ensaios individualizados para cada um dos quatro patógenos. Discos de micélio de 5 mm foram retirados de colônias de *Trichoderma* crescidas em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) Merck®, com cinco dias de incubação e transferidos para a extremidade de placas de Petri (um disco/placa), contendo 20 mL do mesmo meio. Simultaneamente, foram depositados, na extremidade oposta das placas, discos de micélio dos patógenos. O tratamento testemunha foi constituído de placas de Petri contendo somente patógeno. As placas foram incubadas a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas. A inibição do crescimento micelial dos patógenos foi avaliada quando as colônias dos tratamentos testemunha preencheram toda a placa de Petri. As avaliações consistiram de medição, com paquímetro, do diâmetro das colônias. Os percentuais de inibição foram calculados pela fórmula:  $I = (C-T/C) \times 100$ , onde I = índice de inibição (%); C = diâmetro das colônias do patógeno na placa controle e T = diâmetro das colônias do patógeno nos pareamentos (Mello et al., 2007). Além disso, foi avaliado o efeito dos tratamentos na produção de escleródios por *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*, por meio da contagem manual, realizada após 15 e 20 dias de incubação, respectivamente. Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições por linhagem de *Trichoderma*, sendo a unidade experimental constituída de uma placa de Petri. Os dados obtidos (percentuais de inibição do crescimento micelial) foram submetidos à análise de variância e, as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade, utilizando o *software* Sisvar 5.6 (Ferreira, 2011).

### **Avaliação da inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *S. Rolfsii*, expostos aos compostos orgânicos voláteis de cepas comerciais de *Trichoderma***

Discos de micélio de 5 mm de diâmetro de BDA Merck® colonizado por *Trichoderma*, com cinco dias de incubação, foram transferidos para a base de uma placa de Petri contendo 20 mL de meio BDA. Do mesmo modo, discos de micélio colonizados por *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* foram depositados na base de outra placa de Petri com meio BDA. As bases das placas contendo os antagonistas e patógenos foram sobrepostas, envolvidas com Parafilm® e seladas com plástico filme, com o patógeno permanecendo na placa superior. A testemunha consistiu no conjunto de placas contendo apenas os patógenos. As culturas foram incubadas à temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.

Após a total colonização da superfície do meio BDA nos tratamentos controle, foram tomadas medidas do diâmetro das colônias com o auxílio de um paquímetro digital. Os valores médios de inibição foram calculados com o uso da fórmula:  $I = (C - T)/C \times 100$ , onde “I” representa o índice de inibição (%); “C” é o diâmetro das colônias dos patógenos nos tratamentos controle; e “T”, o diâmetro das colônias do patógeno nos tratamentos com o antagonista; em milímetros. O experimento foi conduzido em DIC, com quatro repetições por tratamento. Os dados obtidos (percentuais de inibição do crescimento micelial) foram submetidos à análise de variância e, as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade, utilizando o *software* Sisvar 5.6 (Ferreira, 2011).

## Resultados

### Avaliação do antagonismo das cepas comerciais de *Trichoderma* contra *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *S. rolfsii* por meio do pareamento de culturas

Nos experimentos de cultivo pareado, observou-se que as oito cepas comerciais de *Trichoderma* inibem o crescimento micelial de *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *S. rolfsii*. Todas as cepas atingiram porcentagens médias de inibição de *M. phaseolina*, em relação a testemunha, superiores a 59,4 % (Tabela 2). Com relação a esse patógeno, a cepa *T. harzianum* CCT 7589 se destacou ao apresentar um valor médio de inibição de 80,6 %, destacando-se também contra *R. solani*, para o qual, a inibição do crescimento micelial foi de 62,0 %, em média.

**Tabela 2:** Inibição do crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* por cepas comerciais de *Trichoderma*, em cultivo pareado.

Cepa	Inibição Micelial (%)*			
	<i>M. phaseolina</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>R. solani</i>	<i>S. rolfsii</i>
IBLF 006	73,1±3,19b	65,2±1,80a	58,1±1,67b	54,8±1,28a
URM 5911	64,4±7,20c	58,9±3,33a	50,2±2,10c	47,8±1,92c
CPQBA040-11DRM09	59,4±1,11c	63,3±5,88a	55,6±1,57b	55,2±0,64a
CCT 7589	80,6±1,43a	68,9±2,94a	62,0±3,44a	54,8±0,64a
T22	61,7±0,64c	63,0±3,21a	55,6±0,56b	51,5±1,70b
ESALQ-1306	69,7±8,08b	65,6±2,94a	48,3±1,43c	51,9±1,28b
UFT 201	64,2±1,40c	62,0±4,00a	56,7±2,69b	54,4±0,00a
BV10	64,4±1,29c	60,2±2,94a	53,1±1,06b	54,4±1,11a
CV** (%)	6,50	5,87	3,69	2,31

\*Valores seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem entre si, segundo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).

\*\*Coeficiente de Variação (%).

Na Figura 1, apresentam-se os aspectos das colônias de *Trichoderma* spp. e de *M. phaseolina* durante o cultivo pareado, aos quatro dias de incubação. Nota-se que todas as cepas cresceram sobre as colônias do patógeno. Esporulação por quase toda a extensão das colônias foi observada no tratamento com a cepa *T. harzianum* CCT 7589, já aos quatro dias de incubação. Aos 12 dias, foi possível notar a produção abundante de esporos com todas as cepas de *Trichoderma* sobre as colônias de *M. phaseolina*.

Aos cinco dias de idade, *T. harzianum* IBLF 006, *T. harzianum* CPQBA 040-11DRM 09, *T. harzianum* CCT 7589 e *T. asperellum* UFT 201 avançavam sobre as colônias de *R. solani* (Figuras 2A, C, D, E e G) e já se observou a produção de esporos do antagonista, em alguns casos. Após 10 dias, era possível observar a presença de conídios sobre as colônias do patógeno, com todas essas cepas.

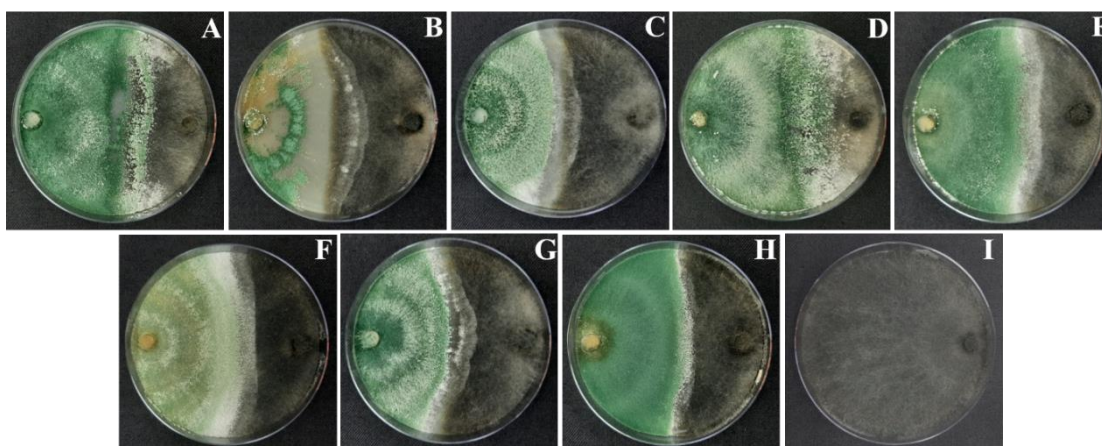
Já no pareamento de culturas com *S. sclerotiorum*, as médias de inibição do patógeno variaram entre 58,9 e 68,9 %, e as cepas não diferiram estatisticamente entre si. Notou-se, na maioria dos tratamentos, a formação de uma zona de inibição entre antagonista e patógeno (Figura 3) Após 10 dias de incubação, *T. harzianum* CCT 7589 e *T. asperellum* UFT 201 cobriam toda a superfície do meio, invadindo as colônias de *S. sclerotiorum*. Além disso, todas as cepas, exceto *T. asperellum* URM 5911, foram capazes de reduzir a produção de escleródios de *S. sclerotiorum* em mais de 87 % (Tabela 3).

Nos experimentos com *S. rolfsii*, cinco cepas (*T. harzianum* IBLF 006, *T. harzianum* CPQBA040-11DRM09, *T. harzianum* CCT 7589, *T. asperellum* UFT 201 e *T. asperellum* BV10) apresentaram maiores valores médios de inibição em relação às demais, não diferindo estatisticamente entre si. Porém, as cepas *T. asperellum* UFT 201 e *T. asperellum* BV10 não exibiram o mesmo padrão na segunda execução do experimento, apresentando valores médios inferiores, em inibição de crescimento micelial. No tratamento com *T. asperellum* BV10 houve a formação de uma ampla faixa de inibição (Figura 4H). Também, em outros tratamentos, observou-se a presença de zonas de inibição bem demarcadas, embora mais estreitas (Figura 4A e C).

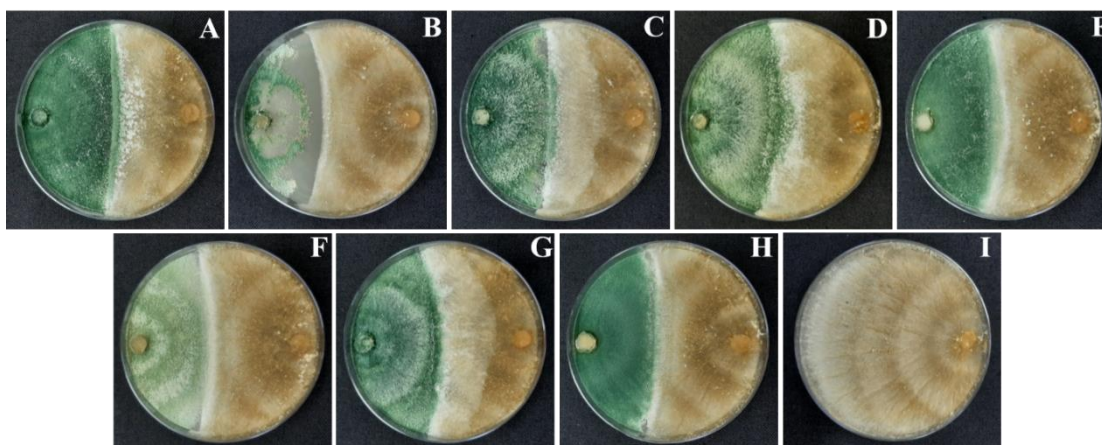
O micélio de *S. rolfsii* cresceu sobre as colônias das cepas *T. asperellum* URM 5911 e *T. harzianum* ESALQ-1306, próximo a zona de contato (Figuras 4B, E e F). Nos tratamentos com as cepas *T. harzianum* CPQBA040-11DRM09, *T. harzianum* CCT 7589 e *T. asperellum* BV10, *Trichoderma* spp. esporulou sobre toda a extensão das colônias de *S. rolfsii*. A produção de escleródios foi consideravelmente reduzida (em mais de 79 %), principalmente *T. harzianum* IBLF 006, *T. harzianum* CPQBA040-11DRM09, *T. harzianum* CCT 7589, *T. harzianum* ESALQ-



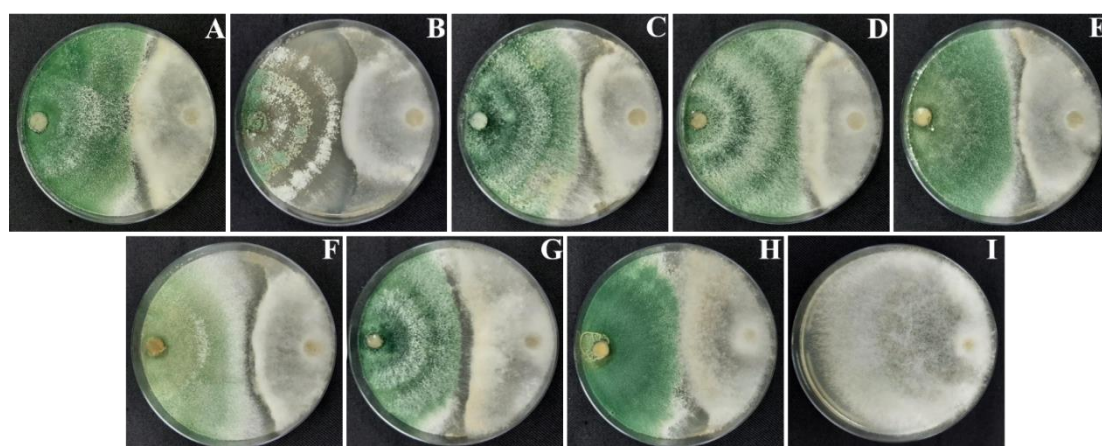
1306, *T. asperellum* UFT 201 e *T. asperellum* BV10 (Tabela 3).



**Figura 1:** Culturas pareadas de *Trichoderma* spp. e *Macrophomina phaseolina*, aos quatro dias de crescimento. A: IBLF 006, B: URM 5911, C: CPQBA040-11DRM09, D: CCT 7589, E: T22, F: Esalq 1306, G: UFT 201, H: BV10, I: Controle (*M. phaseolina* CEN1628).

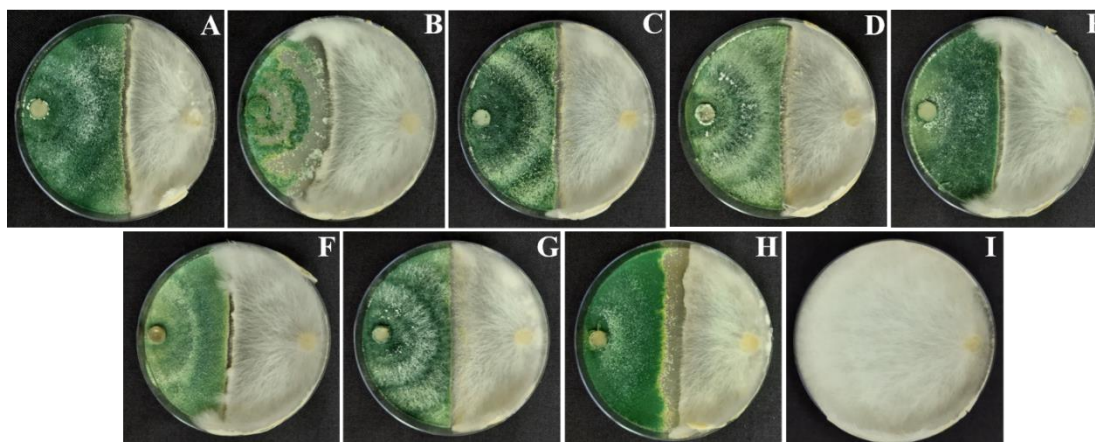


**Figura 2:** Culturas pareadas de *Trichoderma* spp. e *Rhizoctonia solani*, aos cinco dias de crescimento. A: IBLF 006, B: URM 5911, C: CPQBA040-11DRM09, D: CCT 7589, E: T22, F: Esalq 1306, G: UFT 201, H: BV10, I: Controle (*R. solani* CEN1627).



**Figura 3:** Culturas pareadas de *Trichoderma* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum* aos cinco dias de idade. A:

IBLF 006, B: URM 5911, C: CPQBA040-11DRM09, D: CCT 7589, E: T22, F: Esalq 1306, G: UFT 201, H: BV10, I: Controle (*S. sclerotiorum* CEN1147).



**Figura 4:** Culturas pareadas de *Trichoderma* spp. e *Sclerotium rolsii* aos seis dias de idade. A: IBLF 006, B: URM 5911, C: CPQBA040-11DRM09, D: CCT 7589, E: T22, F: Esalq 1306, G: UFT 201, H: BV10, I: Controle (*S. rolsii* CEN216).

**Tabela 3:** Número de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolsii* aos 15 e 20 dias de incubação, respectivamente, nas culturas pareadas com *Trichoderma* spp.

CEN	Número de escleródios*	
	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>S. rolsii</i>
IBLF 006	0,3±0,58a	52,3±21,54a
URM 5911	10,3±5,515b	88,0±7,21b
CPQBA040-11DRM09	0,7±0,58a	27,0±13,11a
CCT 7589	1,3±1,53a	32,7±15,04a
T22	2,3±1,15a	74,0±18,68b
ESALQ-1306	1,0±1,73a	56,0±21,70a
UFT 201	1,7±1,53a	41,3±13,05a
BV10	2,0±2,00a	43,3±10,50a
Controle	17,7±1,15c	272,3±30,66c
CV** (%)	47,08	23,71

\*Valores seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem entre si, segundo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).

\*\*Coeficiente de Variação (%).

#### **Avaliação da inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *S. rolsii* expostos aos compostos orgânicos voláteis de cepas comerciais de *Trichoderma***

Nesse estudo, *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *S. rolsii* foram expostos aos experimentos de compostos orgânicos voláteis (COVs) de cepas comerciais de *Trichoderma*, pelo

sistema de atmosfera compartilhada, no qual disco de micélio do antagonista é depositado na placa inferior e do patógeno na placa superior.

As cepas *T. harzianum* IBLF 006, *T. harzianum* CCT 7589 e *T. harzianum* ESALQ-1306, foram as que apresentaram os valores médios de inibição do crescimento de *M. phaseolina* (19,6, 24,2 e 16,7 %, respectivamente) mais elevados (Tabela 4). Entretanto, esse resultado não se repetiu com *T. harzianum* ESALQ-1306 na segunda execução do experimento, quando não diferiu estatisticamente das menores médias verificadas. Além disso, observando os aspectos das culturas, todas essas cepas inibiram a formação de microescleródios, visto que, via de regra, as colônias se apresentam escuras devido à presença dessas estruturas (Figura 5).

**Tabela 4:** Inibição do crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* em exposição aos compostos orgânicos voláteis das cepas comerciais de *Trichoderma*.

Cepa	Inibição Micelial (%)*			
	<i>M. phaseolina</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>R. solani</i>	<i>S. rolfsii</i>
IBLF 006	19,6±4,68a	21,1±3,27b	20,3±3,08a	51,8±1,60a
URM 5911	2,9±4,19c	27,2±6,68a	11,7±2,53b	33,5±2,58b
CPQBA040-11DRM 9	11,2±6,72b	20,6±4,78b	26,6±4,31a	48,5±3,58a
CCT 7589	24,2±1,32a	28,0±8,13a	25,4±1,23a	52,5±4,68a
T22	16,6±3,02b	19,0±6,80b	22,7±2,62a	48,8±10,06a
ESALQ-1306	16,7±1,82a	31,3±2,95a	20,4±4,99a	53,9±6,83a
UFT 201	13,9±4,23b	12,6±6,81b	15,6±4,90b	40,4±2,37b
BV10	11,4±3,03b	26,0±6,61a	9,1±6,13b	48,9±1,92a
CV** (%)	28,90	26,04	22,62	10,13

\*Valores seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, segundo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ). \*\* Coeficiente de Variação (%).

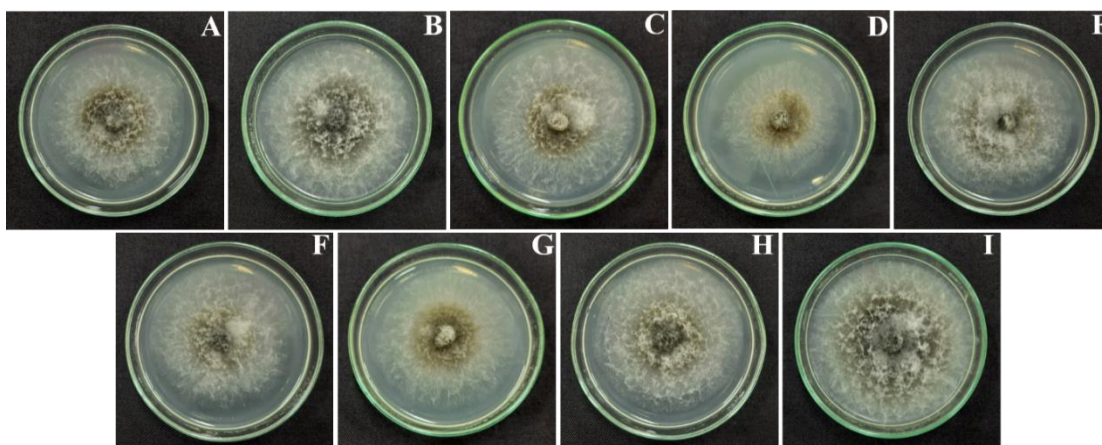
As cepas *T. harzianum* CCT 7589 e *T. harzianum* ESALQ-1306 apresentaram as maiores médias de inibição de *S. sclerotiorum*, sendo 31,3 e 28,8 %, respectivamente (Tabela 4). Já *T. asperellum* URM 5911 e BV10, embora se destacando no primeiro experimento, não apresentaram o mesmo padrão de resposta na segunda execução dos testes. O aspecto das colônias pode ser observado na Figura 6.

Quanto à *R. solani*, os COVs das cepas *T. harzianum* IBLF 006, *T. harzianum* CPQBA040-11DRM09, *T. harzianum* CCT 7589, *T. harzianum* T22 e *T. harzianum* ESALQ-1306

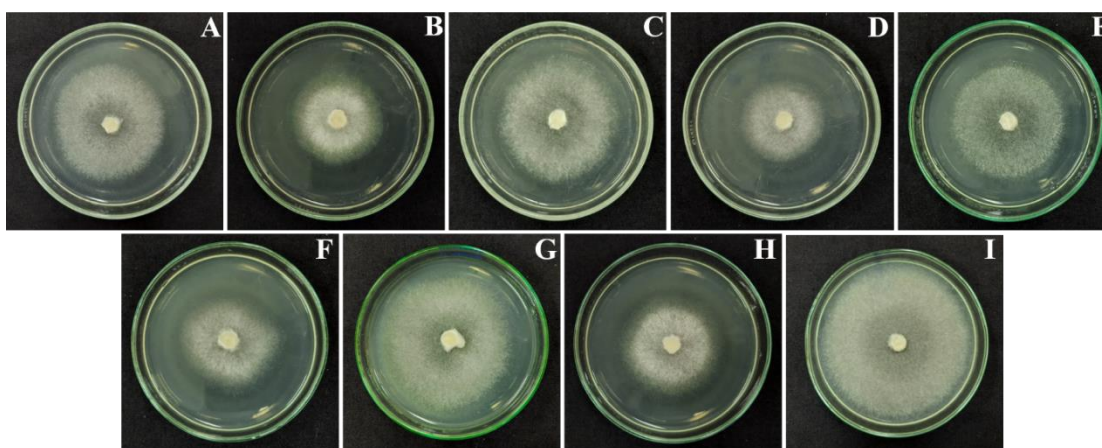


apresentaram as maiores médias de inibição de crescimento micelial do patógeno (Tabela 4). Além disso, as colônias expostas aos antagonistas, visualmente, apresentaram menor produção de micélio aéreo (Figura 7).

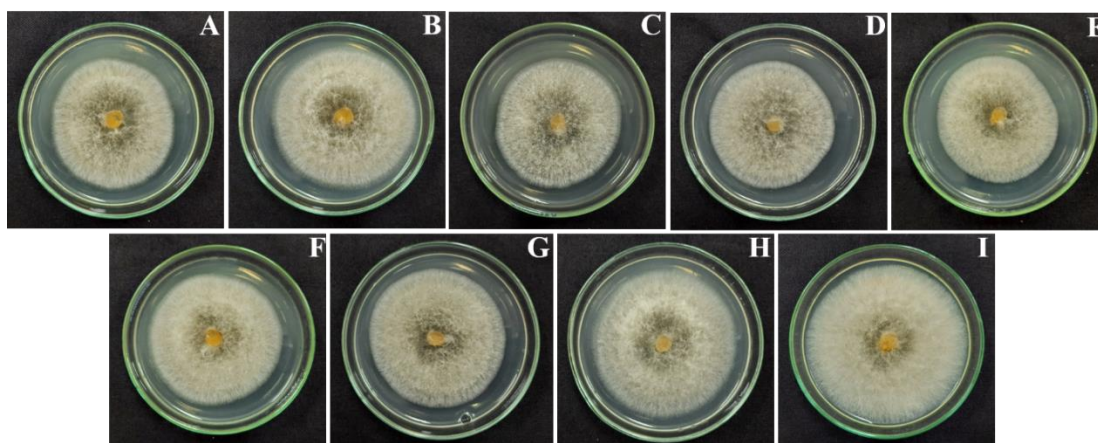
Nos experimentos com *S. rolfsii*, *T. harzianum* IBLF 006, *T. harzianum* CPQBA040-11DRM09, *T. harzianum* CCT 7589, *T. harzianum* T22, *T. harzianum* ESALQ-1306 e *T. asperellum* BV10 apresentaram as maiores porcentagens de inibição do patógeno (Tabela 4), seguido das cepas *T. asperellum* URM 5911 e UFT 201, que também inibiram consideravelmente o crescimento micelial de *S. rolfsii* (Figura 8).



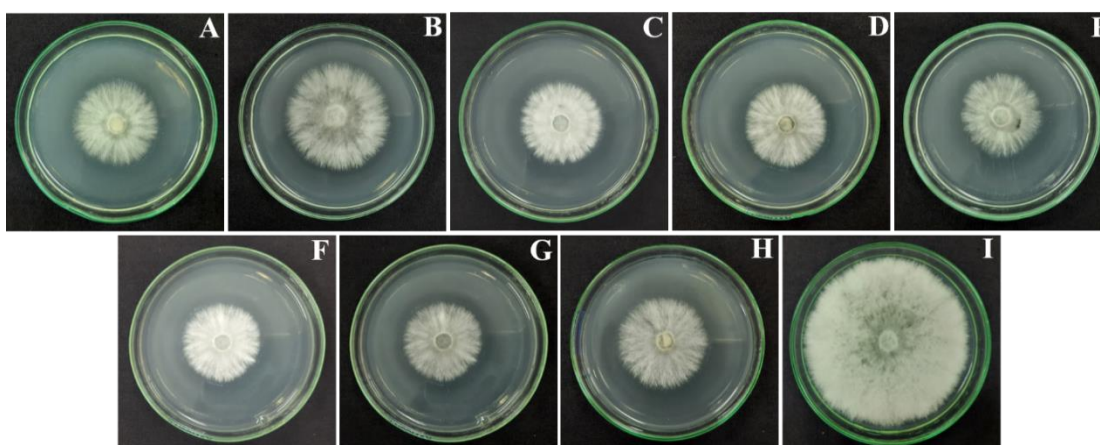
**Figura 5:** Colônias de *Macrophomina phaseolina* aos três dias de idade, expostas aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. A: IBLF 006, B: URM 5911, C: CPQBA040-11DRM09, D: CCT 7589, E: T22, F: Esalq 1306, G: UFT 201, H: BV10, I: Controle (*M. phaseolina* CEN1628).



**Figura 6:** Colônias de *Sclerotinia sclerotiorum* aos três dias de idade, expostas aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. A: IBLF 006, B: URM 5911, C: CPQBA 040-11DRM 09, D: CCT 7589, E: T22, F: Esalq 1306, G: UFT 201, H: BV10, I: Controle (*S. sclerotiorum* CEN1147).



**Figura 7:** Colônias de *Rhizoctonia solani* aos quatro dias de idade, expostas aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. A: IBLF 006, B: URM 5911, C: CPQBA040-11DRM09, D: CCT 7589, E: T22, F: Esalq 1306, G: UFT 201, H: BV10, I: Controle (*R. solani* CEN1627).



**Figura 8:** Colônias de *Sclerotium rolfsii* aos quatro dias de idade, com exposição aos compostos orgânicos voláteis de *Trichoderma* spp. A: IBLF 006, B: URM 5911, C: CPQBA040-11DRM09, D: CCT 7589, E: T22, F: Esalq 1306, G: UFT 201, H: BV10, I: Controle (*S. rolfsii* CEN216).

## Discussão

Neste estudo, foi feito um comparativo do potencial de cepas comerciais de *Trichoderma* spp. disponíveis no mercado como produtos formulados, quanto à inibição do desenvolvimento de colônias de quatro patógenos de plantas: *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. Para isso, foram utilizados os métodos de culturas pareadas e de atmosfera compartilhada ou sistema de placas invertidas.

No pareamento de culturas, a cepa *T. harzianum* CCT 7589 apresentou a maior inibição micelial de *M. phaseolina*, alcançando a porcentagem de 80,6 %, além de exibir habilidade micoparasítica, pois aos seis dias de incubação crescia sobre quase toda a colônia do patógeno, enquanto as demais cepas levaram mais tempo para colonizar toda a placa. No estudo de Rajani

et al. (2021), isolados de *Trichoderma*, incluindo a espécie *T. harzianum*, também cresceram e esporularam por toda a colônia de *M. phaseolina* no cultivo pareado.

A cepa *T. harzianum* CCT 7589 também se destacou nos testes de inibição do crescimento de *R. solani*, tendo atingido a porcentagem média de 62,0 % e, aos seis dias de incubação, avançando sobre as colônias do patógeno. As cepas *T. harzianum* IBLF 006, *T. harzianum* CPQB040-11DRM09 e *T. asperellum* UFT 201 comportaram da mesma forma. Nos pareamentos com *S. sclerotiorum*, todas as cepas apresentaram porcentagens de inibição do crescimento com médias estatisticamente iguais, variando entre 58,9 % e 68,9 %. As cepas *T. harzianum* CCT 7589 e *T. asperellum* UFT 201 demonstraram maior habilidade micoparasítica, pois colonizaram toda a colônia do patógeno. Além disso, exceto *T. asperellum* URM 5911, todas as cepas inibiram consideravelmente o número de escleródios produzidos pelas colônias de *S. sclerotiorum*.

No cultivo duplo com *S. rolfsii*, *T. harzianum* CCT 7589 também esteve entre as maiores médias de inibição, junto com as cepas *T. harzianum* IBLF 006 e *T. harzianum* CPQBA040-11DRM09, nos dois experimentos executados. No tratamento com a cepa *T. asperellum* BV10 houve a formação de um grande halo de inibição entre as colônias, o que significa que o mecanismo de antibiose pode estar fortemente relacionado ao antagonismo do patógeno, uma vez que o crescimento micelial deste foi interrompido antes do contato entre as colônias. Além disso, todas as cepas aqui estudadas reduziram o número de escleródios. Também no estudo conduzido por Isaias et al. (2014), com cepas de *Trichoderma* não comerciais, compostos não voláteis de um isolado de *T. asperellum* foram capazes de inibir o crescimento de *S. rolfsii* em mais de 50 %.

A cepa *T. harzianum* CCT 7589 foi a que mais se destacou frente aos patógenos durante o cultivo pareado. Além de se apresentar como micoparasita, demonstrou capacidade de inibir a produção de escleródios por *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*. Outros isolados de *T. harzianum* também já foram demonstrados inibirem a formação de escleródios em colônias desses patógenos (Abdullah et al., 2008; Kushwaha et al., 2018). Escleródios são a principal forma de sobrevivência e disseminação desses patógenos, logo, um agente de controle biológico que consiga parasitar essas estruturas têm grande potencial para diminuir a incidência e severidade das doenças.

O parasitismo exercido por *T. harzianum* sobre escleródios de *S. rolfsii*, foi demonstrado anteriormente (Benhamou et al., 1996). Os autores inferem que a penetração na parede do hospedeiro foi alcançada por meio de hifas contraídas. Além disso, observações estruturais, mostraram que o crescimento e desenvolvimento de *Trichoderma* coincidiram com extensas alterações nas células hospedeiras, como retração e agregação do citoplasma, e quebra de

vacúolos. Outro mecanismo utilizado por *Trichoderma*, durante o parasitismo, é a produção de enzimas degradadoras de parede celular, tais como quitinases, celulasas e  $\beta$ -1,3-glucanase (Hirpara et al., 2017; Wonglom et al., 2019).

Já no experimento com compostos orgânicos voláteis, a cepa *T. harzianum* CCT 7589 foi destaque frente a *M. phaseolina*, pois estão entre as que apresentaram as maiores médias nos dois experimentos executados, diferentemente da cepa *T. harzianum* ESALQ 1306. Além disso, foi observada uma redução na produção de microescleródios pela colônia. Iqbal & Mukhtar (2020) demonstraram que diferentes espécies de *Trichoderma* testadas foram capazes de inibir o crescimento micelial e a produção de microescleródios por *M. phaseolina*. Nesse estudo, um isolado da espécie *T. harzianum* ficou entre os mais eficazes.

Nos ensaios com *S. sclerotiorum*, as cepas *T. harzianum* CCT 7589 e *T. harzianum* ESALQ-1306 foram as que mais inibiram o crescimento do patógeno. As cepas *T. harzianum* IBLF 006, *T. harzianum* CPQBA040-11DRM09, *T. harzianum* CCT 7589, *T. harzianum* T22 e *T. harzianum* ESALQ-1306 apresentaram as maiores médias de inibição do crescimento de *R. solani* e *S. rolfsii*. Vinale et al. (2006) demonstraram que compostos originados do metabolismo secundário da cepa *T. harzianum* T22, também foram capazes de inibir o crescimento de *R. solani*.

A antibiose exercida por compostos orgânicos voláteis é um importante mecanismo de ação de *Trichoderma* e tem sido utilizada como um dos parâmetros para a seleção de linhagens desses fungos como agentes de biocontrole (Kaddes et al., 2019; Silva et al., 2020). Os genomas de várias espécies de *Trichoderma* têm sido identificados como ricos em genes que codificam enzimas responsáveis pela produção de metabólitos secundários, o que pode contribuir para uma potencial vantagem competitiva em suas atividades de biocontrole (Guo et al., 2019). Nossos resultados demonstraram que a capacidade das cepas comerciais de *Trichoderma* de inibirem patógenos de solo, por COVs, é heterogênea. Isso está em conformidade com o estudo de Cooney & Lauren (1998), ao inferirem que a produção de COVs de *Trichoderma* spp. pode ser específica para cada tipo de patógeno antagonizado. Esses autores mostraram níveis mais elevados de 6-pentil- $\alpha$ -pirona (6PAP) produzido por *T. harzianum*, em confronto com *B. cinerea* e, em menor quantidade, em confronto com *Fusarium culmorum* e *R. solani*.

Estudos comparativos entre produtos comerciais disponíveis no mercado são escassos, e os encontrados tratam principalmente de promoção de crescimento de plantas (Barroso et al., 2014; Ferreira et al., 2021, Oliveira et al., 2018). Estudos conduzidos por Macena et al. (2020) mostraram, com as cepas *T. harzianum* T22 e *T. asperellum* URM 5911, a supressão da

germinação miceliogênica e carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum*, e quando foram aplicadas em sementes de soja, promoveram crescimento de plantas e preveniram o ataque de patógeno.

Nas duas metodologias adotadas no presente trabalho, todas as cepas de *Trichoderma* apresentaram capacidade inibitória dos fungos testados, porém a cepa *T. harzianum* CCT 7589 mostrou resultados superiores quanto à habilidade micoparasítica e de inibição de escleródios, e também nos experimentos de compostos orgânicos voláteis, o que sugere que esta cepa possui habilidade para atuar também por antibiose, por emissão de compostos voláteis tóxicos aos patógenos. Além disso, todas as cepas apresentaram potencial na inibição contra *S. rolfsii*, apesar de nenhum dos produtos testados ser recomendado para o controle desse patógeno.

Nenhuma das cepas comerciais aqui estudadas estão registradas para uso contra todos os patógenos testados, apesar dos resultados favoráveis obtidos. Além disso, patógenos como *M. Phaseolina* e *S. rolfsii*, que há alguns anos eram considerados secundários em culturas como soja e milho, vem ganhando importância no Brasil (Almeida et al., 2014, Grigolli, 2015). O presente estudo compara diferentes cepas comerciais de *Trichoderma* no antagonismo a diferentes patógenos de solo, em condições *in vitro*, e nos dão indicação do possível comportamento dessas cepas em condições *in vivo*. A escolha das oito cepas comerciais para os testes desenvolvidos teve como base questionamentos de pesquisadores, assistentes técnicos e agricultores sobre a eficiência das cepas utilizadas na agricultura brasileira. Entretanto, recomendam-se novos estudos para avaliar o comportamento das mesmas *in vivo* e, desta forma, oferecer mais robustez a esses dados iniciais, assim, garantir informações mais seguras aos agricultores.

## **Conclusão**

Todas as cepas comerciais testadas inibiram, em diferentes proporções, o crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* nos experimentos de culturas pareadas e exposição aos compostos orgânicos voláteis. A cepa *T. harzianum* CCT 7589 foi a que mais se destacou no pareamento de culturas e na exposição aos compostos orgânicos voláteis.

## **Referências**

ABDULLAH MT, ALI NY, SULEMAN P (2008) Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. Crop Protection, 27:1354-1359.



AGROFIT. Disponível em: [https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 05 de janeiro de 2022.

ALMEIDA AMR, SEIXAS CDS, FARIAS JRB, OLIVEIRA MCN, FRANCHINI JC, DEBIASI H, COSTA JM, GAUDÊNCIO CA (2014). *Macrophomina phaseolina* em soja. Londrina: Embrapa Soja.

ABREU LM, PFENNING LH (2019). O Gênero *Trichoderma* In: MEYER MC, MAZARO SM, SILVA JC. *Trichoderma: uso na agricultura*. 1ed. Brasília, DF: Embrapa.

BARROSO FM, MUNIZ PHPC, MILAN MD, SANTOS WSS, FERREIRA NCF, RODRIGUES F, CARVALHO DDC (2019) Growth Promotion of Parsley (*Petroselinum crispum* L.) Using Commercial Strains of *Trichoderma* spp. *Journal of Agricultural Science*, 11(4).

BENHAMOU N, CHET I (1996). Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. 1996. *Phytopathology*, 86: 405-416.

BETTIOL W, PINTO ZV, SILVA JC, FORNER C, FARIA MR, PACIFICO MG, COSTA LSA (2019). Produtos comerciais à base de *Trichoderma* In: MEYER MC, MAZARO SM, SILVA JC. *Trichoderma: uso na agricultura*. 1 ed. Brasília, DF: Embrapa.

CHAVERRI P, BRANCO-ROCHA F, JAKLITSCH W, GAZIS R, DEGENKOLB T, SAMUELS GJ (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia* 107: 558-590.

COONEY JM, LAUREN DR. (1998). *Trichoderma*/pathogen interactions: measurement of antagonistic chemicals produced at the antagonist/pathogen interface using a tubular bioassay. *Letters in Applied Microbiology*, 27: 283-286.

DALZOTTO L, TORTELLI B, STEFANSKI FS, SACON D, SILVA VN, MILANESI PM (2020). Creole bean seeds microbiolization with doses of *Trichoderma harzianum*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.50:5, e20190542.

FERREIRA DF (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35:1039-1042.

FERREIRA NCF, ROCHA ED, RODRIGUES F, SANTOS SX, OLIVEIRA TAS, DUARTE EAA, CARVALHO DDC (2021). *Trichoderma* spp. in growth promotion of *Jacaranda mimosifolia* D. Don. *Journal of Agricultural Studies*, 9(2).

GRIGOLLI JFJ (2015). Manejo de Doenças na Cultura da Soja. In: LOURENÇÃO ALF et al. *Tecnologia e produção: Soja 2014/2015*. Curitiba, 161p.

GUO Y, GHIRARDO A, WEBER B, SCHNUTZIER JP, BENZ JP, ROSENKRANZ M (2019). *Trichoderma* species differ in their volatile profiles and in antagonism toward ectomycorrhiza *Laccaria bicolor*. *Frontiers in Microbiology*, 10:1-15.

HIRPARA DG, GAJERA HP, HIRPARA HZ, GOLAKIYA BA (2017). Antipathy of *Trichoderma* against *Sclerotium rolfsii* Sacc.: evaluation of cell wall-degrading enzymatic activities and molecular diversity analysis of antagonistic. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 27:22-28.

ISAIAS CO, MARTINS I, SILVA JBT, SILVA JP, MELLO SCM (2014). Ação antagonística e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahlia*. *Summa Phytopathologica* 40(1):34-41.

IQBAL U, MUKHTAR T (2020). Evaluation of Biocontrol Potential of Seven Indigenous *Trichoderma* Species against Charcoal Rot Causing Fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Gesunde Pflanzen*, 72:195-202.

KADDES A, FAUCONNIER ML, SASSI K, NASRAOUI B, JIJAKLI MH (2019). Endophytic fungal volatile compounds as solution for sustainable agriculture. *Molecules*, 24:1-16.

KUSHWAHA SK, 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.

LOPES UP, MICHEREFF SJ (2018). Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos. Recife: EDUFRPE, 208p.

MACENA AMF, KOBORI NN, MASCARIN GM, VIDA JB, HARTMAN GL (2020). Antagonism of *Trichoderma*-based biofungicides against Brazilian and North American isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* and growth promotion of soybean. *BioControl*, 65:235-246.

MACHADO DFM, PARZIANELLO FR, SILVA ACF, ANTONIOLLI ZI (2012). *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. *Revista de Ciências Agrárias* 35:274-288.

MASCARIN GM, BONFIM JUNIOR MF, ARAÚJO FILHO JV (2012) *Trichoderma harzianum* reduces population of *Meloidogyne incognita* in cucumber plants under greenhouse conditions. *Journal of Entomology and Nematology*, 4(6):54-57.

MELO SCM, ÁVILA ZR, BRAÚNA LM, PÁDUA RR, GOMES D (2007). Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 11(1):1-9.

MICHEREFF SJ, DOMINGOS EGT, ANDRADE MM (2005). Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Recife: UFRPE, 398p.

OLIVEIRA JB, MUNIZ PHPC, PEIXOTO GHS, OLIVEIRA TAS, DUARTE EAA, RODRIGUES F, CARVALHO DDC (2018). Promotion of Seedling Growth and Production of Wheat by Using *Trichoderma* spp. *Journal of Agricultural Science*, 10(8).

RAJANI P, RAJASEKARAN C, VASANTHAKUMARI MM, SHANNON BO, RAVIKANTH G, SHAANKER U (2021). Inhibition of plant pathogenic fungi by endophytic *Trichoderma* spp. through mycoparasitism and volatile organic compounds. *Microbiological Research*, 242:126595.

SILVA LR, VALADARES-INGLIS MC, MORAES MCB, MAGALHÃES DM, SIFUENTES DN, MARTINS I, MELLO SCM (2020). Morphological and protein alterations in *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary after exposure to volatile organic compounds of *Trichoderma* spp. *Biological Control*, 147:1-7.

VINALE F, MARRA R, SCALA F, GHISALBERT EL, LORITO M, SIVASITHAMPARAM K (2006). Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 43:143-148.

ZENG W, KIRK W, HAO JIANJUN (2012). Field management of *Sclerotinia* stem rot of soybean using biological control agents. *Biological Control*, 60:141-147.

WONGLOM P, DAENGSUWAN W, ITOD S, SUNPAPAO A (2019). Biological control of *Sclerotium* fruit rot of snake fruit and stem rot of lettuce by *Trichoderma* sp. T76-12/2 and the mechanisms involved. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 107:1-7.

## CAPÍTULO 2

### Efeito de cepas não comerciais de *Trichoderma* no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*

#### Resumo

*Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* são patógenos habitantes do solo, capazes de sobreviver nesse ambiente por longos períodos como estruturas de sobrevivência e ocasionam doenças radiculares em diferentes espécies de plantas. Esses fitopatógenos afetam a germinação das sementes, além de infectar raízes e caules, causando o tombamento das plântulas. *Trichoderma* é o principal agente de controle biológico de doenças veiculadas pelo solo. É capaz de atuar por diferentes mecanismos de ação, como competição, micoparasitismo, antibiose, promoção de crescimento e indução de resistência. Além disso, fungos desse gênero são capazes de colonizar escleródios, reduzindo sua viabilidade. O objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade de diferentes cepas de *Trichoderma* para inibir o crescimento micelial de *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *S. rolfsii*, pelos métodos: pareamento de culturas, exposição aos compostos orgânicos voláteis em atmosfera compartilhada e exposição aos extratos brutos obtidos a partir de filtrados autoclavados de culturas do antagonista. Todas as cepas de *Trichoderma* inibiram o crescimento dos quatro patógenos testados, nos testes de cultivo pareado e atmosfera compartilhada. As cepas CEN1277 e CEN1559, ambos pertencentes à espécie *T. asperelloides*, destacaram-se entre as que apresentaram as maiores porcentagens de inibição, com diferentes porcentagens entre si e conforme a metodologia adotada. Os filtrados autoclavados de *T. afroharzianum* CEN287 e *T. rifaai* CEN288 foram superiores na inibição de *S. sclerotiorum*, alcançando 75,6 e 79,2 % de inibição, respectivamente. Já *M. phaseolina* e *R. solani* não foram inibidos por nenhum dos tratamentos, enquanto *S. rolfsii* apresentou inconsistência nos resultados.

#### Introdução

Fungos fitopatogênicos habitantes do solo, entre os quais *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*, são responsáveis por grandes perdas na agricultura. Eles são capazes de sobreviver por longos períodos de tempo em forma de estruturas de sobrevivência, os escleródios, que são agregados miceliais cobertos por uma camada melanizada. Geralmente esses fungos são bons competidores e podem permanecer como

saprófitas nos restos culturais (Michereff et al., 2005). Também podem ser carreados pelas sementes, causam tombamentos de pré e pós-emergência (*damping off*) e, quando presentes no solo, são capazes de infectar as raízes e o colo das plantas. Em estágios mais avançados da cultura, causam lesões, murchas e, no caso de infecções mais severas, morte de plantas (Bedendo, 2018).

Além da ampla gama de hospedeiros, a habilidade para sobreviverem nos resíduos culturais e de se manterem viáveis no solo como escleródios, dificulta o manejo das doenças causadas por esses patógenos, por medidas culturais como a rotação de culturas e pelo uso de fungicidas químicos (David et al., 2018). Assim, o controle biológico de doenças assume um importante papel no manejo de doenças de solo, além de promover a sustentabilidade e a redução do uso de agroquímicos (O'Brien, 2017).

O gênero *Trichoderma* pertence ao filo Ascomycota, família Hypocreaceae (Kirk, 2012). São fungos benéficos que possuem atividade contra vários fitopatógenos e atuam por diferentes mecanismos de ação, como competição, micoparasitismo e antibiose, este envolvendo a produção de compostos voláteis e não voláteis. Atuam também indiretamente, por indução de resistência e promoção de crescimento de plantas (Rubio et al., 2014), devido à capacidade para sobreviver em restos culturais e na rizosfera das plantas, com as quais podem estabelecer interação do tipo simbiose (Queiroz et al., 2004; Saravankumar et al., 2016). Tais interações variam entre isolados, ou seja, intraespecificamente, e, também, dependendo da espécie de planta envolvida (Druzhinina et al., 2011; Sandro, 2020).

Diferentes estudos relatam a capacidade de *Trichoderma* spp. para inibir o crescimento micelial de *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *S. rolfsii*, bem como a formação e germinação de escleródios, atuando por diferentes mecanismos de ação (Isaias et al., 2014; Carvalho et al., 2015; Rajani et al., 2021; Silva et al., 2021b). A Coleção de Agentes de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) contém mais de 1500 isolados de *Trichoderma*. Recentemente, 60 cepas de *Trichoderma* foram testadas contra diferentes patógenos e oito dessas foram selecionadas. Assim, o objetivo desse trabalho é avaliar cepas de *Trichoderma* quanto a supressão dos patógenos mencionados, em experimentos *in vitro*.

## **Material e Métodos**

### **Origem e preservação das cepas utilizados**

Foram utilizadas oito cepas de *Trichoderma* (Tabela 1) pertencentes à Coleção de Agentes de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Brasília,

Distrito Federal, selecionados a partir de estudos anteriores. Os patógenos testados foram *Macrophomina phaseolina* CEN1628, *Sclerotinia sclerotiorum* CEN1147, *Rhizoctonia solani* CEN1627 e *Sclerotium rolfsii* CEN216, também mantidos na Coleção.

**Tabela 1:** Origem das cepas de *Trichoderma* utilizadas.

Código	Local de coleta	Rizosfera/hospedeiro	Espécie
CEN281	Copebrás/DF	<i>Gossypium</i> sp.	<i>T. afroharzianum</i>
CEN287	Copebrás/DF	<i>Gossypium</i> sp.	<i>T. afroharzianum</i>
CEN288	Copebrás/DF	<i>Gossypium</i> sp.	<i>T. rifaïi</i>
CEN1242	Rajadinha/DF	<i>Zea mays</i>	<i>T. azevedoi</i>
CEN1277	Rajadinha/DF	<i>Petroselinum crispum</i>	<i>T. asperelloides</i>
CEN1513	Manaus/AM	<i>Theobroma cacao</i>	<i>T. koningiopsis</i>
CEN1546	Poconé/MT	Pantanal	<i>T. afroharzianum</i>
CEN1559	Poconé/MT	Pantanal	<i>T. asperelloides</i>

### **Inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *S. rolfsii* pelas cepas de *Trichoderma* em culturas pareadas**

Discos de micélio de 5 mm de diâmetro ( $\emptyset$ ) foram retirados das colônias de *Trichoderma* obtidas em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) Merck®, com 5 ou 6 dias de incubação e transferidos para a extremidade de placas de Petri de 90 mm de diâmetro (um disco/placa), contendo 20 mL do mesmo meio. Simultaneamente, foram depositados individualmente na extremidade oposta das placas, discos de micélio dos patógenos *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. O tratamento testemunha foi constituído de placas de Petri contendo somente patógeno. As placas com *S. sclerotiorum* em *M. phaseolina* foram incubadas a 25 °C, e aquelas com *R. solani* e *S. rolfsii* à 28 °C, todas com fotoperíodo de 12 horas. A inibição do crescimento micelial dos patógenos foi avaliada quando as colônias dos tratamentos testemunha colonizaram toda a superfície do meio, tomando-se as medidas do diâmetro das colônias, utilizando régua milimetrada. Os cálculos de percentuais de inibição foram realizados pela fórmula:  $I = (C-T/C) \times 100$ , onde I = índice de inibição (%); C diâmetro das colônias na placa controle e; T = diâmetro das colônias do patógeno nos pareamentos (Melo et al., 2007). Além disso, foi realizada a contagem manual de escleródios de *S. rolfsii* e *S.*

*sclerotiorum* após 15 dias de crescimento das colônias. Foi adotado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições por cepa de *Trichoderma*, sendo a unidade experimental constituída de uma placa de Petri. O experimento foi conduzido duas vezes. Os dados obtidos (percentuais de inibição do crescimento micelial) foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o *software* Sisvar 5.6 (Ferreira, 2011).

### **Inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *S. rolfsii* expostos a compostos orgânicos voláteis de cepas de *Trichoderma***

Discos de micélio de (5 mm Ø) de BDA Merck® colonizado com *Trichoderma*, aos 5 - 6 dias de cultivo, foram transferidos para a base de uma placa de Petri (90 mm Ø) contendo 20 mL de meio BDA. Após incubação por 72 horas à 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, discos de micélio colonizados por *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *S. Rolfsii*, foram depositados em outras bases de placas, também com meio BDA. Imediatamente após, as bases contendo patógeno foram sobrepostas às bases contendo *Trichoderma*. Nesse experimento, as cepas de *Trichoderma* foram cultivadas três dias antes da montagem do experimento devido a relatos de que quando o antagonista está em fase de esporulação, a capacidade de inibição micelial é maior (Silva et al., 2021a). As combinações, cada uma representando um tratamento, foram unidas com Parafilm® e o conjunto selado com plástico filme, mantendo-se as placas cotendo patógeno na posição superior. As culturas, assim preparadas, foram distribuídas em câmara de crescimento, onde se mantiveram à temperaturas de 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas, de modo que o patógeno ocupou a parte superior do conjunto. Testemunhas consistiram de conjuntos de placas contendo apenas patógeno na parte superior.

Após a total colonização do meio BDA nas testemunhas, foram tomadas medidas do diâmetro das colônias com o auxílio de régua milimetrada. Os valores médios de inibição foram calculados com o uso da fórmula:  $I = (C - T)/C \times 100$ , onde “I” representa a porcentagem de inibição, “C” os valores da medida de diâmetro da cultura dos patógenos nos tratamentos controle e “T”, dos valores dos tratamentos com a presença do antagonista, em milímetros. O experimento foi conduzido duas vezes, em DIC, com três repetições por tratamento. Os valores de inibição do crescimento micelial foram submetidos à análise de variância e, as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o *software* Sisvar 5.6 (Ferreira, 2011). Ao final do experimento, aos cinco dias, as placas com os patógenos foram retiradas da atmosfera

compartilhada, fechadas com uma tampa de placa de Petri e incubadas novamente, para observar se o crescimento micelial e formação de escleródios seria afetado após o contato com os compostos orgânicos voláteis emitidos pelo antagonista.

### **Inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *S. rolfsii* sob exposição a filtrados de colônia de *Trichoderma***

Os patógenos *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *S. rolfsii* foram expostos aos filtrados autoclavados produzidos pelas oito cepas de *Trichoderma*. Para isso, foram distribuídos 150 mL de meio líquido (Batata-Dextrose-BD) em frascos Erlenmeyers de 250 mL. Cada frasco recebeu três discos de micélio de colônias de *Trichoderma* e foram mantidos sob agitação, por sete dias. Posteriormente, coletou-se o filtrado de cada cultura do antagonista em gaze esterilizada e esses filtrados foram individualmente incorporados à alíquota de meio BDA, na proporção de 25%, ou seja, cada frasco continha ¼ de filtrado de *Trichoderma* e ¾ de BDA (Guimarães et al., 2016, adaptado). Após autoclavagem à temperatura de 121 °C por 20 minutos, os meios contendo filtrado de *Trichoderma* foram vertidos em placas de 90 mm e disco de micélio colonizados com patógeno foram depositados na superfície do meio. Placas contendo meio sem adição de filtrado de *Trichoderma* foram utilizadas como testemunhas. O experimento foi conduzido em DIC, com nove tratamentos (cepas de *Trichoderma* + mais testemunhas) e cinco repetições. Cada experimento foi conduzido pelo menos duas vezes para confirmação dos dados.

A avaliação consistiu na medição dos diâmetros das colônias dos patógenos e cálculo das porcentagens de inibição do crescimento micelial, em relação à testemunha, utilizando a fórmula:  $I = (C - T)/C \times 100$ , onde “I” representa a porcentagem de inibição, “C” os valores da medida de diâmetro da cultura dos patógenos nos tratamentos controle e “T”, dos valores dos tratamentos com a presença do antagonista. Os dados foram submetidos à análise de variância e, as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott, à 5% de probabilidade, utilizando o *software* Sisvar 5.6 (Ferreira, 2011).

## **Resultados**

### **Inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *S. rolfsii* por linhagens de *Trichoderma*, pelo método de pareamento de culturas**

As oito cepas testadas inibiram o crescimento do patógeno *M. phaseolina* em pelo menos 61,3%, com destaque para *T. azevedoi* CEN1242, *T. koningiopsis* CEN1513, *T. afroharzianum*



CEN1546 e *T. asperelloides* CEN1559, que alcançaram os maiores valores médios de porcentagem de inibição (Tabela 2). Além disso, todas as cepas avançaram sobre as colônias do patógeno, inclusive produzindo esporos. Esse fato foi observado principalmente com as cepas *T. asperelloides* CEN1277 e CEN1559, que cobriram praticamente toda a placa de Petri (Figura 1). No tratamento com *T. afroharzianum* CEN1546, inicialmente, houve a formação de uma grande zona de inibição (Figura 1D), posteriormente encoberta pela cepa de *Trichoderma*.

**Tabela 2.** Inibição micelial de *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* por cepas não comerciais de *Trichoderma*, no cultivo pareado.

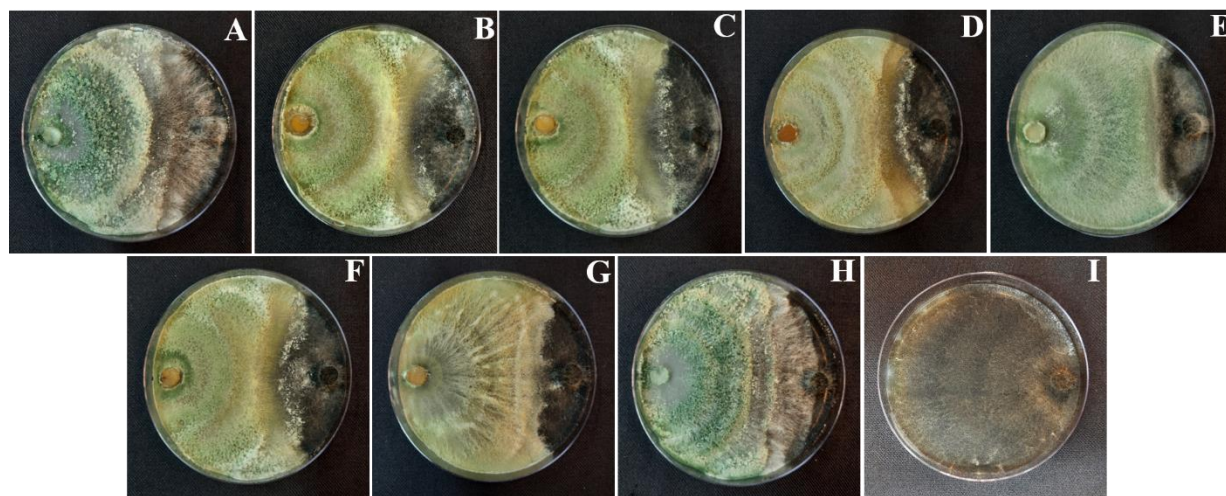
Cepa	Inibição Micelial (%)*			
	<i>M. phaseolina</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>R. solani</i>	<i>S. rolfsii</i>
CEN281	63,1±1,65b	57,3±3,90a	52,0±2,13c	54,9±2,43b
CEN287	62,0±2,53b	56,8±3,63a	51,3±2,77c	55,6±1,36b
CEN288	61,3±1,22b	57,3±0,99a	54,2±1,45b	50,4±3,90c
CEN1242	64,9±1,27a	56,0±2,02a	56,9±1,45a	53,3±2,61b
CEN1277	61,5±1,27b	54,9±3,90a	55,8±1,22a	59,3±1,86a
CEN1513	67,1±1,68a	58,2±6,96a	57,1±0,99a	60,0±1,57a
CEN1546	64,9±2,01a	57,1±4,42a	54,7±1,45a	54,2±3,96b
CEN1559	65,3±1,45a	53,3±34,16a	53,6±1,99b	49,8±2,41c
CV** (%)	2,70	7,72	3,37	4,74

\*Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem entre si, segundo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ). \*\*Coeficiente de Variação (%).

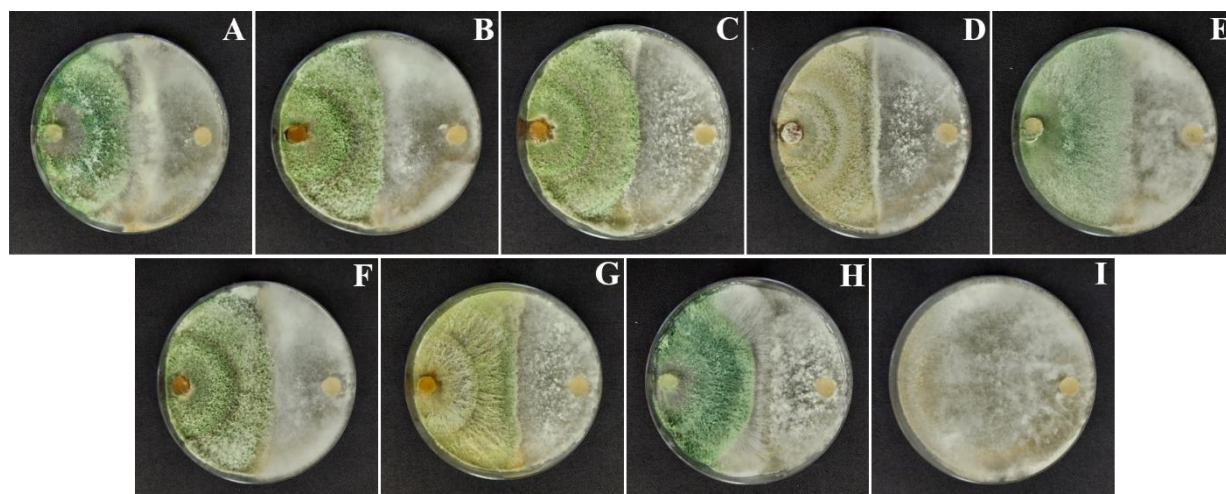
Quanto ao patógeno *S. sclerotiorum*, os valores médios de inibição do crescimento micelial variaram entre 53,3 e 58,2% (Tabela 2, Figura 2), sem que fosse detectada diferença significativa entre os valores médios obtidos com as cepas, ao nível de 0,05. Vale enfatizar que o coeficiente de variação foi mais alto, com este patógeno. Na contagem do número de escleródios realizada aos 15 dias, observou-se que as cepas *T. asperelloides* CEN1277 e CEN1559 inibiram completamente a produção dessas estruturas de sobrevivência (Tabela 3). Todas as cepas de *Trichoderma* sobrepuseram as colônias do patógeno e produziram esporos em abundância. Notou-se que os escleródios formados em presença de *T. koningiopsis* CEN1513 perderam a rigidez, mostrando-se deteriorados.

Nos pareamentos com *R. solani*, aos cinco dias de crescimento, quatro cepas apresentaram os maiores valores médios de inibição do crescimento micelial *T. azevedoi* CEN1242 (56,9 %), *T. asperelloides* CEN1277 (55,8 %), *T. afroharzianum* CEN1546 (54,7 %) e o *T. koningiopsis*

CEN1513 (57,7 %). O avanço de *Trichoderma* sobre as colônias do patógeno foi observado já no quinto dia, com as cepas *T. asperelloides* CEN1277 e CEN1559. (Figura 3). Após 10 dias, todas as cepas do antagonista foram observadas crescendo sobre as colônias do patógeno.



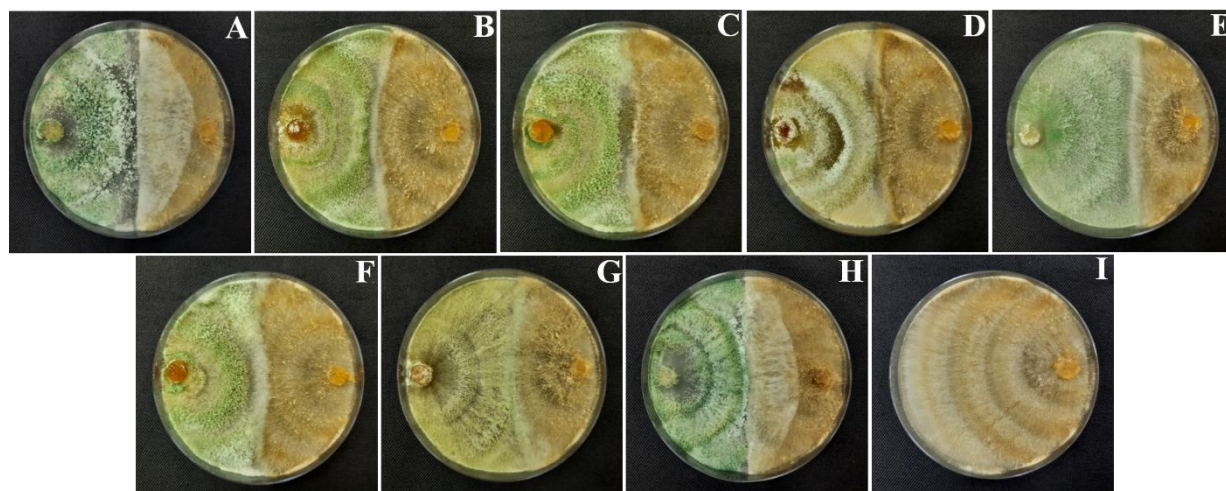
**Figura 1:** Culturas pareadas de *Trichoderma* spp. e *Macrophomina phaseolina* aos cinco dias de crescimento. A: CEN1277, B: CEN287, C: CEN288, D: CEN1546, E: CEN1513, F: CEN281, G: CEN1242, H: CEN1559, I: Controle (*M. phaseolina* CEN1628).



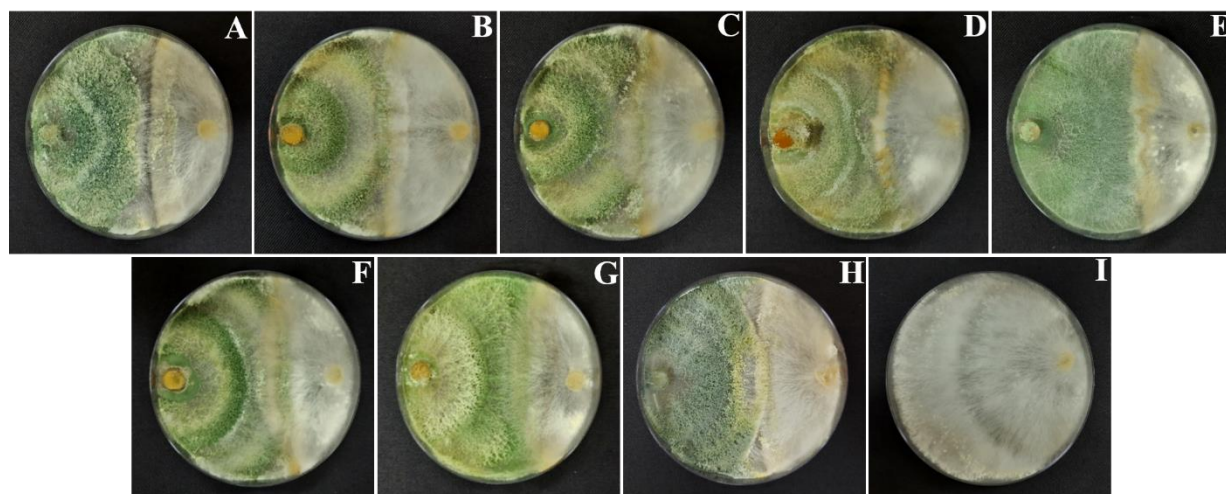
**Figura 2:** Culturas pareadas de *Trichoderma* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum* aos cinco dias de cultivo. A: CEN1277, B: CEN287, C: CEN288, D: CEN1546, E: CEN1513, F: CEN281, G: CEN1242, H: CEN1559, I: Controle (*S. sclerotiorum* CEN1147).

Quanto ao *S. rolfisii*, *T. asperelloides* CEN1277 e *T. koningiopsis* CEN1513 de *Trichoderma* apresentaram os maiores índices de inibição, de 59,3 e 60,0 %, respectivamente (Tabela 2). Aos cinco dias de cultivo, foi observado o crescimento das cepas de *Trichoderma* sobre as colônias do patógeno, à exceção de *T. azevedoi* CEN1242, que foi invadido pelo *S. rolfisii* (Figura 4). Na contagem do número de escleródios aos 15 dias, foi observado que todas as cepas testadas reduziram drasticamente a produção dessas estruturas de sobrevivência, em

comparação com a testemunha (Tabela 3). Perda de rigidez dos escleródios foi notada, exceto com a cepa *T. koningiopsis* CEN1513.



**Figura 3:** Culturas pareadas de *Trichoderma* spp. e *Rhizoctonia solani* após cinco dias de cultivo. A: CEN1277, B: CEN287, C: CEN288, D: CEN1546, E: CEN1513, F: CEN281, G: CEN1242, H: CEN1559, I: Controle (*R. solani* CEN1627).



**Figura 4:** Pareamento de culturas entre *Trichoderma* spp. e *Sclerotium rolfsii* após cinco dias de crescimento. A: CEN1277, B: CEN287, C: CEN288, D: CEN1546, E: CEN1513, F: CEN281, G: CEN1242, H: CEN1559, I: Controle (*S. rolfsii* CEN216).



**Tabela 3:** Número de escleródios produzidos por *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* após 15 dias cultivados em pareamento com *Trichoderma* spp.

CEN	Número de escleródios	
	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>S. rolfsii</i>
CEN281	4,2±2,59b	13,3±6,24a
CEN287	7,8±2,59c	14,8±7,54a
CEN288	6,4±1,14b	22,5±4,43a
CEN1242	2,0±a	23,8±16,52a
CEN1277	0a	15,3±3,30a
CEN1513	5,0±2,55b	46,8±15,95b
CEN1546	9,4±3,21c	20,0±8,04a
CEN1559	0a	22,5±3,87a
Controle	32,8±3,77d	173,3±21,61c
CV (%)*	32,65	29,39

\*Valores seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, segundo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ). \*Coeficiente de Variação (%).

### **Inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *S. rolfsii* expostos aos compostos orgânicos voláteis de cepas de *Trichoderma***

Ao ser avaliado o crescimento micelial dos patógenos cultivados em atmosfera compartilhada com as oito cepas de *Trichoderma* utilizadas neste estudo, observou-se que todas à excessão de *T. koningiopsis* CEN1513 apresentaram porcentagens de inibição de *M. phaseolina* acima de 59,8 % e não diferiram significativamente entre si (Tabela 4). Portanto, diferença significativa foi observada entre CEN1513 e as demais.

As cepas *T. azevedoi* CEN1242, *T. asperelloides* CEN1277 e CEN1559 foram as que apresentaram as maiores porcentagens de inibição de *S. sclerotiorum*, cujos valores ficaram em 67,5 %, 63,2 % e 63,8 %, respectivamente. Nos tratamentos com *Trichoderma* spp., as colônias apresentaram micélio escasso, em comparação com as testemunhas. Já no experimento com *R. solani*, *T. asperelloides* CEN1559 inibiu totalmente o crescimento micelial do patógeno, seguido de *T. asperelloides* CEN1277, que apresentou em média 84,2 % de inibição. As cepas *T. asperelloides* CEN 1277 e CEN1559 se destacaram na inibição de *S. rolfsii* pela produção desses compostos, atingindo valores médios de 84,8 e 85,6 %.

Por fim, após os patógenos serem retirados do sistema de atmosfera compartilhada, todos retomaram o crescimento e formaram colônias com aspecto micelial e formação de escleródios

semelhantes ao controle.

**Tabela 4:** Inibição micelial de *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* por compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Trichoderma*.

Cepa	Inibição Micelial (%)*			
	<i>M. phaseolina</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>R. solani</i>	<i>S. rolfsii</i>
CEN281	64,4±3,54a	55,5±11,19b	78,7±1,78c	77,3±4,83b
CEN287	59,8±6,09a	57,2±4,03b	77,2±2,45c	76,1±1,52b
CEN288	62,8±12,09a	54,4±3,42b	71,1±4,61d	75,3±3,84b
CEN1242	70,3±4,07a	67,5±3,97a	76,3±5,310c	73,7±6,29b
CEN1277	66,9±4,32a	63,2±3,02a	84,2±1,15b	84,8±0,39a
CEN1513	48,5±5,76b	49,6±5,85b	68,9±3,21d	68,1±0,74c
CEN1546	67,9±4,36a	58,5±3,40b	75,2±1,50c	76,4±1,78b
CEN1559	71,0±6,59a	63,8±2,65a	100,0±0a	85,6±0,30a
CV** (%)	10,20	9,66	4,01	4,30

\*Valores seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, segundo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ). \*\*Coeficiente de Variação (%).

#### **Avaliação da inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *S. rolfsii* expostos aos filtrados culturas de *Trichoderma* spp.**

Os patógenos *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *S. rolfsii* foram cultivados em meio de cultura suplementado com filtrados de quatro cepas de *Trichoderma* e foi avaliado o crescimento micelial. *Macrophomina phaseolina* e *R. solani* não apresentaram inibição do crescimento pelos filtrados adicionados no meio (Tabela 5).

Os tratamentos com as cepas *T. afroharzianum* CEN287 e *T. rifaai* CEN288 foram os que mais inibiram *S. sclerotiorum*, com porcentagens médias de 75,6 e 79,2 %; verificou-se crescimento micelial apenas próximo ao disco de micélio depositado no centro da placa (Tabela 5). Já *T. azevedoi* CEN1242 e *T. koningiopsis* CEN1513 não inibiram o crescimento do patógeno e as colônias se assemelhavam ao verificado nas testemunhas. As cepas *T. asperelloides* CEN1277 e CEN1559 inibiram o crescimento micelial e a formação de escleródios pelas culturas *S. sclerotiorum*.

**Tabela 5:** Inibição micelial de *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani* por filtrados de cultura de *Trichoderma* spp.

CEN	Inibição Micelial (%)*		
	<i>M. phaseolina</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>R. solani</i>
CEN281	0	61,8±2,82c	0
CEN287	0	75,6±2,36a	0
CEN288	0	79,2±6,05a	0
CEN1242	0	0e	0
CEN1277	0	59,2±3,59c	0
CEN1513	0	0e	0
CEN1546	0	18,1±2,03d	0
CEN1559	0	65,9±5,51b	0
CV (%)**	-	8,51	-

\*Valores seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, segundo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ). \*\*Coeficiente de Variação (%).

Quanto ao *S. rolfsii*, verificou-se uma inconsistência dos resultados entre os experimentos, ou seja, as respostas em alguns tratamentos variaram a cada experimento, sendo difícil tirar alguma conclusão sobre a eficiência dos isolados no controle do patógeno.

## Discussão

Nesse estudo, oito cepas de *Trichoderma* mantidas na Coleção de Agentes de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foram testados quanto à inibição do crescimento micelial dos patógenos *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *S. rolfsii*, com o uso de três metodologias: pareamento de culturas, exposição aos compostos orgânicos voláteis (COVs) e aos filtrados brutos de *Trichoderma* spp.

As cepas *T. asperelloides* CEN1277, *T. koningiopsis* CEN1513, *T. afroharzianum* CEN1546 e *T. asperelloides* CEN1559 apresentaram as maiores porcentagens de inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina* no cultivo pareado. *Trichoderma asperelloides* CEN1277 e *T. asperelloides* CEN1559 avançaram sobre as colônias do patógeno, indicando exercer forte atividade micoparasítica. Já *T. afroharzianum* CEN1546 formou uma zona de inibição, ou seja, área sem crescimento micelial, provavelmente em decorrência da produção de substâncias tóxicas ao patógeno ou pela privação de nutrientes utilizados antes por *Trichoderma*. Mendoza et al. (2015) também relataram o micoparasitismo e a formação de zonas de inibição entre as colônias

de *Trichoderma* spp. e *M. phaseolina*. Outras espécies de *Trichoderma* já foram relatadas como eficientes na inibição de *M. phaseolina* no pareamento de culturas, entre as quais, *T. harzianum* (Khalili et al., 2016), *T. hamatum* (Iqbal & Mukhtar, 2020), *T. viride* (Khann et al., 2019) e *T. longibrachiatum* (Sridharan et al., 2020). É importante considerar que a inibição de patógenos no pareamento de culturas pode estar relacionada tanto ao hiperparasitismo como à competição por espaço, nutrientes e oxigênio (Mendonza et al., 2015).

Já no experimento de compostos orgânicos voláteis, *T. koningiopsis* CEN1513 apresentou a menor média de inibição do crescimento de *M. phaseolina*, enquanto as demais cepas não diferiram estatisticamente entre si. Com esse resultado é possível postular que *T. koningiopsis* CEN1513 não possui a capacidade de emitir COVs como principal estratégia de antagonismo, a menos que as condições de cultivo não tenha sido favoráveis à expressão dessa característica, para a cepa em questão. O método da atmosfera compartilhada também foi adotado por Sridharan et al. (2020), que relataram a produção de COVs por *T. longibrachiatum*, com a consequente redução do crescimento micelial de *M. phaseolina*.

No pareamento de culturas, todas as cepas de *Trichoderma* testadas foram capazes de inibir o crescimento de *S. sclerotiorum* em mais de 53% e as porcentagens médias verificadas com as diferentes cepas não diferiram estatisticamente. Com 15 dias de crescimento, todas as cepas cobriram as colônias do patógeno, demonstrando habilidade micoparasítica. Além disso, *T. asperelloides* CEN1277 e *T. asperelloides* CEN1559 inibiram completamente a formação de escleródios por *S. sclerotiorum*. Já a cepa *T. koningiopsis* CEN1513 reduziu rigidez dos escleródios, indicando deterioração dessas estruturas dos patógenos. Sumida et al. (2018) também demonstraram, com pareamento de culturas, a ação antagônica de duas cepas de *T. asperelloides*, relacionada à inibição do crescimento micelial de isolados de *S. sclerotiorum* procedentes de diferentes regiões do Brasil.

No presente trabalho, as cepas *T. asperelloides* CEN1277, *T. asperelloides* CEN1559 e *T. azevedoi* CEN1242 também se destacaram na inibição de *S. sclerotiorum* por emissão de COVs. Essa espécie foi descrita em anos recentes (Inglis et al., 2020). Além disso, as colônias do patógeno apresentaram micélio menos compacto comparadas ao tratamento testemunhas, o que pode estar relacionado à produção de hifas com menor diâmetro pelo patógeno frente exposição aos COVs de *Trichoderma* spp., como relatado por Silva et al. (2020). Em um estudo recente de Silva et al. (2021b) foi relatado que os COVs de outra cepa de *T. azevedoi* (CEN1241) reduziu a severidade do mofo-branco em alface e a germinação miceliogênica de escleródios de

*S. sclerotiorum*. Outros estudos, adotando metodologias semelhantes, confirmam o resultado de inibição de *S. sclerotiorum* por COVs de *Trichoderma* spp. (Ojaghian et al., 2019, Rajani et al., 2021).

Já no experimento com filtrados de culturas, *T. afroharzianum* CEN287 e *T. rifaii* CEN288 apresentaram as maiores porcentagens de inibição de *S. sclerotiorum*, sugerindo que a habilidade dessas cepas em antagonizar esse patógeno está relacionada à liberação de substâncias tóxicas durante a fermentação líquida, embora esse fato não descarte a possibilidade de haver outros mecanismos envolvidos. Há relatos de inibição do crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *Cladosporium herbarum* (Carvalho et al., 2014; Guimarães et al., 2016) por essas duas cepas. Carvalho et al. (2015) conduziram ensaios de campo com *T. afroharzianum* CEN287, no qual demonstraram a redução do número de apotécios formados a partir da germinação de escleródios de *S. sclerotiorum*, como também, a redução da severidade do mofo-branco em feijão comum.

As cepas *T. asperelloides* CEN1277 e *T. asperelloides* CEN1559 inibiram totalmente a formação de escleródios de *S. sclerotiorum*, demonstrando grande potencial para suprimir a formação dessas estruturas de sobrevivência, lembrando que tais estruturas exercem importante papel na permanência no solo e na disseminação desse fitopatógeno. A toxicidade, *in vitro*, sobre *S. sclerotiorum* causada por filtrados de *Trichoderma* spp. verificada neste trabalho corrobora resultados obtidos por Sumida et al. (2018) e por Zhang et al. (2016). O tratamento com a cepa *T. azevedoi* CEN1242 não apresentou inibição micelial de *S. sclerotiorum*, diferentemente do resultado encontrado por Marques et al. (2018), que analisou a mesma cepa.

Quanto a *R. solani*, as oito cepas de *Trichoderma* inibiram o crescimento micelial do patógeno em culturas pareadas, com porcentagens de inibição acima de 51,3 %. Destacaram-se *T. asperelloides* CEN1277 e *T. asperelloides* CEN1559, que rapidamente avançaram sobre a colônia de *R. solani* (aos cinco dias de incubação). Resultados semelhantes foram relatados recentemente, com diferentes cepas de *Trichoderma* (Kahn et al., 2019; Gajera et al., 2020). Também Kotasthane et al. (2015) demonstraram no confronto de *Trichoderma* sp. com *R. solani*, que o antagonista foi capaz de envolver a hifa do hospedeiro e penetrar suas células.

Novamente, *T. asperelloides* CEN1277 e CEN1559 apresentaram as maiores porcentagens de inibição do crescimento micelial de *R. solani* relacionada à produção de COVs, chegando a 100 % com *T. asperelloides* CEN1559, ou seja, além de exibirem ação micoparasita, estas cepas também são exímias produtoras de COVs. A capacidade de emitir esses compostos tóxicos à



*R. solani* também foi descrita por Chaudhary et al. (2020), com *T. harzianum* e *T. atroviridae*, cujos índices de inibição foram de 72,5 e 64,5 %, respectivamente. Ainda, Halifu et al. (2020), relataram essa habilidade com uma cepa de *T. virens*, cujo índice de inibição ao *R. solani* foi de 80,10 %.

No pareamento de culturas de *Trichoderma* com *S. rolfsii*, as cepas *T. asperelloides* CEN1277 e *T. koningiopsis* CEN1513 apresentaram os maiores índices de inibição (59,3 e 60,0 %, respectivamente). *Trichoderma koningiopsis* CEN1513 não apresentou, entretanto, habilidade para parasitar escleródios, nem de reduzir a formação destes nas culturas examinadas. Kushwaha et al. (2018) também demonstrou a inibição desse patógeno por *T. virens* e *T. harzianum*, sendo que ambas as espécies também foram capazes de reduzir em mais de 80 % o número de escleródios formados pelas culturas. Resultados também interessantes foram verificados com *T. longibrachiatum*, *T. viride* e *T. aureoviride* (Kotasthane et al., 2015; Rajani et al., 2021). Ainda, Kotasthane et al. (2015) relataram, em um estudo com um *Trichoderma* não identificado em nível de espécie, lise de parede de hifas do patógeno por metabólitos tóxicos liberados pelo antagonista, seguida de dissolução do conteúdo citoplasmático.

Todas as cepas de *Trichoderma* foram capazes de emitir COVs e inibir o crescimento micelial de *S. rolfsii*, sendo que *T. asperelloides* CEN1277 e *T. asperelloides* CEN1559 foram as que apresentaram os maiores índices de inibição. Isaias et al. (2014) encontraram resultados semelhantes com outras cepas da Coleção.

Já no experimento em que se utilizaram filtrados de *Trichoderma*, a falta de consistência dos resultados não possibilitaram uma conclusão sobre atividade das cepas contra o patógeno *S. rolfsii*. Entretanto, foi possível notar que *T. afroharzianum* CEN281 e *T. rifaii* CEN288 foram capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno em todos os experimentos, embora não tenham apresentado o mesmo padrão em termos da porcentagem de inibição. Outros estudos utilizando filtrados de diferentes espécies de *Trichoderma* mostraram a habilidade de diferentes cepas para suprimirem o crescimento desse patógeno (Isaias et al., 2014; Marques et al., 2018; Rajani et al., 2021).

No presente estudo, os filtrados de cultura de *Trichoderma* spp. foram autoclavados após adição ao meio e provavelmente esse fato esteja relacionado à variação verificada nos resultados. Filtrados de *Trichoderma* também podem ser esterelizados através da filtragem em membrana de celulose, para incorporação ao meio já autoclavado (Rajani et al., 2021). Outro procedimento adequado seria a obtenção dos extratos utilizando solventes orgânicos (Sumida et al., 2018). Isaias

et al. (2014) avaliou a termoestabilidade de filtrados de *Trichoderma* spp., e mesmo havendo uma diminuição na porcentagem de inibição, os compostos não perderam a capacidade de inibir o crescimento micelial de *S. rolfsii* e *Verticillium dahliae*. Estudos conduzidos por Marques et al. (2018) revelaram que os metabólitos secundários de algumas cepas de *Trichoderma* possuem amplo espectro de ação anti-fúngica, porém, outras são patógenos-específicas.

Apesar dos filtrados autoclavados de *Trichoderma* não terem inibido o crescimento dos patógenos *M. phaseolina* e *R. solani*, no meio de cultivo, não se pode afirmar que o mecanismo de antibiose por compostos não voláteis são ineficientes. Extratos brutos de *T. longibrachiatum* e *T. virens* inibiram o crescimento de ambos, *M. phaseolina* e *R. solani*, quando extraídos com solventes orgânicos (Halifu et al., 2020; Sridharan et al., 2021). Outra hipótese a ser considerada é a de que a concentração do filtrado de *Trichoderma* adotada não foi suficiente, necessitando de novos experimentos utilizando diferentes concentrações para se ter uma resposta. É importante salientar que a quantidade produzida e as propriedades dos metabólitos fúngicos é influenciada pelas condições de cultivo.

No geral, observa-se que a capacidade de antagonizar fitopatógenos é variável entre espécies e entre cepas da mesma espécie, assim como já foi relatado por outros autores (Iqbal & Mukhtar, 2020; Kotasthane et al., 2015; Rajani et al., 2021). Além disso, um isolado pode ter maior habilidade em um determinado mecanismo de ação do que em outro (Kushwaha et al., 2018). Por isso estudos de diferentes interações entre esses microrganismos são importantes para selecionar aquele que melhor se aplica a cada patossistema, ou para combinar isolados com diferentes mecanismos de ação.

O micoparasitismo realizado por *Trichoderma* pode estar relacionado à penetração de hifas, alteração da permeabilidade de membrana celular e outras alterações nas células hospedeiras, como retração e agregação do citoplasma, quebra de vacúolos e produção de enzimas degradadoras de parede celular do patógeno, como quitinases, celulasas e  $\beta$ -1,3-glucanase (Hirpara et al., 2017; Kotasthane et al., 2015; Wonglom et al., 2019). Além de um estudo comparativo entre potenciais agentes de controle biológico, esses resultados podem auxiliar no entendimento dos mecanismos de ação utilizados pelas diferentes cepas de *Trichoderma*. Existe uma variedade de compostos, voláteis e não voláteis, emitidos por *Trichoderma* spp., os quais podem estar relacionados às atividades antagonísticas exercidas sobre os fitopatógenos, sendo que o perfil desses compostos em cada cepa pode ser espécie ou isolado dependente, também influenciado pelas interações no ambiente (Sridharan, et al., 2020). Os compostos mais comuns

produzidos por *Trichoderma* spp. pertencem às classes dos policetídeos, pironas, terpenóides, compostos heterocíclicos, butenolídeos e peptaibols (Ramada et al., 2019).

No presente estudo, as cepas *T. asperelloides* CEN1277 e CEN1559, foram as que mais se destacaram na inibição do crescimento dos fitopatógenos estudados e na inibição dos escleródios por *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*. Ambas as cepas demonstraram a habilidades de competição, micoparasitismo, antibiose por emissão de compostos orgânicos voláteis e não voláteis, além de reduzirem a produção de escleródios. Entretanto, as oito cepas se revelaram potencialmente capazes de controlar o desenvolvimento dos quatro fitopatógenos que infectam culturas economicamente importantes e esse potencial necessita agora ser melhor examinado por meio de estudos em plantas.

Quanto à atividade antifúngica de compostos orgânicos voláteis e não voláteis de *Trichoderma*, é interessante, ao se pensar no uso aplicado desses compostos como biofumigantes (caso dos COVs), e como produtos naturais, obtidos a partir de cepas de *Trichoderma*, que estes poderiam ser utilizados como estratégias adicionais ao controle biológico, no manejo das doenças de plantas (Ruangwong et al., 2021; Sumida et al., 2018). Assim, é possível imaginar, porventura, formulações de produtos à base de células vivas de *Trichoderma* enriquecidos com compostos bioativos, pois, dessa forma, os compostos tóxicos aos patógenos estariam prontamente disponíveis logo após a aplicação e as células vivas garantiriam a manutenção da atividade de biocontrole por mais tempo.

## **Conclusão**

As oito cepas de *Trichoderma* testadas neste trabalho inibem o crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*, como verificado nos testes de culturas pareadas e de exposição aos compostos orgânicos voláteis.

As cepas *T. asperelloides* CEN1277 e CEN1559 destacaram-se quanto à inibição do crescimento dos fitopatógenos, bem como, na inibição de formação de escleródios de *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*.

Filtrados autoclavados das cepas *T. afroharzianum* CEN287 e *T. rifaai* CEN288 se destacaram na inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. Os demais patógenos não foram inibidos pelos filtrados de *Trichoderma* spp. ou não apresentaram resultados consistentes, aos se considerar os diferentes experimentos.

## Referências

ABDULLAH MT, ALI NY, SULEMAN P (2008). Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Crop Protection*, 27:1354-1359.

AGROFIT. Disponível em: [https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 05 de janeiro de 2022.

BEDENDO, IP (2018) Podridões de raiz e colo. In: AMORIM L, BERGAMIN FILHO A, REZENDE JAM. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. Ouro Fino: Agronômica Ceres.

CARVALHO DDC, LOBO JUNIOR M, MARTINS I, INGLIS PW, MELLO SCM (2014). Biological control of *Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. *Tropical Plant Pathology*, 39(5):384-391.

CARVALHO DDC, GERALDINE AM, LOBO JUNIOR M, MELLO SCM (2015). Biological control of white mold by *Trichoderma harzianum* in common bean under field conditions. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 50(12):1220-1224.

CHAUDHARY S, SAGAR S, LAL M, TOMAR A, KUMAR V, KUMAR M (2020). Biocontrol and growth enhancement potential of *Trichoderma* spp. against *Rhizoctonia solani* causing sheath blight disease in rice. *Journal Environmental Biology*, 41:1034-1045.

DAVID GQ, CHAVARRO-MESA E, SCHURT DA, CERESINI PC (2018). *Rhizoctonia* como fitopatógeno no agroecossistema brasileiro. In: LOPES, U.P. & MICHEREFF, S.J. Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungo. 1ed. - Recife: EDUFRPE, 208p.

DRUZHININA IS, SEIDL-SEIBOTH V, HERRERA-ESTRELLA A, HORWITZ BA, KENERLEY CM, MONTE E, MUKHERJEE PK, ZEILINGER S, et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 749–759.

FERREIRA DF (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35:1039-1042.

HALIFU S, DENG X, SONG X, SONG R, LIANG X (2020). Inhibitory Mechanism of *Trichoderma virens* ZT05 on *Rhizoctonia solani*. *Plants*, 9:912.

HIRPARA DG, GAJERA HP (2018) Molecular heterozygosity and genetic exploitations of *Trichoderma* interfusants enhancing tolerance to fungicides and mycoparasitism against *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Infection, Genetics and Evolution* 66:26–36.

INGLIS PW, MELLO SCM, MARTINS I, SILVA JBT, MACÊDO K, SIFUENTES DN, VALADARES-INGLIS MC (2020). *Trichoderma* from Brazilian garlic and onion crop soils and description of two new species: *Trichoderma azevedoi* and *Trichoderma peberdyi*. *Plos One*, 15: 1-23.

IQBAL, U; MUKHTAR, T. Evaluation of Biocontrol Potential of Seven Indigenous *Trichoderma* Species against Charcoal Rot Causing Fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Gesunde Pflanzen*,

72:195-202, 2020.

ISAIAS, C.O.; MARTINS, I.; SILVA, J.B.T; SILVA, J.P.; & MELLO, S.C.M. Ação antagonica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfii* e *Verticillium dahlia*. Summa Phytopathologica 40(1):34-41, 2014.

KIRK P (2012). *Index Fungorum*. CABI Bioscience, CBS and Landcare Resarch. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp?strGenus=Trichoderma>, Acesso em: 07 de fevereiro de 2022.

KHALILI E, JAVED MA, HUYOP F, RAYATPANAH S, JAMSHIDI S, WAHAB RA (2016). Evaluation of *Trichoderma* isolates as potential biological control agent against soybean charcoal rot disease caused by *Macrophomina phaseolina*. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 30:3, 479-488,

KHAN MR, HAQUE Z, RASOOL F, SALATI K, KHAN U, MOHIDDIN FA, ZUHAIB (2019) Management of root-rot disease complex of mungbean caused by *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani* through soil application of *Trichoderma* spp. Crop Protection, 119:24-29.

KOTASTHANE A, AGRAWAL T, KUSHWAH R, RAHATKAR O (2015). In-vitro antagonism of *Trichoderma* spp. against *Sclerotium rolfii* and *Rhizoctonia solani* and their response towards growth of cucumber, bottle gourd and bitter gourd. European Journal of Plant Pathology, 141:523–543.

KUSHWAHA SK, KUMAR S, CHAUDHARY B (2018). Efficacy of *Trichoderma* against *Sclerotium rolfii* causing collar rot disease of lentil under in vitro conditions. Journal of Applied and Natural Science 10(1): 307-312.

MARQUES E, MARTINS I, MELLO SCM (2018). Antifungal potential of crude extracts of *Trichoderma* spp. Biota Neotrop. 18(1).

MELO SCM, ÁVILA ZR, BRAÚNA LM, PÁDUA RR, GOMES D (2007). Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfii* Sacc. Fitosanidad, 11(1):1-9.

MENDOZA JL, PÉREZ MI, PRIETO JM, VELÁSQUEZ JD, OLIVARES JG, LANGARICA HR (2015). Antibiosis of *Trichoderma* spp strains native to northeastern Mexico against the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 1093-1101.

MEYER MC, CAMPOS H, GODOY CV, UTIAMADA CM, SILVA LHCP, GOUSSAIN M (2016) Ensaio cooperativos de controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* na cultura da soja: resultados sumarizados da safra 2015/2016. Circular técnica 124.

MICHEREFF SJ, DOMINGOS EGT, ANDRADE MM (2005). Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Recife: UFRPE, 398p.

O'BRIEN PA (2017). Biological control of plant diseases. Australasian Plant Pathology, 46:293-304.

OJAGHIAN S, WANG L, XIE GL, ZHANG JZ (2019). Effect of volatiles produced by *Trichoderma* spp. on expression of glutathione transferase genes in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control* 136: 1-6.

QUEIROZ PR, VALADARES-INGLIS MC, INGLIS PW (2004). Survival in soil and detection of co-transformed *Trichoderma harzianum* by nested PCR. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39(4):403-405.

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

RAJANI P, RAJASEKARAN C, VASANTHAKUMARI MM, SHANNON BO, RAVIKANTH G, SHAANKER U (2021) Inhibition of plant pathogenic fungi by endophytic *Trichoderma* spp. through mycoparasitism and volatile organic compounds. *Microbiological Research*, 242:126595.

RUANGWONG OU, WONGLOM, P, SUWANNARACH N, KUMLA J, THAOCHAN N, CHOMNUNTI P, PITIJA K, SUNPAPAO A (2021). Volatile organic compound from *Trichoderma asperelloides* TSU1: Impact on plant pathogenic fungi. *Journal of Fungi*, 7: 1-13.

RUBIO MB, QUIJADA NM, PÉREZ E, DOMÍNGUEZ S, MONTE E, HERMOSA R (2014). Identifying Beneficial Qualities of *Trichoderma parareesei* for Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(6): 1864-1873.

SARAVANAKUMAR K, LI Y, YU C, WANG Q, WANG M, SUN J, GATO J, CHEN J (2017) Effect of *Trichoderma harzianum* on maize rhizosphere microbiome and biocontrol of *Fusarium* Stalk rot. *Scientific Reports*, 7:1771.

SILVA, LR, MUNIZ PHPC, PEIXOTO GHS, LUCCAS BEGD, SILVA JBT, MELLO SCM (2021a). Mycelial inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Trichoderma* spp. volatile organic compounds in distinct stages of development. *Pak. J. Biol. Sci.*, 24: 527-536.

SILVA LR, VALADERES INGLIS MC, PEIXOTO GHS, LUCCAS BEG, MUNIZ PHPC, MAGALHÃES DM, MORAES MCB, MELLO SCM (2021b). Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma azevedoi* promote the growth of lettuce plants and delay the symptoms of white mold. *Biological Control*, 152:104447.

SILVA LR, VALADARES-INGLIS MC, MORAES MCB, MAGALHÃES DM, SIFUENTES DN, MARTINS I, MELLO SCM (2020). Morphological and protein alterations in *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary after exposure to volatile organic compounds of *Trichoderma* spp. *Biological Control*. 147:1-7.

SRIDHARAN AP, SUGITA T, KARTHIKEYAN G, UTHANDI S (2020). Comprehensive profiling of the VOCs of *Trichoderma longibrachiatum* EF5 while interacting with *Sclerotium rolfsii* and *Macrophomina phaseolina*. *Microbiological Research*, 236:126436.

SRIDHARAN AP, SUGITA T, KARTHIKEYAN G, NAKKEERAN S, UTHANDI S (2021).

Metabolites of *Trichoderma longibrachiatum* EF5 inhibits soil borne pathogen, *Macrophomina phaseolina* by triggering amino sugar metabolism. *Microbial Pathogenesis*, 150:104714.

SUMIDA CH, DANIEL JFS, ARAUJO APCS, PEITL DC, ABREU LM, DEKKER RFH & CANTERI MG (2018). *Trichoderma asperelloides* antagonism to nine *Sclerotinia sclerotiorum* strains and biological control of white mold disease in soybean plants, *Biocontrol Science and Technology*, 28(2):142-156.

WONGLOM P, DAENGSUWAN W, ITOD S, SUNPAPAO A (2019). Biological control of *Sclerotium* fruit rot of snake fruit and stem rot of lettuce by *Trichoderma* sp. T76-12/2 and the mechanisms involved. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 107: 1-7.

ZHANG F, GE H, ZHANG FAN, GUO N, WANG Y, CHEN L, JI X, LI C (2016). Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Plant Physiology and Biochemistry* 100:64-74

## CAPÍTULO 3

### Compatibilidade de cepas de *Trichoderma* com agrotóxicos

#### Resumo

*Trichoderma* spp. é o principal agente fúngico no controle biológico de doenças de plantas causadas por diferentes patógenos. Esse agente de biocontrole pode fazer parte de um manejo integrado de doenças, onde são utilizadas diferentes estratégias de controle, entre as quais, o uso de controle químico. Para garantia de que fungicidas, inseticidas e herbicidas químicos, rotineiramente empregados durante o ciclo da cultura, não irão afetar a eficácia de *Trichoderma*, realizam-se os testes de compatibilidade. Logo, o objetivo deste estudo é testar a compatibilidade de quatro cepas de *Trichoderma* com agrotóxicos de diferentes grupos químicos, recomendados para a cultura da soja. Foram avaliados: o crescimento micelial das cepas em meio de cultura suplementado com os produtos químicos, em duas doses; a capacidade de germinação de conídios quando expostos à duas doses de caldas dos produtos; e o efeito de produtos indicados no tratamento de sementes, no crescimento micelial de *Trichoderma*. Os resultados variaram entre as cepas, doses e tipo de uso testados. O inseticida Fipronil foi o único que apresentou compatibilidade em todos os casos. Os fungicidas Picoxistrobina/Tebuconazol/Mancozeb, Metconazol, Fenpropimorfe/Cilco-hexanona e Bixafem /Protioconazol/Trifloxistrobina demonstraram ser incompatíveis com as quatro cepas testadas. Pelo menos uma das cepas apresentou algum nível de tolerância aos herbicidas 2,4-D, Haloxifope-r-metilico/Dietileno glicol monoetil éter, Glifosato, Cletodim, Atrazina; e aos fungicidas Piraclostrobina/Fluxaproxade, Procimidona, Mancozeb, Tiofanato metílico, Picoxistrobina/Ciproconazol, Fluxaproxade/Protioconazol, Propiconazol/Difenoconazol e Tebuconazol. O fungicida Fludioxonil e os inseticidas Clorantraniliprole e Imidacloprido/Tiodicarbe, recomendados para o tratamento de sementes, não afetaram o crescimento de *Trichoderma*, diferentemente de Carbendazim/Tiram que causou certa inibição quando comparado aos demais.

#### Introdução

O manejo integrado de doenças de plantas (MID) consiste na adoção de diferentes estratégias de controle, qual sejam controle cultural, físico, genético, químico e biológico. As estratégias a serem adotadas com base em fatores técnicos, econômicos e ambientais (Bergamin Filho & Amorim, 2018). O controle biológico de doenças (CBD) pode ser conceituado como o



“controle de um organismo por outro organismo”, ou o controle de um patógeno por um microrganismo antagonista (Bettiol et al, 2019). Logo, quando se usa dessa estratégia, devem-se excluir práticas que interfiram na eficácia e sobrevivência dos agentes de controle biológico. Fungos do gênero *Trichoderma* estão entre os antagonistas de maior interesse, posto que é considerado eficaz no controle de diversas doenças de plantas causadas por fungos e nematoides. Esses fungos são capazes de sobreviver em restos culturais e na rizosfera das plantas (Queiroz et al., 2004; Saravanakumar et al., 2016), e de colonizar estruturas de sobrevivência (escleródios) de fungos fitopatogênicos (Meyer, et al., 2016).

*Trichoderma* spp. podem, em determinados casos, serem usados em substituição ao controle químico, como também, de modo simultâneo ou alternados com este, durante o ciclo da cultura. Há relatos de que o uso associado de *Trichoderma* e produtos químicos pode causar efeitos sinérgico e aditivo (Dilbo et al., 2015). Diferentes agroquímicos são utilizados nos sistemas agrícolas (fungicidas, inseticidas, herbicidas, entre outros) e tais moléculas, podem afetar a ação dos biofungicidas (Dhanya et al., 2016; Santoro et al., 2014). Portanto, a associação dos dois métodos requer a verificação prévia da compatibilidade entre ingredientes ativos, formulações, doses, tecnologia e época de aplicação (Dalcosta et al., 2019).

Os agrotóxicos têm sido utilizados há vários anos para controlar doenças de plantas (Godoy et al., 2015). Porém, sua intensa utilização em altas dosagens, tem causado impactos ambientais, contaminação dos alimentos, intoxicação de agricultores, além do surgimento de resistência entre os patógenos (Bettiol & Morandi, 2009). Face ao que foi dito, estudos prévios de compatibilidade com esses produtos são fundamentais para o sucesso na combinação com agentes biológico. Nesse trabalho, quatro cepas de *Trichoderma* que se revelaram promissoras para uso como ingredientes ativos de biofungicidas em estudos anteriores foram testados quanto à compatibilidade com fungicidas, inseticidas e herbicidas registrados para a cultura da soja no Brasil.

## **Material e Métodos**

### **Cepas de *Trichoderma* utilizadas**

As quatro cepas utilizadas nestes estudos de compatibilidade foram *T. afroharzianum* CEN281, *T. afroharzianum* CEN287, *T. azevedoi* CEN1242 e *T. koningiopsis* CEN1513. Essas cepas, pertencentes à Coleção de Agentes de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), vem sendo extensamente avaliadas contra vários patógenos de

solo que afetam a soja e outras culturas, com resultados promissores.

### Agrotóxicos utilizados

Foram testados 14 fungicidas, sete herbicidas e três inseticidas (Tabela 1), que fazem parte do manejo da soja atualmente.

**Tabela 1:** Nome comercial, classe e grupo químico dos agrotóxicos testados.

Nome comercial	Fabricante	Classe	Princípio ativo
Cronnos <sup>®</sup>	ADAMA	Fungicida	Picoxistrobina/Tebuconazol/Mancozeb
Blavity <sup>®</sup>	BASF S.A.	Fungicida	Fluxapiraxade/Protiococonazol
Caramba <sup>®</sup>	BASF S.A.	Fungicida	Metconazol
Orkestra <sup>®</sup>	BASF S.A.	Fungicida	Piraclostrobina/Fluxapiraxade
Versatilis <sup>®</sup>	BASF S.A.	Fungicida	Fenpropimorfe/Cilco-hexanona
Derosal <sup>®</sup> Plus*	Bayer S.A.	Fungicida	Carbendazim /Tiram
Fox <sup>®</sup> Xpro	Bayer S.A.	Fungicida	Bixafem /Protiococonazol/Trifloxistrobina
Aproach <sup>®</sup> Prima	Du Pont	Fungicida	Picoxistrobina /Ciproconazol
Support <sup>®</sup>	Sipcam Nichino	Fungicida	Tiofanato metílico
Sumilex <sup>®</sup> 500	Sumitomo	Fungicida	Procimidona
Maxim <sup>®</sup> *	Syngenta	Fungicida	Fludioxonil
Score Flexi <sup>®</sup>	Syngenta	Fungicida	Propiconazol/Difenoconazol
Tebufort <sup>®</sup>	UPL	Fungicida	Tebuconazol
Unizeb Gold <sup>®</sup>	UPL	Fungicida	Mancozeb
Aminol <sup>®</sup>	ADAMA	Herbicida	2,4-D
Exemplo <sup>®</sup>	Albaugh	Herbicida	2,4-D
Cletodim <sup>®</sup>	Nortox	Herbicida	Cletodim
Verdict <sup>®</sup> Max	Dow AgroSciences	Herbicida	Haloxifope-r-metílico/Dietileno glicol monoetil éter
Facero <sup>®</sup>	Iharabras	Herbicida	Atrazina
Roundup <sup>®</sup> Original	Monsanto	Herbicida	Glifosato
Zapp QI <sup>®</sup>	Syngenta	Herbicida	Glifosato potássico
Cropstar <sup>®</sup> *	Bayer S.A.	Inseticida	Imidacloprido/Tiodicarbe
Dermacor <sup>®</sup> *	Du Pont	Inseticida	Clorantraniliprole
Singular <sup>®</sup>	Ouro Fino	Inseticida	Fipronil

\*Tratamento de Sementes

### Crescimento micelial de *Trichoderma* spp. em meio de cultura suplementado com os agrotóxicos

Todos produtos químicos, exceto aqueles recomendados para tratamento de sementes, foram incorporados ao meio Batata Dextrose Ágar (BDA) Merck<sup>®</sup>, em duas concentrações do produto químico, de acordo com os intervalos de dose e volume de calda pulverizações terrestres, como recomendações para cada produto (Tabela 2). A menor concentração consistiu na menor dose do produto concentrado, diluído no maior volume de calda indicado. Já a maior concentração

foi obtida pela maior dose do produto concentrado, no menor volume de calda recomendado. Excessões foram os produtos Approach Prima<sup>®</sup> e Singular<sup>®</sup>, indicado para aplicação como dose única, em pulverização terrestre.

**Tabela 2.** Dosagens dos agrotóxicos para incorporação ao meio de cultivo das cepas de *Trichoderma*.

<b>Princípio Ativo</b>	<b>Dose menor</b>	<b>Dose maior</b>
Picoxistrobina/Tebuconazol/Mancozeb	13,33 mL/L	20,00 mL/L
Fluxapiraxade/Protioconazol	1,25 mL/L	3,00 mL/L
Metconazol	2,50 mL/L	6,00 mL/L
Piraclostrobina/Fluxapiraxade	1,67 mL/L	2,33 mL/L
Fenpropimorfe/Cilco-hexanona	2,00 mL/L	7,14 mL/L
Bixafem /Protioconazol/Trifloxistrobina	2,50 mL/L	5,00 mL/L
Picoxistrobina /Ciproconazol	1,50 mL/L	1,50 mL/L
Tiofanato metílico	3,00 mL/L	5,00 mL/L
Procimidona	10,00 g/L	10,00 g/L
Propiconazol/Difenoconazol	0,33 mL/L	1,50 mL/L
Tebuconazol	1,67 mL/L	7,50 mL/L
Mancozeb	5,00 g/L	20,00 g/L
2,4-D	1,67 mL/L	5,00 mL/L
2,4-D	1,00 mL/L	35,00 mL/L
Cletodim	1,17 mL/L	4,50 mL/L
Haloxifope-r-metílico/Dietileno glicol monoetil éter	0,18 mL/L	2,33 mL/L
Atrazina	10,00 mL/L	25,00 mL/L
Glifosato	2,00 mL/L	60,00 mL/L
Glifosato potássico	3,50 mL/L	17,50 mL/L
Fipronil	0,25 mL/L	0,25 mL/L

Os produtos químicos foram adicionados, na concentração desejada, em frascos Erlenmeyers contendo 500 mL de meio de cultura BDA fundido. Dessa mistura, 20 mL foram vertidos em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. Após a solidificação do meio, um disco (5 mm Ø) de BDA colonizado por *Trichoderma*, retirado de culturas com cinco dias de idade, foi depositado na superfície do meio, em cada placa. As testemunhas consistiram de placas contendo meio de cultura sem adição de produtos químicos. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições por tratamento. As culturas foram incubadas a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações, realizada aos três dias de incubação, consistiram na aferição do diâmetro das colônias, em duas direções. Obtidos os valores médios do diâmetro das colônias, calculou-se a porcentagem de inibição de *Trichoderma*, para cada dose, utilizando a fórmula:  $I = (C - T)/C \times$

100, onde I representa a porcentagem de inibição; C os valores do diâmetro das testemunhas; e T os diâmetros das colônias nos tratamentos com produtos químicos (Melo et al., 2007). Os dados foram submetidos à análise de variância e, as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, utilizando o *software* Sisvar 5.6 (Ferreira, 2011). Para que a análise estatística respeitasse a distribuição normal dos dados, valores iguais a 100 % de inibição não foram incluídos na ANOVA e no teste de comparação de médias.

### **Germinação de conídios de *Trichoderma* spp. cultivados em presença de agrotóxicos**

Quatro cepas de *Trichoderma* foram cultivadas em BDA Merck®, à temperatura de 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas. Após cinco dias de incubação, água destilada esterilizada foi adicionada às placas e os conídios foram desalojados com auxílio de alça de Drigalski. Preparou-se, então, uma suspensão contendo  $1 \times 10^7$  conídios/mL e esta foi adicionada às caldas dos produtos químicos.

Para o preparo das caldas, foram adotadas duas doses: a menor concentração do produto químico recomendada na bula para aplicação terrestre e a maior concentração do produto recomendada para aplicação aérea (Tabela 3), obtendo-se um volume final de calda de 10 mL. Os produtos Aminol, Exemplo e Singular não são recomendados para pulverizações aéreas. Por isso, foram utilizadas, para esses produtos, as maiores concentrações recomendadas em aplicações terrestres.

As caldas contendo os conídios de *Trichoderma* foram agitadas e permaneceram em repouso por duas horas, quando foram novamente agitadas. Imediatamente a seguir, gotas de 10 µL foram plaqueadas em meio BDA 1/5, ou seja, produzido com 20 % da concentração indicada no rótulo do produto. Após 16 horas de incubação à temperatura ambiente, as áreas do meio que receberam as gotas de suspensão foram cortadas e examinadas ao microscópio ótico, com lentes de aumento de 40x. Foram contados 100 conídios, entre germinados e não germinados, presentes em três gotas por tratamento, para a dose maior e duas gotas, para a dose menor. As testemunhas foram constituídas por suspensões de conídios diluídos em água destilada esterilizada.

Calculou-se a porcentagem de germinação para cada cepa de *Trichoderma* testada, nas diferentes caldas. Os dados foram submetidos à análise de variância e, as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, utilizando o *software* Sisvar 5.6 (Ferreira, 2011). Para que a análise estatística respeitasse a distribuição normal dos dados, valores iguais a 0 % de inibição não foram incluídos na ANOVA e no teste de comparação de médias.

**Tabela 3:** Dosagem dos agrotóxicos utilizadas para compor as caldas utilizadas nos testes de compatibilidade com *Trichoderma*.

<b>Princípio Ativo</b>	<b>Dose menor</b>	<b>Dose maior</b>
Picoxistrobina/Tebuconazol/Mancozeb	13,30 mL/L	100,00 mL/L
Fluxapiroxade/Protioconazol	1,67 mL/L	10,00 mL/L
Metconazol	2,50 mL/L	10,00 mL/L
Piraclostrobina/Fluxapiroxade	1,25 mL/L	11,67 mL/L
Fenpropimorfe/Cilco-hexanona	2,00 mL/L	16,67 mL/L
Bixafem /Protioconazol/Trifloxistrobina	3,33 mL/L	16,67 mL/L
Picoxistrobina/Ciproconazol	1,50 mL/L	10,00 mL/L
Tiofanato metílico	3,00 mL/L	33,33 mL/L
Procimidona	5,00 g/L	33,33 g/L
Propiconazol/Difenoconazol	0,5 mL/L	5,00 mL/L
Tebuconazol	16,67 mL/L	25,00 mL/L
Mancozeb	5,00 g/L	100,00 g/L
Cletodim	1,17 mL/L	15,00 mL/L
Haloxifope-r-metílico/Dietileno glicol monoetil éter	0,23 mL/L	11,67 mL/L
Glifosato potássico	0,28 mL/L	140,00 mL/L
2,4-D	1,67 mL/L	15,00 mL/L
2,4-D	10,00 mL/L	17,50 mL/L
Glifosato	1,25 mL/L	150,00 mL/L
Atrazina	10,00 mL/L	125,00 mL/L
Fipronil	0,25 mL/L	0,25 mL/L

\*Sem indicação para pulverização aérea.

### **Efeito do tratamento de sementes agrotóxicos no crescimento micelial de *Trichoderma spp.***

Sementes de soja foram tratadas com produtos químicos nas dosagens recomendadas pelos fabricantes (Tabela 4), padronizando-se um volume de calda de 5,4 mL para 500 g de sementes. As sementes foram acondicionadas em sacos plásticos transparentes e em seguida as caldas dos produtos químicos foram aplicadas, sendo realizada a mistura manual até que o produto cobrisse todas as sementes. As sementes foram, então, distribuídas em bandejas, cobertas por papel pardo e deixadas a secar *over night*, à temperatura de 18 °C.

Quatro sementes de cada tratamento com produtos químicos foram depositadas, em pontos equidistantes, em placas de Petri de 90 mm contendo meio de cultura BDA. Um disco de ágar contendo micélio (5 mm Ø) de cepas de *Trichoderma* foi depositado no centro de cada placa, para verificar o crescimento das colônias do antagonista em presença das sementes tratadas. Testemunhas foram preparadas com sementes de soja não tratadas. O experimento foi conduzido em DIC, com quatro repetições por tratamento e as placas foram incubadas a 25 °C.

**Tabela 4:** Produtos químicos utilizados para o tratamento de sementes de soja e dosagens utilizadas.

Princípio Ativo	Dose p.c./100 Kg sementes	Dose p.c./0,5 Kg
Clorantraniliprole	100 mL	0,5 mL + 4,9 mL água
Imidacloprido/Tiodicarbe	700 mL	3,5 mL + 1,9 mL água
Fludioxonil	200 mL	1,0 mL + 4,4 mL água
Carbendazim /Tiram	200 mL	1,0 mL + 4,4 mL água

## Resultados

### Crescimento micelial de *Trichoderma* spp. em meio de cultura suplementado com agrotóxicos

Os fungicidas Fluxapiraxade/Protioconazol, Metconazol, Picoxistrobina/Tebuconazol, Bixafem/Protioconazol/Trifloxistrobina, Tiofanato metílico, Tebuconazol e Fenpropimorfe/Cilco-hexanona inibiram completamente o crescimento de todas as quatro cepas de *Trichoderma*, em ambas as doses utilizadas, e por isso não foram apresentados nas tabelas. Na Tabela 5 e Tabela 6 estão apresentados os resultados de inibição do crescimento micelial de *Trichoderma* spp, na menor e maior dose, respectivamente. O inseticida Fipronil apresentou ser compatível com todos as cepas, em ambas as doses. *Trichoderma afroharzianum* CEN287 e *T. koningiopsis* CEN1513 não foram inibidos pelo herbicida 2,4-D (Exemplo<sup>®</sup>), diferentemente de *T. azevedoi* CEN1242 e *T. afroharzianum* CEN281 que foram completamente inibidos.

O herbicida Haloxifope-r-metílico/Dietileno glicol monoetil éter causou a inibição de *Trichoderma* spp. apenas quando adotado na maior dose, na menor dose, a inibição micelial mínima foi da cepa *T. afroharzianum* CEN281 (38,8 %). Nos tratamentos com o herbicida Glifosato (Roundup<sup>®</sup> Original), na menor dose, não houve inibição do crescimento das quatro cepas, entretanto, os inibiu completamente quando utilizado na maior dose. Os herbicidas 2,4-D (Aminol<sup>®</sup>) e Cletodim causaram porcentagens de inibição variadas entre as cepas, porém a inibição foi maior quando foi adotada a maior dose do produto. Os herbicidas Atrazina e Glifosato potássico (Zapp QI<sup>®</sup>) foram os que causaram maior inibição do crescimento das cepas de *Trichoderma*.

Dentre os fungicidas, nos tratamentos com Piraclostrobina/Fluxapiraxade a inibição do crescimento foi menor quando adotada a menor dose. O fungicida Mancozeb inibiu totalmente o crescimento das quatro cepas na maior dose, porém, na menor dose o fungo foi capaz de crescer. Já Procimidona obteve porcentagens de inibição por volta de 80 %, para todas as cepas. Não houve diferença entre as doses, pois o produto é recomendado para aplicação terrestre em dose única.

Por fim, os fungicidas Picoxistrobina/Ciproconazol e Propiconazol/Difenoconazol apresentaram resultados semelhantes, pois inibiram completamente todos as cepas nas duas doses, exceto *T. koningiopsis* CEN1513, em que o fungo foi capaz de crescer em ambas as doses.

**Tabela 5:** Inibição do crescimento micelial das cepas *T. afroharzianum* CEN287, *T. koningiopsis* CEN1513, *T. afroharzianum* CEN281 e *T. azevedoi* CEN1242 em BDA suplementado com diferentes agrotóxicos, na menor dose recomendada para aplicação terrestre.

Produtos químicos	Inibição Micelial (%)**			
	CEN287	CEN1513	CEN281	CEN1242
Fipronil	0,0±0,00a	0,0±0,00a	0,0±0,00a	0,0±0,00a
2,4-D (Exemplo <sup>®</sup> )	0,0±0,00a	0,0±0,00a	100,0*	100,0*
Haloxifope-r-metílico/ Dietileno glicol monoetil éter	0,0±0,00a	0,0±0,00a	0,0±0,00a	0,0±0,00a
Glifosato	0,00±0,00a	0,0±0,00a	0,00±0,00a	0,0±0,00a
2,4-D (Aminol <sup>®</sup> )	34,3±1,95b	60,1±0,32d	43,0±2,31c	18,3±1,92c
Cletodim	41,5±3,78c	46,1±1,92c	51,9±7,34d	10,7±0,32b
Atrazina	84,8±0,3e	81,3±1,95e	88,5±0,32h	79,8±1,28e
Glifosato potássico	86,1±0,56e	32,8±0,96b	68,7±0,85e	86,1±0,56f
Piraclostrobina/Fluxapiraxade	43,2±3,70c	56,9±16,42d	38,0±0,85b	17,2±0,55c
Mancozeb	74,3±0,32d	46,1±4,34c	74,9±1,79f	80,4±0,85e
Procimidona	82,4±1,40e	80,9±0,32e	82,02±0,64h	75,9±1,70d
Picoxistrobina /Ciproconazol	100,0*	45,7±0,85c	100,0*	100,0*
Propiconazol/Difenoconazol	100,0*	78,3±0,55e	100,0*	100,0*
CV***	4,35	11,61	5,36	2,57

\*Valores iguais a 100,0 não fizeram parte do teste de médias. \*\*Valores seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si, segundo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ). \*\*\*Coeficiente de Variação (%).

**Tabela 6:** Inibição do crescimento micelial das cepas *T. afroharzianum* CEN287, *T. koningiopsis* CEN1513, *T. afroharzianum* CEN281 e *T. azevedoi* CEN1242 em BDA suplementado com diferentes agrotóxicos, na maior dose recomendada para aplicação terrestre.

Produtos químicos	Inibição Micelial (%)**			
	CEN287	CEN1513	CEN281	CEN1242
Fipronil	0,0±0,00a	0,0±0,00a	0,0±0,00a	0,0±0,00a
2,4-D (Exemplo®)	0,0±0,00a	0,0±0,00a	100,0*	100,0*
Haloxifope-r-metílico/ Dietileno glicol monoetil éter	41,9±1,73b	62,4±0,32b	38,8±2,42b	46,7±6,01b
Glifosato	100,0*	100,0*	100,0*	100,0*
2,4-D (Aminol®)	82,9±2,84d	100,0*	75,9±d	63,5±1,28d
Cletodim	86,5±1,39e	100,0*	100,0*	86,1±0,00f
Atrazina	100,0*	85,9±0,32e	86,5,1±1,70e	88,5±0,85f
Glifosato potássico	100,0*	88,0±0,32f	85,4±0,32e	100,0*
Piraclostrobina/Fluxapiroxade	58,9±3,64c	75,6±0,55c	61,1±4,84c	57,8±1,11c
Mancozeb	100,0*	100,0*	100,0*	100,0*
Procimidona	82,4±1,40d	80,9±0,32d	82,0±0,64e	75,9±1,70e
Picoxistrobina /Ciproconazol	100,0*	76,3±1,16c	100,0*	100,0*
Propiconazol/Difenoconazol	100,0*	86,3±1,28e	100,0*	100,0*
CV***	3,89	1,05	3,62	3,98

\*Valores iguais a 100,0 não fizeram parte do teste de médias. \*\*Valores seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si, segundo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ). \*\*\*Coeficiente de Variação (%).

### Germinação de conídios de *Trichoderma* spp. expostos às caldas de agrotóxicos

As cepas *T. afroharzianum* CEN287, *T. koningiopsis* CEN1513, *T. afroharzianum* CEN281 e *T. azevedoi* CEN1242 também foram testados quanto à compatibilidade, avaliando-se a porcentagem de germinação de conídios após a exposição às caldas dos produtos químicos, em duas doses (Tabela 7 e 8).

O inseticida Fipronil apresentou ser compatível com as cepas de *Trichoderma*, pois apresentaram porcentagens médias iguais ou próximas ao controle. Nos tratamentos com os herbicidas Haloxifope-r-metílico/Dietileno glicol monoetil éter, 2,4-D (Exemplo®), Cletodim e Atrazina, as cepas apresentaram porcentagens médias de germinação iguais ao controle para todas as cepas e dose, exceto *T. afroharzianum* CEN281, quando exposto às maiores doses, cuja porcentagem de germinação foi reduzida, ainda assim, próxima ao controle. Com o herbicida 2,4-D (Aminol®), *Trichoderma* spp. apresentaram porcentagens de germinação estatisticamente iguais ao controle quando tratados com a menor dose, e 0 % na dose maior.



As germinação dos conídios das cepas *T. koningiopsis* CEN1513 e *T. afroharzianum* CEN281 foi de 33,8 % e 22,9 %, respectivamente, no tratamento com Glifosato (Roundup® Original), na menor dose. Na maior dose, não ocorreu germinação de conídios em presença de Roundup® Original. Glifosato potássico (Zapp QI®) foi o herbicida que mais afetou a germinação de *Trichoderma* spp., apresentando valor próximo e igual a zero.

**Tabela 7:** Porcentagem de germinação de conídios das cepas *T. afroharzianum* CEN287, *T. koningiopsis* CEN1513, *T. afroharzianum* CEN281 e *T. azevedoi* CEN1242 após imersão em calda de produtos químicos, na menor dose recomendada para aplicação terrestre.

Produtos Químicos	Germinação de Conídios (%)**			
	CEN287	CEN1513	CEN281	CEN1242
Controle	100,0±0,00a	100,0±0,00a	100,0±0,00a	100,0±0,00a
Fipronil	84,1±10,68b	87,5±0,92b	91,4±1,69a	88,9±0,35b
Haloxifope-r-metílico/ Dietileno glicol monoetil éter	100,0±0,00a	100,0±0,00a	99,0±1,41a	100,0±0,01a
2,4-D (Exemplo®)	100,0±0,00a	100,0±0,00a	100,0±0,01a	100,0±0,00a
Cletodim	100,0±0,00a	100,0±0,00a	98,5±2,12a	99,0±1,41a
Fipronil	99,0±1,41a	100,0±0,00a	98,5±2,12a	100,0±0,001a
2,4-D (Aminol®)	98,5±2,12a	98,5±2,12a	99,5±0,71a	100,0±0,01a
Glifosato	0,0*	33,8±3,11f	22,9±3,96c	2,0±0,00f
Glifosato potássico	6,0±2,12e	6,0±1,41i	11,1±2,12d	0,5±0,71f
Procimidona	65,5±2,76c	56,0±1,62e	60,8±7,14b	80,4±7,91c
Tiofanato metílico	22,4±5,02d	13,7±2,40g	6,9±7,00d	7,5±3,54f
Picoxistrobina /Ciproconazol	21,10±2,12d	79,9±5,52c	5,0±1,41d	27,20±9,89e
Piraclostrobina/Fluxapiraxade	20,0±5,23d	14,3±3,46g	17,5±2,12c	25,8±2,62e
Bixafem /Protioconazol/Trifloxistrobina	3,0±0,00e	3,5±0,71i	1,5±2,12d	2,0±0,00f
Fluxapiraxade/Protioconazol	1,0±0,00e	71,6±7,28d	0,00*	69,1±10,46d
Propiconazol/Difenoconazol	0,0*	70,0±2,83d	0,00*	0,0*
Metconazol	0,0*	0,0±0,00i	0,00*	0,0*
Tebuconazol	0,0*	81,8±3,61c	0,00*	0,0*
Picoxistrobina/Tebuconazol/Mancozeb	0,0*	8,5±0,71h	5,0±1,41d	0,0*
Mancozeb	0,0*	0,0±0,00i	0,00*	0,0*
Fenpropimorfe/Cilco-hexanona	0,0*	0,0±0,00i	0,00*	0,0*
CV***	5,92	4,85	5,95	7,16

\*Valores iguais a 0,0 não foram incluídos no teste de médias. \*\*Valores seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si, segundo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ). \*\*\*Coeficiente de Variação (%).

**Tabela 8:** Porcentagem de germinação de conídios das cepas *T. afroharzianum* CEN287, *T. koningiopsis* CEN1513, *T. afroharzianum* CEN281 e *T. azevedoi* CEN1242 após imersão em calda de produtos químicos, na maior dose recomendada para aplicação aérea.

Produtos Químicos	Germinação de Conídios (%)**			
	CEN287	CEN1513	CEN281	CEN1242
Controle	100,0±0,00a	100,0±0,00a	100,0±0,00a	100,00a
Fipronil	98,33±0,58a	98,3±0,58a	98,3±0,58a	98,0±1,00a
Haloxifope-r-metílico/ Dietileno glicol monoetil éter	97,3±0,58a	97,3±0,57a	99,0±1,00a	97,3±0,57a
2,4-D (Exemplo <sup>®</sup> )	90,3±0,57b	97,0±1,00a	75,7±3,51c	99,0±1,00a
Cletodim	96,0±1,00a	98,3±0,57a	95,3±2,52b	97,3±0,58a
Fipronil	95,3±0,58a	99,0±1,00a	93,0±1,00b	99,0±1,00a
2,4-D (Aminol <sup>®</sup> )	0,0*	28,4±3,40c	0,0*	0,0*
Glifosato	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*
Glifosato potássico	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*
Procimidona	22,3±3,45c	4,8±4,80d	23,4±1,25d	22,7±0,45c
Tiofanato metílico	23,7±3,65c	27,6±1,00c	19,6±e	19,3±4,20d
Picoxistrobina /Ciproconazol	0,0*	15,6±7,82d	1,0±1,00g	0,0*
Piraclostrobina/Fluxapirroxade	12,7±0,58d	6,0±1,00e	4,7±0,58f	28,0±3,00b
Bixafem /Protioconazol/Trifloxistrobina	0,0*	0,0*	0,0*	5,2±2,38e
Fluxapirroxade/Protioconazol	27,7±10,07c	0,0*	0,7±0,58g	0,7±0,58f
Propiconazol/Difenoconazol	2,7±0,57e	26,0±3,00c	3,7±0,59f	4,7±0,57e
Metconazol	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*
Tebuconazol	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*
Picoxistrobina/Tebuconazol/Mancozeb	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*
Mancozeb	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*
Fenpropimorfe/Cilco-hexanona	1,0±0,01e	6,3±4,04e	3,0±f	0,67±0,57f
CV***	5,94	5,78	3,21	3,19

\*Valores iguais a 0,0 não foram incluídos no teste de médias. \*\*Valores seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si, segundo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ). \*\*\*Coeficiente de Variação (%).

Nos tratamentos com o fungicida Procimidona na menor dose, as porcentagens de germinação de *Trichoderma* spp. foram superiores a 56,0 %, e os valores foram reduzidos na

maior dose. Com o fungicida Tiofanato metílico, as maiores porcentagens foram alcançadas na maior dose, para todas as cepas. A cepa *T. koningiopsis* CEN1513 demonstrou ser a menos afetada pelos fungicidas Picoxistrobina/Ciproconazol e Propiconazol/Difenoconazol, apresentando porcentagens de 79,9 e 70,0 %, respectivamente. Nos tratamentos com o fungicida Piraclostrobina/Fluxapiroxade, as cepas tiveram maior porcentagem de germinação na menor dose, exceto por *T. azevedoi* CEN1242, em que a porcentagem foi maior quando utilizada a dose maior.

No tratamento com Fluxapiroxade/Protioconazol, a cepa *T. afroharzianum* CEN287 teve maior germinação na maior dose. Na menor dose, *T. koningiopsis* CEN1513 e *T. azevedoi* CEN1242 alcançaram porcentagens de 71,6 e 69,1 %, respectivamente, e não germinaram na maior dose. O isolado *T. koningiopsis* CEN1513 foi o único que germinou quando exposto ao fungicida Tebuconzol, alcançando 81,8 % de germinação. Quanto aos fungicidas Bixafem /Protioconazol/Trifloxistrobina, Picoxistrobina/Tebuconazol/Mancozeb, Fenpropimorfe/Cilcohexanona, Metconazol e Mancozeb as porcentagens nas duas doses foram iguais ou próximas a zero.

Como informação adicional, observou-se que cepas *T. koningiopsis* CEN1513 e *T. azevedoi* CEN1242 germinaram mais rapidamente do que as demais, pois no momento da avaliação havia maior formação de tubos germinativos.

### **Efeito do tratamento de sementes com agrotóxicos no crescimento micelial de *Trichoderma* spp.**

Sementes tratadas com produtos químicos e discos de micélio das cepas de *Trichoderma* foram dispostos em placas de Petri com meio de cultura, para avaliar o efeito dos produtos no crescimento do fungo antagonista.

Todas as quatro cepas, *T. afroharzianum* CEN287, *T. koningiopsis* CEN1513, *T. afroharzianum* CEN281 e *T. azevedoi* CEN1242, cresceram vigorosamente por toda a placa de Petri, inclusive sobre as sementes tratadas com os inseticidas Clorantraniliprole e Imidacloprido/Tiodicarbe e com o fungicida Fludioxonil. Nas placas com sementes tratadas com o fungicida Carbendazim/Tiram, *Trichoderma* spp. cresceram por toda a placa, porém não colonizaram as sementes ou colonizaram sutilmente, produzindo pouco micélio e esporulação.

## Discussão

Nesse estudo, as cepas *T. afroharzianum* CEN287, *T. koningiopsis* CEN1513, *T. afroharzianum* CEN281 e *T. azevedoi* CEN1242 foram testadas quanto à compatibilidade com diferentes produtos químicos recomendados para cultura da soja, adotando-se três metodologias: crescimento em meio de cultura suplementado com os produtos, capacidade de germinação de conídios expostos às caldas dos agrotóxicos e crescimento micelial próximo a sementes tratadas com os produtos recomendados apenas para o tratamento de sementes.

O inseticida Fipronil demonstrou não afetar o crescimento micelial e a germinação de conídios de *Trichoderma* spp. Esse mesmo ingrediente ativo também foi utilizado no estudo de Dhanya et al. (2016), que relataram 25,0 % de inibição do crescimento micelial de *T. viride*, o que permite supor que as cepas aqui testadas possam ser mais tolerantes.

Nos experimentos de inibição do crescimento micelial, os herbicidas Atrazina e Glifosato potássico foram responsáveis pelas maiores porcentagens de inibição, em ambas as doses. Nos tratamentos com os herbicidas 2,4-D (Aminol<sup>®</sup>), Cletodim, Haloxifope-r-metílico/Dietileno glicol monoetil éter e Glifosato observou-se o efeito de doses, ou seja, a inibição do crescimento aumentou quando foi utilizada a maior dose. A redução da compatibilidade com o aumento da dose também já foi observada em outros estudos (Widmer, 2019; Maheswary et al., 2020).

No geral, a resposta de crescimento micelial entre as cepas não variou, exceto para casos como dos tratamentos com o herbicida 2,4-D (Exemplo<sup>®</sup>), em que *T. afroharzianum* CEN287 e *T. koningiopsis* CEN1513 não tiveram o crescimento micelial inibido. Já *T. afroharzianum* CEN281 e *T. azevedoi* CEN1242 foram inibidos completamente, em ambas as doses adotadas.

Dentre os fungicidas, foi observado o efeito de doses nos tratamentos com Piraclostrobina/Fluxapiroxade e Mancozeb. Maheshwary et al. (2020) utilizaram Mancozeb para estudos de compatibilidade e demonstraram o aumento da inibição do crescimento micelial de *T. asperellum* na maior dose indicada.

Os fungicidas Fluxapiroxade/Protioconazol, Metconazol, Picoxistrobina/Tebuconazol/Mancozeb, Bixafem/Protioconazol/Trifloxistrobina, Tiofanato metílico, Tebuconazol e Fenpropimorfe/Cilco-hexanona inibiram completamente o crescimento de todas as quatro cepas de *Trichoderma*, em ambas as doses.

*Trichoderma koningiopsis* CEN1513 foi o único que não teve crescimento inibido pelas duas doses de Picoxistrobina/Ciproconazol e Propiconazol/Difenoconazol. Silva et al. (2018) também observaram a variação de resposta entre isolados em seu estudo, demonstrando mais uma

vez, a importância de se verificar a compatibilidade de cada cepa.

Quando foi avaliado a germinação dos conídios de *Trichoderma* spp., nos tratamentos com os herbicidas Haloxifope-r-metílico/Dietileno glicol monoetil éter, 2,4-D (Exemplo<sup>®</sup>), Cletodim e Atrazina, as porcentagens de germinação foram estatisticamente iguais ao controle, em ambas as doses, para todas as cepas. Com isso, é possível notar algumas respostas de compatibilidade distintas entre as duas metodologias. Santoro et al. (2014) estudaram o 2,4-D e atrazina, também adotando as duas metodologias para avaliar a inibição de *T. atroviride*. Quando o meio foi suplementado com os produtos, ambos inibiram o crescimento do fungo, porém, a germinação dos conídios não foi afetada pelo produto.

Nos tratamentos com Glifosato (Roundup<sup>®</sup> Original), a germinação das quatro cepas foram completamente inibidas na maior dose. Já na menor dose, os conídios das cepas *T. afroharzianum* CEN281 e *T. koningiopsis* CEN1513 germinaram, porém em baixas porcentagens. O herbicida Glifosato potássico (Zapp QI<sup>®</sup>) foi o que mais inibiu a germinação de *Trichoderma* spp. Roundup<sup>®</sup> Original e Zapp QI<sup>®</sup> pertencem ao mesmo grupo químico, chamado glicina substituída. Porém, segundo as bulas dos respectivos produtos, o Zapp QI<sup>®</sup> contém maior concentração do ingrediente ativo (AGROFIT, 2022), o que explicaria sua maior capacidade de inibir o crescimento e a germinação de *Trichoderma* spp. Apesar da compatibilidade de um determinado produto ser um indício para os demais, a resposta a cada molécula pode variar de acordo com a formulação, sendo assim, é importante que sejam feitos testes específicos para se ter uma conclusão. Algo semelhante acontece com os herbicidas Aminol<sup>®</sup> e Exemplo<sup>®</sup>, que tem em sua composição o 2,4-D e apresentaram respostas diferentes de compatibilidade.

Também se observou variações da resposta de germinação entre as cepas. Por exemplo, *T. koningiopsis* CEN1513 foi o único que obteve porcentagem de germinação mais próxima ao controle nos tratamentos com Propiconazol/Difenoconazol e Tebuconazol, na menor dose. Os fungicidas tebuconazol e propiconazol foram testados por Maheswary et al. (2020) e inibiram completamente o crescimento de *T. asperellum*.

Nos tratamentos com os fungicidas Tiofanato metílico, Fluxapiróxade/Protioconazol e Piraclostrobina/Fluxapiróxade a germinação dos conídios de algumas cepas foi menor quando utilizada a menor dose, o que não era de se esperar. Tal fato pode estar relacionado a um erro de contagem, pois esses produtos dificultaram a contagem de conídios germinados e não germinados devido a presença de muitas partículas misturadas aos conídios, tornando-se difícil reconhecer os conídios não germinados. Situação semelhante foi relatada por Santoro et al. (2014). O uso

associado de tiofanato metílico e *Trichoderma* spp. foi estudado por Abd-El-Khair et al. (2019), no controle de *Fusarium solani* e *F. oxysporum* em feijão, e foi relatado que a aplicação do conjunto foi mais eficaz no controle dos patógenos, do que quando usados individualmente. Isso demonstra um efeito sinérgico nessa combinação. Assim, outra hipótese, é que o Tiofanato metílico tenha tido efeito estimulante na germinação de conídios de *Trichoderma* spp.

Também foi observada diferença entre a velocidade de germinação dos conídios, em que *T. koningiopsis* CEN1513 e *T. azevedoi* CEN1242 emitiram os tubos germinativos e formaram hifas antes das demais cepas. Essa seria uma vantagem competitiva de um agente de biocontrole, pois se estabeleceria mais rapidamente no substrato em que foi aplicado.

No experimento com sementes tratadas com produtos químicos, o fungicida Fludioxonil e os inseticidas Clorantraniliprole e Imidacloprido/Tiodicarbe não afetaram o crescimento das colônias de *Trichoderma* spp. Isso traz indícios de que as cepas estudadas poderiam ser utilizadas no tratamento de sementes em conjunto com esses produtos. Já no tratamento com o fungicida Carbendazim/Tiram, apesar de terem colonizado o meio, as cepas não cresceram sobre as sementes como nos controles, demonstrando certa inibição. Carbendazim já foi relatado inibindo completamente o crescimento de *T. asperellum* ao ser suplementado em meio de cultura. Já Tiram foi relatado como compatível com *T. harzianum* (Saxena et al., 2014).

A resistência de fungos à fungicidas pode estar relacionada a mutações no sítio de atuação do produto químico ou a capacidade de degradá-los (Mutawila et al., 2014; Szpyrka et al., 2020). Já para os herbicidas e inseticidas, a resistência é provavelmente devido ao mecanismo de atuação desses produtos, que agem na fisiologia específica a plantas e insetos, respectivamente.

Este estudo apresenta cepas de *Trichoderma* de diferentes espécies, que toleram determinadas concentrações de agrotóxicos de diferentes grupos químicos. Assim, demonstram potencial para serem utilizados em conjunto no manejo integrado de doenças. Estudos em campo devem ser feitos para definir a melhor estratégia de controle, sendo possível reduzir o número de aplicações ou a dose desses produtos. No caso dos herbicidas e inseticidas, o conhecimento da compatibilidade pode auxiliar na tomada de decisão das aplicações desses produtos químicos destinados ao controle de insetos praga e plantas daninhas, sem afetar a viabilidade do agente de controle biológico.

## **Conclusão**

Os resultados de compatibilidade dos produtos químicos com *Trichoderma* spp. variaram

entre cepas, doses e metodologias utilizadas.

Na maioria dos casos, as cepas foram menos inibidas quando foi utilizada a menor dose do produto.

As cepas demonstraram maior tolerância aos herbicidas e inseticidas testados, do que aos fungicidas.

O inseticida Fipronil foi o único que apresentou compatibilidade em todos os casos.

Os fungicidas Picoxistrobina/Tebuconazol/Mancozeb, Metconazol, Fenpropimorfe/Cilcohexanona e Bixafem/Protioconazol/Trifloxistrobina demonstraram ser incompatíveis em todas as situações testadas.

*Trichoderma koningiopsis* CEN1513 se destacou ao revelar tolerância à produtos que inibiram as demais cepas.

O fungicida Fludioxonil e os inseticidas Clorantranilprole e Imidacloprido/Tiodicarbe, recomendados para o tratamento de sementes, não afetaram o crescimento de *Trichoderma*, diferente do fungicida Carbendazim/Tiram, que causou certa inibição.

## Referências

ABD-EL-KHAIR H, ELSHAHAWY IE, HAGGAG HEK (2019). Field application of *Trichoderma* spp. combined with thiophanate-methyl for controlling *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* in dry bean. Bulletin of the National Research Centre, 43:19.

AGROFIT. Disponível em: [https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 05 de janeiro de 2022.

AHESHWARY NP, GANGADHARA NAIK B, AMOGHAVARSHA CHITTARAGI, MK NAIK, SATISH KM, NANDISH MS (2020). Compatibility of *Trichoderma asperellum* with fungicides. The Pharma Innovation Journal, 9(8):136-140.

BEDENDO IP (2018) Podridões de raiz e colo. In: AMORIM L, BERGAMIN FILHO A, REZENDE JAM. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. Ouro Fino: Agronômica Ceres.

BERGAMIN FILHO A, AMORIM L (2018). In: AMORIM L, BERGAMIN FILHO A, REZENDE JAM. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. Ouro Fino: Agronômica Ceres.

BETTIOL W, PINTO ZV, SILVA JC, FORNER C, FARIA MR, PACIFICO MG, COSTA LSA (2019). Produtos comerciais à base de *Trichoderma* In: MEYER, M.C.; MAZARO, S.M.; SILVA, J.C. *Trichoderma*: uso na agricultura. 1 ed. Brasília, DF: Embrapa.

DALACOSTA NL, FURLAN SG, MAZARO SM (2019). Compatibilidade de produtos à base de *Trichoderma* com fungicidas utilizados no tratamento de sementes. In: MEYER, M.C.; MAZARO, S.M.; SILVA, J.C. *Trichoderma*: uso na agricultura. 1 ed. Brasília, DF: Embrapa.

DHANYA MK, ANJUMOL KB, MURUGAN M, DEEPTHY KB (2016) Compatibility of *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorescens* with plant protection chemicals and fertilizers in cardamom. *Journal of Tropical Agriculture*, 54 (2):129-135.

DILBO C, ALEMU M, LENCHO A, HUNDUMA T (2015). Integrated Management of Garlic White Rot (*Sclerotium cepivorum* Berk) Using Some Fungicides and Antifungal *Trichoderma* Species. *Plant Pathology & Microbiology*, 6:251.

FERREIRA DF (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35:1039-1042.

MELO SCM, ÁVILA ZR, BRAÚNA LM, PÁDUA RR, GOMES D (2007). Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 11(1):1-9.

MAHESHWARY NP, GANGADHARA NAIK B, AMOGHAVARSHA CHITTARAGI, MK NAIK, SATISH KM AND NANDISH MS (2020). Compatibility of *Trichoderma asperellum* with fungicides. *The Pharma Innovation Journal*, 9(8):136-140.

MEYER MC, CAMPOS H, GODOY CV, UTIAMADA CM, SILVA LHCP, GOUSSAIN M (2016) Ensaio cooperativos de controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* na cultura da soja: resultados sumarizados da safra 2015/2016. *Circular técnica* 124.

MUTAWILA C, HALLEN F, MOSTERT L (2014). Development of benzimidazole resistant *Trichoderma* strains for the integration of chemical and biocontrol methods of grapevine pruning wound protection. *Biocontrol*.

QUEIROZ PR, VALADARES-INGLIS MC, INGLIS PW (2004). Survival in soil and detection of co-transformed *Trichoderma harzianum* by nested PCR. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39(4):403-405.

SANTORO PH, CAVAGUCHI SA, ALEXANDRE TM, ZORZETTI J, NEVES PMOJ (2014). In vitro Sensitivity of Antagonistic *Trichoderma atroviride* to Herbicides. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(2)238-243, 2014.

SARAVANAKUMAR K, LI Y, YU C, WANG Q, WANG M, SUN J, GATO J, CHEN J (2017). Effect of *Trichoderma harzianum* on maize rhizosphere microbiome and biocontrol of *Fusarium* Stalk rot. *Scientific Reports*, 7:1771.

SAXENA D, TEWARI AK, RAI D (2014). The in vitro Effect of Some Commonly Used Fungicides, Insecticides and Herbicides for Their Compatibility with *Trichoderma harzianum* PBT23. *World Applied Sciences Journal*, 31(4):444-448,

SILVA MAF, MOURA KE, MOURA KE, SALOMÃO D, PATRÍCIO FRA (2018). Compatibility of *Trichoderma* isolates with pesticides used in lettuce crop. *Summa Phytopathologica*, v.44, n.2, p.137-142.

SZPYRKA E, PODBIELSKA M, ZWOLAK A, PIECHOWICZ B, SIEBIELEC G, SŁOWIK-



BOROWIEC M (2020). Influence of a Commercial Biological Fungicide containing *Trichoderma harzianum* Rifai T-22 on Dissipation Kinetics and Degradation of Five Herbicides in Two Types of Soil. *Molecules*, 25:1391.

WIDMER T (2019). Compatibility of *Trichoderma asperellum* isolates to selected soil fungicides. *Crop Protection* 120:91–96.

## CONCLUSÕES GERAIS

1. Todas as cepas comerciais testadas inibiram o crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* nos experimentos de culturas pareadas e exposição aos compostos orgânicos voláteis, com destaque para a cepa *T. harzianum* CCT 7589.
2. As oito cepas de *Trichoderma* testadas neste trabalho inibiram o crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*, como verificado nos testes de culturas pareadas e de exposição aos compostos orgânicos voláteis, com destaque para as cepas *T. asperelloides* CEN1277 e *T. asperelloides* CEN1559, pertencentes a espécie *T. asperelloides*, que também atuaram na inibição de formação de escleródios de *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*. Filtrados autoclavados das cepas *T. afroharzianum* CEN287 e *T. rifaii* CEN288 se destacaram na inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. Os demais patógenos não foram inibidos pelos filtrados ou não apresentaram resultados consistentes entre as execuções dos experimentos.
3. Os resultados de compatibilidade dos produtos químicos com *Trichoderma* spp. variaram entre cepas, doses e metodologias utilizadas, porém, na maioria dos casos, as cepas foram menos inibidas quando foi utilizada a menor dose. O inseticida Fipronil foi o único que apresentou compatibilidade em todos os casos. Já os fungicidas Picoxistrobina/Tebuconazol/Mancozeb, Metconazol, Fenpropimorfe/Cilco-hexanona, Bixafem /Protioconazol/Trifloxistrobina demonstraram ser incompatíveis em todas as situações testadas. O fungicida Fludioxonil e os inseticidas Clorantraniliprole e Imidacloprido/Tiodicarbe<sup>®</sup>, recomendados para o tratamento de sementes, não afetaram o crescimento de *Trichoderma*, diferente do fungicida Carbendazim/Tiram, que causou certa inibição.